

UCH-FC
DOC-B
T275

ESTUDIOS DE LA REGULACION DE LA CASEINAQUINASA II
DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

ROWENA TELLEZ NEUBAUER

Noviembre 1993

Director de Tesis: Dra. Catherine Connelly

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

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

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

Rowena Leonora Téllez Neubauer

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 5 de Noviembre de 1993.

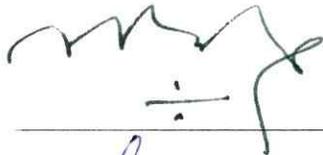
Director de Tesis:

Dra. Catherine Connelly

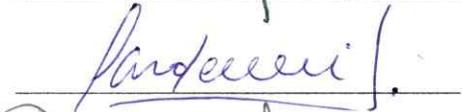


Comisión de Evaluación de la Tesis

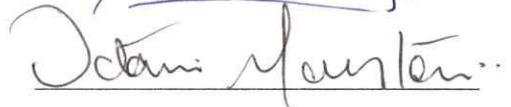
Dr. Jorge Babul



Dr. Emilio Cardemil



Dr. Octavio Monasterio



Dr. Luis Valladares



Esta tesis fue realizada en el Laboratorio del Dr. *Jorge Allende R.* en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. *Catherine Connelly M.*

INDICE DE MATERIAS

	página
LISTA DE TABLAS.	xii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xviii
SUMMARY	xxv
INTRODUCCION	1
A. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PROTEINAQUINASAS	1
B. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CASEINAQUINASA II.	9
C. DISTRIBUCION DE LA CASEINAQUINASA II.	13
D. LA SUBUNIDAD α	14
E. LA SUBUNIDAD β	17
F. ESPECIFICIDAD DE LA CASEINAQUINASA II.	19
G. REGULACION DE LA CASEINAQUINASA II.	25
H. ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LA CASEINAQUINASA II.	30
I. FUNCION BIOLOGICA Y SUSTRATOS DE LA CASEINAQUINASA I.	35

	pág.
OBJETIVOS	44
MATERIALES Y METODOS	46
A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION	46
B. METODOS	48
1. Síntesis de [γ - ³² P] ATP	48
2. Preparación de la caseína desfosforilada	50
3. Preparación de la caseínaquinasa II de núcleos de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	50
3.a. Obtención del ovario de <i>Xenopus laevis</i>	50
3.b. Obtención de oocitos estado VI	51
3.c. Obtención de núcleos aislados	52
3.d. Preparación de los extractos nucleares	53
3.e. Purificación de la caseínaquinasa II del extracto nuclear.	53
3.e.i. Cromatografía en DEAE-Sephadex	53
3.e.ii. Cromatografía en fosfocelulosa	54
4. Preparación de las subunidades α y β de la caseína quinasa II	55
5. Preparación de la subunidad α mutada	55
6. Determinación de la actividad de la caseínaquinasa II.	56
6.a. Ensayo estándar.	56
6.b. Ensayo de la actividad enzimática de la subunidad α	57
6.c. Ensayo de la actividad enzimática usando enzima	

	pág.
reconstituida	58
6.d. Determinación de la actividad enzimática utilizando péptido sustrato	58
6.e. Determinación de la actividad enzimática utilizando los péptidos de tubulina como sustratos	58
6.f. Determinación de la actividad enzimática utilizando tubulina como sustrato	59
6.g. Determinación de la actividad enzimática de la caseína- quinasa II de levadura	60
7. Determinación de la actividad enzimática de la caseína- quinasa I de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	60
8. Tirosinilación de la tubulina con [¹⁴ C] tirosina.	61
9. Análisis de la [¹⁴ C] tubulina.	62
10. Cinética de digestión de la tubulina con carboxi- peptidasa A	62
11. Determinación de la concentración de los péptidos sintéticos usados como sustratos e inhibidores de la caseínaquinasa II.	63
12. Tratamiento de los resultados	63
RESULTADOS	65

A.	ESTUDIO DEL EFECTO DE POLIMEROS POLIPEPTIDICOS DE L-AMINOACIDOS ACIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II DE <i>Xenopus laevis</i>	65
1.	Efecto de ácido poliglutámico y de ácido poliaspártico sobre la actividad de la caseínaquinasa II	65
2.	Efecto de copolímeros de ácido glutámico y aminoácidos aromáticos o neutros sobre la actividad de la caseínaquinasa II	68
3.	Determinación de las constantes de inhibición del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina en proporción 4:1	78
4.	Efecto de la fuerza iónica en la inhibición ejercida por el ácido poliglutámico y por el copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1	81
B.	EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA EN PROPORCION 4:1 SOBRE LA ACTIVIDAD DE OTRAS CASEINAQUINASAS	83
C.	EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II USANDO EL PEPTIDO SUSTRATO RRREEETTTEEEE	87
D.	EFECTO DE PEPTIDOS SINTETICOS DE SECUENCIA CONOCIDA EN LOS CUALES SE TIENE NUEVE RESIDUOS DE ACIDO GLUTAMICO Y	

	pág.
DOS RESIDUOS DE TIROSINA	91
1. Determinación de las K_i de los péptidos $E_gY_2(int)$, $D_gY_2(int)$, Y_2E_g y E_gY_2	91
2. Efecto de los péptidos YEEEEEEEEEE (Y_2E_g) y EEEEEEEEEYY (E_gY_2) sobre la actividad de la caseínaquinasa II al cambiar la concentración del Mg^{+2} y al sustituirlo por Mn^{+2}	95
E. EFECTO DE INHIBIDORES CONSTITUIDOS POR ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA SOBRE LA SUBUNIDAD α RECOMBINANTE DE LA CASEINA QUINASA II. COMPARACION CON RESPECTO A LA HOLOENZIMA Y A LA RECOMBINANTE $\alpha + \beta$	104
1. Efecto del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 sobre la actividad de la subunidad α recombinante de la caseínaquinasa II	105
2. Efecto de los péptidos Y_2E_g y E_gY_2 sobre la subunidad α recombinante de la caseínaquinasa II. Comparación con la holoenzima y la enzima recombinante $\alpha + \beta$	109
F. EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA SOBRE UNA SUBUNIDAD α MUTANTE DE LA CASEINAQUINASA II	112
G. DETERMINACION DE LA K_m APARENTE DE LOS PEPTIDOS SUSTRATOS QUE TIENEN TIROSINA EN MEDIO DE LAS SECUENCIAS DE ACIDO GLUTAMICO	114
H. INTERACCION DE LA CASEINAQUINASA II CON MOLECULAS	

	pág.
NATURALES Y COMPUESTOS CON ACTIVIDAD FISIOLÓGICA	118
1. Estudios con tubulina y derivados	118
1.a. Interacción de caseínaquinasa II con tubulina y péptidos derivados	118
1.b. Tirosinilación de la tubulina con [¹⁴ C] tirosina y posterior utilización de esta proteína como sustrato de la caseínaquinasa II	120
1.c. Utilización de péptidos sintéticos correspondientes al segmento carboxilo terminal de la tubulina como sustratos de la caseínaquinasa II	124
1.d. Péptidos de tubulina como inhibidores de la caseínaquinasa II	128
2. Estudios con ácido fólico y derivados	132
2.a. Efecto de los derivados de ácido fólico y análogos sobre la caseínaquinasa II	132
2.b. Determinación de las constantes de inhibición aparente de los derivados del ácido fólico	141
I. EFECTO DE INHIBIDORES DE TIROSINA PROTEINAQUINASAS SOBRE LA CASEINAQUINASA II	143
 DISCUSION	 148
A. LA PRESENCIA DEL RESIDUO DE TIROSINA EN SECUENCIAS DE RESIDUOS ACIDOS ES RECONOCIDA ESPECIFICAMENTE POR LA CASEINAQUINASA II	148

	pág.
B. PEPTIDOS SINTETICOS INDICAN QUE LA POSICION DEL RESIDUO DE TIROSINA, CON RESPECTO A LOS RESIDUOS ACIDOS, ES IMPORTANTE	160
C. CONSIDERACIONES CON RESPECTO A LAS SECUENCIAS INHIBIDORAS DE LA CASEINAQUINASA II Y SU PRESENCIA EN MOLECULAS DE INTERES BIOLOGICO	168
D. EFECTO DE DERIVADOS POLIGLUTAMILADOS DEL ACIDO FOLICO	173
E. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE TIROSINA PROTEINAQUINASAS, GENISTEINA Y 2,5-DIHIROXIMETILCINAMATO, SOBRE LA CASEINAQUINASA II	177
F. INFLUENCIA DE LA SUBUNIDAD β DE LA CASEINAQUINASA II EN EL RECONOCIMIENTO DE LAS SECUENCIAS CON TIROSINA	179
G. INTERES FISIOLOGICO DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS	185
H. PROYECCIONES DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN ESTA TESIS	188
 CONCLUSIONES.	 196
 BIBLIOGRAFIA.	 197
 APENDICE I: Secuencias de proteínasquinatas de distintas especies (de Hanks y col., 1988).	 214

APENDICE II: Secuencias de las subunidades α de caseínaquinasas II de diferente origen (de Jedlicki y col., 1992).	218
APENDICE III. Secuencias de las subunidades β reguladoras de caseínaquinasas II de distintas especies (de Jedlicki y col., 1992).	220

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Inhibición de la caseínaquinasa II por polipéptidos de aminoácidos ácidos.	66
FIGURA 2: Inhibición de la caseínaquinasa II por copolímeros ricos en aminoácidos ácidos.	69
FIGURA 3: Inhibición de la caseínaquinasa II por copolímeros de ácido glutámico y aminoácidos aromáticos.	71
FIGURA 4: Inhibición de la caseínaquinasa II por copolímeros de ácido glutámico y tirosina en proporción 1:1.	73
FIGURA 5: Efecto de copolímeros de ácido glutámico y tirosina, aminoácidos neutros y lisina sobre la caseínaquinasa II.	75
FIGURA 6: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II por el ácido poliglutámico.	79

	pág.
FIGURA 7: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II por el copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1.	80
FIGURA 8: Efecto de la fuerza iónica sobre la inhibición de la actividad de la caseínaquinasa II por ácido poliglutámico y por el copolímero de ácido glutámico: tirosina 4:1.	82
FIGURA 9: Gráfico de Lineweaver y Burk para la determinación de la Km aparente para el péptido sustrato RRREEETTTEEEE.	89
FIGURA 10: Inhibición de la caseínaquinasa II por ácido poliglutámico y el copolímero ácido glutámico: tirosina 4:1, usando el péptido sustrato.	90
FIGURA 11: Inhibición de la caseínaquinasa II por péptidos constituidos por 9 residuos de ácido glutámico y 2 de tirosina.	92
FIGURA 12: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II mediante el péptido constituido por 9 residuos de ácido glutámico y 2 de tirosina intercalados en la secuencia : D ₉ Y ₂ (int) . . .	96
FIGURA 13: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II mediante el péptido constituido por 9 residuos de ácido glutámico y 2 de	

	pág.
tirosina intercalados en la secuencia: E_9Y_2 (int) . . .	97
FIGURA 14: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II mediante el péptido constituido por 9 residuos de ácido glutámico y 2 de tirosina: E_9Y_2	98
FIGURA 15: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II mediante el péptido constituido por 2 residuos de tirosina y 9 de ácido glutámico: Y_2E_9	99
FIGURA 16: Comparación de la inhibición de la caseínaquinasa II por los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 , en presencia de Mg^{+2} o Mn^{+2} . .	101
FIGURA 17: Efecto de los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 a diferentes concentraciones de Mg^{+2} y a una concentración de Mn^{+2} 0,75 mM.	102
FIGURA 18: Efecto del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 sobre la actividad de la subunidad α de la caseínaquinasa II.	107
FIGURA 19: I_{50} del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 correspondientes al efecto sobre la actividad de la caseínaquinasa II holoenzima, la subunidad α y la enzima recombinante ($\alpha + \beta$) . . .	108
FIGURA 20: Efecto de los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 sobre la subunidad α	110

	pág.
FIGURA 21: Efecto de los péptidos E_9Y_2 e Y_2E_9 sobre la holoenzima, la enzima recombinante ($\alpha + \beta$) y la subunidad α	111
FIGURA 22: Efecto del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 sobre la subunidad α y la subunidad α mutada.	113
FIGURA 23: Gráfico de Lineweaver y Burk para la determinación de la K_m aparente de los péptidos sustratos que contienen una tirosina intercalada en su secuencia. . .	116
FIGURA 24: Comparación entre el grado de degradación de [^{14}C] tubulina por carboxipeptidasa A y la fosforilación de esta tubulina por caseínaquinasa II en función del tiempo de incubación con la proteasa.	123
FIGURA 25: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II mediante los péptidos de tubulina.	131
FIGURA 26.A.: Estructura del derivado mono- γ -glutamilado del ácido fólico.	133
FIGURA 26.B.: Estructura del derivado mono- γ -glutamilado del metotrexato.	135
FIGURA 27: Efecto de compuestos penta- γ -glutamilados de ácido fólico y derivados, sobre la actividad de la caseínaquinasa II.	139

	pág.
FIGURA 28: Efecto de derivados poliglutamilados del metotrexato. .	140
FIGURA 29 A: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II mediante penta- γ glutamyl metotrexato.	142
FIGURA 29 B: Gráfico de Lineweaver y Burk para la inhibición de la caseínaquinasa II mediante ácido para- aminobenzoil-L-glutamyl-di- γ glutámico	143
FIGURA 30: Inhibición de la actividad de la caseínaquinasa II mediante genisteína y metil-2,5-dihidroxycinamato. . . .	147

LISTA DE TABLAS

TABLA I: INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR DIFERENTES POLIPEPTIDOS ANIONICOS.	77
TABLA II: EFECTO DE ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO GLUTAMICO:TIROSINA 4:1 SOBRE LA CASEINAQUINASA II DE LEVADURA.	84
TABLA III: EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO GLUTAMICO:TIROSINA 4:1 SOBRE LA CASEINAQUINASA I DE OOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	86
TABLA IV: PARAMETROS CINETICOS APARENTES DE LOS PEPTIDOS SUBSTRATOS FOSFORILADOS POR LA CASEINAQUINASA II. . . .	117
TABLA V: EFECTO DE LA PREINCUBACION DE TUBULINA CON CARBOXIPEPTIDASA A SOBRE EL GRADO DE FOSFORILACION	

	pág.
DE LA TUBULINA POR CASEINAQUINASA II.	122
TABLA VI: FOSFORILACION DE LOS PEPTIDOS SINTETICOS DE TUBULINA POR LA CASEINAQUINASA II.	126
TABLA VII: EFECTO INHIBIDOR DE LOS PEPTIDOS DE TUBULINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II.	129
TABLA VIII: EFECTOS DE DERIVADOS DEL ACIDO FOLICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II.	137
TABLA IX: I ₅₀ DE INHIBIDORES DE TIROSINA PROTEINAQUINASAS	146

ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
cAMP	adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
cGMP	guanosina 3', 5' -monofosfato cíclico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
Ci	Curie
CPA	carboxipeptidasa A
cpm	cuentas por minuto
CQ I	caseínaquinasa I
CQ II	caseínaquinasa II
CREB	factor de unión al DNA y al elemento de respuesta a cAMP
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGTA	ácido etilenglicol bis-(β-amino etil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
GTP	guanosina 5'-trifosfato
Hepes	ácido N-(2-hidroxietil) - piperazina-N'-2-etanosulfónico
IGF	factor de crecimiento semejante a insulina

I_{50}	concentración de inhibidor correspondiente al 50% de actividad
kDa	kiloDalton
K_a	constante de activación
K_i	constante de inhibición
$K_{i_{ap}}$	constante de inhibición aparente
K_m	constante de Michaelis
$K_{m_{ap}}$	constante de Michaelis aparente
MPF	factor promotor de la maduración
NAD^+	nicotinamida adenina dinucleótido
NMR	resonancia magnética nuclear
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pi	fosfato inorgánico
PM	peso molecular
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POPOP	1,4-bis (5-fenil-2-oxazolil) benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
PQ A	proteínaquinasa dependiente de cAMP
RNA	ácido ribonucleico
SRF	factor de respuesta al suero
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
V_{max}	velocidad máxima
$V_{max_{ap}}$	velocidad máxima aparente
U.V.	luz ultravioleta

También se utilizará para los aminoácidos las siguientes nomenclaturas:

ala	alanina
asp	ácido aspártico
fenilala	fenilalanina
glu	ácido glutámico
leu	leucina
lis	lisina
ser.	serina
tir	tirosina
treo	treonina
poli glu : tir	copolímero de ácido glutámico y tirosina
poli asp	ácido poliaspártico
poli glu	ácido poliglutámico
gluOEt	residuo de ácido glutámico esterificado con un grupo etilo en el carboxilo γ .

Además se usará la nomenclatura de una letra para los aminoácidos:

A	alanina
C	cisteína
D	ácido aspártico
E	ácido glutámico
F	fenilalanina
G	glicina

H	histidina
I	isoleucina
K	lisina
L	leucina
M	metionina
N	asparragina
P	prolina
Q	glutamina
R	arginina
S	serina
T	treonina
V	valina
W	triptofano
Y	tirosina
X	simboliza cualquier aminoácido

RESUMEN

La caseínaquinasa II es una serina/treonina proteínaquinasa presente en todas las células de los organismos eucariotes estudiados, encontrándose tanto en el núcleo como en el citoplasma. Hay numerosos datos que indican que participaría en los procesos de desarrollo y proliferación celular. Entre sus numerosos sustratos se encuentran productos de oncogenes nucleares como myc, myb, fos y jun, indicando un papel en la regulación de la transcripción.

La enzima se presenta como un tetrámero constituido por dos subunidades α o una α y otra α' y dos subunidades β . Su actividad óptima requiere una alta concentración de NaCl o KCl (150 mM) y de Mg^{+2} (10 mM). Se caracteriza porque también puede utilizar GTP como sustrato dador de fosforilo.

Es notable la sensibilidad de la caseínaquinasa II a ser inhibida por heparina en concentraciones en el intervalo nanomolar. Por otra parte, es activada por policationes y polipéptidos básicos como espermina, espermidina y polilisisina.

Las subunidades α y α' son las subunidades catalíticas y son activas por sí solas. Sus secuencias se caracterizan porque están altamente conservadas entre las distintas especies, desde la de levadura hasta la humana. La subunidad β también presenta alta homología de secuencia

entre las distintas especies. Esta subunidad participa en la regulación de la actividad, especificidad y estabilidad de la enzima. La subunidad β aumenta varias veces la actividad de la subunidad α .

La estructura consensual del sitio de fosforilación ha sido objeto de numerosos estudios mediante el análisis de la secuencia de los sustratos proteicos y también por la utilización de péptidos sintéticos. Así se ha determinado el requerimiento estructural mínimo que consiste en S/T X X E/D, en el cual el tercer aminoácido hacia el extremo carboxilo terminal después de la serina o treonina debe ser un aminoácido ácido (ácido glutámico, ácido aspártico, fosfoserina, fosfotreonina o fosfotirosina). Las posiciones marcadas con X también pueden ser ocupadas por residuos ácidos.

En esta tesis se abordó el estudio de la regulación de la caseínaquinasa II, analizando la interacción de moléculas de naturaleza peptídica con el sitio activo de la enzima.

Se estudió el efecto inhibitor de polipéptidos ricos en ácido glutámico. El ácido poliglutámico actúa como un inhibidor competitivo de la caseínaquinasa II de oocitos *Xenopus laevis*, con una K_i de $7,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$. En la mayoría de los casos, la presencia de aminoácidos diferentes al ácido

glutámico en la cadena polipeptídica, disminuye el efecto inhibitor del polipéptido. En el caso del copolímero de ácido glutámico y tirosina en una proporción 4:1 se observó un notable aumento en la capacidad inhibidora, obteniéndose una K_i de $0,023 \pm 0,001 \mu\text{M}$, lo que equivale aproximadamente a una disminución de 300 veces en el valor con respecto a la del ácido poliglutámico. Ningún otro copolímero, incluso el constituido por ácido glutámico y el aminoácido aromático fenilalanina, fue capaz de igualar el efecto del copolímero con tirosina.

Mediante el uso de péptidos sintéticos de secuencia conocida se determinó que la caseínaquinasa II es capaz de discriminar la ubicación de la tirosina en esta secuencia, observándose que es más inhibida por un péptido de nueve ácidos glutámicos y dos tirosinas, en el cual las tirosinas se encuentran en el extremo amino terminal (Y_2E_9). Para este péptido la enzima presenta un I_{50} de 0,2 mM y el péptido que tiene la misma composición, pero con las tirosinas en el extremo carboxilo terminal (E_9Y_2), presenta un I_{50} de 0,55 mM.

La secuencia Y_2E_9 es homóloga a la secuencia que tiene la serina o la treonina cuando es fosforilada por la caseínaquinasa II, en la secuencia consensual para un sustrato.

Al realizar experimentos semejantes con la subunidad

α de la caseínaquinasa II, se observó que ella es mucho menos sensible que la holoenzima a la presencia de tirosina en un copolímero de ácido glutámico y tirosina. La diferencia entre el I_{50} de este copolímero y el I_{50} del ácido poliglutámico fue sólo de un orden de magnitud, indicando que la subunidad β al formar la holoenzima contribuye al reconocimiento de la caseínaquinasa II de los sustratos peptídicos específicos. Algo semejante se observó con los péptidos de 11 aminoácidos. La subunidad α mostró no ser capaz de discriminar la ubicación de la tirosina, siendo inhibida en forma semejante por ambos péptidos (Y_2E_9 y E_9Y_2).

Una subunidad α mutada, en la cual dos residuos de lisina se cambiaron por ácido glutámico, resultó menos sensible a los polímeros ácidos que la subunidad α silvestre. Sin embargo, la subunidad α mutada posee una gran sensibilidad a polímeros que contienen residuos de tirosina.

Los experimentos realizados con distintas concentraciones de Mg^{+2} , así como también al reemplazar esta catión por Mn^{+2} , muestran que es necesaria la presencia de Mg^{+2} en su concentración óptima (7-12 mM) para que la inhibición de la caseínaquinasa II mediante los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 ocurra en la medida y con las características descritas. Al bajar la concentración de Mg^{+2} , o bien al cambiar éste por Mn^{+2} , la enzima se torna menos sensible a la inhibición y además se observa que la inhibición por ambos péptidos se hace

semejante.

Mediante el estudio con péptidos sintéticos sustratos de la caseínaquinasa II, los cuales tienen una tirosina intercalada, RRREYEETEEEE y RRREEEYTEEEE, se observó que la tirosina afecta la afinidad de la enzima por estos péptidos, presentando con el primero un valor de $V_{max}/K_{m_{ap}}$ dos veces superior al valor obtenido con el péptido de referencia RRREEEFTEEEE.

Con el propósito de definir un papel fisiológico para la caseínaquinasa II, se eligió dos sistemas biológicos en los cuales la enzima interactuaría con compuestos ricos en grupos ácidos, la tubulina (un sustrato de la caseínaquinasa II) y el ácido fólico.

Los experimentos realizados con péptidos sintéticos diseñados según el segmento carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina, indican que éstos últimos no son buenos sustratos de la caseínaquinasa II, sin embargo, son inhibidores competitivos de la enzima.

Al estudiar el efecto de derivados poli- γ -glutamilados del ácido fólico, se encontró que éstos son inhibidores competitivos de la enzima, siendo más eficientes en la inhibición a medida que aumenta el número de residuos de ácidos glutámicos unidos al grupo aromático del ácido fólico. También la inhibición por estos compuestos

depende de la naturaleza del grupo aromático unido a la cadena de poliglutamato. De esta manera, los derivados del metotrexato son más eficientes inhibidores que los derivados del para-aminobenzoato.

Estos resultados nos han permitido definir que la caseínaquinasa II reconoce secuencias peptídicas más complejas que las simplemente polianiónicas. La introducción de los grupos fenólicos de la tirosina entre los residuos de ácido poliglutámico incrementa la afinidad de la enzima por dichos polipéptidos. Lo mismo ocurre con los anillos aromáticos sustituidos en el caso de los derivados poliglutamilados del ácido fólico. Este reconocimiento, en el cual juega un papel importante la subunidad reguladora β , también incluye una selección preferencial de péptidos que contienen la tirosina hacia el extremo amino del grupo de ácidos glutámicos. Esta ubicación relativa de la tirosina es igual a la que la enzima selecciona en los péptidos sustratos que contienen serina o treonina con varios ácidos glutámicos. Por lo tanto, se puede proponer que los péptidos inhibidores que contienen tirosina y ácido glutámico actúan como seudosustratos. Esta proposición es interesante en vista del reciente descubrimiento de enzimas de especificidad dual, las cuales pueden fosforilar tanto serinas y treoninas como tirosinas.

El trabajo presentado en esta tesis permite llegar

a las siguientes conclusiones:

1. La caseínaquinasa II reconoce específicamente a la tirosina inmersa en secuencias de ácido poliglutámico. Estas secuencias peptídicas son potentes inhibidores de la enzima.
2. Grupos aromáticos sustituidos, como los que se encuentran en los derivados poliglutamilados del ácido fólico, también incrementan la capacidad inhibidora de las secuencias polianiónicas.
3. La enzima interactúa preferentemente con péptidos que tienen tirosinas en el extremo amino terminal de los grupos de ácidos glutámicos. Este reconocimiento se asemeja a su interacción con péptidos sustratos compuestos por serinas o treoninas y ácidos glutámicos.
4. La subunidad β de la caseínaquinasa II influye en el reconocimiento de la tirosina en péptidos ricos en residuos ácidos y en la discriminación de la posición de esa tirosina en la secuencia inhibidora.

SUMMARY

Casein kinase II is a serine/threonine protein kinase present in the cells of all the eukaryotic organisms studied. It is localized both in the nucleus and in the cytoplasm. Important cytoplasmatic proteins, nuclear transcription factors and oncogen products such as myc, myb, fos and jun are casein kinase II substrates, indicating that apparently casein kinase II participates in growth and proliferation processes and in transcription regulation.

Casein kinase II has a tetrameric structure, with two α or α' subunits and two β subunits. Its optimal activity requires high NaCl or KCl concentration (150 mM KCl) and Mg^{+2} concentration (7-10 mM). Casein kinase II is an unusual protein kinase in that it can use GTP as well as ATP as phosphate donors.

Casein kinase II is extremely sensitive to heparin inhibition and is inhibited at nanomolar concentrations of the polyanion. Casein kinase II is activated by polyamines such as spermine and spermidine and by basic polypeptides such as polylysine.

The α or α' subunits are the catalytic subunits and are active by themselves. The α sequences are highly conserved among the different species, from yeast to human.

The β subunit is also highly homologous between the different species. The β subunit enhances a catalytic activity and influences the specificity and stability of the enzyme.

The specificity requirements for casein kinase II phosphorylation of protein substrates has been studied through the analysis of a number of proteins phosphorylated by the enzyme and also through the use of synthetic peptides. The minimum consensus has been determined to be: S/T X X E/D in which the third amino acid after the serine or the threonine must be an acidic amino acid (glutamic acid, aspartic acid, phosphoserine, phosphothreonine or phosphotyrosine). The positions denoted by X are also commonly acidic residues.

This thesis has centered on the study of how the interaction with different peptide structures regulate the activity of casein kinase II.

In particular the inhibitory effect of glutamic acid rich polypeptides was studied. Polyglutamic acid acts as a competitive inhibitor of *Xenopus laevis* oocytes casein kinase II, with a K_i of $7.2 \pm 0,3 \mu\text{M}$. In most of the cases, the additional presence of an amino acid different to glutamic acid in the polymer decreased the inhibitory effect of polyglutamate peptide. However in the case of a copolymer containing glutamic acid and tyrosine in 4:1 proportion, a great increase of the inhibition capacity was observed. A K_i

value of $0.023 \pm 0.001 \mu\text{M}$ was obtained for copoly glu:tyr (4:1), a value 300 times lower than that of polyglutamate. Several other copolymers, including copolymer of glutamic acid and phenylalanine (4:1) did not produce a similar effect.

Using synthetic peptides with known sequences, it was determined that the enzyme is able to discriminate the position of tyrosine with respect to the polyglutamic cluster. Thus it was observed that the enzyme is more inhibited by an undecapeptide in which two tyrosine residues are in the amino terminal position before 9 glutamic acids ($Y_2 E_9$) than by its reciprocal sequence in which the tyrosine residues are at the carboxyl end ($E_9 Y_2$). The corresponding I_{50} values are 0.2 mM and 0.55 mM.

The preference for the position of the tyrosines preceeding the glutamic cluster is similar to the specificity of the enzyme towards peptide substrates in which the serine or threonine residues which are phosphorylated are amino-terminal to the acidic residues.

When similar experiments were carried out with the isolated casein kinase II α subunit, instead of the holoenzyme, it was observed that the α subunit is less sensitive to the inhibition of the glutamic acid:tyrosine copolymer. The I_{50} value of this copolymer with the α subunit was only one order of magnitude lower than the I_{50} value of

polyglutamic acid. This indicates that the β subunit in the holoenzyme participates in the casein kinase II recognition of specific peptide substrates.

A similar observation was made with the undecapeptides. In this case, the α subunit was not able to discriminate the position of the tyrosine residues and was inhibited in a similar manner by both peptides ($Y_2 E_9$ and $E_9 Y_2$).

A mutated α subunit in which two lysines were changed to glutamic acid residues was found generally to be less sensitive to acidic polymers than α^{wt} , however the mutant retained increased sensitivity to polymers containing tyrosine residues. Experiments were carried out with different concentrations of Mg^{+2} and replacing the cation by Mn^{+2} . It was observed that suboptimal concentrations of Mg^{+2} make the enzyme less sensitive to inhibition by these peptides and reduce the differences between the peptides with different positions of the tyrosine.

Studies were also carried out with synthetic peptides substrates having tyrosines in different positions such as:

RRREYEETEEEE and RRREEEYTEEEEE.

In this case again, it was found that the presence of the tyrosine residue influences the affinity for the enzyme.

The first presented a $V_{max}/K_{m_{app}}$ value two times higher than the value obtained with peptide RRREEEFTEEEE.

Studies were also performed with tubulin, a natural casein kinase II substrate, and with synthetic peptides containing the sequence corresponding to the carboxylic end of the α subunit of tubulin. The results obtained seemed to indicate that the tyrosinylation of the carboxylic terminal segment of α subunit of tubulin decreases the phosphorylation of tubulin by casein kinase II.

The effect of poly- γ -glutamylated derivatives of folic acid on the activity of casein kinase II was also studied. These derivatives were found to be good inhibitors of casein kinase II. The efficiency in the inhibition of these compounds increased as the number of glutamic acid residues attached to the aromatic group of these compounds was also increased. The inhibition by these compounds also depends on the nature of aromatic group attached to the γ polyglutamate chain. For instance, the methotrexate derivatives are more efficient inhibitors than the para-amino-benzoate compounds containing a similar number of glutamate residues.

These results indicate that the recognition by casein kinase II of peptide substrates is more complex than a mere interaction with a polyanionic chain. Thus the introduction of the tyrosine phenolic groups within the

polyglutamic acid residues increases the affinity of these peptides for the enzyme. In the same manner, the presence of aromatic substituted rings in the polyglutamylated derivatives of folic acid also increases their affinity for casein kinase II.

The recognition of substituted aromatic rings is greatly dependent on the presence of the β subunit. The fact that casein kinase II recognizes tyrosine residues in peptides in a similar position as it recognizes ser/thr in substrate sequences supports the idea that tyrosine-containing acidic peptides act as pseudosubstrate inhibitors. This finding is relevant to the novel discovery of dual specificity protein kinases that can phosphorylate both serine/threonine or tyrosine.

The work of this thesis allows us to conclude:

1. Casein kinase II specifically recognizes tyrosine immersed in polyglutamic acid sequences. These peptide sequences are potent inhibitors of the enzyme.
2. Substituted aromatic groups, like those present in polyglutamylated folic acid derivatives, also increase inhibitory capacity of polyanionic sequences.

3. The enzyme preferentially interacts with peptides with tyrosines in the amino terminal extreme of the glutamic acid sequences. This positional recognition is similar to the interaction of the enzyme with substrate peptides containing serines or threonines and glutamic acid.

4. The casein kinase II β subunit participates in the recognition of the tyrosine in peptides rich in acidic residues and in the position discrimination of this tyrosine in the inhibitory sequence.

INTRODUCCION

A. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PROTEINAQUINASAS

La fosforilación de proteínas es un proceso que ocurre en la célula eucariótica como parte del mecanismo de transducción de señales y de la regulación de la actividad biológica de un número importante de proteínas intracelulares. Casi un tercio de las proteínas de una célula eucariótica se encuentra fosforilado durante las diferentes etapas del ciclo celular. En este proceso participan enzimas denominadas proteinaquinasas.

Durante los últimos diez años hemos apreciado un aumento impresionante en el número de las diversas proteinaquinasas identificadas, llegando a sumar más de cien tipos diferentes. En eucariontes, la fosforilación de las proteínas ocurre principalmente en el grupo hidroxilo de un residuo aminoacídico, lo cual produce cambios tanto en el tamaño como en la carga del mismo. Esta modificación covalente de la proteína puede afectar las interacciones que el residuo establece con otros grupos de la misma molécula proteica o de otras con las cuales la proteína se relaciona. La modificación puede afectar la función de la proteína, ya sea en forma indirecta, como por ejemplo, provocando un cambio en su conformación, o bien directamente, afectando a un residuo

aminoacídico relacionado con el sitio activo.

Las proteínquinasas se han clasificado en dos grandes grupos, las específicas para serina y treonina y las específicas para tirosina (Hanks y col., 1988). En primer lugar se describió la fosforilación de proteínas en los residuos de aminoácidos hidroxilados alifáticos (serinas y treoninas) (Edelman y col., 1987). Este tipo de fosforilación ocurre principalmente en el citoplasma. A su vez, el reconocimiento de las tirosina proteínquinasas fue posterior. En efecto, en el año 1978 se obtuvieron evidencias que indican que el gen transformante del virus del sarcoma de Rous corresponde a una proteínquinaasa que fosforila tirosina (Collet y Erickson, 1978). Con éste y otros antecedentes y dado que la fosforilación en tirosina es una modificación que ocurre en mucho menor proporción en la célula (la fosfotirosina es menos del 0,05% del total del contenido de fosfoaminoácidos estables a ácido), esta actividad se relacionó inicialmente con los procesos de transformación celular y tumorigénesis (Hunter y Sefton, 1980). Sin embargo, actualmente se sabe que las actividades fosforilantes en tirosina correspondientes a los virus transformantes, tienen su contrapartida en las células normales. En la célula, las enzimas con actividad tirosina proteínquinaasa están implicadas principalmente en los procesos de control del crecimiento celular (Hunter y Cooper, 1985) y en

la mayoría de los casos conocidos forman parte de receptores de la membrana plasmática (Cartwright y col., 1987; Findik y Presek, 1988).

Además de este tipo de proteínasas, existe otro tipo de ellas capaces de fosforilar otros aminoácidos como histidina, lisina, arginina y aminoácidos ácidos. Varias de éstas han sido estudiadas con mayor profundidad en procariontes (Bourret y col., 1991).

A pesar de la gran diversidad de proteínasas individualizadas, todas presentan una gran similitud entre las secuencias relacionadas con la actividad catalítica. El estudio comparativo de Hanks y Quinn (Hanks y Quinn, 1991), muestra doce regiones conservadas en las serina proteínasas y once en las tirosina proteínasas. La similitud en estas zonas de la secuencia no sólo se presenta dentro del mismo tipo de proteínasas, sino que también entre el grupo de las serina proteínasas y las tirosina proteínasas. En el Apéndice I (Hanks y col., 1988), se muestran los segmentos conservados en los dominios responsables de la actividad catalítica en estos dos tipos de quinasas.

En las regiones conservadas no ha sido posible encontrar secuencias de aminoácidos que puedan ser las responsables de la diferenciación entre los dos tipos de especificidades de las proteínasas. Esto ha hecho

suponer que la diferencia de especificidad podría estar dada por secuencias ubicadas en otros dominios de la enzima (Hanks y col., 1988).

Por mucho tiempo se consideró que la diferenciación entre las proteínquinasas que fosforilan a los aminoácidos hidroxilados alifáticos y las que fosforilan al aminoácido aromático era absoluta, de manera que fue muy sorprendente el hallazgo reciente de enzimas con especificidad dual. Este descubrimiento tuvo lugar cuando se utilizó anticuerpos antifosfotirosina para detectar la presencia de tirosina proteínquinasas en genotecas de levadura expresadas en bacterias. La primera información de este tipo se obtuvo en *Saccharomyces pombe* (Featherstone y Russel, 1991), donde se encontró la enzima wee-1, la cual constituye un regulador negativo de la entrada en mitosis, y fue clasificada, por el análisis de su secuencia, entre las serina/treonina proteínquinasas. Sin embargo, esta enzima puede autofosforilarse tanto en serina como en tirosina y además fosforila en tirosina al sustrato exógeno angiotensina II.

Luego, trabajando con *Saccharomyces cerevisiae* (Stern y col., 1991), se encontró también una enzima que según la clasificación de Hanks corresponde a una serina/treonina proteínquinasas. Esta enzima, denominada SPK1, cataliza su autofosforilación y la fosforilación de sustratos exógenos en

serinas y treoninas; sin embargo, es capaz de fosforilar también a un copolímero de ácido glutámico y tirosina (poli glu:tir 4:1), el cual es un sustrato sintético de las tirosina proteínquinasas.

A partir de estos hallazgos se han encontrado otras enzimas con especificidad dual. En *Xenopus*, el activador de la MAP quinasa (proteínquinasasa activada por agentes mitogénicos) fosforila a esta última en la treonina 183 y en la tirosina 185 (Rossomando y col., 1992). En ratón se ha encontrado la enzima ERK1 (Crews y col., 1991), la cual es una serina/treonina proteínquinasasa (fosforila a la proteína 2 asociada a microtúbulos), pero al catalizar su autofosforilación, ésta ocurre tanto en tirosina como en serina y treonina. En células humanas se ha descrito la presencia de TTK (Mills y col., 1992), que corresponde a una proteínquinasasa identificada en células T y que se ha encontrado también en otros tejidos en activa proliferación. Esta enzima, que está muy relacionada con SPK1 y con la proteínquinasasa cdc2 (cdc2 o p34 cdc2 quinasa), puede fosforilar ciertas proteínas en serina, treonina y en tirosina. También se ha informado el caso del receptor de insulina (Baltensperger y col., 1992), el cual al ser activado por la unión de la insulina, se autofosforila en tirosina en su subunidad β . Esto tiene como resultado una estimulación de la actividad tirosina proteínquinasasa del

receptor. Además de esta autofosforilación en tirosina, se encontró que el receptor puede autofosforilarse en una serina, lo cual también aumentaría la actividad tirosina proteínquinasa del receptor.

Con estos ejemplos se puede apreciar que la especificidad dual está representada en distintas especies y se presenta en proteínquinasas clasificadas como específicas para serina y treonina, así como también en aquellas clasificadas como específicas para tirosina.

Históricamente, la glicógenosintetasa constituyó el paradigma de la modificación de las características de una proteína mediante su fosforilación. Esta enzima se inactiva cuando una serina específica es fosforilada mediante la proteínquinasa A. Estudios relacionados con esta proteínquinasa y otros estudios pioneros revelaron que el estado fisiológico de un tejido puede alterarse mediante fosforilaciones y desfosforilaciones de enzimas e inhibidores proteicos (Rubin y Rose, 1975; Krebs y Bravo, 1979).

Como en el caso de la glicógenosintetasa, muchas proteínas sufren fosforilación de un sólo aminoácido, pero también son muchas las que presentan múltiples fosforilaciones. Por ejemplo, en la fosvitina, una proteína del huevo, se encuentran incorporados más de cien grupos fosforilo, lo cual es necesario para el desarrollo del embrión (Rubin y

Rose, 1979). El extremo carboxílico de la RNA polimerasa también sufre múltiples fosforilaciones, pero aún está en estudio el papel de éstas en la función de la enzima (Zandomeni y col., 1986; Saltzman y Weinmann, 1989).

Es muy interesante el hecho de que en algunas proteínas que experimentan múltiples fosforilaciones, éstas sean catalizadas en forma secuencial por más de una proteína-quinasa. Por ejemplo, la caseínaquinasa I (CQ I) puede fosforilar a la serina en un sitio S(P) X X S de un sustrato dado solamente si la primera serina ha sido previamente fosforilada por la caseínaquinasa II (CQ II) (Hathaway y Traugh, 1982). Generalmente en este tipo de fosforilación secuencial, las primeras fosforilaciones no son las que directamente provocan un cambio de la actividad, pero son necesarias para que ocurra la fosforilación posterior que sí afecta dicha actividad. Una situación de este tipo se presenta en la regulación fina de una serie de proteínas importantes en el metabolismo.

La fosforilación de proteínas ocurre en un aminoácido ubicado en un sitio clave de la molécula sustrato, el cual está determinado por la especificidad de la proteína-quinasa particular que cataliza la reacción. Esto le adjudica a la simple reacción de esterificación una complejidad que justifica la gran cantidad de enzimas destinadas a catalizar en forma específica estos procesos de fosforilación. Al cons-

tituir la fosforilación uno de los mecanismos de regulación celular, hay que considerar también el hecho de que las células deben responder en forma discriminada a estímulos que son múltiples y diversos, por lo tanto las enzimas encargadas de la fosforilación deben ser también susceptibles a regulación.

Estas enzimas pueden ser reguladas mediante activadores e inhibidores que se unen a ellas en forma específica. Tenemos, como ejemplos, a la proteínaquinasa A (PKA), cuya actividad es dependiente de cAMP y a la proteínaquinasa C, que requiere de fosfolípidos y Ca^{+2} (Taylor y col., 1990).

Algunas de estas enzimas presentan también un mecanismo de autorregulación. En efecto, poseen en sus secuencias un sitio análogo al sitio presente en los sustratos y que es el fosforilado por la enzima, pero este sitio carece del aminoácido hidroxilado receptor del fosforilo. Esta secuencia análoga a un sustrato se encuentra en un dominio de la enzima que, en la estructura terciaria (o cuaternaria) de ésta, queda en contacto y se une con el sitio activo. Esta interacción intramolecular impide la unión del verdadero sustrato. Esta secuencia, llamada secuencia de pseudosustrato, puede ser liberada del sitio activo mediante diversos mecanismos, entre ellos, la proteólisis del segmento inhibidor o por un cambio conformacional inducido por la unión de un efector. También puede ocurrir una reacción de autofosforilación, o bien, una

de fosforilación por acción de otras enzimas que rompa la interacción inhibidora (Soderling, 1990). Un ejemplo de liberación de la secuencia de seudosustrato se tiene en el caso de la proteínquinasa A. En este caso, la estructura tetramérica se separa por acción del cAMP en dos subunidades catalíticas monoméricas y en un dímero constituido por las dos subunidades reguladoras (R_{I2} o R_{II2}). De ellas, R_I posee la secuencia R R G A, un sitio semejante a la secuencia consensual de fosforilación de la enzima. Así, esta secuencia es una secuencia de seudosustrato que, en algunas condiciones (sin cAMP), estaría unida al sitio catalítico impidiendo la unión del sustrato (Taylor, 1989).

A pesar de que este mecanismo de autorregulación ha sido establecido en varias de las enzimas más estudiadas, no es posible saber todavía cuán general es dentro de la gran familia de las proteínquinasas.

B. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CASEINAQUINASA II

La caseínaquinasa II pertenece a la clase de las serina/treonina proteínquinasas. Su nombre tiene un origen operacional debido a que la caseína es uno de los sustratos proteicos más ampliamente utilizado para el ensayo de su actividad. El número II se refiere a que eluye a continuación de otra serina proteínquinasa, la caseínaquinasa I, cuando es

purificada a partir de un lisado celular, a través de una columna de DEAE-celulosa (Hathaway y Traugh, 1979).

La caseínaquinasa II ha sido purificada y analizada en una gran variedad de organismos, incluyendo levaduras, drosophilas, anfibios y humanos (Clairborne y col., 1983; Prowald y col., 1984; Mülner-Lorillon y col., 1988; Kandrór y col., 1989; Bidwai y col., 1992). La enzima se presenta como un tetrámero de 130-140 kDa, constituido por dos subunidades catalíticas α o una α y otra α' , entre 36 y 44 kDa y dos subunidades β de menor tamaño, entre 24 y 30 kDa. Esta subunidad β sufre autofosforilación, y además regula a la subunidad catalítica α activándola (Cochet y Chambaz, 1983; Traugh y col., 1990). El tetrámero puede tener la forma $\alpha_2\beta_2$ o $\alpha\alpha'\beta_2$ y se ha postulado que su existencia en una forma o la otra dependería del tejido en el cual se encuentre la enzima (Maridor y col., 1991). En la actualidad se tienen evidencias concluyentes de que α y α' son dos polipéptidos diferentes y que son producto de genes independientes (Padmanabha y Glover, 1987; Litchfield y col., 1990; Lozeman y col., 1990).

La disposición espacial de las subunidades no se conoce, pero la resistencia de la subunidad β a la proteólisis cuando la holoenzima se trata con las enzimas tripsina y quimotripsina, indica que dicha subunidad se encontraría parcialmente protegida por la estructura cuaternaria (Meggio

y Pinna, 1984). Esto concuerda con el hecho de que el grupo fosforilo incorporado en la subunidad β , mediante autofosforilación, es resistente a la acción de proteínafosfatasas (Agostini y col., 1987) y también con el hecho de que la holoenzima reacciona débilmente con un anticuerpo contra la subunidad β (Dahmus, 1981).

A diferencia de la mayoría de las proteínquinasas, la caseínaquinasa II utiliza tanto ATP como GTP como nucleótidos donantes de fosforilo. La tirosina proteínquinasa src y la cdc2 quinasa constituyen otras excepciones que también utilizan ambos nucleótidos (Hunter y Cooper, 1985). Esta capacidad de utilizar GTP, relativamente exclusiva de la caseínaquinasa II, es usada como uno de los criterios para identificar su actividad. En las numerosas caseínaquinasas II estudiadas, el valor de la K_m para ATP varía entre 5 y 30 μM y entre 5 y 100 μM para GTP (Glover, 1986; Clairborne y col., 1983; Tuazon y Traugh, 1991).

La caseínaquinasa II es activa en un amplio intervalo de pH, mostrando la máxima actividad a pH cercanos a 8,0 (Hathaway y Traugh, 1983; Leiva y col., 1987). Su actividad depende de la concentración de sal (KCl o NaCl). Una fuerza iónica alta es necesaria para la estabilización de la estructura tetramérica (Glover, 1986), mientras que a baja fuerza iónica se produce agregación e inactivación de la enzima.

Esta agregación se revierte, y a la vez se recupera la actividad, si la concentración de sal aumenta hasta 0,2 M (Mamrack, 1989). Los valores óptimos de concentración de sal varían entre 0,1 y 0,2 M, siendo esto dependiente de la concentración del sustrato proteico (Hathaway y Traugh, 1983).

La caseínaquinasa II requiere una alta concentración de Mg^{+2} para su máxima actividad. En efecto, la concentración óptima de Mg^{+2} está entre 5 y 15 mM. A concentraciones mayores se observa una disminución gradual de su actividad. La estimulación de la actividad enzimática por una concentración de Mg^{+2} en exceso con respecto a la requerida para la formación del complejo $MgATP^{-2}$ sugiere una función adicional de este catión (Glover y col. 1983). Esta idea es apoyada por Hathaway y Traugh, quienes han postulado la presencia de dos sitios de unión para Mg^{+2} , uno de alta afinidad y otro de baja afinidad (Hathaway y Traugh, 1984 a).

Por otra parte, los trabajos realizados por Gatica y col. (Gatica y col., 1993) muestran que algunos iones metálicos pueden sustituir al Mg^{+2} . En el caso del $MnATP^{-2}$, la enzima presenta aproximadamente un 30% de la actividad que posee con $MgATP^{-2}$ y la concentración de Mn^{+2} necesaria para obtener la máxima actividad enzimática es de 750 μM . El Co^{+2} también puede reemplazar al Mg^{+2} , pero en este caso la caseínaquinasa II presenta sólo un 10% de dicha actividad. Cabe se-

ñalar que la utilización de Mn^{+2} y de Co^{+2} es una característica de algunas tirosina proteínquinasas (Hunter y Cooper, 1985). También los resultados experimentales indican que en presencia de Mn^{+2} la caseínaquinasa II tiene una menor Km para GTP.

C. DISTRIBUCION DE LA CASEINAQUINASA II

La caseínaquinasa II es una enzima que se ha encontrado presente en todas las células de eucariontes analizadas (Edelman y col., 1987). Dentro de la célula se ha encontrado tanto en el núcleo como en el citoplasma (Hathaway y Traugh, 1982) y, mediante fraccionamiento celular, se ha localizado su actividad también en mitocondria y en microsomas (Edelman y col., 1987). Esto es coherente con el hecho de que son sustratos de esta enzima proteínas ubicadas a su vez en distintos compartimientos celulares.

Algunos estudios han mostrado que la enzima está presente principalmente en el citoplasma. Este es el caso de la enzima de oocitos de *Rana temporaria*, inducidos a madurar mediante el tratamiento con progesterona (Kandror y col., 1989). Por otra parte, en nuestro laboratorio se encontró que la caseínaquinasa II es la actividad fosforilante predominante en el núcleo de *Xenopus laevis* (Leiva y col., 1987). Además, trabajando con fibroblastos embrionarios de pollo (mediante técnicas de inmunofluorescencia) se han encontrado evidencias

de que, durante la interfase del ciclo celular, las tres subunidades de la enzima (α , α' y β) se encuentran mayoritariamente en el núcleo (Krek y col., 1992). La caseínaquinasa II también ha sido purificada de nucleólos aislados (Caizergues-Ferrer y col., 1987) y estudios realizados con técnicas de inmunocitoquímica la han localizado en altas concentraciones en este compartimiento.

D. LA SUBUNIDAD α

La subunidad α posee el sitio de unión del nucleótido (ATP o GTP) (Hathaway y col., 1981). El clonamiento de esta subunidad a partir de diferentes genotecas de cDNA y la expresión de la proteína *in vitro* han permitido conocer sus características (Saxena y col., 1987; Meisner y col., 1989; Lozeman y col., 1990; Hu y Rubin, 1990 a; Hu y Rubin, 1990 b; Traugh y col., 1990; Maridor y col., 1991; Lin y col., 1991; Jedlicki y col., 1992). Entre las subunidades α secuenciadas se encuentra la de levadura (Wu y col., 1988), la de *Drosophila* (Saxena y col., 1987), la de *Xenopus* (Jedlicki y col., 1992), la de rata y la humana (Meisner y col., 1989). Estas subunidades de origen distinto han sido comparadas entre sí y también con las secuencias de otras proteínaquinasas. En primer término, se encontró un 67% de similitud entre las subunidades α de levadura y de *Drosophila* y un 90% entre la de

Drosophila y la humana. Es importante señalar que la secuencia de la subunidad α de anfibio y la de la subunidad α humana tienen más de un 90% de similitud (Jedlicki y col., 1992), encontrándose la mayoría de las diferencias en el extremo carboxilo terminal (ver Apéndice I, Hanks y col., 1988 y Apéndice II, Jedlicki y col., 1992). Por otra parte, al comparar la secuencia de la subunidad α de *Drosophila* con las de otras proteínquinasas (Hanks y Quinn, 1991), se observa que la subunidad α de la caseínquinasasa II presenta una mayor similitud con las proteínquinasas que participan en los procesos de fosforilación durante el ciclo celular que con otras serina/treonina proteínquinasas, tales como las dependientes de cAMP, de Ca^{+2} y calmodulina y de fosfolípidos.

En el subdominio I (ver Apéndices I y II), donde se encuentra la secuencia característica G X G X X G/S, común en los sitios de unión del ATP de un gran número de proteínquinasas (Taylor y col., 1990), la caseínquinasasa II llama la atención porque posee un residuo de tirosina (antes del último residuo de serina), de modo que su secuencia es G X G X Y S. La secuencia más corriente entre las serina proteínquinasas es G X G X F G/S, y la diferencia observada hace a la caseínquinasasa II más semejante a las proteínquinasas de la familia de las cdc2 quinasas que participan en el ciclo celular (Mülner-Lorillon y col., 1990).

La caseínaquinasa II presenta otra diferencia casi exclusiva puesto que en el subdominio II posee una valina (valina 64) en lugar de la alanina (alanina 70 en la PQ A) y una diferencia exclusiva en el subdominio VII, en el cual la fenilalanina dentro de la secuencia consensual D F G (fenilalanina 174 en la PQ A) está reemplazada por un triptófano (triptófano 174). Se ha postulado que esta última diferencia estaría relacionada con su capacidad para utilizar GTP (Jakobi y Traugh, 1992).

En el subdominio II, a continuación de la lisina que participa directamente en la reacción de fosforilación (lisina 67, ver Apéndice II), la subunidad α posee una agrupación de lisinas y argininas que le es característica (Kamps y Selfton, 1986). Meisner y colaboradores (Meisner y col., 1989) han postulado que esta serie de residuos de aminoácidos básicos forma una α -hélice que se encontraría sobresaliendo de la estructura proteica y correspondería al sitio en el cual ocurre la unión de la enzima con el sustrato proteico (Lozeman y col., 1990). También llama la atención que la subunidad α , en el segmento : $^{142}\text{K X}_5 \text{H X}_5 \text{H R X}_2 \text{K X}_1 \text{H X}_5 \text{H X}_1 \text{H R K X}_1 \text{R}$ del subdominio VI, posee otra agrupación de aminoácidos básicos. De estos aminoácidos básicos cinco corresponden a histidina, tres a lisina y tres a arginina. Este subdominio básico está conservado entre numerosas serina/treonina proteí-

naquinasas. Sin embargo, en el caso de la proteínasquinasa A existe un aminoácido ácido (el lugar correspondiente al residuo de ácido glutámico en la posición 170 de la PQ A, ver Apéndice I), en cambio la caseínaquinasa II posee el aminoácido básico histidina:

CQ II : R D V K P H N y PQ A : R D L K P E N (Hanks y Quinn, 1991). A esta serie de aminoácidos básicos también se le atribuye un papel en el reconocimiento de los sustratos proteicos (Hanks y Quinn, 1988).

E. LA SUBUNIDAD β

Se puede comprobar que existe mucha similitud entre las subunidades β de las caseínaquinasas II de distintas especies. La subunidad β de *Drosophila* tiene un 88% de similitud aminoacídica con la subunidad β humana, y dentro del 12% de diferencia, la mitad corresponde a sustituciones conservadas. Por otra parte, las subunidades β de *Xenopus laevis*, bovino y humana son prácticamente idénticas (Heller-Harrison y col., 1989; Jedlicki y col., 1992) (ver Apéndice III).

Al analizar la secuencia de la subunidad β llama la atención la existencia de dos zonas de carga opuesta ubicadas en cada extremo de la cadena polipeptídica (Takio y col., 1987). Hacia el extremo carboxilo terminal existe una gran cantidad de residuos aminoacídicos básicos y hacia el extremo

aminoterminal se encuentran numerosos residuos aminoacídicos ácidos, especialmente concentrados entre los residuos 55 y 64. La secuencia básica podría facilitar una interacción con los sustratos de carácter ácido. En cambio, a la secuencia ácida se le ha atribuido la interacción con poliaminas y polipéptidos básicos, los cuales estimulan a la enzima (Takio y col., 1987; Hathaway y Traugh, 1984 b; Traugh y col., 1990). Los experimentos en los cuales, por mutación sitio dirigida *in vitro*, los residuos ácidos se cambiaron por alanina, muestran que esta subunidad β mutada estimula 27 veces a la subunidad α , y no 5 a 6 veces como lo hace la subunidad no mutada. Esto ha hecho atribuirle a esta región una posible función atenuadora (Boldyreff, y col., 1992).

La secuencia S S S E E, adyacente a la primera metionina, resulta de gran interés. Esta zona se ha definido como el sitio de autofosforilación de la enzima, pues las serinas ubicadas en el primer y el segundo lugar cumplen con la secuencia consensual descrita para la especificidad de la enzima (ver más adelante). Esta posibilidad había sido postulada por Lichtfield y col. (Lichtfield y col., 1991) y ha sido recientemente demostrada en nuestro laboratorio (Hinrichs y col., 1993). Hasta la fecha no ha sido demostrado que la fosforilación de estas serinas alteren la actividad enzimática de la caseínaquinasa II (Hinrichs, y col., 1993).

Se ha tratado de encontrar similitud entre la secuencia de la subunidad β y las secuencias de las subunidades o dominios reguladores de otras proteínquinasas, sin embargo, no ha sido posible establecer similitud con ninguna de éstas, así como tampoco con otras secuencias conocidas de proteínas (Takio y col., 1987).

F.- ESPECIFICIDAD DE LA CASEINAQUINASA II

La especificidad de la caseínaquinasa II de fosforilar serinas y treoninas que anteceden a aminoácidos ácidos es otra característica peculiar de esta enzima que la diferencia de muchas otras serina/treonina proteínquinasas, capaces de fosforilar residuos insertos en muy variadas secuencias (Kennelly y Krebs, 1991). De la misma manera que la caseínaquinasa II, la caseínaquinasa I y muchas tirosina proteínquinasas, también fosforilan a un residuo aminoacídico ubicado en un entorno ácido: CQ I, S (P) X X E S (Hathaway y Traugh, 1982) y aquellas tirosina proteínquinasas, E E E Y (Hunter y Cooper, 1985).

Las primeras informaciones con respecto a la especificidad de la caseínaquinasa II se obtuvieron al analizar los aminoácidos fosforilados por esta enzima al actuar sobre diferentes variedades de caseína. Con estos estudios se pudo observar que la caseínaquinasa II fosforila tanto serina como

treonina, lo cual la distingue de la caseínaquinasa I, la otra proteínaquinasa que fosforila residuos adyacentes a aminoácidos ácidos pero que fosforila exclusivamente serinas. También se encontró que, a diferencia de esta última, requiere que los residuos ácidos vecinos a la serina o a la treonina, se ubiquen hacia el extremo carboxilo terminal en la secuencia. En esta forma se estableció un primer consenso de fosforilación de la caseínaquinasa II presente en las caseínas α , α y β y que corresponde a S/T E/S(P) E/D (Hathaway y Traugh, 1982).

Posteriormente, se han realizado estudios con péptidos sintéticos en forma muy sistemática, para establecer las determinantes de la especificidad de la caseínaquinasa II. Se usaron como sustratos péptidos pequeños cuyas secuencias corresponden a los sitios de la glicógenosintetasa y de la troponina T que son fosforilados por la caseínaquinasa II. Estos péptidos fueron fosforilados por esta proteínaquinasa, pero presentaron valores de K_m aparente superiores en dos órdenes de magnitud a los correspondientes valores de K_m de las proteínas sustratos (Meggio y col., 1984). Los mismos autores establecieron además la importancia de la presencia de al menos un aminoácido ácido en la tercera posición hacia el extremo carboxílico de la serina: S X X E/D, siendo esta secuencia la estructura mínima necesaria para servir de sustrato. Utilizando péptidos sintéticos, se vió que una activi-

dad enzimática óptima se encuentra con la secuencia S E E E. El cambio del aminoácido ubicado en el tercer lugar por un aminoácido neutro como alanina disminuye la velocidad de fosforilación en un 40%. Otros péptidos sintéticos utilizados en estos estudios constan de una serina o una treonina seguida por 5 a 7 residuos ácidos hacia el extremo carboxilo terminal. Se comparó este tipo de péptidos con otros en los cuales uno o más aminoácidos van siendo sustituidos por aminoácidos diferentes, principalmente por aminoácidos neutros como alanina.

Es así como en la actualidad han sido aclarados algunos aspectos importantes en el consenso de fosforilación de la caseínaquinasa II, habiendo contribuido a ello en forma relevante Pinna y colaboradores y Krebs y colaboradores (Meggio y col., 1984; Kuenzel y Krebs, 1985; Marin y col., 1986; Kuenzel y col., 1987; Marchiori y col., 1988; Litchfield y col., 1990; Perich y col., 1992). Las conclusiones más importantes de estos trabajos se resumen a continuación: la posición número tres, hacia el extremo carboxilo terminal desde el residuo hidroxilado, es fundamental para la acción de la caseínaquinasa II. Un péptido que carece de un aminoácido ácido en ese lugar es fosforilado en mucho menor extensión que otro que sí lo posee, aun cuando este último presente una menor cantidad de aminoácidos ácidos (en total). Por ejemplo, el péptido S A A E A A aún puede ser sustrato de la enzima, lo

cual no sucede con el péptido S A E A A A ni con el péptido S E E A A A, y además el primero es fosforilado con una mayor V_{max} que el péptido S E E A E E. Una mayor cantidad de residuos ácidos hacia el extremo carboxilo terminal favorece la afinidad con la enzima. Por ejemplo, la K_m disminuye desde un valor de 18,9 mM para el péptido S A A E A A a 0,3 mM para el péptido S E E E E E (Meggio y col., 1984; Marin y col., 1986; Kuenzel y col., 1987; Marchiori y col., 1988).

La existencia de aminoácidos ácidos hacia el extremo amino terminal del residuo hidroxilado favorece la reacción de fosforilación, con respecto a la eficiencia (V_{max}/K_m), pero no es requisito suficiente para que un péptido sea sustrato, como ocurre con el caso del péptido E E E E E S (Meggio y col., 1984; Marin y col., 1986; Marchori y col., 1988).

La presencia de un residuo básico vecino a la serina fosforilable hacia el extremo N-terminal disminuye más de 100 veces la eficiencia de la enzima; así mismo, una lisina colocada en el cuarto lugar hacia el extremo carboxilo terminal disminuye aproximadamente 25 veces la actividad de la enzima con respecto a la actividad que presenta con un péptido que posee una valina en esa posición. La treonina puede reemplazar a la serina, pero se observa una disminución considerable en la eficiencia (el valor de V_{max}/K_m es aproximadamente 240 veces menor). Sin embargo, una tirosina en el lugar de la

serina no puede en absoluto ser fosforilada. Una serina fosforilada puede reemplazar a un ácido glutámico o a un ácido aspártico en cualquier posición, aún en la ubicación clave del tercer lugar a continuación de la serina (o treonina) fosforilable (Kuenzel y col., 1987; Marchori y col., 1988; Kuenzel y col., 1987; Litchfield y col., 1990).

Recientemente se encontró que la caseínaquinasa II presenta ciertas variaciones en la secuencia consensual de fosforilación cuando en el sustrato hay presentes serinas fosforiladas. La enzima fosforila con mayor velocidad a un péptido que posee la secuencia acetil S(P) S(P) S S(P) que al péptido de referencia S E E E (Perich y col., 1992). Utilizando este tipo de péptidos, los autores observaron que la caseínaquinasa II requiere que la serina que va a ser fosforilada esté seguida por una serina fosforilada, pero también encontraron que es necesaria la presencia de dos serinas fosforiladas adyacentes hacia el extremo amino terminal. La carencia de estas serinas fosforiladas en un péptido A A S S(P) S(P) disminuye casi 200 veces la velocidad de fosforilación. También se pudo observar que el aumento de serinas fosforiladas hacia el extremo aminoterminal produce una disminución en el valor de la Km. Por ejemplo, el péptido acetil S(P) S(P) S(P) S S(P) tiene una Km de 0,3 mM y un valor de Vmax/Km de 26,6, en cambio, el péptido

acetil S(P) S(P) S(P) S(P) S S(P) tiene una Km de 0,09 mM y el valor de Vmax/Km aumenta a 75,5.

Por otra parte, también se aclaró que la secuencia consensual debe cumplir con la condición estructural de formar una vuelta β (Carrol y col., 1988). Considerando esta condición, se puede explicar el hecho de que existan secuencias que son sustratos de la caseínaquinasa II aun cuando son moderadamente ácidas o no cumplen plenamente con los requisitos de la secuencia consensual, pero que, sin embargo establecen una vuelta β en el segmento que posee el residuo fosforilable. Estudios no publicados con técnicas de NMR de péptidos, entre los cuales se encuentra el péptido E S L S S S E E, correspondiente al sitio de fosforilación de la β caseína, muestran que forma esta vuelta β (ref. en Meggio y col., 1989). También el análisis de algunas secuencias de otros sustratos de la enzima, como las oncoproteínas Fos, Myc y E1A, muestra la presencia de prolina antes de la serina fosforilable (Hathaway y Traugh, 1982; Carrol y col., 1988), como se observa igualmente en los sitios de fosforilación de la glicógeno sintetasa (P H Q S E D E E E), de la ornitina carboxilasa (P G S D D E D E S), del antígeno T mayor del virus SV40 (E E M P S S D D E A T A D) y de la proteína 14 del grupo de alta movilidad (S P A S D E A E E K). Esta última representa el caso de un sustrato que no cumple con el requisito del amino-

ácido ácido en el tercer lugar.

De lo anterior se desprende que la secuencia consensual de especificidad de la caseínaquinasa II no sólo tiene requerimientos en cuanto a secuencia aminoacídica sino que, tal como es lógico suponer de un largo segmento perteneciente a una estructura proteica, debe cumplir también con requisitos estructurales de manera tal que se adecúe a la estructura del sitio activo de la enzima, como así mismo a probables sitios vecinos que contribuyan a acomodar la zona del sustrato proteico que debe quedar en contacto con la enzima.

G. REGULACION DE LA CASEINAQUINASA II

La caseínaquinasa II es susceptible de ser regulada a través de diferentes mecanismos. En primer término, considerando su estructura oligomérica, la enzima activa se encuentra como el tetrámero $\alpha_2\beta_2$ y, tal como se mencionó anteriormente, requiere de una concentración de sal entre 0,1 y 0,2 M. Si la fuerza iónica es baja (menor que 0,05 M), se produce la agregación de la enzima con la formación de filamentos (Glover, 1986).

Por otra parte, se sabe que la subunidad α aislada posee actividad enzimática (Cochet y Chambaz, 1983), pero esta actividad es aproximadamente del 10 al 20% de la actividad que presenta la holoenzima (Lin y col., 1991; Hinrichs y col.,

1993). Esto indica que la subunidad β estimula la actividad de la enzima (aun cuando, además posea una función atenuadora (Boldyreff, y col., 1992)). También se ha encontrado que la subunidad β le confiere estabilidad térmica a la enzima (Meggio y col., 1992).

Otra forma de estabilizar y de este modo regular la actividad de la enzima, podría ser su asociación con sustratos. Un ejemplo de esta asociación es su unión a tubulina y microtúbulos (Risnik y col., 1988).

Los estudios de expresión de la subunidad β recombinante sugieren una posible regulación a través de la variación en la proporción entre las dos subunidades (Filhol y col., 1991). Krek y col. (Krek y col., 1992) no concuerdan con esta idea. Sin embargo, recientemente Robitzki y col. (Robitzki y col., 1993), trabajando con el gen de la caseínaquinasa II humana, presentaron evidencias que sugieren que la subunidad α se une en forma específica a un segmento de 70 pares de bases ubicado en el promotor del gen de la subunidad β . Un exceso de la subunidad β libera a la subunidad α del segmento del promotor, formando holoenzima. La holoenzima es incapaz de unirse a la región promotora. Además, observaron que un incremento de la expresión de la subunidad α aumenta la transcripción de la subunidad β . Estos experimentos apoyan la idea de que la expresión de ambas subunidades está coordinada,

de manera tal que la subunidad α actuaría como un factor de transcripción en la expresión de la subunidad β . Sin embargo, estos estudios requieren de mayores análisis para su confirmación.

Debido a que la subunidad β es blanco del efecto de activadores policatiónicos de la enzima, tales como la espermina y la polilisina, es lógico pensar que una modificación de esta subunidad, como lo es la fosforilación, puede representar una manera de regular su actividad. Esta idea fue aportada por algunos resultados que mostraron que la actividad de la caseínaquinasa II está aumentada en células 3T3-L1 expuestas a insulina y al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sommercorn y col., 1987). Este aumento no estaba asociado con un aumento en la concentración de la caseínaquinasa II. Esto apoya la idea de que la caseínaquinasa II es activada por algún tipo de modificación covalente. Por otra parte, en forma más directa, se demostró que la proteínaquinasa p34 cdc2 de huevos de estrella de mar fosforila *in vitro* a la subunidad β de la caseínaquinasa II de *Xenopus* en una serina y en una treonina (Mülner-Lorillon y col., 1990) y se relacionó esta fosforilación con un aumento en la actividad de la caseínaquinasa II. Recientemente, Litchfield y col. (Litchfield y col., 1991) encontraron que la subunidad β es fosforilada por la p34 cdc2 (obtenidas ambas de células BK3A

de un linfoma de pollo) en la serina 209 y esto coincide con los resultados obtenidos en estas mismas células detenidas en mitosis por nocodazol (Litchfield y col., 1992).

Estos resultados son de gran interés pues podrían relacionar la actividad de la caseínaquinasa II con la cadena de fosforilaciones que ocurren durante el ciclo celular.

Por otra parte y en forma análoga a lo que ocurre con otras proteínasquinatas cuya actividad es controlada por autofosforilación (Cobb y col., 1989; Tuazon y Traugh, 1991), es posible que la autofosforilación de la subunidad β afecte la actividad de la enzima. La autofosforilación de la subunidad β es muy rápida y coincide en sus parámetros cinéticos con un mecanismo de tipo intramolecular (Meggio y Pinna, 1984).

Según algunos autores, la autofosforilación de la subunidad β es afectada por policationes. En efecto, la polilisina y la poliarginina inhiben este proceso (Palen y Traugh, 1991), en cambio la espermina lo aumenta (Meggio y Pinna, 1984). Por otra parte, Palen y Traugh, trabajando con caseínaquinasa II de hígado de rata, (Palen y Traugh, 1984) observaron que las proteínas básicas afectan de diferente manera a la autofosforilación; por ejemplo, la protamina inhibe la autofosforilación, en cambio, tanto la histona H1 como una mezcla de histonas 3 y 4 la estimulan. Con estos resultados se ha postulado que existiría una relación inversa entre la

autofosforilación de la subunidad β y la activación de la caseínaquinasa II (Palen y Traugh, 1991). Sin embargo, en oocitos de *Xenopus laevis* se ha observado que la subunidad β no presenta inhibición de la autofosforilación en presencia de polilisina y además una mutante de la subunidad β que posee glicinas reemplazando a las dos serinas en el sitio autofosforilable, mantiene la capacidad de estimular a la subunidad α (Hinrichs y col., 1993). Es preciso un estudio más acabado para aclarar estas aparentes diferencias con respecto a los efectos de la autofosforilación en la subunidad β .

La subunidad α también está sujeta a fosforilación tanto por la acción de otras proteínasquinasa como por autofosforilación. La proteínasquinasa p34 cdc2 (Litchfield y col., 1992) fosforila a la subunidad α *in vitro* y al analizar el mapa polipeptídico se observan los mismos péptidos fosforilados que los que presenta la caseínaquinasa II obtenida de células BK3A en cultivos detenidos en mitosis. Estas fosforilaciones no ocurren en la subunidad α' ni en la subunidad α de la enzima de oocitos de *Xenopus laevis*, las cuales carecen de las secuencias consensuales de fosforilación para la p34 cdc2.

Al parecer, la fosforilación de la subunidad α no afecta a la actividad de la enzima cuando ésta se ensaya *in vitro* (Litchfield y col., 1992). Sin embargo, se discute la posibilidad de que los cambios fisicoquímicos producidos por

la fosforilación se traduzcan en cambios en las interacciones con moléculas que influyan en su actividad o bien afecten su ubicación intracelular.

A diferencia de lo que ocurre con la subunidad β , la autofosforilación de las subunidades α y α' es estimulada tanto por polipéptidos básicos como por proteínas básicas (Palen y Traugh, 1991), pero no se ha establecido una relación entre la autofosforilación de la subunidad α y la actividad de la enzima.

H. ACTIVADORES E INHIBIDORES DE LA CASEINAQUINASA II

La caseínaquinasa II no es afectada por moduladores o cofactores, en contraste a lo que sucede con varias otras proteínaquinasas. Su actividad es independiente de nucleótidos cíclicos, Ca^{+2} , calmodulina y fosfolípidos (Hathaway y Traugh, 1983). Ultimamente se ha encontrado que la enzima preparada de cerebro de rata es activada seis veces por esfingosina (McDonald y col., 1991). A este hecho no se le ha encontrado un significado fisiológico. Sin embargo, desde hace tiempo se han descrito una variedad de compuestos que afectan la actividad *in vitro*, los cuales se caracterizan, en su mayoría, por ser moléculas polianiónicas o policatiónicas. Entre los compuestos que activan a la caseínaquinasa II se encuentran los policationes espermina y espermidina (Jacob y

col., 1983) y polipéptidos básicos como la polilisina (Hathaway y Traugh, 1984 b). La activación de la enzima por estos compuestos se caracteriza porque no se puede establecer un patrón común de respuesta. En efecto, la respuesta de la enzima depende no sólo del tipo de polication y su concentración, sino también de la concentración de Mg^{+2} en el medio, de forma tal que sólo se manifiesta la activación cuando se tienen bajas concentraciones de este catión (Hathaway y Traugh, 1984 b). También se ha observado que la espermina es un activador más potente que la espermidina y que puede suplir parcialmente los requerimientos de Mg^{+2} (el cual tiene una K_m de 2,5 mM con ATP como sustrato) (Hathaway y Traugh, 1984 b). La K_a de la espermina es 0,28 mM. Así, este activador podría tener algún significado puesto que el valor de K_a es alcanzado en las condiciones fisiológicas en algunos tipos celulares, como es el caso de reticulocitos (Hathaway y Traugh, 1984 b).

Algunos estudios demuestran que la polilisina activa la fosforilación de la calmodulina y de la ornitina decarboxilasa, catalizadas por la caseínaquinasa II (Meggio y col., 1992 a). En cambio, la espermina no afecta la fosforilación de ninguno de estos dos sustratos.

Un papel fisiológico relacionado con la activación por este tipo de policationes puede ser discutido y todavía no hay una prueba directa de una relación entre la caseínaqui-

nasa II y estos compuestos, pero el efecto de ellos resulta interesante si se considera que la enzima está ubicada preferentemente en el núcleo (Taylor y col., 1987; Krek y col., 1992). Además, la activación mediante estos compuestos puede ser una muestra de la acción que ejercen sobre la enzima ciertos dominios de algunas proteínas nucleares, tales como las histonas y la nucleoplasmina (Taylor y col., 1987), las cuales tienen largas secuencias de residuos aminoácidos básicos.

Por otra parte, se ha encontrado que numerosas moléculas polianiónicas son inhibidores de la caseínaquinasa II; entre ellas se puede mencionar el inositol hexasulfato, el piridoxal 5'-fosfato, el 2,3-bisfosfoglicerato y la heparina. Todos ellos han mostrado ser competitivos con respecto al sustrato proteico (Hathaway y Traugh, 1983).

De estos inhibidores, el 2,3-bisfosfoglicerato tiene un I_{50} de 1,8 mM para la caseínaquinasa II de reticulocitos de conejo. Este compuesto se asocia a la hemoglobina, pero en ciertas condiciones podría encontrarse libre en concentración suficiente como para afectar a la caseínaquinasa II, al igual que lo hace con algunas enzimas de la vía glicolítica, con las cuales presenta un I_{50} semejante (Hathaway y Traugh, 1984 c).

La inhibición de la caseínaquinasa II mediante la heparina sorprende por el bajo valor del I_{50} , el cual está en el orden nanomolar de concentración (1,4 nM) (Hathaway y col.,

1980; Plana y col., 1982). Además, debido a que este compuesto no es capaz de inhibir a otras proteínasquinasa o si lo hace requiere concentraciones bastante mayores, la inhibición por heparina se utiliza como herramienta para identificar a una proteínasquinasa como caseínasquinasa II. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la fosforilación de algunos sustratos mediante esta enzima puede ser resistente a la inhibición por heparina, tal como ocurre en el caso de la fosforilación de la nucleoplasmina (Taylor y col., 1987). La disminución de la sensibilidad de la caseínasquinasa II a la heparina cuando fosforila determinados sustratos se atribuye a que estos tienen una mayor cantidad de residuos aminoácidos ácidos.

Si bien se ha demostrado que la inhibición por heparina es competitiva con respecto al sustrato proteico, no se descarta la posibilidad de que además interactúe con otros sitios lejanos al sitio activo (Hathaway y Traugh, 1982).

Dentro de las moléculas que inhiben a la caseínasquinasa II se encuentran también algunos oligonucleótidos, observándose que los oligonucleótidos ricos en uracilo y el DNA de una hebra presentan el mayor efecto inhibitor (Gatica y col., 1989). Podría ser muy interesante que algunos ácidos nucleicos, dependiendo de su secuencia, fuesen reguladores de la caseínasquinasa II, tanto en su actividad nuclear como citoplasmática.

El hecho de que moléculas polianiónicas inhiban a la caseínaquinasa II, así como también las características de la secuencia consensual de fosforilación de la enzima, han motivado el estudio del efecto de moléculas polipeptídicas con alto contenido de residuos aminoácidos ácidos. Meggio y col. (Meggio y col. 1983; Meggio y col. 1984), realizaron estudios para observar el comportamiento de este tipo de moléculas tanto como sustratos o como inhibidores de la caseínaquinasa II. Estos autores, utilizando caseínaquinasa II de hígado de rata, analizaron el efecto de polipéptidos de ácido glutámico y encontraron que el ácido poliglutámico presenta un efecto inhibitorio sobre la enzima, si dicho compuesto posee 10 o más residuos de aminoácidos. Este efecto es realmente notable si el número de residuos es de 70, obteniéndose una K_i de 0,11 μM y un I_{50} de 1 μM . Los valores de estas constantes se aproximan a los valores obtenidos con heparina. Posteriormente se comprobó que el ácido poliaspártico es aún más efectivo como inhibidor (Meggio y col, 1984).

Si bien es cierto que estos compuestos son sintéticos, lo cual también ocurre en el caso de la polilisina, al efectuar un análisis de las secuencias de diversas proteínas de interés fisiológico, es posible encontrar en ellas segmentos con un alto contenido de residuos de aminoácidos ácidos, y si estas proteínas están relacionadas con la actividad de la

caseínaquinasa II, podrían a la vez actuar como inhibidores de la actividad de esta enzima.

I. FUNCION BIOLOGICA Y SUSTRATOS DE LA CASEINAQUINASA II

Muchas de las características de la caseínaquinasa II hacen pensar que la función de esta enzima es indispensable para la célula. Además de sus ya mencionadas características de ubicuidad en los diferentes tipos de células y de conservación de su secuencia, se ha demostrado que cepas mutantes de levadura, deficientes en caseínaquinasa II, son letales (Padmanabha y col., 1990). Apoya esta idea el hecho de que numerosas proteínas sustratos de la caseínaquinasa II tienen gran importancia en el metabolismo celular, así como también las evidencias indican que la enzima experimenta cambios en su actividad bajo distintas condiciones fisiológicas o patológicas del desarrollo celular. En algunos casos, como en el de la topoisomerasa II (Corbett y col., 1992) y en el del producto del oncogen myb (Lüscher y col., 1990), se ha podido establecer una relación directa entre la fosforilación catalizada por la caseínaquinasa II y un cambio en la actividad de la proteína sustrato.

La actividad de la enzima está aumentada en células en activa proliferación, como es el caso de células tumorales (Pena y col., 1983; Prowald y col., 1984). Schneider y cola-

boradores (Schneider y col., 1984) compararon la actividad de la caseínaquinasa II en tejido total de ratón, en diferentes estados de la embriogénesis y en células de tumor ascítico de ratón. Estos autores observaron un aumento de 2 a 3 veces en la actividad enzimática a los doce días después de iniciada la gestación. Además encontraron mayor fosforilación de una proteína de 110 kDa la cual coincide en sus características con una proteína de la cromatina no histónica (NHCP). Esta proteína también es fosforilada en gran cantidad en las células tumorales de ratón.

En hepatocitos fetales de rata (Pérez y col., 1987; Grande y col., 1989) también se ha observado un aumento de la actividad de la caseínaquinasa II, con un máximo a los 21 días de iniciada la gestación. Este aumento es paralelo al aumento de la actividad de la histona H₁ quinasa (ahora conocida como cdc2 o p34 cdc2 quinasa). Llama la atención este aumento de la actividad de la caseínaquinasa II en el hígado fetal, puesto que coincide con el comienzo de la acumulación del glicógeno y con el aumento de la concentración de insulina en el plasma del embrión. Estos autores observaron además, que la administración de insulina a ratas de un día no causa un aumento en la actividad de la caseínaquinasa II, pero sí provoca un aumento en la $K_{m_{ap}}$ de la enzima para la caseína.

Recientemente, se ha encontrado otro nexo entre la

acción de la insulina y la de la caseínaquinasa II, a través de la proteína nucleolina (denominada C23). Esta proteína participa en la regulación de la transcripción de la RNA polimerasa I y en los procesos relacionados con el transporte del RNA ribosomal. La nucleolina se regularía mediante fosforilación (Jordan, 1987). A su vez, la insulina induce la diferenciación de las células 3T3-442A y este proceso va acompañado de un aumento en la fosforilación de la nucleolina. Sin embargo, cuando el tratamiento con insulina se realiza en presencia de DRB (5,6-diclorobenzimida ribosido), un inhibidor difusible de la caseínaquinasa II, no ocurre la fosforilación de la nucleolina (Csermely y col. 1993).

Otras hormonas también modifican la actividad de la caseínaquinasa II. Sommercorn y Krebs (Sommercorn y Krebs, 1987) al inducir la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos mediante dexametasona o 3-isobutil-1-metilxantina, observaron un aumento transitorio en la actividad de la caseínaquinasa II, con un máximo al cuarto día. Este aumento corresponde también a un aumento en la cantidad de la enzima. El aumento de la actividad de la enzima coincide con un aumento en los receptores de insulina, pero cuando la actividad de la enzima comienza a declinar, la cantidad de receptores continúa elevada. Todas estas observaciones muestran que existe una relación compleja entre la insulina y la actividad de la caseínaquinasa II.

Los estudios con respecto al efecto del factor de crecimiento epidérmico sobre la caseínaquinasa II (Ackerman y Osheroff, 1989) aportan más evidencias sobre el papel de la enzima en los procesos de proliferación celular. Estos autores observaron que el tratamiento de células del carcinoma humano A-431 con EGF produce una estimulación transitoria de 4 veces en la actividad de la caseínaquinasa II, la cual no está acompañada de un aumento en la cantidad de enzima. No se han logrado evidencias de una relación directa entre la actividad tirosina proteínaquinasa del receptor de EGF y la modificación de la actividad de la caseínaquinasa II, pues mediante el uso de anticuerpos contra fosfotirosina no se ha encontrado tirosinas fosforiladas en la enzima. Pero, dada la posibilidad de una o más fosforilaciones en serina o en treonina de la caseínaquinasa II, los autores postulan el requerimiento de una o más serina/treonina proteínaquinasas como intermediarios en la cascada de reacciones.

La acción de factores hormonales sobre la caseínaquinasa II también ocurre en distintos tejidos en forma específica. Una situación de este tipo ha sido descrita por Klarlund y Czech (Klarlund y Czech, 1989). Estos autores observaron que los fibroblastos BALB/c 3T3, deprivados de suero, experimentan un aumento rápido en la actividad de la caseína-

jante a insulina-I (IGF-I) o con insulina. Debido a la rapidez con la que se manifiesta, esta activación podría deberse a una modificación de la enzima, hipótesis que es apoyada por el hecho de que no se observa un aumento paralelo de incorporación de timidina tritiada en DNA. Este aumento de actividad de la enzima en las células BALB/c 3T3 no es reproducido ni por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) ni por EGF.

Muchos de los antecedentes que relacionan a la caseínaquinasa II con los procesos de proliferación celular son apoyados por el trabajo de Carroll y Marshak (Carroll y Marshak, 1989). Estos autores estimularon con suero a fibroblastos humanos de pulmón W138 y observaron un aumento rápido en la actividad de la caseínaquinasa II, a los 30 minutos de adicionado el suero, seguido de un aumento posterior lento. Estos resultados fueron corroborados por De Benedette y Snow (De Benedette y Snow, 1991) en estudios realizados con linfocitos B de ratón, sistema en el cual observaron que la actividad y la expresión de la caseínaquinasa II oscila durante el ciclo celular inducido por derivados de forboles e ionomicina. Se produce un máximo de actividad a las 18 horas, el cual cae a las 24 horas después de la estimulación. Esta caída de la actividad de la caseínaquinasa II está relacionada con una mayor actividad de la proteínaquinasa C. Estos resultados

aportan antecedentes que apoyan la idea de que, junto con una regulación de la actividad de la caseínaquinasa II mediante modificaciones covalentes, ocurriría una regulación de su expresión durante el desarrollo y el ciclo celular. Sin embargo, actualmente existe controversia con respecto a estos resultados. En efecto, cabe hacer notar que Hunter criticó los trabajos de Carroll y Marshak y los de Klarlund y Czech como no reproducibles (Hunter y Karin, 1992).

La relación de la caseínaquinasa II con el ciclo celular se pone de manifiesto a través de otras evidencias experimentales, como es el caso de la fosforilación *in vitro* tanto de la subunidad α como de la β de la enzima por la p34 cdc2 quinasa (Mülner-Lorillon y col., 1990). La p34 cdc2 quinasa fosforila a sustratos determinantes del ciclo celular, como la histona H1, c-src y láminas tipo B (Nakawaga y col., 1990). Algunos de los sustratos de esta enzima también poseen sitios de fosforilación por la caseínaquinasa II, como es el caso de la RNA polimerasa II, el antígeno T del virus SV40, nucleolina y la proteína p53 (Lewin, 1990).

En la búsqueda de la función que cumple la caseínaquinasa II en la célula es interesante también analizar su participación en la fosforilación de algunas proteínas relacionadas con la expresión génica. Se ha encontrado que la caseínaquinasa II participa en este proceso en varios niveles,

ya sea afectando el traslado al núcleo de ciertos factores de transcripción, su unión al DNA o bien su interacción con el resto de la maquinaria transcripcional. Es el caso del antígeno T del virus SV40 (Kalderon y Smith., 1984), el cual además de la señal de entrada al núcleo (NLS) P K K K R K V, posee otra secuencia responsable de la cinética de transporte y en la cual se encuentran dos serinas fosforilables por la caseínaquinasa II, la 111 y la 112; estas serinas al estar fosforiladas aceleran el transporte al núcleo (Rihs y col., 1991). Esta secuencia fosforilable por la caseínaquinasa II es altamente conservada entre los virus animales, por ejemplo, entre la proteína E1A del adenovirus y la proteína E7 del virus de papiloma humana. También se ha relacionado la fosforilación de las serinas homólogas a las 111 y 112 del antígeno T del virus SV40 con el potencial oncogénico de estas proteínas (Barbosa y col., 1990).

Numerosos productos oncogénicos corresponden a factores de transcripción, entre ellos, Myb, Myc, Fos y Jun. Se ha descrito que la unión al DNA de algunos de ellos se afecta por fosforilación. En efecto, la fosforilación del c-Myb por la caseínaquinasa II da como resultado una gran disminución en su capacidad de unirse al DNA (Lüscher y col., 1990). Así mismo, es interesante la regulación negativa del c-Jun, el cual constituye el componente principal del factor de trans-

cripción AP-1. Se ha demostrado que la fosforilación de Jun por caseínaquinasa II en el extremo carboxilo terminal causa la inhibición de su unión al DNA (Boyle y col., 1991).

En otros casos se ha observado que la unión al DNA del factor de transcripción es activada por la fosforilación. Uno de ellos es el del factor de respuesta al suero (SRF), el cual se une al promotor de c-Fos a través de una secuencia denominada SRS (Treisman, 1986) y que en células A 431 se ha visto que es inducible por EGF (Prywes y Roeder, 1986). El SRF tiene 4 serinas fosforilables por la caseínaquinasa II, de las cuales la serina 83 y la 85 serían importantes dado que su fosforilación estaría relacionada con cambios en su unión al DNA.

Es interesante el hecho de que la caseínaquinasa II fosforila al factor de unión al DNA y al elemento de respuesta a cAMP (CREB) humano en una región comprendida entre los aminoácidos 92 y 108 (Lee y col., 1990). Se sabe que la fosforilación de este factor de transcripción por medio de la proteínaquinasa A da como resultado un aumento de la transcripción de los genes que poseen el motivo CRE. Así, es necesario establecer si la fosforilación de CREB por la caseínaquinasa II, altera o no la velocidad de transcripción de genes específicos.

Los antecedentes existentes muestran que la

caseínaquinasa II participa en distintos niveles de la actividad celular. Cada vez es más evidente que la enzima participa en los mecanismos de transducción de señales. En este caso, su acción se ejerce tanto en el citoplasma como en el núcleo, integrando probablemente cascadas de fosforilaciones, y en ellas podría estar relacionada tanto con la familia de las serina/treonina proteínaquinasas como con de las tirosina proteínaquinasas.

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de trabajo realizado, quedan aún aspectos fundamentales que aclarar con respecto a las funciones fisiológicas de la enzima y a su regulación.

Es de suponer que la gran potencialidad de fosforilación de la caseínaquinasa II debe estar siendo ejercida dentro de la célula en forma coordinada, y para ello, su actividad debe ser modulada de numerosas formas. Policaciones, polianiones, metabolitos, hormonas y factores proteicos pueden regularla tanto en su actividad como en su expresión. Además, sin duda existen fosfatasas específicas que contrarrestan específicamente su actividad y que, a su vez, también pueden ser reguladas.

OBJETIVOS

El trabajo de esta tesis está centrado en el estudio de la regulación de la caseínaquinasa II, considerando su especificidad.

Este estudio se abordó desde el punto de vista de la inhibición mediante moléculas cuyas estructuras cumplieren los requisitos siguientes:

- a. presentar homología con el consenso de fosforilación de la caseínaquinasa II.
- b. tener representación en estructuras de moléculas de importancia fisiológica.

Con este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. estudiar las características de la inhibición de la caseínaquinasa II por polipéptidos ricos en ácido glutámico.

2. estudiar la influencia de la presencia de aminoácidos aromáticos y alifáticos en el efecto inhibitor de un copolímero con ácido glutámico.
3. estudiar específicamente el efecto de la presencia de tirosina, ya sea en polipéptidos o en péptidos pequeños de secuencia conocida que se comporten como sustratos o inhibidores de la caseínaquinasa II.
4. estudiar el efecto de moléculas de interés fisiológico, las cuales presenten estructuras que cumplan requisitos para comportarse como sustratos o inhibidores de la caseínaquinasa II.

MATERIALES Y METODOS

A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION

ADP, ATP, benzamidina, caseína, colagenasa (tipo IA), carboxipeptidasa A, DTT, EDTA, EGTA, espermina, espermidina, glicerol, GTP, Hepes, heparina, L- α -glicerofosfato, 2-mercaptoetanol, piruvato de sodio, PMSF, seroalbúmina de bovino (fracción V), PPO, POPOP, polilisina (12 y 24 kDa, determinados por viscosidad), ácido poliaspártico (11,5 y 42,5 kDa), ácido poliglutámico (14 y 43 kDa), copolímero de ácido glutámico y alanina 6:4 (30 kDa), copolímero de ácido glutámico y ácido glutámico esterificado 4:1 (91 kDa), copolímero de ácido glutámico y leucina 4:1 (10 kDa), copolímero de ácido glutámico, alanina y tirosina 6:3:1 (25 kDa), copolímero de ácido glutámico, lisina y tirosina 6:3:1 (28 kDa), copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 (46 kDa), copolímero de ácido glutámico y tirosina 1:1 (30 kDa), Tris y Tritón X-100, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

Gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa (de levadura), L- α -glicerofosfatodeshidrogenasa, triosafosfato isomerasa (de músculo de conejo), lactatodeshidrogenasa (de corazón de porcino), 3-fosfogliceratoquinasa (de levadura),

creatinaquinasa (de músculo de conejo), NAD⁺ y proteasa (tipo VII), fueron adquiridos a Boehringer Mannheim GmbH Biochemica.

Sacarosa, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, fosfato monoácido de potasio, pirofosfato de sodio, sulfato de amonio, tartrato de sodio y potasio, ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico, ácido tricloroacético, etanol, hidróxido de sodio, todos grado analítico, se adquirieron en Merck A.G., Riedel-de Haën A.G. o Fluka A.G.

El péptido sustrato RRREEETTTEEEE fue donado por el Dr. Rodrigo Bravo, entonces en el European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania. El péptido sustrato RRREEETEEEEE fue adquirido en Penninsula Laboratories.

Los péptidos sintéticos de tubulina: RRRGVOSVEGEGEEEGEE y RRRGVDSVEGEGEEGGEEY; los péptidos inhibidores: Y₂E₉, E₉Y₂, E₃YE₄YE₂ y D₃YD₄YD₂; los péptidos sustratos: R₃EYE₂TE₄, R₃E₃YTE₄ y R₃E₃FTE₄, fueron sintetizados y purificados por el Dr. Sandor Pongor del International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italia.

La tubulina fue preparada y purificada por la Sra. Marina Acoria y donada por el Dr. Octavio Monasterio, Laboratorio Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 de

4,2 kDa y el copolímero de ácido glutámico y tirosina 1:1 (12,5 kDa) fueron donados por el Dr. Michael Sela del Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

Los derivados poliglutamilados del ácido fólico, del ácido para-amino-benzoico y metotrexato fueron obtenidos de Dr. B. Schirchs Laboratories, Jona, Suiza.

La caseínaquinasa II de levadura fue donada por el Dr. Hans Sternbach del Max Planck Institute, Göttingen, Alemania.

DEAE Sephadex A-25 y Sephadex G-25 fueron adquiridos en Pharmacia Fine Chemicals.

Los papeles Whatman P81 y Whatman 3 MM provienen de Whatman y R. Balstm. Ltda.

[³²P] fosfato se adquirió tanto en Amersham International como en New England Nuclear Research Products.

Las hembras adultas de *Xenopus laevis* fueron adquiridas en South African Snake Farm, Cape Province, R.S.A y mantenidas en tanques a 22 °C.

B. METODOS

1. Síntesis de [γ -³²P]-ATP

El [γ -³²P]-ATP se preparó según el método de Walseth y Johnson (Walseth y Johnson, 1979).

El procedimiento experimental se describe a

continuación: la solución de ^{32}Pi (10 mCi) en HCl 0,2 N se lleva a pH 8,0 con NaOH 2 N. Luego la solución se incuba por una hora a 37 °C en un medio compuesto por: Tris-HCl 80 mM, pH 9; DTT 10 mM; L- α -glicerofosfato 0,2 mM; NAD^+ 0,8 mM; MgCl_2 20mM; ADP 0,08 mM; piruvato de sodio 2 mM; L- α -glicerofosfatodeshidrogenasa 14 $\mu\text{g/ml}$ (0,8 unidades); triosafosfatoisomerasa 140 $\mu\text{g/ml}$ (0,7 unidades) ; gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa 14 $\mu\text{g/ml}$ (1,1 unidades); 3-fosfogliceratoquinasa 1,4 $\mu\text{g/ml}$ (0,6 unidades) y lactatodeshidrogenasa 7 $\mu\text{g/ml}$ (3,5 unidades). El volumen final es de 1 ml. Las enzimas suspendidas en sulfato de amonio se mezclan previamente en la proporción adecuada, se centrifugan a 1.000 x g por 10 minutos y el residuo se resuspende en una solución amortiguadora que contiene Tris-HCl 50 mM, pH 9 y DTT 1 mM, para luego agregarlas a la mezcla de reacción. La reacción se detiene calentando a 100 °C durante 2 minutos.

La determinación de la pureza del [γ - ^{32}P] ATP sintetizado, así como también del rendimiento de la incorporación de ^{32}Pi en [γ - ^{32}P] ATP, se realiza a través de una cromatografía ascendente en placas de polietilenimino celulosa, usando como solvente fosfato de potasio 0,75 M, pH 3,5. La migración del patrón de ATP se determina exponiendo la placa cromatográfica a la luz U.V. de onda corta. El ATP migra a una distancia relativa (R_f) entre 0,4 y 0,5.

2. Preparación de la caseína desfosforilada

La caseína desfosforilada, la cual se utiliza como sustrato de la caseínaquinasa II, es preparada según el método descrito por Hathaway y Traugh (Hathaway y Traugh, 1983) y que consiste en lo siguiente: se resuspende 10 g de caseína mixta en 100 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 9,5. La solución se calienta a 100 °C y se mantiene a esa temperatura durante 10 minutos. Si es necesario, se adiciona NaOH 0,1 N para mantener el pH en 9,5. Luego se dializa la caseína extensivamente contra 40 volúmenes de una solución que contiene: amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EGTA 1 mM, pH 7,5; y EDTA 5 mM, pH 7,5. Finalmente, se dializa contra 10 volúmenes de agua durante 48 horas, cambiando seis veces. La solución se guarda congelada a -20 °C en una concentración de 60 mg/ml.

3. Preparación de la caseínaquinasa II de núcleos de oocitos de *Xenopus laevis*

3.a. Obtención del ovario de *Xenopus laevis*

Las hembras adultas de *Xenopus laevis* son anestesiadas previamente por hipotermia en un baño de agua con hielo. El ovario se extrae quirúrgicamente mediante una pequeña incisión en el abdomen. El ovario extraído se coloca en solución salina de Barth para anfibios y se mantiene en ella a 4 °C. Esta solución tiene los siguientes componentes:

amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; MgSO₄ 0,82 mM; CaCl₂ 0,74 mM; KCl 1 mM; Ca(NO₃)₂ 0,33 mM; NaCl 88 mM; NaHCO₃ 2,4 mM; penicilina 0,1 mM y estreptomina 0,1 mM).

3.b. Obtención de oocitos estado VI

Se aíslan los oocitos provenientes de cuatro ovarios de rana. Para esto, se cortan los ovarios en trozos pequeños y se lavan con solución salina de Barth. Luego se incuban por 3 a 4 horas a 22 °C en la misma solución a la cual se le adiciona colagenasa en una concentración final de 0,2% p/v. Este tratamiento disocia el tejido del ovario, dejando oocitos libres y células foliculares en suspensión. Se deja decantar los oocitos, se elimina la solución de incubación y las células se lavan repetidas veces. De esta forma se elimina parte de las células foliculares, así como también los oocitos de los primeros estados de la ovogénesis y los trozos de tejido conectivo. Los oocitos de distinto tamaño se separan de acuerdo a su diámetro por filtración a través de una malla de nylon (Nitex) (Burzio y Koide, 1977), con la cual se retienen los oocitos que poseen más de 700 µm y que corresponden a oocitos de los estados IV, V y VI. (Dumont, 1972). Finalmente, los oocitos de estados V y VI (1.000 a 1.300 µm de diámetro) se separan de los de estado IV (700 a 900 µm) en forma manual. Todo este procedimiento se realiza a 4 °C en la solución salina.

3.c. Obtención de núcleos aislados

La obtención de núcleos se realiza de acuerdo a la técnica de Burzio y Koide (Burzio y Koide, 1976), con algunas modificaciones. Los oocitos de los estados V y VI separados por el procedimiento ya señalado, se colocan en forma de monocapa en tubos de centrifuga de 250 ml con 15 ml de solución salina, a la cual se agrega proteasa (tipo VII) en una concentración final de 0,01% y se incuba durante 15 minutos a 25 °C. Al término de la incubación se elimina la solución por succión, se adiciona 5 ml de solución salina conteniendo PMSF 0,5 mM y se deja reposar durante 5 minutos. Esta operación se repite dos veces. A continuación, los oocitos se suspenden en 10 ml de solución de lisis, constituida por sacarosa 0,25 M; PMSF 0,5 mM; MgCl₂ 3,5 mM y tritón X-100 0,2%. La suspensión se mantiene en hielo por 10 minutos y luego se centrifuga a 250 x g por 10 minutos a 4 °C. Se adiciona 30 ml de una solución que contiene sacarosa 0,25 M; MgCl₂ 7 mM; PMSF 0,5 mM y tritón X-100 0,1% (solución A).

Los núcleos liberados y suspendidos se colocan sobre una malla de nylon de 25 µm, la que se mantiene sumergida en la solución A. Se lavan los núcleos pasando sobre ellos solución A hasta eliminar todos los residuos ajenos a la suspensión de núcleos. Los núcleos se colectan con una pipeta Pasteur y se colocan en un tubo que contiene una solución de

sacarosa 0,25 M y $MgCl_2$ 7 mM. Todas estas últimas etapas se realizan también a 4 °C.

3.d. Preparación de los extractos nucleares

Los núcleos, obtenidos por el método anteriormente descrito, se colocan en un volumen adecuado de una solución cuya composición es la siguiente: amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; $MgCl_2$ 7 mM; EDTA 1 mM; DTT 0,5 mM y glicerol 5% (amortiguador A). Luego se agrega sulfato de amonio para obtener una concentración final de 0,3 M y se homogeneiza a 4 °C, utilizando un homogeneizador con vástago de vidrio. Se diluye este extracto con amortiguador A, hasta obtener una concentración de sulfato de amonio de 0,1 M. Se centrifuga a 40.000 x g por 20 minutos a 4 °C y se recupera el líquido sobrenadante.

3.e. Purificación de la caseínaquinasa II del extracto nuclear

La purificación de la enzima se realiza por fraccionamiento en DEAE-Sephadex, seguido de una cromatografía en fosfocelulosa. Este método fue descrito originalmente por Hathaway y Traugh (Hathaway y Traugh, 1983) y modificado en nuestro laboratorio. (Leiva y col., 1987; Taylor y col., 1987).

3.e.i. Cromatografía en DEAE-Sephadex

Al líquido sobrenadante, correspondiente a la

última etapa de la preparación del extracto de núcleos, se le agrega NaCl hasta obtener una concentración de 0,05 M. Se equilibra la columna (1,4 cm x 5 cm) con amortiguador A que contiene NaCl 0,05 M. Se coloca la muestra en la columna y se lava con 10 volúmenes de la misma solución. La elución se realiza mediante una gradiente lineal de NaCl entre 0,05 y 1M, utilizando el equivalente a 20 volúmenes de columna (160 ml). Se colectan fracciones de 2 ml, a las cuales se les determina la absorbancia a 280 nm y las actividades de las caseínaquinasas I y II. La caseínaquinasa II eluye entre 0,22 y 0,25 mM NaCl.

3.2.ii. Cromatografía en fosfocelulosa

Se juntan las fracciones que contienen actividad de caseínaquinasa II, eluidas de la cromatografía anterior, y se le adiciona sulfato de amonio hasta una saturación de 80%. El sedimento obtenido se colecta por centrifugación a 10.000 x g por 10 minutos y se disuelve en un mínimo de una solución constituida por fosfato de sodio 25 mM, pH 6,8; 2-mercaptoetanol 10 mM; EDTA 1 mM; EGTA 2 mM (amortiguador B). Se agrega NaCl hasta obtener una concentración final de 0,25 mM y se aplica a una columna de fosfocelulosa (1,4 cm x 5 cm), equilibrada con amortiguador B. Se lava con 10 volúmenes de amortiguador B que contiene 0,25 M NaCl y se eluye con una gradiente lineal entre 0,25 y 1 M de NaCl, utilizando el equivalente a 20 volúmenes de columna. Se colectan fracciones

de 4 ml y se mide la absorbancia a 280 nm y la actividad de la caseínaquinasa II. Esta última eluye a una concentración de NaCl de 0,7 M. Se colectan las fracciones que tienen actividad para caseínaquinasa II y se conservan a 4 °C.

Esta preparación contiene la caseínaquinasa II purificada y presenta normalmente entre 150 a 250 unidades por ml. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 pmol de [32 P] fosfato en caseína por minuto, en condiciones estándar. La preparación contiene aproximadamente 10 µg de proteína por ml y la actividad específica estimada es de 25 nmoles de [32 P] fosfato incorporados en caseína por minuto y por mg de proteína.

4. Preparación de las subunidades α y β de la caseínaquinasa II

Las subunidades α y β de la caseínaquinasa II de *Xenopus laevis* fueron clonadas y expresadas en el laboratorio por A.Jedlicki y M.V.Hinrichs (Jedlicki y col., 1992). Las preparaciones utilizadas fueron también purificadas en el laboratorio por M.Gatica (Gatica, M., comunicación personal). La preparación de la subunidad α contenía 2 a 3 nmoles /ml y la de la subunidad β , entre 15 a 20 nmoles/ml.

5. Preparación de la subunidad α mutada

La subunidad α mutada fue preparada por A. Jedlicki en el laboratorio, según la técnica de "primer overlap" (Ho y

col., 1989). En esta subunidad las lisinas 75 y 76 se reemplazaron por residuos de ácido glutámico. También fue purificada en el laboratorio y las preparaciones contenían aproximadamente 3 nmoles/ml.

6. Determinación de la actividad de la caseínaquinasa II

La actividad de la caseínaquinasa II se determina midiendo la cantidad de [^{32}P] fosfato incorporado en el sustrato proteico, a partir de [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP, el cual se utiliza como dador de fosforilo.

6.a. Ensayo estándar

El ensayo estándar de actividad de la caseínaquinasa II se realiza según la técnica descrita por Hathaway y Traugh (Hathaway y Traugh, 1983), con algunas modificaciones.

En un volumen final de 30 μl se tienen los siguientes componentes: Hepes 50 mM, pH 7,8; KCl 150 mM; MgCl_2 7 mM; DTT 10 mM; [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP 100 μM (0,5 a 2,0 $\mu\text{Ci}/\text{pmol}$) y caseína desfosforilada 5 mg/ml. Se incuba a 30 $^\circ\text{C}$ por 10 o 15 minutos (según el ensayo), considerando que la reacción es lineal hasta los 30 minutos (Leiva y col., 1987). La reacción se inicia agregando 0,5 a 3,0 unidades de la enzima purificada. Se detiene la reacción colocando una alícuota de 25 μl del incubado en un trozo de papel de fosfocelulosa Whatman P81 de 2 cm x 1 cm. Estos trozos de papel, correspondiendo cada uno de ellos a un tubo de reacción, se

lavan con una solución que contiene ácido ortofosfórico 75 mM. El lavado se repite 3 veces, durante 10 minutos cada vez. Los trozos de papel se secan y la radiactividad se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido.

Para descontar la actividad de proteínasquinasa proveniente de una posible contaminación con caseínaquinasa I, se realiza el ensayo en presencia y en ausencia de heparina en concentración de 10 µg/ml (Leiva y col., 1987). A esta concentración la heparina inhibe casi en un 100% la actividad de la caseínaquinasa II. De esta forma se determina como actividad caseínaquinasa II aquella que es inhibida por heparina y se calcula restando la actividad remanente en presencia de heparina de la actividad medida en ausencia del inhibidor. La actividad no inhibida por heparina variaba entre 1 y 5% de la actividad total en las diferentes preparaciones.

6.b. Ensayo de la actividad enzimática de la subunidad α

Para ensayar la actividad de la subunidad α se utiliza el ensayo estándar, pero en vez de la caseínaquinasa II se utiliza 1-2 pmoles de la subunidad α (42 a 84 ngramos) de una preparación con una actividad específica de 65 nmoles de fosfato incorporados por minuto y por mg de proteína, de manera de tener entre 0,5 y 3,0 unidades de actividad enzimática por ensayo. La concentración de KCl en el ensayo fue 50 mM, a menos que se indique otro valor.

6.c. Ensayo de la actividad enzimática usando enzima reconstituida

Para ensayar la actividad enzimática con enzima reconstituida se usa el ensayo estándar, pero en vez de caseínaquinasa II se utilizan cantidades equimolares de las subunidades α y β (1,5 pmoles por ensayo de cada una, lo que equivale aproximadamente a 60 ng de subunidad α y 40 ng de subunidad β). En estas condiciones se obtiene entre 2 y 3 unidades de actividad enzimática. La concentración de KCl en el ensayo fue 120 mM, a menos que se indique otro valor.

6.d. Determinación de la actividad enzimática utilizando péptido sustrato

La actividad enzimática de la caseínaquinasa II se determina en este caso a través del ensayo estándar, pero usando una concentración de péptido sustrato de 3,5 mM, a menos que se indique otro valor.

6.e. Determinación de la actividad enzimática utilizando los péptidos de tubulina como sustratos

En este caso, la actividad enzimática de la caseínaquinasa II se determina a través del ensayo estándar, pero usando los péptidos de tubulina como sustratos, en una concentración de 4,2 mM.

6.f. Determinación de la actividad enzimática utilizando tubulina como sustrato

La actividad de la caseínaquinasa II se determina en este caso utilizando el mismo medio de incubación descrito en el ensayo estándar, pero usando tubulina como sustrato, en una concentración de 5 µg/µl. La reacción se detiene colocando una alícuota de 25 µl en un trozo de papel Whatman 3 MM, de 2 cm x 1 cm. Los trozos de papel se lavan una vez en una solución de TCA al 10%, pirofosfato de sodio 10 mM y ATP 1 mM, seguido de 5 lavados en TCA al 10% y pirofosfato de sodio 10 mM. Los papeles se lavan con etanol, se secan y se cuantifica la radiactividad por espectrometría de centelleo líquido.

La tubulina purificada se encuentra en un medio con fosfato 10 mM, MgCl₂ 0,5 mM y sacarosa 1 M. Para utilizar esta tubulina como sustrato, se cambia este medio por una solución amortiguadora de Hepes 50 mM, pH 7,9, para lo cual se procede de la siguiente manera: en una jeringa de 5 ml se coloca Sephadex G-25 y se equilibra con la solución de amortiguador Hepes 50 mM, pH 7,9. Esta columna se centrifuga a 3.000 x g por 3 minutos. La tubulina, diluída 1:1 con la misma solución amortiguadora, se coloca sobre la resina seca y se centrifuga nuevamente a 3.000 x g durante 3 minutos. La tubulina se recupera en el filtrado y se le determina la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

Cuando se utiliza [^{14}C] tubulina como sustrato, para calcular las dpm de [^{32}P] incorporadas en tubulina se debe descontar de las dpm totales aquellas que corresponden al ^{14}C .

6.g. Determinación de la actividad enzimática de la caseínaquinasa II de levadura

Para ensayar la actividad de la enzima de levadura se utiliza el ensayo estándar, pero usando 3 unidades de caseínaquinasa II de levadura.

7. Determinación de la actividad enzimática de la caseínaquinasa I de oocitos de *Xenopus laevis*

Cuando se prepara la caseínaquinasa II, la caseínaquinasa I se obtiene en la cromatografía en DEAE Sephadex del extracto nuclear, en la cual eluye a una concentración de NaCl entre 0,10 y 0,18 mM. Se colecta las fracciones correspondientes al pico cuya actividad proteínaquinasa es insensible a heparina y se conservan a 4 °C. Esta preparación contiene entre 50 y 150 unidades de caseínaquinasa I por ml. La unidad de actividad de la caseínaquinasa I se define de igual forma que la de la caseínaquinasa II.

Para ensayar la actividad de la caseínaquinasa I se utiliza el mismo ensayo estándar que para la caseínaquinasa II, pero usando 0,5 unidades de la enzima. La actividad de la caseínaquinasa I corresponde a la actividad que se obtiene en presencia de heparina.

8. Tirosinilación de la tubulina con [^{14}C] tirosina

La tirosinilación de la tubulina se realizó en el Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, conjuntamente con el Sr. Carlos González y bajo la asesoría del Dr. Octavio Monasterio.

Se siguió el método descrito por Arce y col. (Arce y col., 1975), el cual se detalla a continuación: se tiene 50 μg de tubulina purificada de cerebro de pollo en 0,2 ml de un medio que contiene ATP 3,125 mM; KCl 3,75 mM; MgCl_2 16,25 mM; tirosina 0,125 mM y 1,8 mCi de [^{14}C] tirosina. A esta solución se le agrega 0,8 ml de extracto de cerebro de pollo y se incuba durante 30 minutos a 37 °C.

El extracto de cerebro de pollo contiene la actividad enzimática de tubulinatirosinaligasa y se prepara de cerebros recién extraídos, procediendo como se indica brevemente a continuación: se homogeneiza el tejido con una solución que contiene fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0; MgCl_2 5mM; GTP 0,1 mM y sacarosa 0,24 mM, en una relación de 1 ml de solución por cada gramo de tejido. Luego se centrifuga a 100.000 x g durante 1 hora a 4 °C. En el líquido sobrenadante se encuentra la actividad tubulinatirosinaligasa. Puesto que en esta preparación deben estar presentes numerosas proteasas, cuando se ensaya la actividad tubulinatirosinaquinasa se realizan dos incubaciones, una en ausencia y otra en presencia

de benzamidina 0,05 M. Este compuesto es un eficiente inhibidor de proteasas y se adiciona para comprobar si se modifica o no la eficiencia de la tirosinilación.

9. Análisis de la [^{14}C] tubulina

La tubulina tirosinilada con [^{14}C] tirosina, en presencia y en ausencia de benzamidina, se separa de la [^{14}C] tirosina libre por filtración en Sephadex G-25, según el método descrito en el punto 6.f. A la tubulina presente en el filtrado se le determina la incorporación de [^{14}C] tirosina, contando una alícuota de este filtrado por espectrometría de centelleo líquido. A ambas preparaciones se les determinó proteínas por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

10. Cinética de digestión de la tubulina con carboxipeptidasa A

La carboxipeptidasa A (CPA) de páncreas de bovino se trata según indica el catálogo de Sigma Chem.Co.: se toma 1 mg de CPA disuelta en tolueno:agua y se lleva a sequedad bajo N_2 . El residuo se disuelve en 15 μl de NaOH 0,1 N, se agrega 40 μl de bicarbonato de sodio al 1% y se diluye con agua hasta 350 μl .

La digestión con CPA se realiza según el método de Kumar y Flavin (Kumar y Flavin, 1981), el cual consiste en lo siguiente: un volumen de tubulina se diluye con un volumen de amortiguador Hepes 0,05 M, pH 8,0. El volumen del amortiguador

a utilizar depende de la concentración de tubulina y se calcula de manera de obtener una concentración de tubulina de 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A la solución obtenida se le adiciona 1/5 de gramos de CPA por gramo de tubulina y se incuba a temperatura ambiente por los tiempos indicados en cada caso. La digestión se detiene colocando una alícuota del incubado en una alícuota igual de DTT 30 mM a 37 °C por 15 minutos (la concentración final de DTT, 15 mM, inactiva a la CPA en forma irreversible). De aquí se toma una alícuota de 5 μl (que contiene tubulina en concentración de 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para el ensayo de fosforilación de la tubulina con caseínaquinasa II.

11. Determinación de la concentración de los péptidos sintéticos usados como sustratos e inhibidores de la caseínaquinasa II

La concentración de los péptidos sintéticos se determinó en primer término por pesada. En el caso de los péptidos que contienen tirosina y fenilalanina, se confirmó la concentración por espectrometría U.V., considerando el coeficiente de extinción de la tirosina, a pH 7,0, de 1.300 M^{-1}/cm , a 275 nm, y el de la fenilalanina, a pH 7,0, de 200 M^{-1}/cm , a 257 nm (Van Holde, 1971). La diferencia entre ambos métodos no superó el 5%.

12. Tratamiento de los resultados

Cada experimento fue realizado con duplicados o

triplicados en idénticas condiciones. Los gráficos y tablas fueron confeccionados con los valores promedios.

Las determinaciones de los parámetros cinéticos de K_m , K_i y V_{max} se ajustaron con el programa "Leonora" creado por el Dr. Athel Cornish-Bowden, versión 1.0.33., 1993., CNRS-CCBM BP 71., considerando la ecuación:

$$v = V[S]/\{K_m[1+([I]/K_i)]+[S][1+([I]/K_i)]\}$$
, (Cornish-Bowden, 1974). Con los valores obtenidos se realizaron los gráficos de Lineweaver y Burk.

Las determinaciones de los I_{50} normalizados, para contrarrestar el efecto del tamaño de los polipéptidos, se realizaron considerando unidades monoméricas representativas, tanto de los homopolímeros como de los copolímeros. Por ejemplo, para el ácido poliglutámico se consideró Glu_5 , para el copolímero de ácido glutámico y tirosina en proporción 4:1 se consideró Glu_4Tir_1 , para el copolímero de ácido glutámico y fenilalanina en proporción 4:1 se consideró Glu_4Fen_1 , etc. Los valores de estas masas moleculares se utilizaron para calcular las concentraciones de las unidades monoméricas usadas en cada caso.

RESULTADOS

A. ESTUDIO DEL EFECTO DE POLIMEROS POLIPEPTIDICOS DE L-AMINOACIDOS ACIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II DE *XENOPUS LAEVIS*

Como se estableció en la Introducción, la caseínaquinasa II tiene una especificidad bien definida que se caracteriza por fosforilar proteínas en serinas o treoninas insertas en una secuencia de aminoácidos ácidos. Con este antecedente resultó de interés estudiar el efecto de polipéptidos ricos en aminoácidos ácidos como lo son el ácido poliglutámico y el ácido poliaspártico.

1. Efecto del ácido poliglutámico y del ácido poliaspártico sobre la actividad de la caseínaquinasa II

En la Figura 1.A y 1.B. se muestra el porcentaje de actividad enzimática como función de la concentración micromolar de los polipéptidos ácido poliglutámico, de 43 kDa, y ácido poliaspártico, de 42,5 kDa.

Se puede observar que el ácido poliaspártico es mejor inhibidor de la caseínaquinasa II que el ácido poliglutámico, obteniéndose un I_{50} de 5 μM para el ácido poliglutámico y de 0,25 μM para el ácido poliaspártico.

También se analizó como influye el peso molecular de los polipéptidos en el efecto inhibidor que ellos ejercen.

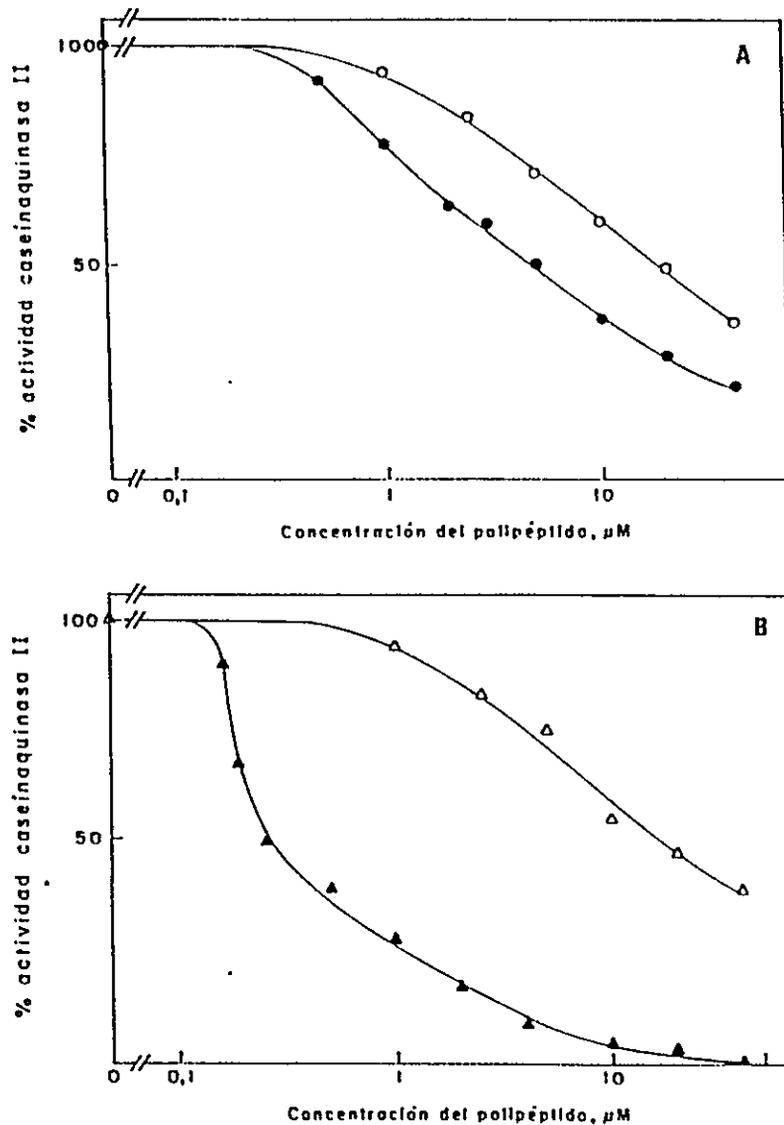


FIGURA 1: INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR POLIPEPTIDOS DE AMINOACIDOS ACIDOS.

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml, en presencia de diferentes concentraciones de polipéptidos de aminoácidos ácidos.

A: ácido poliglutámico de 43 kDa (●), y ácido poliglutámico de 14 kDa (○).
B: ácido poliaspártico de 42,5 kDa (▲) y ácido poliaspártico 11,5 de kDa (△).

El 100% corresponde a la actividad determinada en ausencia de polipéptidos inhibidores. El 100% corresponde a una incorporación de 1,4 pmoles/min de [^{32}P] fosfato cuando se utilizó los inhibidores de mayor peso molecular y de 0,2 pmoles/min cuando se utilizó los inhibidores de menor peso molecular.

En la Figura 1.A. se muestra, en forma comparativa, el efecto del ácido poliglutámico de 14 kDa, junto con los valores obtenidos con el ácido poliglutámico de 43 kDa.

A su vez, en la Figura 1.B. se muestra, de igual forma, lo que ocurre al usar como inhibidor ácido poliaspártico de 11,5 kDa y se compara su efecto con el del ácido poliaspártico de peso molecular casi 4 veces mayor (42,5 kDa).

Los resultados muestran que los I_{50} de los polipéptidos de menor peso molecular son 20 μM para el ácido poliglutámico y 15 μM para el ácido poliaspártico.

Esto indica que el efecto inhibidor es menor al disminuir el peso molecular del polipéptido. Al calcular los I_{50} basándose en una unidad monomérica $(\text{Glu})_5$ o $(\text{Asp})_5$ (ver Materiales y Métodos), se tiene los valores de 420 μM y 290 μM para el ácido poliglutámico y para el ácido poliaspártico, respectivamente. Al comparar estos valores de I_{50} con los calculados en forma similar para los polipéptidos de mayor peso molecular, que son 324 μM para el ácido poliglutámico y 18 μM para el ácido poliaspártico, se ve que en el caso de los polipéptidos de ácido aspártico hay un aparente efecto adicional por el tamaño del polipéptido, cosa que no se evidencia en el caso de los polipéptidos de ácido glutámico. Analizando los resultados obtenidos en la sección A.1., se concluye que los homopolímeros de aminoácidos ácidos son

buenos inhibidores de la actividad de la caseínaquinasa II de oocitos de *Xenopus laevis*, teniendo una mayor capacidad inhibidora el homopolímero de ácido aspártico.

2. Efecto de copolímeros de ácido glutámico y aminoácidos aromáticos o neutros sobre la actividad de la caseínaquinasa II

Para analizar en una forma más acabada el grado de sensibilidad de la caseínaquinasa II a polipéptidos con aminoácidos con carga negativa, se inició una serie de estudios usando como inhibidores polímeros de ácido glutámico en los cuales se encuentran intercalados al azar aminoácidos de otro tipo. Este estudio también pudo haberse realizado con polímeros de ácido aspártico, sin embargo, se utilizaron polipéptidos ricos en residuos de ácido glutámico debido a su disponibilidad comercial, lo cual no ocurre en el caso de los polipéptidos ricos en ácido aspártico.

Así, se analizó el efecto inhibitor de copolímeros de ácido glutámico con diferentes contenidos de aminoácidos alifáticos neutros o aromáticos. Por ejemplo, se analizó el efecto de los copolímeros glu:ala, 6:4; glu:leu, 4:1; glu:fen, 4:1 y glu:tir, 4:1 y los resultados se presentan en las Figuras 2 y 3.

En la Figura 2 se presentan las curvas obtenidas con

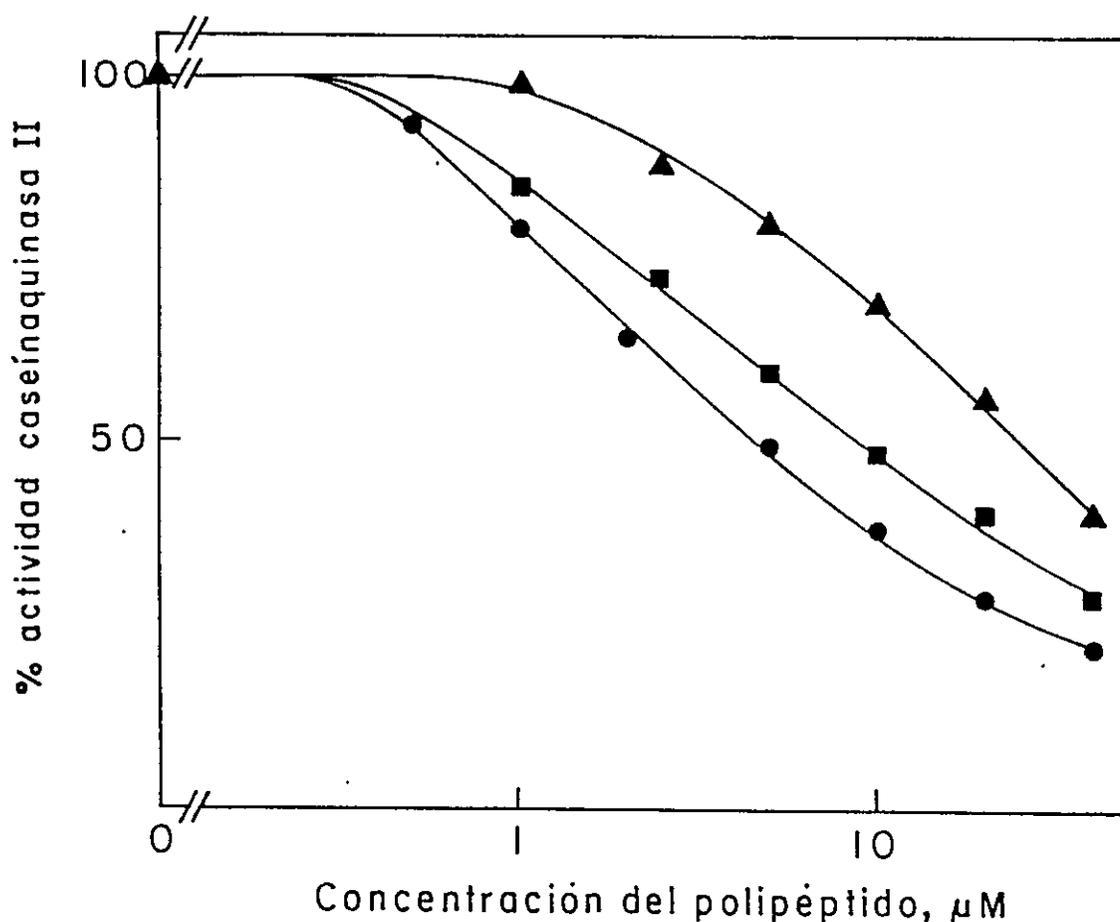


FIGURA 2: INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR COPOLIMEROS RICOS EN ACIDO GLUTAMICO

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml, en presencia de diferentes concentraciones de ácido poliglutámico de 43 kDa (●) copolímero de ácido glutámico y leucina (4:1) de 10 kDa (■) y copolímero de ácido glutámico y alanina (6:4) de 30 kDa (▲). El 100% corresponde a la actividad determinada en ausencia de polipéptidos inhibidores. El 100% corresponde a una incorporación de [^{32}P] fosfato de 1,4 pmoles/min cuando se utilizó el inhibidor ácido poliglutámico y 0,9 pmoles/min en el caso de los inhibidores constituidos por ácido glutámico y leucina o alanina.

ácido poliglutámico y con los copolímeros glu:ala y glu:leu. Por su parte, en la Figura 3 se muestran las obtenidas con poliglu; glu:fen, 4:1 y glu:tir, 4:1. Se puede observar que los copolímeros de ácido glutámico y alanina y de ácido glutámico y leucina son menos efectivos como inhibidores, comparados con el ácido poliglutámico. Los valores de los I_{50} , expresados según las unidades monoméricas, son 2,23 mM para el copolímero de ácido glutámico y alanina y 1,26 mM para el copolímero de ácido glutámico y leucina.

Los copolímeros de ácido glutámico y fenilalanina 4:1 y de ácido glutámico y tirosina 4:1 mostraron ser muy diferentes en su capacidad para inhibir a la caseínaquinasa II, y se observó una notable sensibilidad de la enzima al copolímero que posee un 20% de tirosinas en su estructura. Este copolímero de ácido glutámico y tirosina, 4:1, presenta un efecto inhibitor superior tanto al del ácido poliglutámico, como al del ácido poliaspártico.

En la Figura 3 se observa el efecto de este copolímero, junto con el del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y fenilalanina. El I_{50} obtenido con el copolímero ácido glutámico:tirosina es de 0,02 μ M, valor que es 2 órdenes de magnitud inferior al del ácido poliglutámico de peso molecular similar.

También se estudió el efecto de un copolímero de

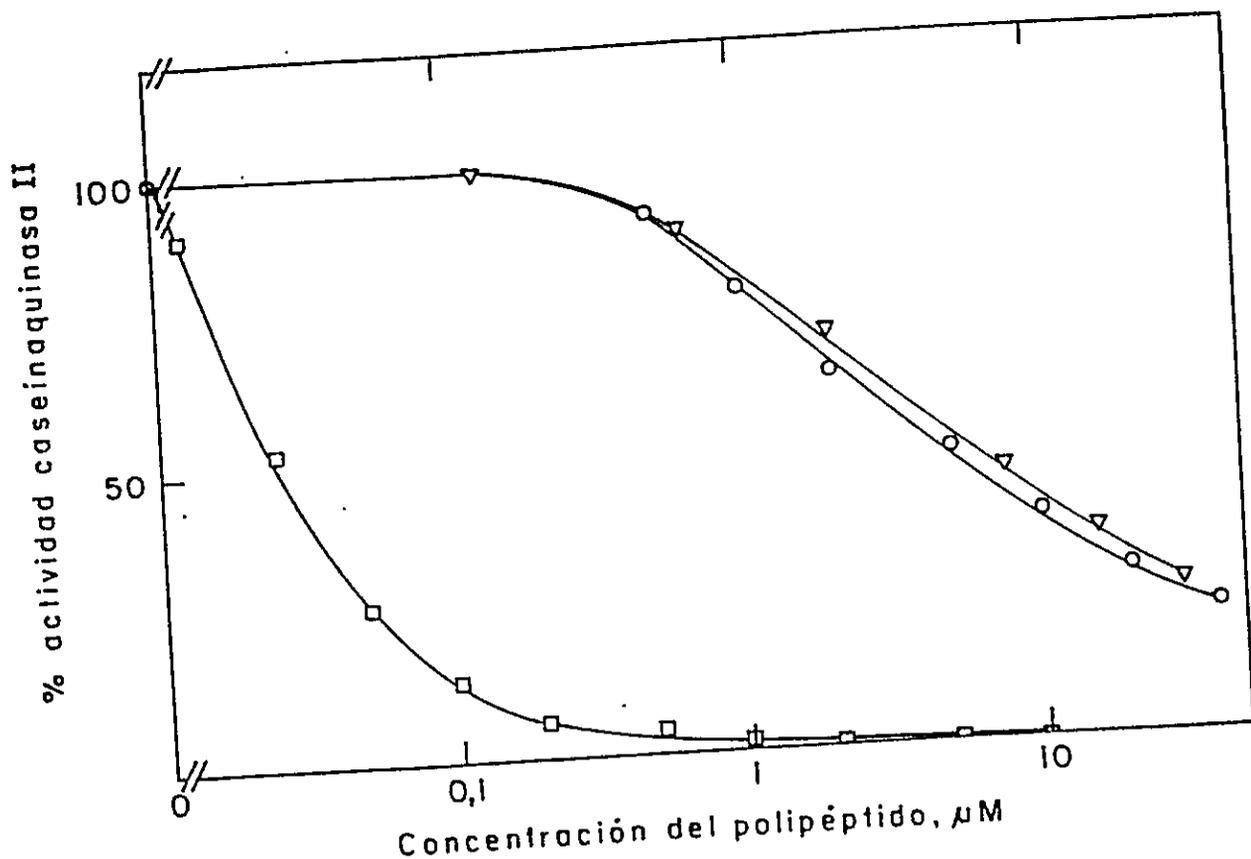


FIGURA 3: INHIBICIÓN DE LA CASEÍNAQUINASA II POR COPOLÍMEROS DE ÁCIDO GLUTÁMICO Y AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS.

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml, en presencia de diferentes concentraciones de copolímero de ácido glutámico y fenilalanina (4:1) de 16 kDa (▽), ácido glutámico y tirosina (4:1) de 46 kDa (□) y ácido poliglutámico de 43 kDa (○). El 100% corresponde a la actividad determinada en ausencia de polipéptidos inhibidores. El 100% equivale a una incorporación de [³²P] fosfato de 1,4 pmoles/min cuando se utilizó el inhibidor de ácido poliglutámico y el copolímero de ácido glutámico y tirosina y de 2,4 pmoles/min en el caso del inhibidor de ácido glutámico y fenilalanina.

ácido glutámico y tirosina 4:1, de 4,2 kDa, y su I_{50} es de 2,5 μM .

El sorprendente efecto de la presencia de tirosina en un polímero de ácido glutámico fue de gran interés y se procedió entonces al estudio del efecto de copolímeros de ácido glutámico y tirosina en los cuales las cantidades de ambos aminoácidos son equivalentes, esto es, donde se altera la distribución de carga del polímero con una cantidad mayor de residuos aromáticos.

Para esto, se utilizaron dos copolímeros de ácido glutámico y tirosina en proporción 1:1, uno de 30 kDa y el otro de 12,5 kDa, y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4. En ella se puede apreciar que estos dos polipéptidos son inhibidores de la enzima, pero su efecto es menor al del copolímero que tiene el ácido glutámico y la tirosina en proporción 4:1.

Esto indica que la proporción de ácido glutámico con respecto a la tirosina es un factor importante en la inhibición que ejercen estos compuestos sobre la caseína-quinasa II.

Resulta evidente que, en los polímeros de secuencia al azar (como lo son todos estos copolímeros), la proporción 4:1 aumenta las probabilidades de que los residuos de tirosina estén separados entre sí por un número aproximado de 4

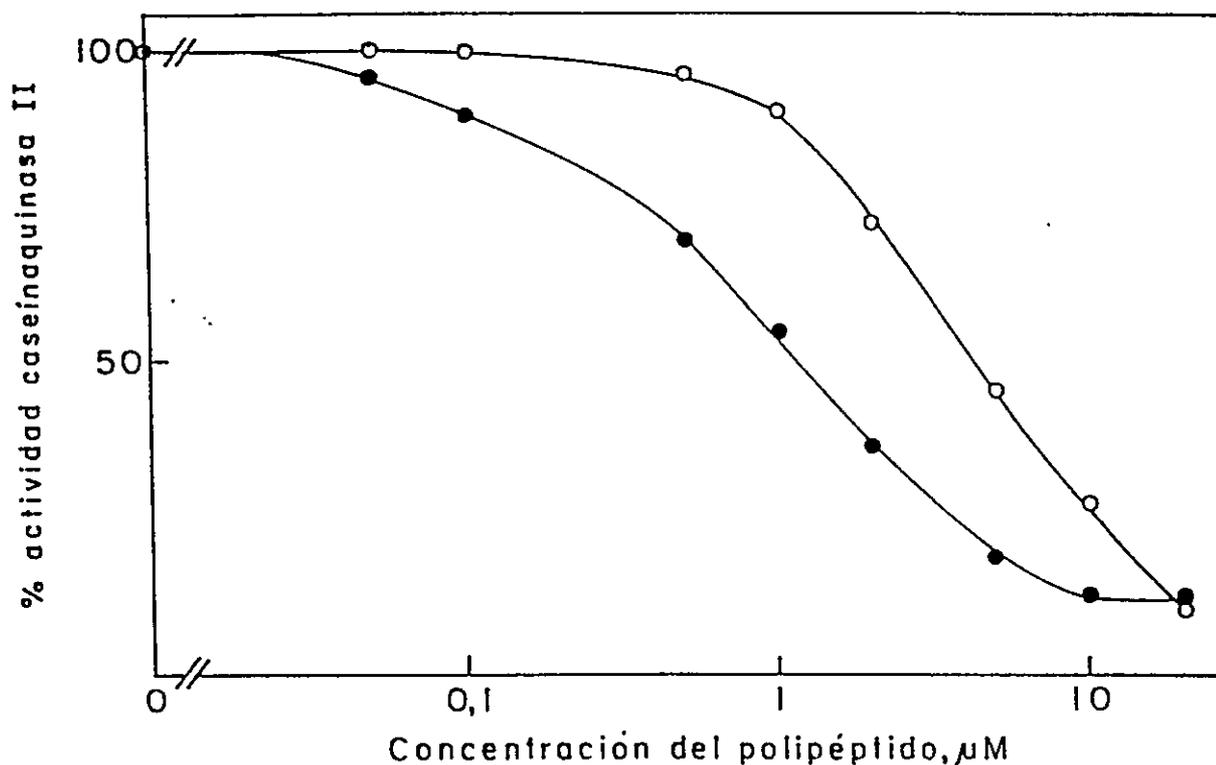


FIGURA 4: INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR COPOLIMEROS DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA EN PROPORCION 1:1.

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml, en presencia de diferentes concentraciones de copolímero de ácido glutámico y tirosina 1:1 de 30 kDa (●) y copolímero de ácido glutámico y tirosina 1:1 de 12,5 kDa (○). El 100% corresponde a la actividad determinada en ausencia de polipéptidos inhibidores. El 100% equivale a una incorporación de [32 P] fosfato de 2,9 pmoles/min cuando se utilizó el copolímero de 30 kDa y de 1,9 pmoles/min cuando se utilizó el copolímero de 12,5 kDa.

residuos de ácido glutámico. Esto indicaría que la enzima presenta mayor afinidad por secuencias con tales características.

Para obtener una mayor discriminación entre los posibles factores que son determinantes para conferir un mayor efecto inhibitor al polipéptido, se probó un copolímero constituido por residuos de ácido glutámico y ácido glutámico esterificado con el grupo etilo y también otros copolímeros. Estos fueron los siguientes: copolímero de ácido glutámico y ácido glutámico esterificado, en proporción 4:1, de 91 kDa; copolímero de ácido glutámico, lisina y tirosina en proporción 6:3:1, de 30 kDa y copolímero de ácido glutámico, alanina y tirosina en proporción 6:3:1, de 25 kDa.

En la Figura 5 se ve el efecto de estos compuestos: el copolímero que tiene la cadena poliglutamilada interrumpida con ácido glutámico esterificado muestra una gran disminución en la capacidad inhibitora, comparado con el ácido poliglutámico, a pesar de tener un peso molecular dos veces mayor. De los copolímeros que poseen, además de los residuos de ácido glutámico y tirosina, un tercer aminoácido, el que tiene lisina ejerce una menor inhibición que el que posee alanina. Este hecho puede atribuirse a la presencia de las lisinas, las cuales, cargadas positivamente, podrían estar contrarrestando parcialmente el efecto de los residuos

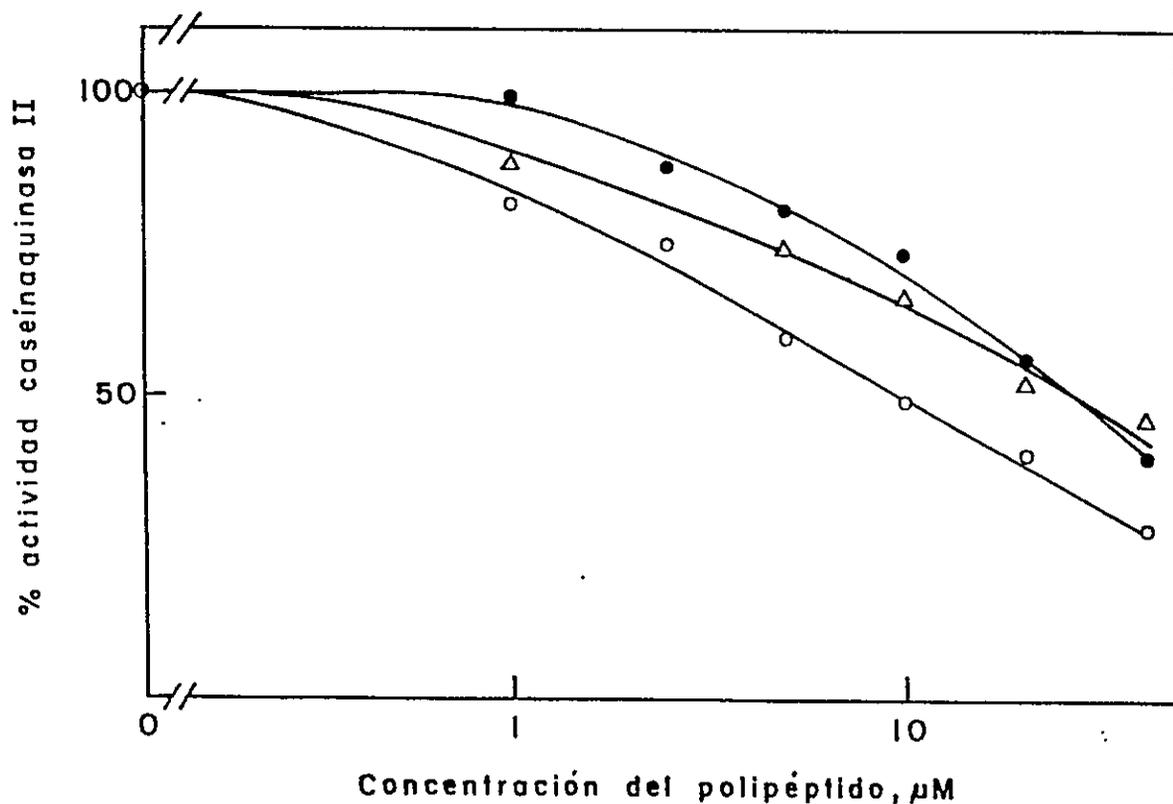


FIGURA 5: EFECTO DE COPOLÍMEROS DE ÁCIDO GLUTÁMICO, TIROSINA, AMINOÁCIDOS NEUTROS Y LISINA SOBRE LA CASEÍNAQUINASA II

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml, en presencia de diferentes concentraciones de los copolímeros: ácido glutámico y ácido glutámico esterificado (γ -glutamato de etilo) (4:1), 91 kDa (Δ), copolímero de ácido glutámico, alanina y tirosina (6:3:1), 25 kDa (\bullet) y ácido glutámico, lisina y tirosina (6:3:1), 28 kDa (\circ). El 100% corresponde a la actividad determinada en ausencia de polipéptidos inhibidores. El 100% equivale a una incorporación de 5,2 pmoles/min cuando se utilizó el copolímero de ácido glutámico y ácido glutámico esterificado y de 2,1 pmoles/min cuando se utilizó los copolímeros de ácido glutámico, alanina y tirosina o ácido glutámico, lisina y tirosina.

aniónicos. Sin embargo, este efecto no es considerable en comparación con factores tales como la interrupción de la cadena polipeptídica por residuos aminoacídicos hidrofóbicos o ramificados.

En la Tabla I se dan los valores de los I_{50} obtenidos directamente y de los valores de I_{50} corregidos según los pesos moleculares. Para este efecto, la concentración del polipéptido se calcula basándose en una unidad monomérica correspondiente a $\text{Glu}_4:\text{X}_1$ (ver Materiales y Métodos). Se puede observar que la presencia de tirosina incrementa la inhibición ejercida por un polímero de ácido glutámico y este efecto se ve como propio solamente de este aminoácido, puesto que otros aminoácidos de naturaleza semejante no son capaces de igualar este efecto. La fenilalanina, que comparte con la tirosina las características de aromaticidad y de tamaño, no puede incrementar la capacidad inhibidora del polímero ácido.

También se observa que la proporción de tirosina presente en el copolímero es importante: el efecto inhibidor es mayor si, en la proporción dada, existe mayor probabilidad de encontrar secuencias en las cuales las tirosinas están separadas entre sí por un número promedio de 4 residuos de ácido glutámico. Por otra parte, en la mayoría de los casos se observa que la interrupción de la cadena de residuos de ácido glutámico por residuos hidrofóbicos, hace que el copolímero presente un menor efecto inhibidor que el homopolímero.

TABLA I: INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR DIFERENTES POLIPEPTIDOS ANIONICOS

POLIPEPTIDO	kDa	μM	I_{50}	μM^*
Acido poliaspártico	11,5	15		290
Acido poliaspártico	42,5	0,25		21
Acido poliglutámico	43	5		324
Acido poliglutámico	14	18		398
Poli glu:tir (4:1)	46	0,02		1,3
Poli glu:tir (4:1)	4,2	2,5		15
Poli glu:fen (4:1)	16	6,4		150
Poli glu:leu (4:1)	10	80		1236
Poli glu:gluOEt (4:1)	91	30		3957
Poli glu:tir (1:1)	12,5	1,3		21
Poli glu:ala (6:4)	30	40		2232
Poli glu:ala:tir (6:3:1)	25	10		428
Poli glu:lis:tir (6:3:1)	28	25		858

*: I_{50} normalizados basándose en una unidad monomérica correspondiente a $\text{glu}_4:\text{X}_1$.

3. Determinación de las constantes de inhibición del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina en proporción 4:1

Es posible pensar que los polipéptidos constituídos por aminoácidos ácidos actúan como inhibidores, uniéndose al sitio activo debido a su semejanza estructural con el sustrato.

La afinidad por el inhibidor podría estar relacionada con el grado de similitud entre el inhibidor y la estructura preferida como sustrato.

Por tal motivo, se hizo el análisis de Lineweaver y Burk para determinar el tipo de inhibición que ejerce tanto el ácido poliglutámico como el copolímero glutámico: tirosina 4:1. En la Figura 6 se muestra el gráfico de Lineweaver y Burk para el ácido poliglutámico, y en la Figura 7 el correspondiente al copolímero glutámico: tirosina 4:1. En ambos casos, los gráficos obtenidos muestran que la inhibición es de tipo competitivo.

Los valores de K_i determinados con este método resultaron ser $7,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ para el ácido poliglutámico, de 43 kDa y $0,023 \pm 0,001 \mu\text{M}$ para el copolímero glutámico:tirosina 4:1, de 46 kDa.

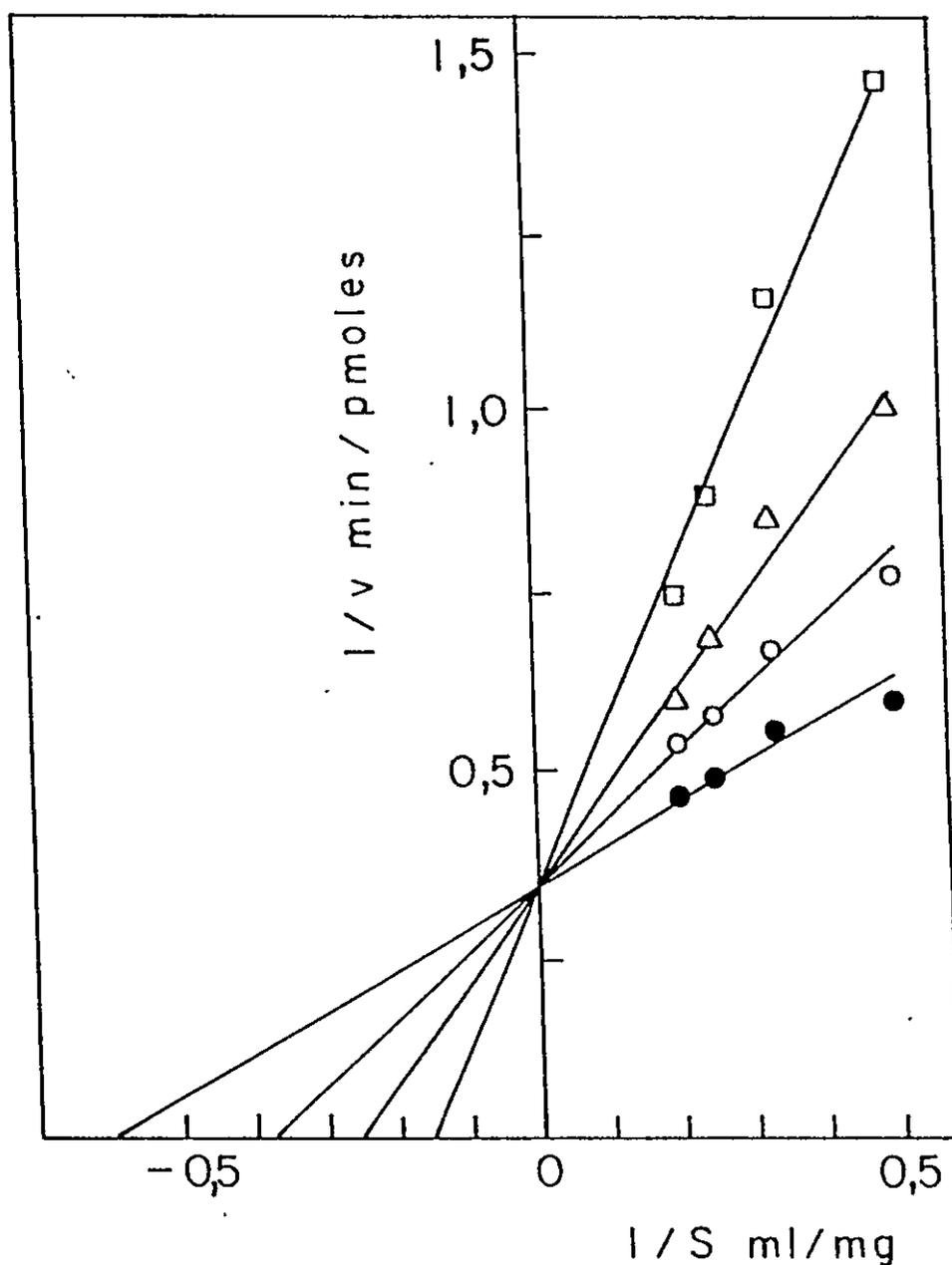


FIGURA 6: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR EL ACIDO POLIGLUTAMICO

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína. La concentración del inhibidor fué: 0 μM (\bullet); 5 μM (\circ), 10 μM (Δ) y 20 μM (\square).

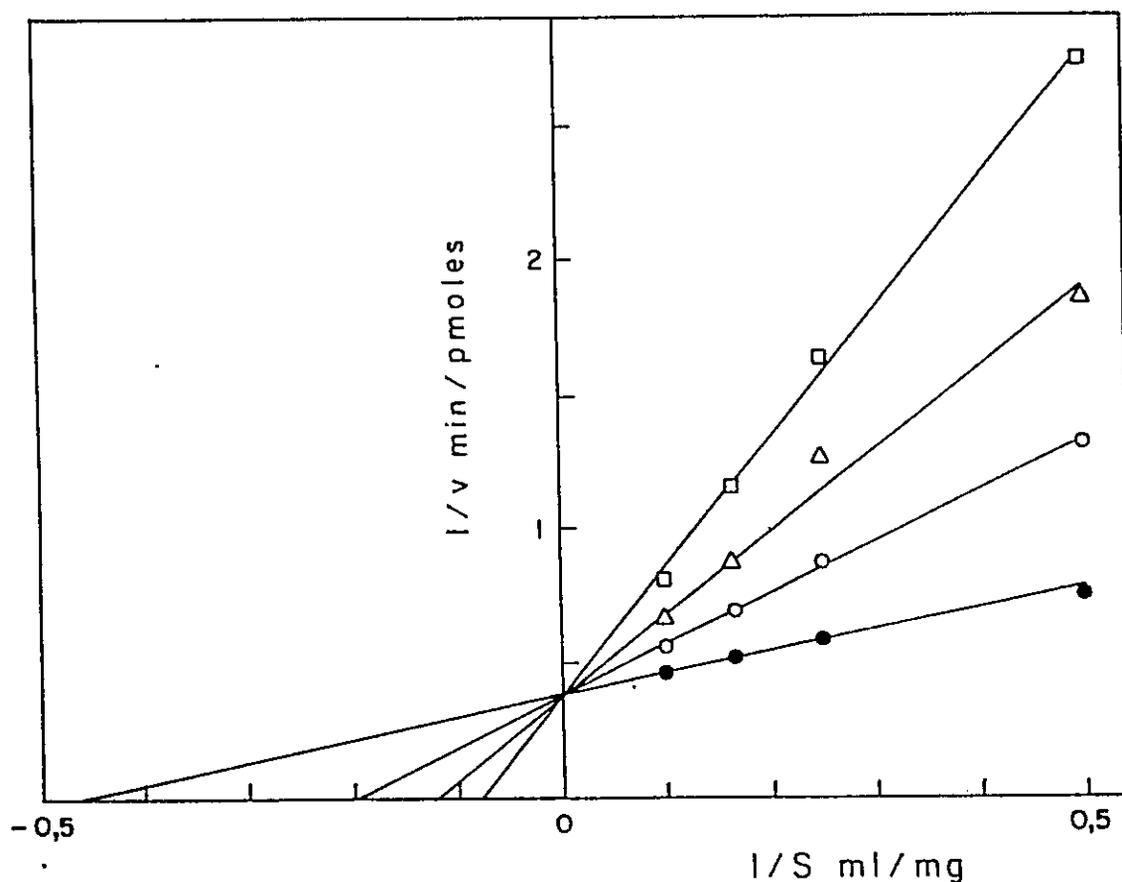


FIGURA 7: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR EL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA 4:1

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína. La concentración del inhibidor fué: 0 μM (●); 0,025 μM (○); 0,05 μM (Δ) y 0,1 μM (□).

4. Efecto de la fuerza iónica en la inhibición ejercida por el ácido poliglutámico y por el copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1

La actividad de la caseínaquinasa II es altamente dependiente de la fuerza iónica. En las condiciones de ensayo utilizadas, el valor óptimo está alrededor de una concentración de KCl o NaCl de 180 mM. Además, como ya se indicó, a concentración de sal de 50 mM o menor, la enzima forma agregados inactivos.

Por esto, fue de interés estudiar el efecto inhibitorio de los polipéptidos ácidos en presencia de diferentes concentraciones de KCl. Para realizar el estudio en forma óptima, se usó las concentraciones de ácido poliglutámico y de poliglu:tir 4:1 que, en las condiciones estándar de sal, producen, en cada caso, un 40% de inhibición. Se aseguró además, que los niveles de actividad enzimática obtenidos a las diferentes concentraciones salinas fuesen lo suficientemente altos como para garantizar una interpretación significativa de los resultados.

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos. Se observa que al aumentar la fuerza iónica sobre 100 mM y sobre 150 mM de KCl, comienza a disminuir el efecto inhibitorio del copolímero de ácido glutámico y tirosina y del ácido poliglutámico, respectivamente.

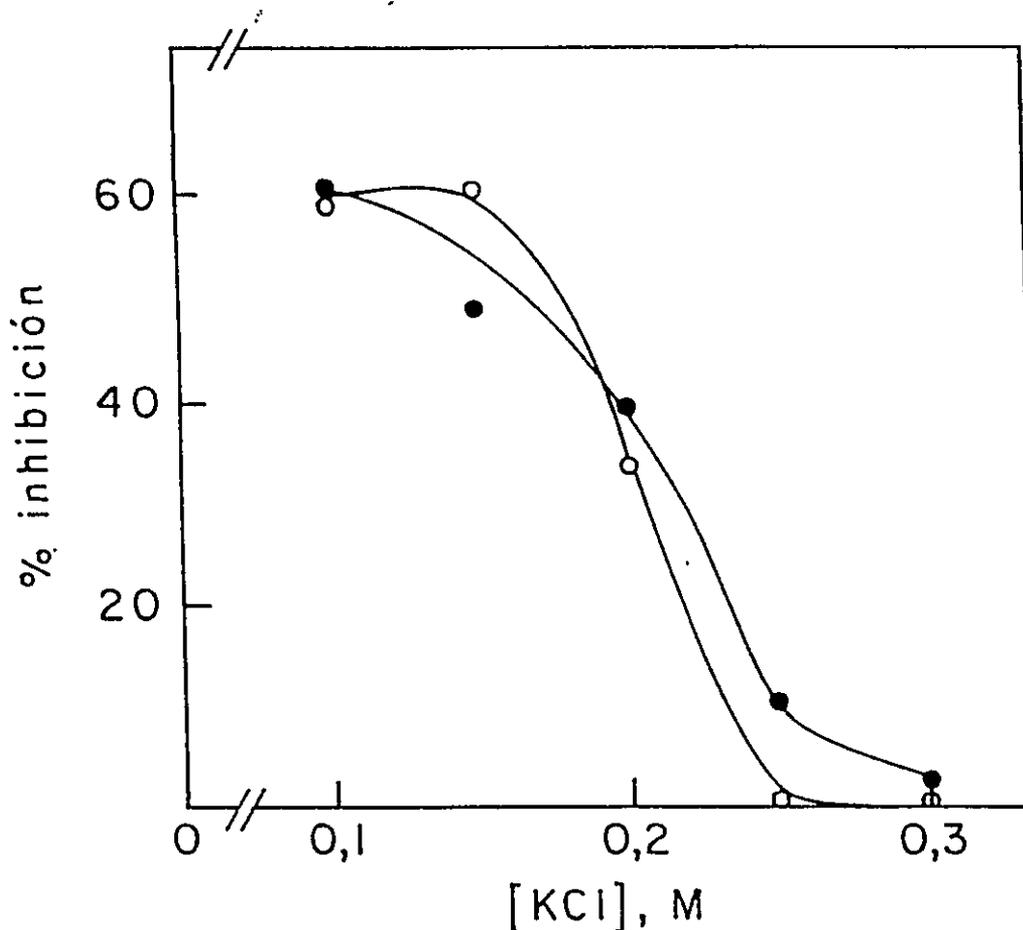


FIGURA 8: EFECTO DE LA FUERZA IONICA SOBRE LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II POR ACIDO POLIGLUTAMICO Y POR EL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO:TIROSINA 4:1

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml y como inhibidores ácido poliglutámico 43 kDa, 85 μ M (○) y el copolímero ácido glutámico:tirosina 4:1, 46 kDa, 35 nM (●), en las correspondientes concentraciones que causan un 60 % de inhibición (a 180 mM de KCl). Las determinaciones se realizaron a diferentes concentraciones de KCl. A cada concentración de KCl se realizó un control sin inhibidor, al cual se le asignó el 100 % de actividad. El 100 % equivale a una incorporación de [32 P] fosfato que fue de 0,3 a 2,4 pmoles/min cuando se utilizó el inhibidor de ácido poliglutámico y que varió entre 0,3 y 2,8 pmoles/min cuando se utilizó el copolímero de ácido glutámico y tirosina.

B. EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA EN PROPORCION 4:1 SOBRE LA ACTIVIDAD DE OTRAS CASEINAQUINASAS

El efecto inhibitor de polianiones, incluyendo algunos poliaminoácidos, sobre la caseínaquinasa II había sido descrito para la enzima de hígado de rata Meggio y col., 1983). Este antecedente y los resultados de esta tesis estarían indicando que la susceptibilidad frente al ácido poliglutámico es propia de las caseínaquinasa II, aun cuando sean de diferentes orígenes.

Para evaluar si una caseínaquinasa II proveniente de otra especie presenta un comportamiento semejante al de la enzima de oocitos de *Xenopus laevis*, se probó el efecto del inhibidores polianiónicos sobre la caseínaquinasa II de levadura purificada a homogeneidad.

En la Tabla II se muestran los valores obtenidos al usar los dos inhibidores en ciertas concentraciones, dentro de los intervalos en que estos inhiben a la caseínaquinasa II de oocitos de *Xenopus laevis*.

Se observa que la caseínaquinasa II de levadura presenta el mismo patrón de inhibición que la enzima de oocitos de *Xenopus laevis*, siendo mucho más inhibida por el copolímero de ácido glutámico y tirosina que por el ácido poliglutámico.

TABLA II: EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO GLUTAMICO:TIROSINA 4:1 SOBRE LA CASEINAQUINASA II DE LEVADURA

INHIBIDOR	CONCENTRACION	% ACTIVIDAD
	μM	
ácido poliglutámico	0	100
" "	0,2	92
" "	1,0	76
" "	10,0	42
" "	40,0	28
copolímero glutámico:tirosina 4:1	0	100
" "	0,08	54
" "	0,20	25
" "	1,00	10
" "	10,00	2

El ensayo de la actividad de la caseínaquinasa II de levadura se realizó como se describe en *Materiales y Métodos*, utilizando como inhibidor el ácido poliglutámico de 43 kDa y el copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 de 46 kDa. El 100% corresponde a la actividad de la enzima sin inhibidor y equivale a una incorporación de [^{32}P] fosfato de 2,8 pmoles/min.

Por otra parte, también interesó ver el efecto de estos polipéptidos sobre la caseínaquinasa I purificada de oocitos de *Xenopus laevis*. Esta enzima, al igual que la caseínaquinasa II, fosforila serinas insertas en secuencias de aminoácidos ácidos.

En la Tabla III se ven los resultados al usar concentraciones similares de los polipéptidos inhibidores con la caseínaquinasa I de oocitos de *Xenopus laevis*. Se observa que la concentración de ácido poliglutámico que produce un 80% de inhibición sobre la caseínaquinasa II, inhibe sólo en aproximadamente un 10% a la caseínaquinasa I.

El copolímero ácido glutámico:tirosina muestra un efecto inhibitor sobre la enzima, pero a la concentración de 1 μ M, con la que se inhibe prácticamente el 100% de la actividad de la caseínaquinasa II, sólo se inhibe entre un 25 y un 30% a la caseínaquinasa I.

Cabe señalar que la proteínaquinasa dependiente de AMPc no es inhibida por estos polipéptidos en su actividad fosforilante de histonas (Gatica M., comunicación personal).

Con los resultados obtenidos en la sección B se puede concluir que el efecto del copolímero glutámico:tirosina 4:1 se debe a una interacción específica, propia de las caseínaquinasas II con este tipo de secuencias.

TABLA III: EFECTO DE ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO GLUTAMICO:TIROSINA 4:1 SOBRE LA CASEINAQUINASA I DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*

INHIBIDOR	CONCENTRACION	% ACTIVIDAD
	μM	
ácido poliglutámico	0,0	100
" "	5,0	91
" "	20,0	92
" "	40,0	92
poli glu:tir 4:1	0,0	100
" "	0,025	82
" "	0,100	80
" "	1,000	73
" "	5,000	68

El ensayo se realizó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como inhibidor el ácido poliglutámico de 43 kDa y el copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 de 46 kDa. El 100% corresponde a la actividad de la enzima sin inhibidor y equivale a una incorporación 1,2 pmoles/min de [^{32}P] fosfato.

C. EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA SOBRE LA CASEINAQUINASA II USANDO EL PEPTIDO SUSTRATO RRREEETTTEEEE

Los estudios descritos hasta ahora muestran los resultados obtenidos utilizando la proteína caseína como sustrato de la caseínaquinasa II. Con el objetivo de precisar los resultados con los inhibidores específicos, se inició una serie de análisis utilizando un sustrato que corresponde a un péptido sintético.

Considerando las secuencias que son fosforiladas por la caseínaquinasa II y basándose en las estructuras de péptidos sustratos descritas en la literatura (Meggio y col., 1984; Kuenzel y Krebs, 1985; Kuenzel y col., 1987), se diseñó un péptido sustrato que tiene la estructura óptima mínima de acuerdo a la secuencia consensual de fosforilación por la caseínaquinasa II. Este péptido posee tres residuos de treonina insertos en medio de residuos de ácido glutámico. Además posee, en su extremo amino, un grupo de tres residuos de arginina (este grupo básico permite que el péptido se una al papel de fosfocelulosa P81 y de esta forma su fosforilación mediante la caseínaquinasa II se analiza por el mismo método utilizado para analizar la fosforilación del sustrato caseína).

El péptido sustrato sintético usado para los

trabajos presentados a continuación tiene la secuencia

R R R E E E T T T E E E E E

En primer término, se determinó la K_m aparente de este péptido sintético, al ser fosforilado mediante la caseínaquinasa II de oocitos de *Xenopus laevis*, lo cual se muestra en la Figura 9. Se obtuvo una $K_{m_{ap}}$ de 0,35 mM, valor que está dentro del intervalo descrito en la literatura para un péptido sustrato semejante, pero que, a diferencia del utilizado en este trabajo, posee un solo residuo de treonina fosforilable (Kuenzel y Krebs, 1985; Kuenzel y col., 1987).

Luego, usando nuestro péptido como sustrato, en una concentración de 3,5 mM, se probó el efecto del ácido poliglutámico y del copolímero ácido glutámico:tirosina 4:1 y los resultados se muestran en la Figura 10. Los valores de los I_{50} son de 0,5 μ M para el ácido poliglutámico y de 0,0025 μ M para el copolímero de ácido glutámico y tirosina.

Nuevamente, el efecto inhibitor del copolímero es dos órdenes de magnitud inferior al del homopolímero. Además, se observa que los I_{50} obtenidos para ambos inhibidores con el péptido sustrato son un orden de magnitud inferior a los obtenidos usando caseína como sustrato.

Los resultados mostrados en esta sección apoyan la hipótesis de la existencia de una interacción específica entre la caseínaquinasa II y un tipo particular de secuencia, en la

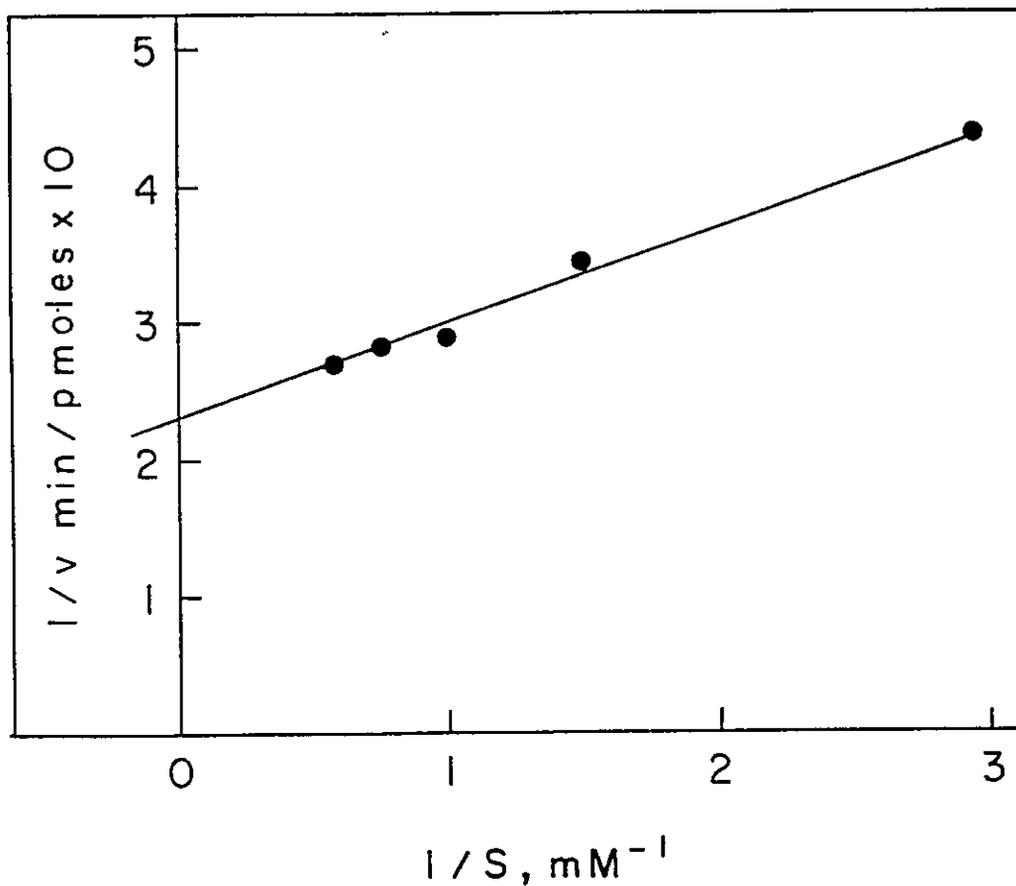


FIGURA 9: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA DETERMINACION DE LA K_m APARENTE DEL PEPTIDO SUSTRATO RRRREETTTEEE

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato diferentes concentraciones del péptido sustrato indicado.

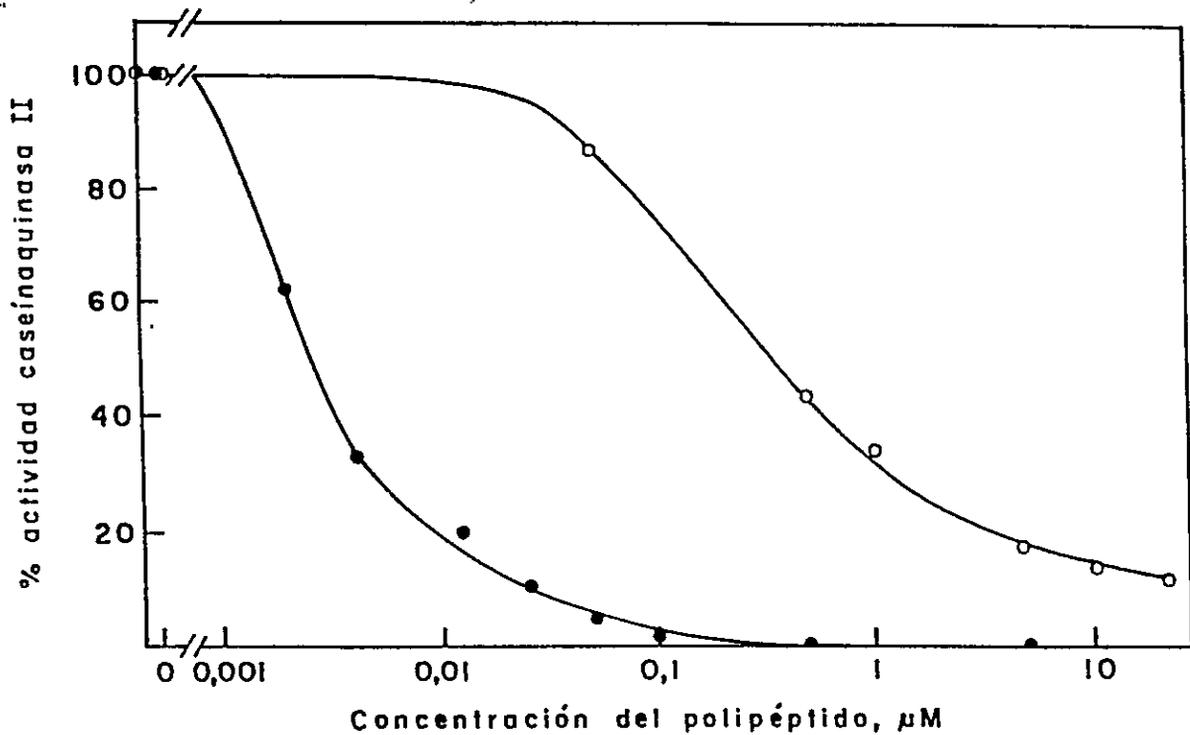


FIGURA 10: INHIBICIÓN DE LA CASEÍNAQUINASA II POR ÁCIDO POLIGLUTÁMICO Y EL COPOLÍMERO ÁCIDO GLUTÁMICO: TIROSINA 4:1, USANDO EL PEPTIDO SUSTRATO.

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato el péptido RRREEETTTEEEE a una concentración de 3,5 mM, en presencia de diferentes concentraciones de ácido poliglútamico (o) y del copolímero de ácido glutámico: tirosina 4:1 (●). El 100% corresponde a la actividad de caseínaquinasa II determinada en ausencia de inhibidor. El 100% equivale a una incorporación de [^{32}P] fosfato de 1,1 pmoles/min.

cual se tiene un grupo de residuos de ácido glutámico junto a una tirosina.

D. EFECTO DE PEPTIDOS SINTETICOS DE SECUENCIA CONOCIDA EN LOS CUALES SE TIENE NUEVE RESIDUOS DE ACIDO GLUTAMICO Y DOS RESIDUOS DE TIROSINA

Debido a que los copolímeros de ácido glutámico y tirosina en relación 4:1 poseen una secuencia al azar, mediante ellos no es posible discriminar si la posición del residuo de tirosina con respecto a los residuos ácidos es o no importante para el efecto inhibitor. Por tal motivo, se diseñaron péptidos de secuencia conocida en los cuales se mantuvo, en una estructura mínima, la proporción 4:1 de residuos de aminoácidos ácidos y tirosina. Estos péptidos son:

YEEEEEEEEEE, EEEEEEEEEYY y EEEYEEEEEEYEE

y además un péptido de ácido aspártico y tirosina de secuencia DDDYDDDDYDD. Estos péptidos se van a simbolizar como Y_2E_9 , E_9Y_2 , $E_9Y_2(int)$ y $D_9Y_2(int)$, donde "int" significa la posición interna de las tirosinas.

1. Determinación de las K_i de los péptidos $E_9Y_2(int)$,

$D_9Y_2(int)$, Y_2E_9 y E_9Y_2

En la Figura 11.A se muestra el efecto de los péptidos de ácido glutámico y tirosina y de ácido aspártico y

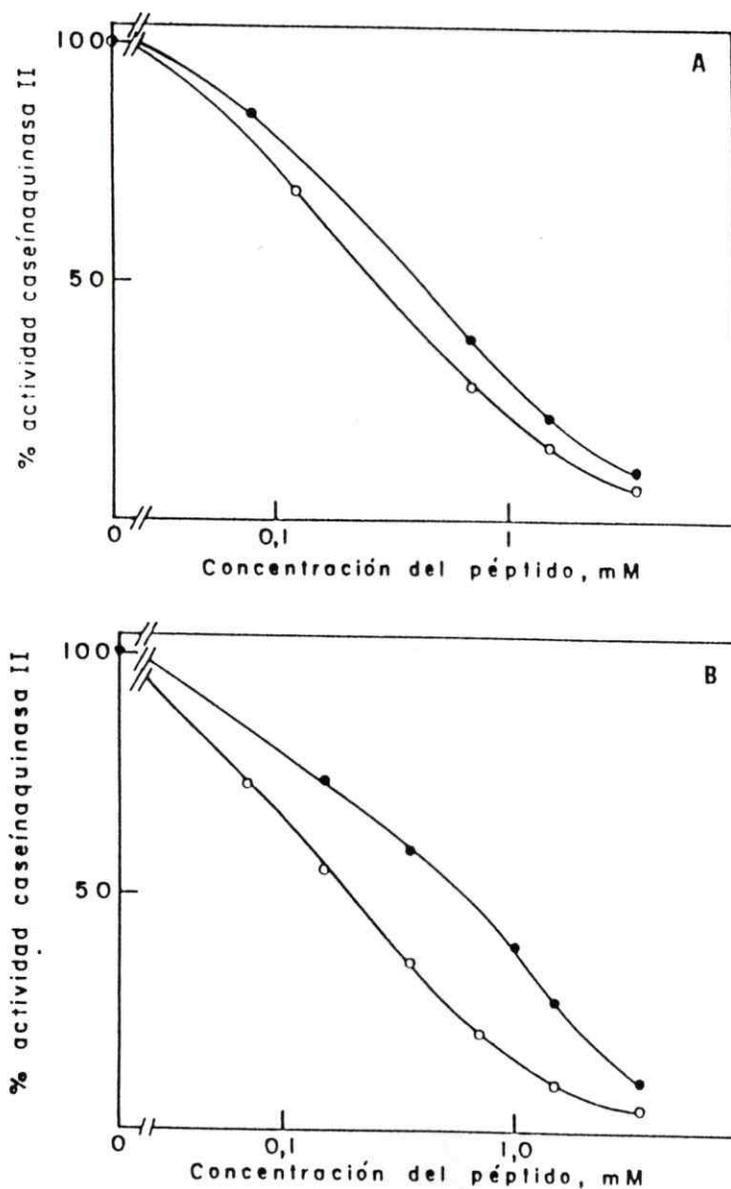


FIGURA 11: INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR PEPTIDOS CONSTITUIDOS POR 9 RESIDUOS DE ACIDO GLUTAMICO Y 2 DE TIROSINA

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml, en presencia de diferentes concentraciones del péptido inhibidor.

A: péptido D9Y2 (int) (o) y E9Y2 int. (●)

B: péptido Y2E9 (o) y E9Y2 (●).

El 100% corresponde a la actividad de caseínaquinasa II determinada en ausencia de inhibidor. El 100 % equivale a una incorporación de [32 P] fosfato de 2,4 pmoles/min.

tirosina, en los cuales las tirosinas se encuentran en el interior de la cadena, separados por un grupo de 4 aminoácidos ácidos: $E_9Y_2(\text{int})$ y $D_9Y_2(\text{int})$. Se observa que ambos péptidos inhiben a la enzima y que el efecto del péptido constituido por ácido aspártico es levemente mayor.

En la Figura 11.B se muestra el efecto de los péptidos constituidos sólo por ácido glutámico y tirosina; en uno de ellos las tirosinas están ubicadas en el extremo amino terminal (Y_2E_9) y en el otro se encuentran en el extremo carboxilo terminal (E_9Y_2). En esta última figura, llama la atención la influencia de la posición de las tirosinas con respecto a la cadena de ácidos glutámicos. En efecto, se observa que el péptido con las tirosinas en el extremo amino causa una mayor inhibición que el péptido con las tirosinas en el extremo carboxilo terminal. Por otra parte, al observar la Figura 11.A se puede comprobar que el péptido con la cadena de ácidos glutámicos interrumpida por tirosinas, tiene un efecto inhibidor intermedio.

A pesar de que el efecto inhibidor de los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 no difiere en órdenes de magnitud (las K_i son $0,1 \pm 0,005$ mM y $0,18 \pm 0,005$ mM, respectivamente), se puede afirmar que el péptido con los residuos de tirosina en el extremo amino terminal es mejor inhibidor que el péptido que posee estos residuos en el extremo carboxílico. Esta afirma-

ción se apoya en los resultados obtenidos con los péptidos que tienen los residuos de tirosina ubicados en medio de la cadena de aminoácidos ácidos. De éstos, como ya se hizo notar, el péptido constituido por ácido aspártico y tirosina tiene un efecto que es sólo levemente mayor al péptido que está formado por ácido glutámico y tirosina. La diferencia es muy pequeña en comparación con la diferencia en el efecto inhibitor que muestran los homopolímeros de ácido glutámico y de ácido aspártico, de 43 y 42,5 kDa respectivamente. Por lo tanto, la disminución en la diferencia de los efectos inhibidores puede considerarse como una consecuencia de la disminución en el tamaño de los péptidos con respecto a los polipéptidos. Siendo así, y dado que siempre estas diferencias son reproducibles, se concluye que la posición de la tirosina en el extremo amino de una secuencia de residuos ácidos hace aumentar la afinidad de la caseínaquinasa II por los péptidos o polipéptidos que las poseen.

También se determinó el tipo de inhibición que ejercen estos péptidos. De acuerdo a los gráficos de Lineweaver y Burk y considerando también los gráficos secundarios obtenidos, se observa que todos estos péptidos estudiados son inhibidores de tipo competitivo.

Además, para corroborar las conclusiones con respecto al efecto de la posición de la tirosina en una

secuencia de aminoácidos ácidos, se determinó las K_i de los péptidos. En las Figuras 12, 13, 14 y 15 se muestran los gráficos de Lineweaver y Burk obtenidos. Los valores de las K_i calculados son:

$$E_9Y_2 = 0,18 \pm 0,005 \text{ mM} \quad Y_2E_9 = 0,10 \pm 0,004 \text{ mM}$$

$$E_9Y_2(\text{int}) = 0,12 \pm 0,010 \text{ mM} \quad \text{y} \quad D_9Y_2(\text{int}) = 0,09 \pm 0,004 \text{ mM}$$

Estos valores de K_i concuerdan con las conclusiones señaladas a raíz de los resultados que se muestran en la Figura 11 y reflejan la sensibilidad de la enzima a estos inhibidores.

2. Efecto de los péptidos YEEEEEEEEEE (Y_2E_9) y EEEEEEEEEYY (E_9Y_2) sobre la actividad de la caseínaquinasa II al cambiar la concentración del Mg^{+2} y al sustituirlo por Mn^{+2} .

La caseínaquinasa II requiere de una alta concentración de Mg^{+2} para su actividad (7-12 mM).

Al sustituir el Mg^{+2} por el Mn^{+2} y usando ATP como sustrato nucleotídico, la enzima presenta aproximadamente un 30% de la actividad obtenida con Mg^{+2} y se observa un máximo de actividad a 0,75 mM de este catión (Gatica, M., comunicación personal; Gatica y col., 1991).

En primer término, se estudió el efecto de los péptidos de ácido glutámico y tirosina, Y_2E_9 y E_9Y_2 , sobre la

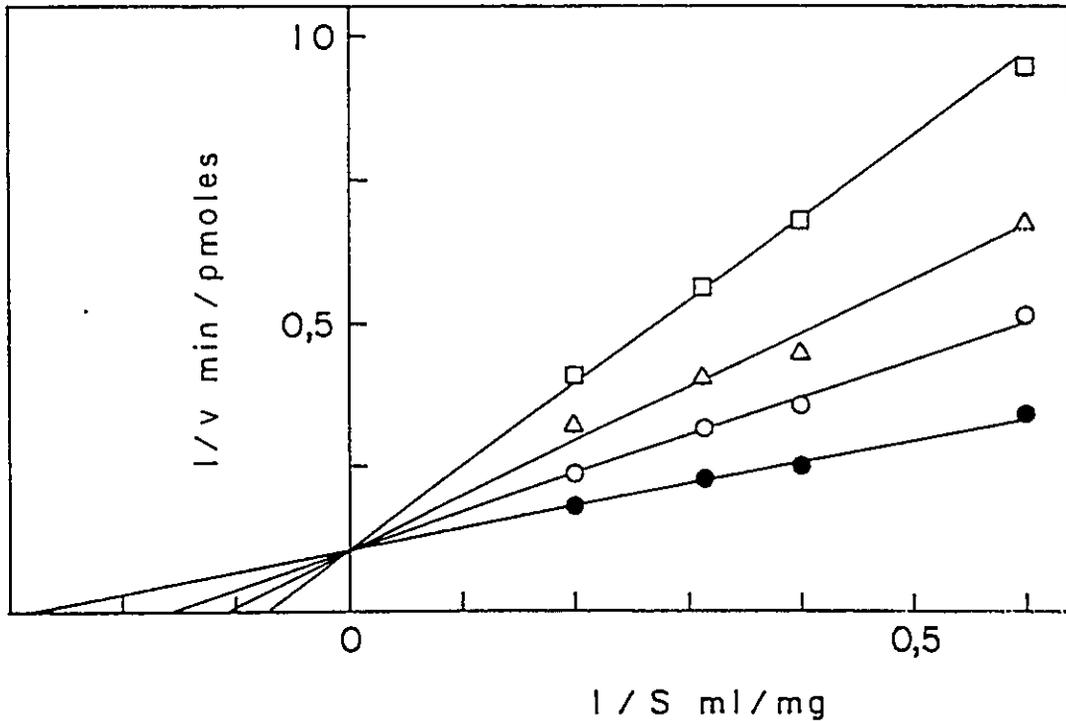


FIGURA 12: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II MEDIANTE EL PEPTIDO CONSTITUIDO POR 9 RESIDUOS DE ACIDO ASPARTICO Y 2 DE TIROSINA INTERCALADOS EN LA SECUENCIA: $D_9Y_2(int)$

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína y en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos inhibidores:

Concentración del inhibidor: 0 (●); 0,0625 mM (○); 0,125 mM (Δ) y 0,250 mM (□).

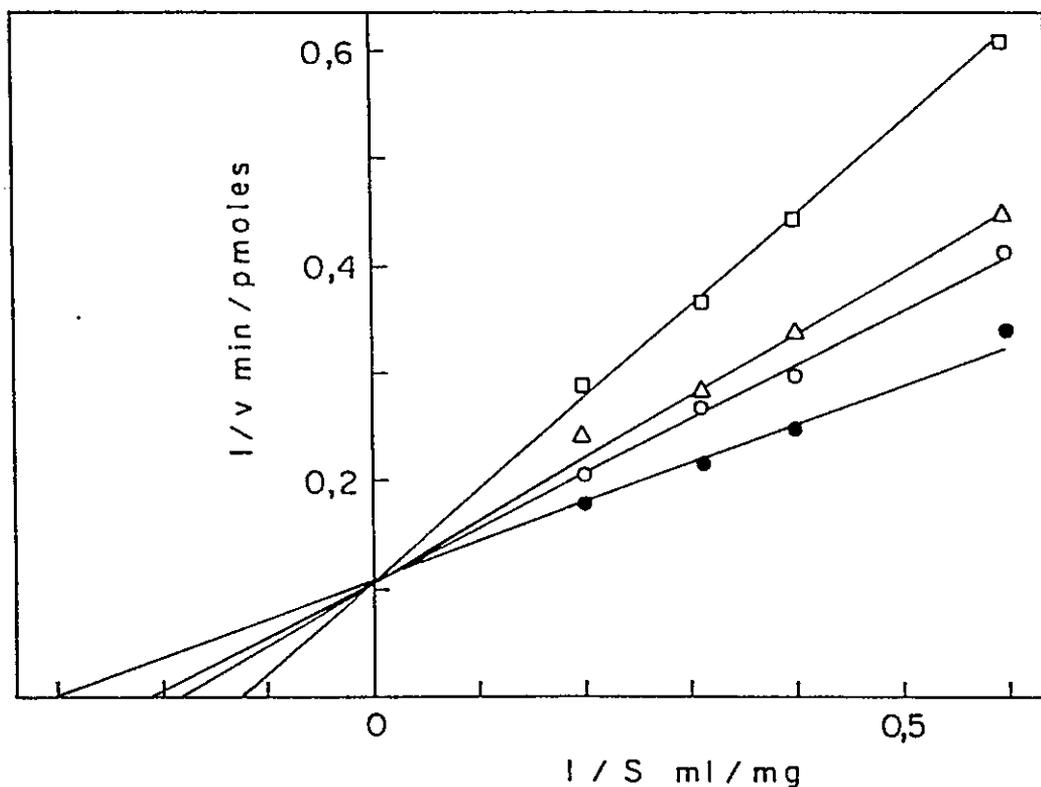


FIGURA 13: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II MEDIANTE EL PEPTIDO CONSTITUIDO POR 9 RESIDUOS DE ACIDO GLUTAMICO Y 2 DE TIROSINA INTERCALADOS EN LA SECUENCIA:
E₉Y₂(int)

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando caseína como sustrato y en presencia de diferentes concentraciones del péptido inhibidor. Concentración de inhibidor : 0 (●); 0,04 mM (○); 0,08 mM (Δ) y 0,16 mM (□).

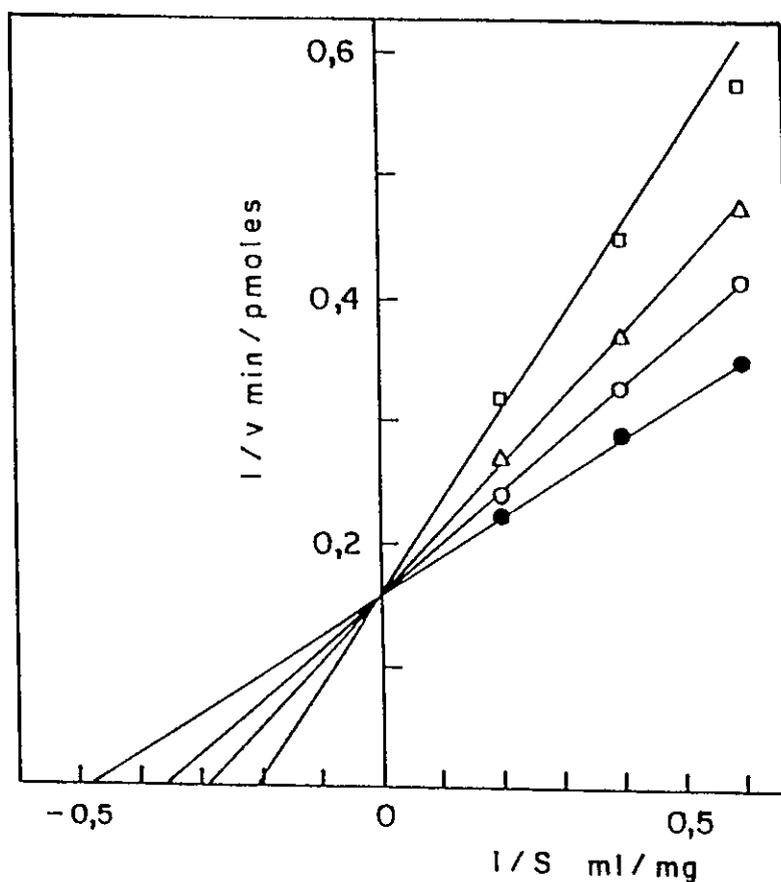


FIGURA 14: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II MEDIANTE EL PEPTIDO CONSTITUIDO POR 9 RESIDUOS DE ACIDO GLUTAMICO Y 2 DE TIROSINA: E₉Y₂

La actividad de la caseinaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor.

Concentración del inhibidor: 0 (●); 0,043 mM (○); 0,086 mM (Δ) y 0,1725 mM (□).

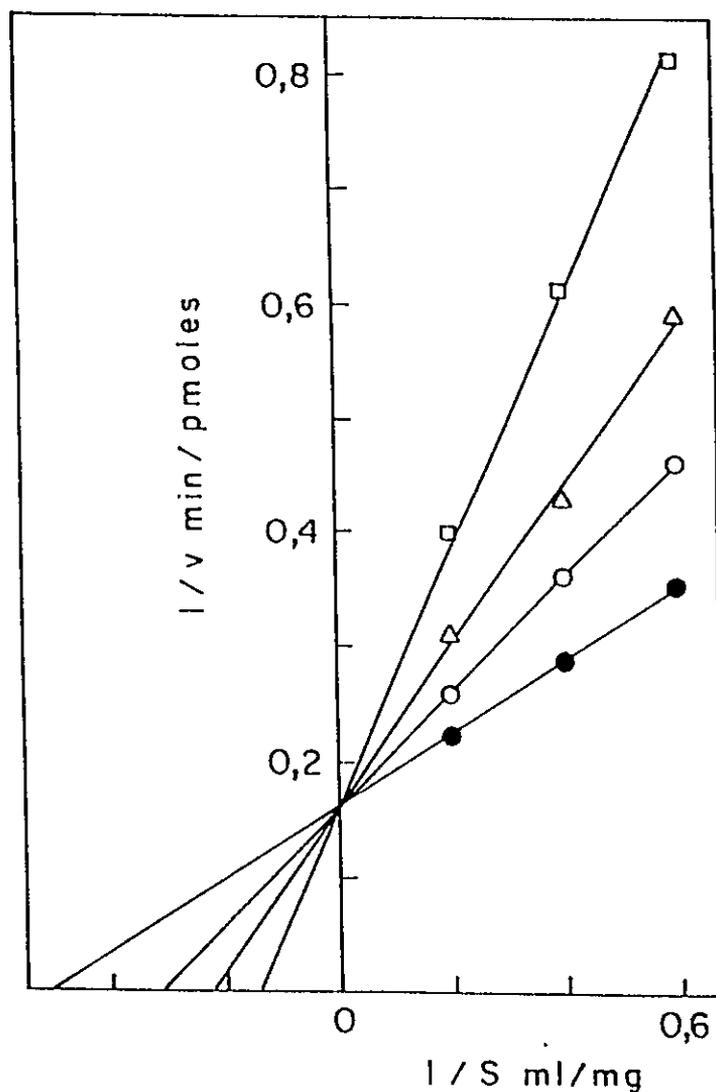


FIGURA 15: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II MEDIANTE EL PEPTIDO CONSTITUIDO POR 2 RESIDUOS DE TIROSINA Y 9 DE ACIDO GLUTAMICO: Y_2E_9

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando caseína como sustrato y en presencia de diferentes concentraciones del péptido inhibidor.
 Concentración del inhibidor: 0 (●); 0,056mM (○); 0,13 mM (Δ) y 0,26 mM (□).

actividad de la caseínaquinasa II, incubando la enzima en un medio en el cual se sustituye el Mg^{+2} por Mn^{+2} en una concentración de 0,75 mM, manteniendo el resto de las condiciones sin alterar y utilizando como sustrato el péptido sustrato.

En forma paralela, se realiza un experimento control utilizando las mismas concentraciones de los péptidos, en presencia de Mg^{+2} 7 mM. Los resultados se expresan como porcentajes respecto a la actividad obtenida en cada caso en ausencia de los péptidos inhibidores. En la Figura 16 se observa que los péptidos ejercen un menor efecto inhibitor cuando en el medio de reacción se ha sustituido el Mg^{+2} por Mn^{+2} .

Luego, y con el objeto de estudiar si los péptidos presentaban diferencias en su efecto inhibitor al modificarse la concentración de Mg^{+2} en el medio, se realizaron ensayos utilizando concentraciones de Mg^{+2} entre 2 y 12 mM. La concentración de los péptidos en estos ensayos fué de 0,15 mM. En todos los casos se realizaron los experimentos controles correspondientes, en ausencia de los péptidos inhibidores. Los resultados, expresados como porcentajes de la actividad control, se muestran en la Figura 17. Se observa que, sea cual sea el catión y su concentración, siempre el péptido Y_2E_9 manifiesta un mayor efecto inhibitor sobre la caseínaquinasa II. Sin embargo, puede notarse que la inhibición de la enzima es

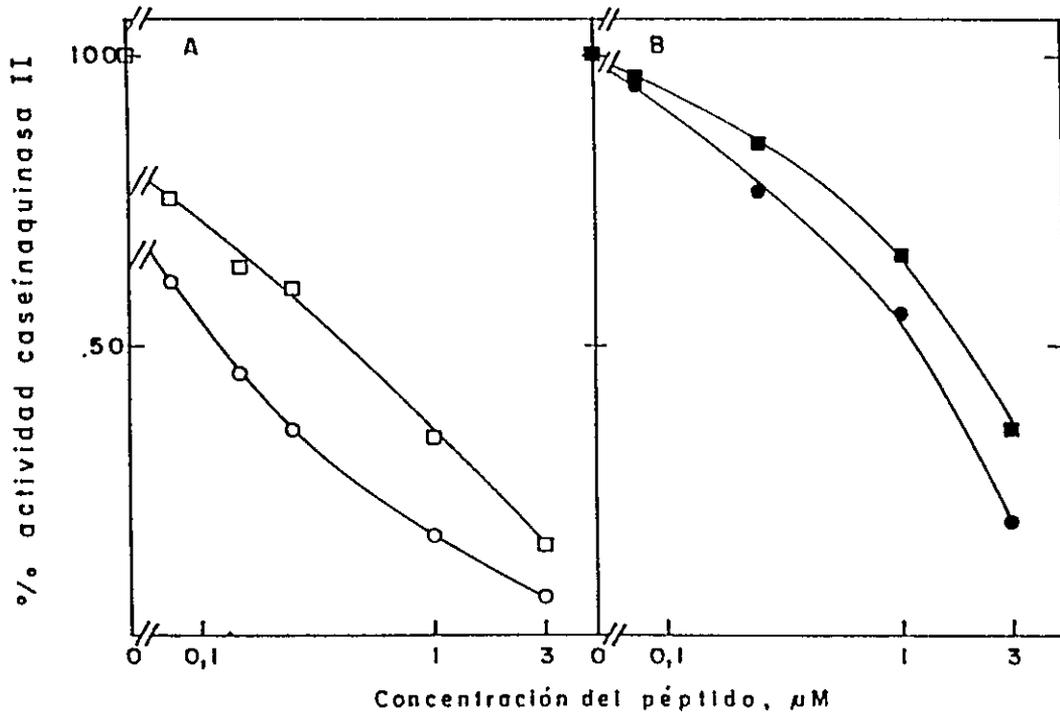


FIGURA 16: COMPARACION DE LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II POR LOS PEPTIDOS Y_2E_9 Y E_9Y_2 EN PRESENCIA DE Mg^{+2} O Mn^{+2}

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml y en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos inhibidores.

A: Y_2E_9 (○) y E_9Y_2 (□), $MgCl_2$ 7 mM.

B: Y_2E_9 (●) y E_9Y_2 (■), $MnCl_2$ 0,75 mM.

El 100% corresponde a la actividad sin inhibidor.

El 100% equivale a una incorporación de [^{32}P] fosfato de 1,4 pmoles/min cuando el medio de incubación tenía $MgCl_2$ 7 mM y de 0,3 pmoles/min cuando se utilizó $MnCl_2$ 0,75 mM.

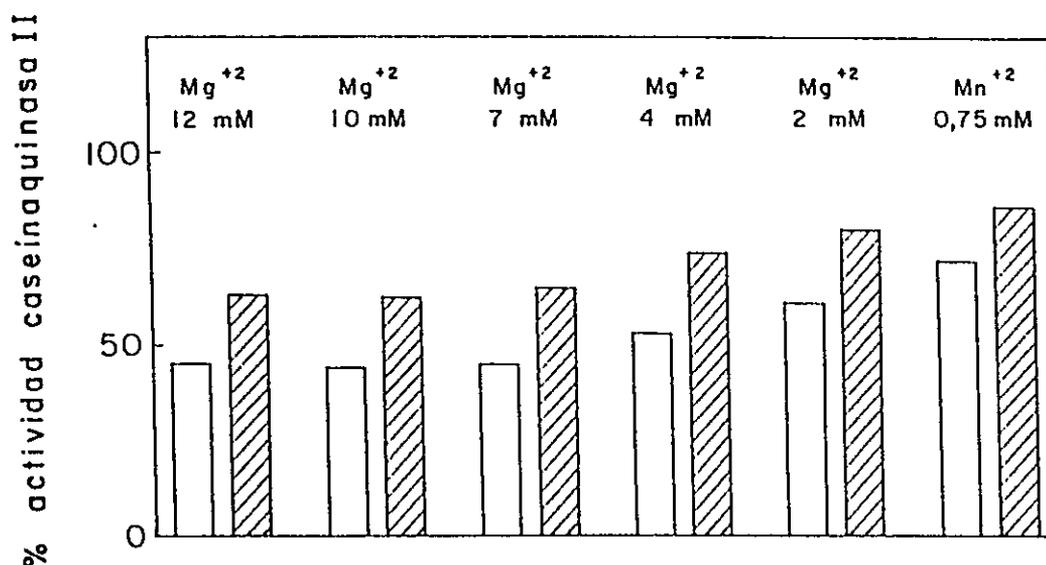


FIGURA 17: EFECTO DE LOS PEPTIDOS Y_2E_9 Y E_9Y_2 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Mg^{+2} Y A UNA CONCENTRACION DE Mn^{+2} DE 0,75 mM

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína 5 mg/ml y en presencia de péptido inhibidor a una concentración de 0,15 mM. Las barras vacías muestran el efecto del péptido Y_2E_9 y las barras achuradas muestran el efecto del péptido E_9Y_2 a las concentraciones de metal indicadas. El 100% corresponde a la actividad enzimática obtenida en ausencia del inhibidor a cada concentración de metal. El 100% equivale a una incorporación de [^{32}P] fosfato entre 2 y 3 pmoles/min cuando se utilizó diferentes concentraciones de $MgCl_2$, y de 0,9 pmoles/min cuando se utilizó $MnCl_2$ 0,75 mM. Los valores de p (calculados mediante el test de Student) fueron entre 0,02 y 0,05.

máxima cuando se tiene en el medio una concentración de Mg^{+2} dentro del intervalo óptimo para la actividad enzimática, es decir, 7-12 mM. También se observa que, a esas concentraciones óptimas, todos los porcentajes de actividad en presencia de los péptidos son semejantes. Los porcentajes de actividad son, en promedio, aproximadamente de 45% en presencia de Y_2E_9 y de 64% en presencia de E_9Y_2 . Sin embargo, cuando la concentración de Mg^{+2} baja a 4 y a 2 mM, los porcentajes de actividad son, respectivamente, de 53 y 61% en presencia de Y_2E_9 , y de 74 y 80% en presencia de E_9Y_2 . Estos resultados indican que el efecto inhibitor de ambos péptidos disminuye al disminuir la concentración de Mg^{+2} . En forma adicional, se observa que la diferencia entre los efectos inhibidores de los dos péptidos tiende a disminuir.

Finalmente, cuando en el medio el Mg^{+2} se sustituye por Mn^{+2} , la disminución del efecto inhibitor de ambos péptidos se hace más evidente. Los porcentajes de actividad son de 72% con el péptido Y_2E_9 y de 86% con el péptido E_9Y_2 . Además, en forma semejante a lo observado a bajas concentraciones de Mg^{+2} , se nota que en presencia de Mn^{+2} la diferencia en la capacidad inhibitor de ambos péptidos tiende a desaparecer.

En resumen, estos estudios muestran que existe un intervalo de concentración de Mg^{+2} óptimo para la manifestación del efecto inhibitor de los péptidos. Este intervalo coincide

con el grado de concentración de Mg^{+2} que es óptimo para la actividad de la enzima. Además, el efecto diferencial de los péptidos con diferentes posiciones de la tirosina con respecto a los ácidos glutámicos, también es influenciado por la concentración de Mg^{+2} y por su sustitución por Mn^{+2} .

E. EFECTO DE INHIBIDORES CONSTITUIDOS POR ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA SOBRE LA SUBUNIDAD α RECOMBINANTE DE LA CASEINA QUINASA II. COMPARACION CON RESPECTO A LA HOLOENZIMA Y A LA RECOMBINANTE $\alpha + \beta$

En el laboratorio se clonaron y se expresaron los cDNA para las subunidades α y β de la caseínaquinasa II de *Xenopus laevis* (Jedlicki y col., 1992; Hinrichs y col., 1993). Esto permitió disponer tanto de la subunidad α como de la subunidad β recombinantes y en estado de alta pureza (Gatica M., comunicación personal).

Disponiendo de la subunidad α , se probó el efecto sobre ella de los inhibidores peptídicos y polipeptídicos constituidos por ácido glutámico y por ácido glutámico y tirosina, con el objeto de determinar si esta subunidad catalítica tiene un comportamiento similar al de la holoenzima.

La subunidad α catalítica presenta similitudes y diferencias con respecto a la holoenzima. Por ejemplo, es

inhibida en forma similar por heparina (Traugh, y col., 1990), pero difiere de la holoenzima en que requiere una concentración de KCl menor, 50 mM, para su actividad óptima (Lin, y col., 1991). Además, tampoco es estimulada por poliaminas, ya sea en las reacciones de autofosforilación o en las de fosforilación de sustratos exógenos (Traugh, y col., 1990; Lin, y col., 1991).

Para estudiar el efecto de los inhibidores peptídicos y polipeptídicos sobre la subunidad α , se mantuvo las condiciones del ensayo iguales a las usadas para la caseínaquinasa II (pH, concentración de Mg^{+2} , etc), pero se utilizó una concentración de KCl de 0,12 M, valor intermedio entre el óptimo de la holoenzima y el óptimo de la subunidad α .

1. Efecto del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 sobre la actividad de la subunidad α recombinante de la caseínaquinasa II

En primer término, se probó el efecto de ácido poliglutámico (43 kDa) y del copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 (46 kDa) sobre la actividad enzimática de la subunidad α . En un experimento paralelo, utilizando las mismas condiciones del ensayo que las utilizadas para la subunidad α , se probó el efecto de estos dos inhibidores sobre la holoenzima.

En la Figura 18 se ve el efecto de estos compuestos sobre ambas actividades enzimáticas. Analizando las curvas, se observa que con la subunidad α la presencia de la tirosina no incrementa tanto la capacidad inhibidora del péptido como lo hace con la holoenzima. Esto se ve más claramente con los correspondientes valores de los I_{50} , los cuales están graficados en la Figura 19. En efecto, en el caso de la subunidad α , los I_{50} del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina son 3,4 y 0,3 μM , respectivamente. Estos valores tienen una diferencia de un orden de magnitud entre sí, en cambio, los valores observados en el caso de la holoenzima nativa difieren en dos órdenes de magnitud (4,2 y 0,048 μM , respectivamente).

Por otra parte, la subunidad α se muestra levemente más susceptible a la inhibición por ácido poliglutámico.

A su vez, si los mismos péptidos inhibidores se ensayan utilizando una mezcla de las subunidades α y β recombinantes, en condiciones adecuadas para reconstituir la enzima (Hinrichs, y col., 1993), se observa que, aunque también los I_{50} son algo superiores a los de la holoenzima, mantienen los dos órdenes de magnitud de diferencia (10,5 y 0,15 μM , respectivamente) (ver Figura 19).

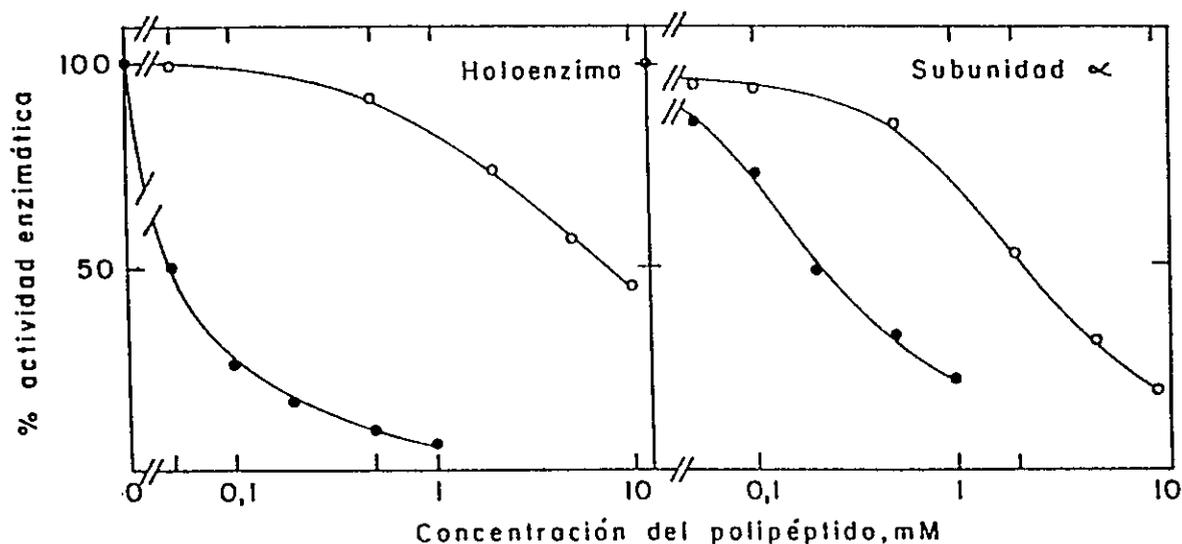


FIGURA 18: EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA 4:1 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA SUBUNIDAD α DE LA CASEINAQUINASA II

El ensayo se realizó como se describe en *Materiales y Métodos*, con la excepción de que en ambos casos la concentración de KCl en el medio de incubación fue de 0,12 M. En el recuadro de la izquierda se tiene el efecto de los inhibidores sobre la actividad de la caseínaquinasa II holoenzima y en el de la derecha se presenta el efecto de los inhibidores sobre la subunidad α recombinante; (○) corresponde a ácido poliglutámico, 43 kDa y (●) al copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1, 46 kDa. El 100% de actividad equivale a una incorporación de [32 P] fosfato de 2 pmoles/min en el caso de la holoenzima y de 3,7 pmoles/min cuando se usó la subunidad α . El 100% corresponde a la actividad enzimática en ausencia de inhibidores.

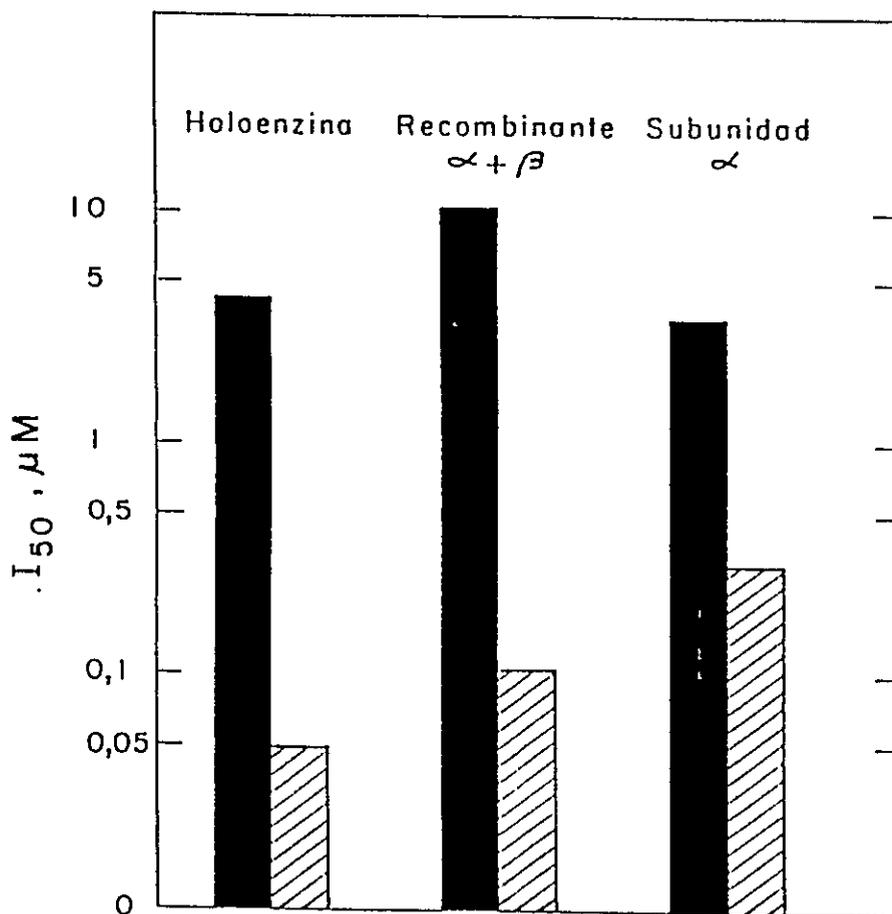


FIGURA 19: I₅₀ DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA 4:1 CORRESPONDIENTES AL EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II HOLOENZIMA, LA SUBUNIDAD α Y LA ENZIMA RECOMBINANTE (α + β)

La actividad enzimática se determinó como se indica en la Figura 18. La subunidad β se utilizó en una proporción molar 1:1 que produce una estimulación de 5 veces de la actividad de la subunidad α (estimulación máxima). Las barras negras corresponden al I₅₀ del ácido poliglutámico y las barras achuradas al I₅₀ del copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1. El 100% de actividad equivale a una incorporación de [³²P] fosfato de 3,7 pmoles/min en el caso de la subunidad α, 19 pmoles/min cuando se usó la enzima recombinante (α + β) y de 20 pmoles/min cuando se utilizó la holoenzima. El 100% corresponde a la actividad enzimática en ausencia de inhibidor.

2. Efecto de los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 sobre la subunidad α recombinante de la caseínaquinasa II. Comparación con la holoenzima y la enzima recombinante $\alpha + \beta$.

Los resultados de la sección anterior muestran que la subunidad α presenta una menor sensibilidad a la inhibición por péptidos que contienen ácido glutámico y tirosina. Por tal motivo, fue de interés estudiar el efecto de los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 sobre la subunidad α . Para ello se probó el efecto de estos péptidos tanto sobre la subunidad α como sobre la holoenzima y la enzima recombinante $\alpha + \beta$, en las condiciones de ensayo descritos en la sección anterior, de modo de poder efectuar las comparaciones correspondientes.

En la Figura 20 se muestra el efecto de distintas concentraciones de los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 con la holoenzima y con la subunidad α recombinante. Es evidente que, al contrario de lo observado con la holoenzima, la subunidad α discrimina muy poco entre ambas secuencias. Los I_{50} obtenidos para estos péptidos son 0,42 y 0,48 mM, respectivamente.

En la Figura 21 se muestra el efecto los péptidos Y_2E_9 y E_9Y_2 , en concentración de 0,3 mM, sobre la subunidad α , la holoenzima nativa y la holoenzima obtenida por reconstitución con las subunidades recombinantes α y β . En todos los casos el ensayo se realiza bajo las mismas condiciones. Los resultados muestran que la enzima recombinante $\alpha + \beta$, aun

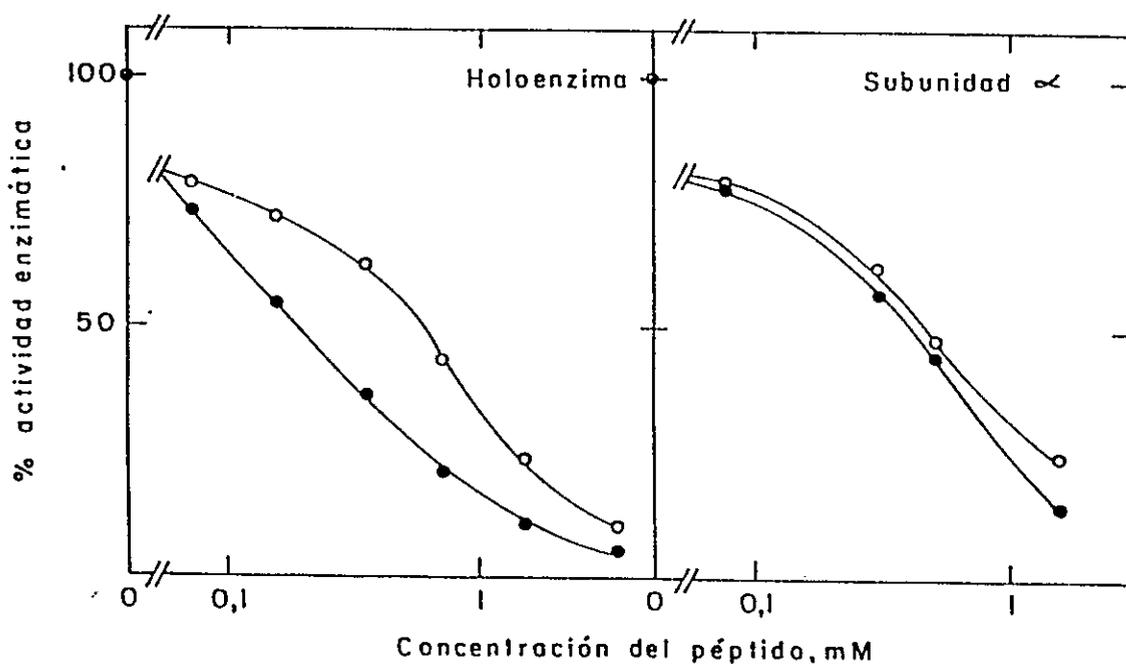


FIGURA 20: EFECTO DE LOS PEPTIDOS Y_2E_g Y E_gY_2 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA SUBUNIDAD α

Los ensayos se realizaron como se indica en *Materiales y Métodos*, con la excepción de que la concentración de KCl utilizada fue de 0,05 M. En el recuadro de la izquierda se ve el efecto de los péptidos E_gY_2 (○) e Y_2E_g (●) sobre la actividad de la holoenzima y en el recuadro de la derecha se ve el efecto de los mismos péptidos, E_gY_2 (○) e Y_2E_g (●) sobre la subunidad α . El 100% equivale a una incorporación de [^{32}P] fosfato de 1,4 pmoles/min cuando se usó la holoenzima y de 27 pmoles/min cuando se usó la subunidad α . El 100% corresponde a la actividad de la enzima en ausencia de inhibidores.

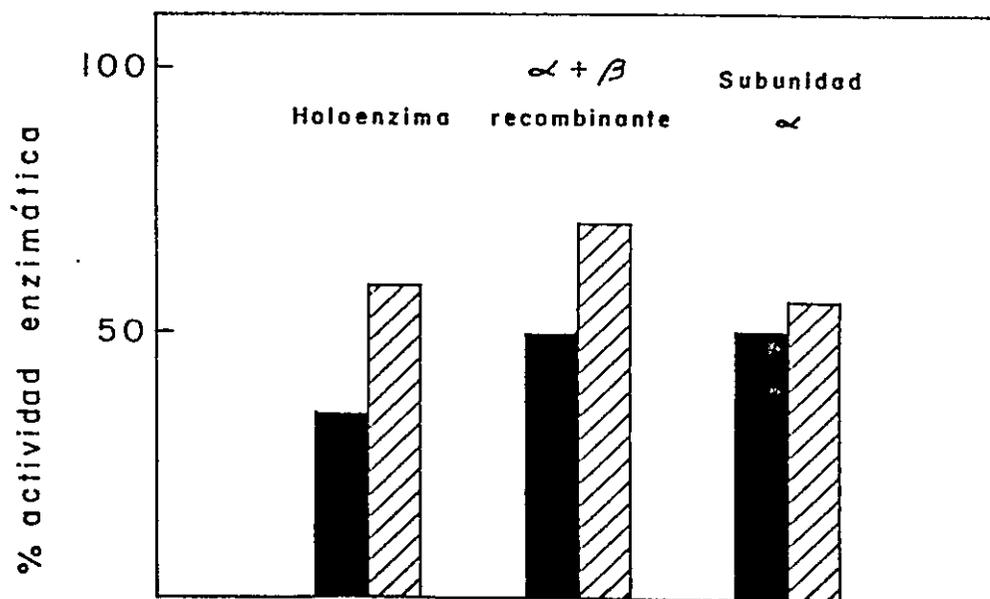


FIGURA 21: EFECTO DE LOS PEPTIDOS E₉Y₂ E Y₂E₉ SOBRE LA HOLOENZIMA, LA ENZIMA RECOMBINANTE (α + β) Y LA SUBUNIDAD α

El ensayo se realizó como se indica en la Figura 20. Las barras negras corresponden al efecto del péptido Y₂E₉ y las barras achuradas al efecto del péptido E₉Y₂. La concentración utilizada de los péptidos fue de 0,3 mM. Para el ensayo con (α + β) se utilizaron cantidades equimolares de las subunidades. El 100% equivale a la incorporación de [³²P] fosfato de 1,4 pmoles/min cuando se usó la holoenzima, 2,7 pmoles/min cuando se usó la subunidad α y 12 pmoles/min cuando se usó la recombinante (α + β). El 100% corresponde a la actividad enzimática en ausencia de inhibidores.

cuando sufre menor inhibición por estos dos péptidos, presenta la misma discriminación que la holoenzima, en cuanto a que es más inhibida por el péptido Y_2E_9 que por el péptido E_9Y_2 .

F. EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPOLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA SOBRE UNA SUBUNIDAD α MUTANTE DE LA CASEINAQUINASA II

El objetivo de este estudio fue obtener información con respecto a la influencia del segmento básico, presente entre los aminoácidos 64 y 83 de la subunidad α de la caseínaquinasa II (ver Apéndice II), sobre la afinidad de la enzima por secuencias ácidas.

Para ello, se estudió el efecto del ácido poliglutámico y del copolímero de ácido glutámico y tirosina (de 43 y 46 kDa, respectivamente) sobre la actividad de la subunidad α mutada, en la cual las lisinas 75 y 76 se cambiaron por residuos de ácido glutámico (Jedlicki, A.M., comunicación personal; Ho y col., 1989). En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos y se observa que la subunidad α mutada es menos sensible a la inhibición por ambos polipéptidos; sin embargo, manifiesta aún una mayor sensibilidad frente al copolímero de ácido glutámico y tirosina 4: 1.

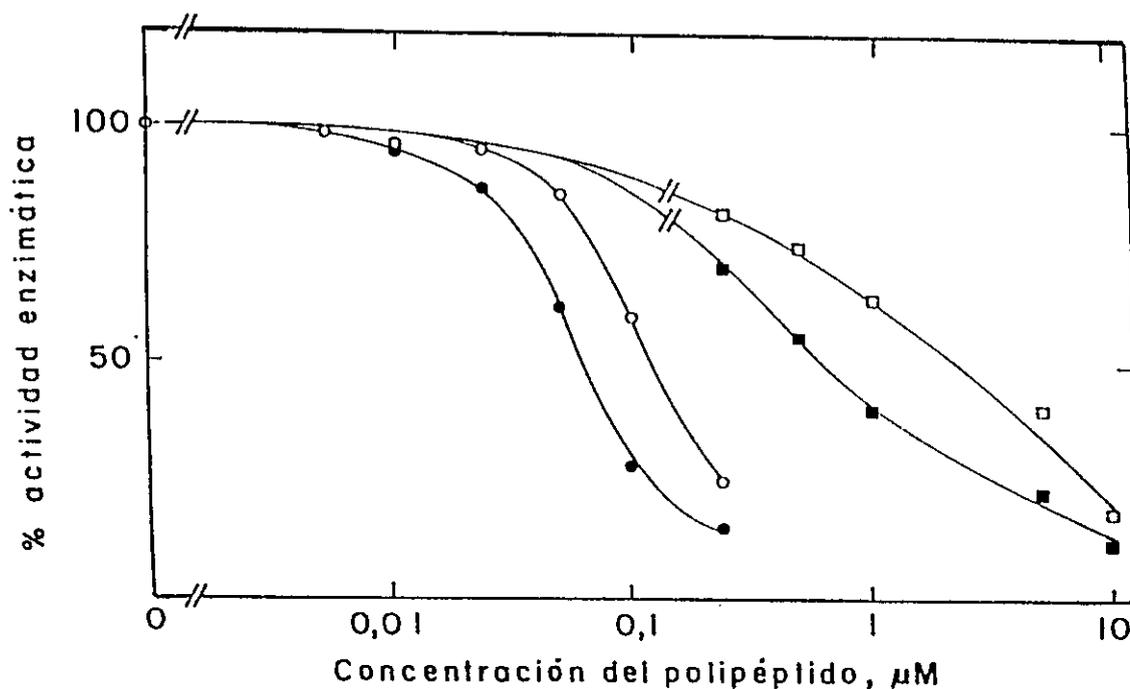


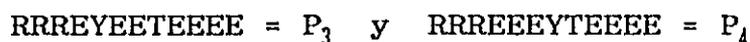
FIGURA 22: EFECTO DEL ACIDO POLIGLUTAMICO Y DEL COPLIMERO DE ACIDO GLUTAMICO Y TIROSINA 4:1 SOBRE LA SUBUNIDAD α Y LA SUBUNIDAD α MUTADA

Los ensayos se realizaron como se indica en *Materiales y Métodos*, con la excepción de que la concentración de KCl utilizada fue de 0,05 M. (●) y (○) corresponden al efecto del copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 sobre la subunidad α y la subunidad α mutada respectivamente; (■) y (□) corresponden al efecto del ácido poliglutámico sobre la subunidad α y la subunidad α mutada respectivamente. El 100% equivale a una incorporación de 11,8 pmoles/min en el caso de la subunidad α y de 12 pmoles/min en el caso de la subunidad α mutada. El 100% corresponde a la actividad en ausencia de los inhibidores.

G. DETERMINACION DE LA K_m APARENTE DE LOS PEPTIDOS SUSTRATOS QUE TIENEN TIROSINA EN MEDIO DE LAS SECUENCIAS DE ACIDO GLUTAMICO

Los resultados obtenidos con los péptidos inhibidores constituidos por ácido glutámico y tirosina indican que la ubicación de la tirosina en la cadena de aminoácidos es importante para determinar la afinidad de la caseínaquinasa II por estas secuencias. Se observa en forma repetida que la ubicación de la tirosina hacia el extremo amino terminal hace que la caseínaquinasa II manifieste una mayor afinidad por el péptido.

Considerando estas observaciones, se estudió el efecto de la ubicación de la tirosina en un péptido sustrato. Para este estudio se diseñaron y se sintetizaron los siguientes péptidos sustratos con tirosina:



También se diseñó un péptido que posee fenilalanina en vez de tirosina, ubicada junto a la treonina:



El objetivo de este estudio fue obtener información con respecto a la influencia de la presencia de una tirosina, insertada en la secuencia consensual de fosforilación de la caseínaquinasa II, en la afinidad de la enzima por dichas secuencias.

El péptido con fenilalanina se consideró un control adecuado, debido a que este aminoácido tiene características moleculares semejantes a la tirosina.

La determinación de las K_m aparente se realizó a través de los gráficos de Lineweaver y Burk que se muestran en la Figura 23 y los valores de los parámetros cinéticos se encuentran en la Tabla IV. Aunque no existen diferencias muy notables en estos valores, todos ellos se encuentran cercanos al valor de $K_{m_{ap}}$ determinado para el péptido sustrato RRREEETTTEEEE, el cual es 0,35 mM. Sin embargo, se puede considerar que las diferencias tienen cierta consistencia con las observaciones anteriores usando péptidos inhibidores. En general, cuando la tirosina está presente, y especialmente en el caso del péptido P_3 , se ve que los valores de las $K_{m_{ap}}$ tienden a disminuir. Si esta diferencia en los valores de $K_{m_{ap}}$ se considera junto a los valores de las $V_{max_{ap}}$, se observa que el péptido P_4 (que tiene la tirosina adyacente a la treonina) también muestra un menor valor de V_{max} y de esta forma, su razón V_{max}/K_m es inferior a la del péptido con fenilalanina (tomado como referencia). Los valores del péptido P_3 (que tiene la tirosina separada por dos ácidos glutámicos de la treonina fosforilable) muestra un valor de $V_{max_{ap}}$ un poco menor, pero su $K_{m_{ap}}$ también es menor, de manera que su razón V_{max}/K_m duplica la del péptido con fenilalanina, lo cual indi-

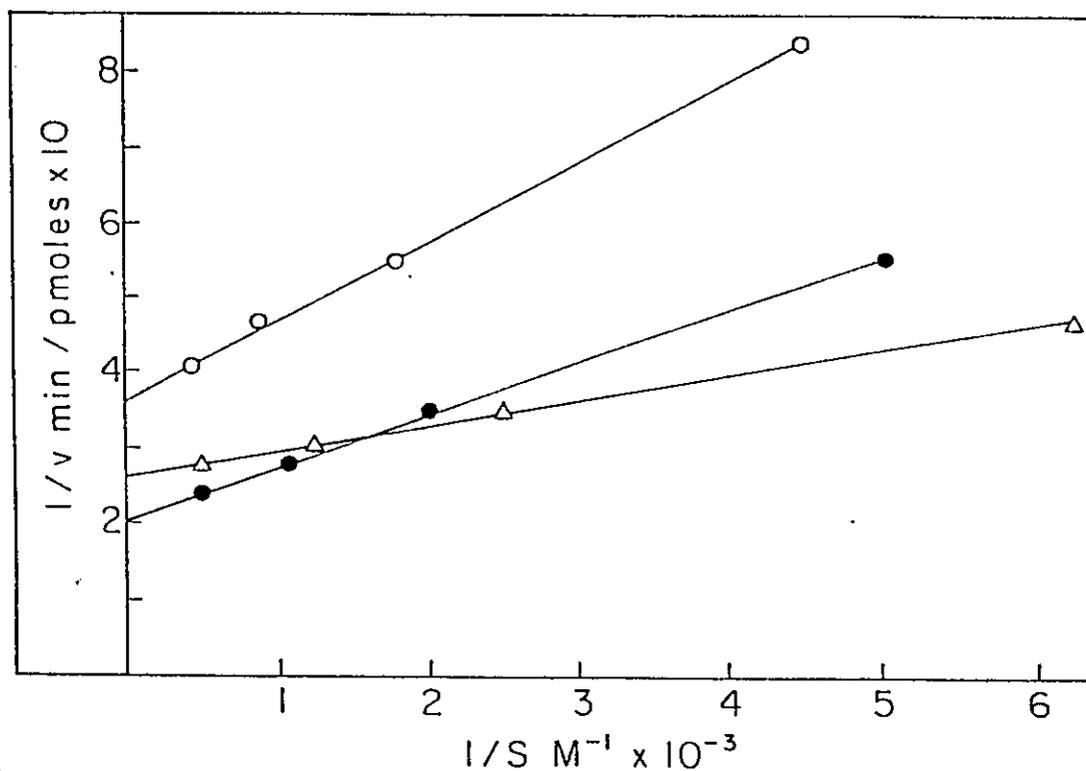


FIGURA 23: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA DETERMINACION DE LA K_m APARENTE DE LOS PEPTIDOS SUSTRATOS QUE CONTIENEN UNA TIROSINA INTERCALADA EN SU SECUENCIA

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando los péptidos sustratos en diferentes concentraciones. P4, RRREEEYTEEE (o); P5, RRREEEFTEEE (●) y P3, RRREYEETEEE (Δ).

TABLA IV: PARAMETROS CINETICOS APARENTES DE LOS PEPTIDOS SUSTRATOS FOSFORILADOS POR CASEINAQUINASA II

Péptido	K_m $\times 10^4$ M	V_{max} $\times 10^{12}$ moles/min	$\frac{V_{max}}{K_m} \times 10^9$	Ψ
RRREETTTEEE	3,5*	4,48*	1,39*	95*
RRREEFTEEE (P ₅)	3,30**	4,86	1,47	100
RRREYYTEEE (P ₄)	2,35**	2,76	0,94	64
RRREYETEE (P ₃)	1,30**	3,83	2,94	200

Ψ : Eficiencia catalítica relativa (%). El valor de V_{max}/K_m del péptido con fenilalanina se considera 100%

* : Datos correspondientes al experimento mostrado en la Figura 10.

** : Los \pm obtenidos fueron respectivamente: 0,004; 0,002 y 0,005.

caría que la enzima presenta una mayor eficiencia catalítica con este péptido.

H. INTERACCION DE LA CASEINAQUINASA II CON MOLECULAS NATURALES Y COMPUESTOS CON ACTIVIDAD FISIOLÓGICA

Con el propósito de definir un papel fisiológico para la caseínaquinasa II, se eligió dos sistemas biológicos en los cuales la enzima interactuaría con compuestos ricos en grupos ácidos, la tubulina y el ácido fólico.

1. Estudios con tubulina y derivados.

1.a. Interacción de la caseínaquinasa II con tubulina y péptidos derivados.

La tubulina es una proteína oligomérica que tiene dos tipos de monómeros, uno α y otro β , ambos aproximadamente de 50-55 kDa (Valenzuela y col., 1981; Serrano y Avila, 1985).

Existen varios hechos de interés con respecto a la tubulina. En primer lugar es sustrato de la caseínaquinasa II; se encontró que un péptido de 16 aminoácidos correspondientes al extremo carboxilo terminal de la subunidad β (isotipo β_3) es fosforilado por la caseínaquinasa II en la serina 444 (Díaz-Nido y col., 1990). Por otro lado, el extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina es tirosinilado por

una actividad tubulina tirosinaligasa (Beltramo y col., 1987). También existe una actividad carboxipeptidasa específica (CTP ó TTCP) que hidroliza el residuo de tirosina (Nath y Flavin, 1980; Kumar y Flavin, 1981). Estos sistemas enzimáticos mantienen un equilibrio entre la forma tirosinilada y la forma destirosinilada de la tubulina (Nath y Flavin, 1980).

Al purificar la tubulina, se obtiene una mezcla que contiene una proporción constante de tubulina con tirosina y de tubulina carente de este aminoácido en el extremo carboxilo terminal de la subunidad α .

La secuencia de los últimos 32 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina es la siguiente:

FSEAREQMAALERDYEEVGVDSVEGE GEEEGEE (Y)

Este péptido se caracteriza por tener un gran número de aminoácidos ácidos, ya que de los 18 últimos aminoácidos, 10 son residuos ácidos.

Considerando esta secuencia, la serina 439 podría ser fosforilada por la caseínaquinasa II y en este proceso podría influir la eventual presencia de la tirosina en el extremo carboxilo terminal.

1.b. Tirosinilización de la tubulina con [^{14}C] tirosina y posterior utilización de esta proteína como sustrato de la caseínaquinasa II

La tubulina se tirosinilizó en presencia y ausencia de benzamidina. Se utilizó benzamidina para proteger a la tubulina de proteólisis.

La tubulina tirosinilada en ausencia de benzamidina muestra una incorporación de 0,163 μmoles de [^{14}C] tirosina por mg de proteína (lo cual equivale aproximadamente a $1,81 \times 10^{-2}$ moles de [^{14}C] tirosina por mol de tubulina) y la tubulina tirosinilada en presencia de benzimidina muestra una incorporación de 0,104 μmoles de [^{14}C] tirosina por mg de proteína (equivalente a $1,16 \times 10^{-2}$ moles de [^{14}C] tirosina por mol de tubulina). Estos resultados muestran que el porcentaje de tirosinilación de la tubulina fue entre el 1 y el 2 %. El bajo rendimiento en la tirosinilación puede atribuirse a que la tubulina utilizada (purificada de cerebro de pollo) posee un grado de tirosinilación previo, debido a la acción de la tirosinilaligasa específica. Por otra parte, la presencia de benzamidina no favoreció la incorporación de tirosina marcada en la tubulina.

Debido a que la baja incorporación de tirosina se atribuye a la presencia de tirosina no marcada en los extremos terminales de la tubulina, se estudió la posibilidad de tratar

la tubulina con una enzima capaz de retirar la tirosina del extremo carboxilo terminal. En esta forma la preparación de tubulina se enriquece con una población de moléculas sin la tirosina en el extremo carboxilo terminal. Para este efecto se utilizó la carboxipeptidasa A de páncreas (CPA) de bovino que posee una actividad enzimática que hidroliza exclusivamente la tirosina terminal de la subunidad α de la tubulina (Nath y Flavin, 1980; Kumar y Flavin, 1981). Con el propósito de medir el efecto de la remoción del residuo de tirosina del extremo carboxilo terminal de tubulina con respecto a su fosforilación por la caseínaquinasa II, se analizaron muestras de tubulina purificada, tratadas durante diferentes tiempos con la carboxipeptidasa A y posteriormente se utilizaron estos productos como sustratos de la caseínaquinasa II. Los resultados se muestran en la Tabla V y en ella se observa que, a medida que aumenta el tiempo de incubación de la tubulina con CPA, aumenta su fosforilación por la caseínaquinasa II.

Considerando el hecho de que la CPA sólo está hidrolizando a la tirosina terminal, se puede establecer en forma indirecta, una relación entre el grado de tirosinilación de la tubulina y su accesibilidad a ser sustrato de la caseínaquinasa II.

Este mismo experimento está ilustrado en la Figura 24. Al estudiar la cinética de remoción de la [^{14}C] tirosina

TABLA V: EFECTO DE LA PREINCUBACION DE TUBULINA CON CARBOXIPEPTIDASA A SOBRE EL GRADO DE FOSFORILACION DE LA TUBULINA POR CASEINAQUINASA II

Tiempo de preincubación con carboxipeptidasa A (minutos)	Incorporación de [^{32}P] fosfato en tubulina	
	pmoles [^{32}P]/min	%
0	2,88	100
10	4,14	144
20	5,18	180
45	6,23	216

La actividad de la caseínaquinasa II se midió en las condiciones indicadas en *Materiales y Métodos*, pero utilizando [^{14}C] tubulina, tratada previamente con carboxipeptidasa A (CPA) en una relación de 1 μg de CPA por 5 μg de tubulina, durante los tiempos indicados. Los valores están corregidos descontando la radiactividad correspondiente a [^{14}C].

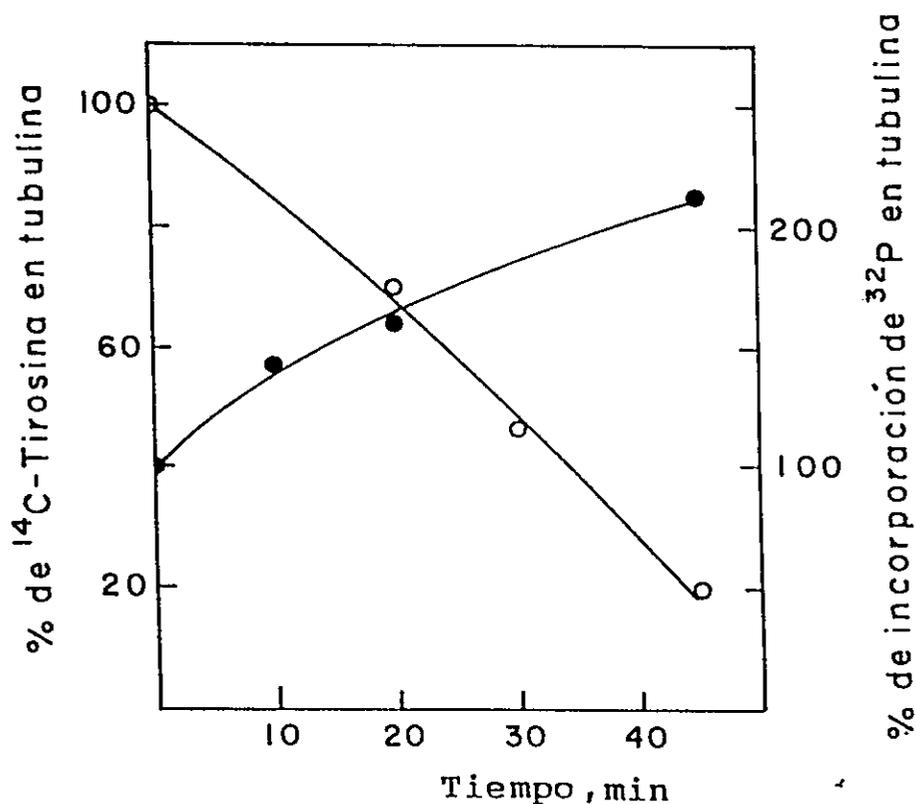


FIGURA 24: COMPARACION ENTRE EL GRADO DE DEGRADACION DE $[^{14}\text{C}]$ TUBULINA POR CARBOXIPEPTIDASA A Y LA FOSFORILACION DE ESTA TUBULINA POR CASEINAQUINASA II EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION CON LA PROTEASA

Como se indica en la Tabla V, $[^{14}\text{C}]$ tubulina se incubó con carboxipeptidasa A (CPA) a los tiempos indicados (○). El 100% de $[^{14}\text{C}]$ tubulina corresponde a la radiactividad en tubulina al tiempo cero de la incubación con CPA. En un experimento paralelo se incubó $[^{14}\text{C}]$ tubulina con CPA por diferentes tiempos. El producto de esta digestión se utilizó como sustrato de la caseínaquinasa II, en un ensayo como se describe en *Materiales y Métodos*, utilizando una concentración final de tubulina 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en el ensayo (●). El 100% de actividad corresponde a la fosforilación de tubulina al tiempo cero de la digestión con CPA. La concentración de CPA es igual a las indicadas en la Tabla V. El 100% equivale a una incorporación de $[^{32}\text{P}]$ fosfato de 3 pmoles/min.

terminal de la tubulina, se utilizan, en forma paralela, las muestras obtenidas a los distintos tiempos de incubación con CPA como sustratos de la caseínaquinasa II.

Estos resultados muestran que la tubulina, marcada con [^{14}C] tirosina en el extremo carboxilo, al ser tratada con CPA pierde gradualmente la radiactividad y esta pérdida está relacionada con un aumento en la capacidad de la tubulina para ser sustrato de la caseínaquinasa II.

1.c. Utilización de péptidos sintéticos correspondientes al segmento carboxilo terminal de la tubulina como sustratos de la caseínaquinasa II

Como se indicó anteriormente, al observar la secuencia del extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina, se ve que la serina 439 precede a una secuencia de residuos de ácido glutámico de tal forma que podría ser fosforilada por la caseínaquinasa II.

Para estudiar esta posibilidad en un sistema más definido y para analizar la influencia que en este hecho podría tener la presencia de la tirosina, se sintetizaron los siguientes péptidos correspondientes al extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina, con 3 argininas adicionales en el extremo amino terminal, para facilitar su unión al filtro de fosfocelulosa:

RRRGVDSSVEGEGEEEGEE

RRRGVDSSVEGEGEEEGEEY

(la serina señalada corresponde al aminoácido 439, indicado como S).

Estos péptidos se utilizaron como sustratos en un ensayo típico de la caseínaquinasa II. Las concentraciones de los péptidos en los ensayos se eligieron considerando que los ellos podrían presentar $K_{m_{ap}}$ cercanos al $K_{m_{ap}}$ del péptido sustrato (0,3 mM).

En la Tabla VI se muestran los resultados obtenidos en distintos experimentos en los cuales se modificó la cantidad de péptido utilizado. En estos experimentos, los controles incluyeron la medición de la fosforilación de la caseína o del péptido sustrato (RRREEETTTEEEEEE).

Se observa que la fosforilación de los péptidos de tubulina por la caseínaquinasa II ocurre en mucho menor grado, comparado con el sustrato caseína o con el péptido sustrato sintético. Al comparar el grado de fosforilación de estos péptidos de tubulina con el del péptido sustrato, se ve que éste incorpora aproximadamente 20 veces más radiactividad que el péptido de tubulina sin tirosina y 40 veces más que el péptido de tubulina con tirosina.

Los resultados obtenidos muestran que ambos péptidos de tubulina son malos sustratos de la caseínaquinasa II.

TABLA VI: FOSFORILACION DE LOS PEPTIDOS SINTETICOS DE TUBULINA POR CASEINAQUINASA II

SUSTRATO	[³² P] fosfato incorporado (pmoles/min)	
	EXP I	EXP II
CASEINA	15,15	13,49
PEPTIDO SUSTRATO (RRREEETEEEE)	--	4,60
PEPTIDO DE TUBULINA SIN TIROSINA	0,29	0,22
PEPTIDO DE TUBULINA CON TIROSINA	0,16	0,11

El ensayo se realizó en un volumen total de 30 µl según lo indicado en *Materiales y Métodos*, pero con las siguientes modificaciones:

EXP I : caseína 150 µg; péptidos de tubulina 0,126 µmoles
 EXP II: caseína 150 µg; péptidos de tubulina 0,126 µmoles; péptido sustrato 0,142 µmoles.

En estos experimentos (I y II) se realizó como control la fosforilación de los sustratos caseína y péptido sustrato, con el objeto de comparar con ellos la fosforilación de los péptidos de tubulina.

Sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que la serina 439, de la subunidad α de la tubulina, sea fosforilada *in vivo* por la caseínaquinasa II. Es posible que cuando la tubulina se encuentra en la célula, factores ambientales y estructurales pueden permitir o favorecer este proceso. Al respecto, cabe mencionar el hecho de que la subunidad α de la tubulina sufre otras modificaciones postraduccionales, como por ejemplo acetilación y poliglutamilación (Eddé y col., 1990). Esta última ocurre en el residuo de ácido glutámico 445, de manera que el primer enlace amido ocurre en el grupo γ carboxílico de este residuo. Según los autores mencionados, las adiciones sucesivas (con un promedio de cinco residuos) pueden ocurrir tanto en el grupo α como en el γ carboxílico de los residuos de ácido glutámico. Es muy probable que este tipo de modificación, que ocurre en forma mayoritaria en la α tubulina neuronal, tenga un papel en la estructuración y funcionamiento de los microtúbulos. Evidentemente, se requieren mayores estudios, en particular para ver si éstas influyen en la fosforilación de la tubulina, así como también, en forma integrada aclarar la importancia fisiológica de estas modificaciones.

1.d. Péptidos de tubulina como inhibidores de la caseínaquinasa II

Debido a que la fosforilación de los péptidos de tubulina mediante la caseínaquinasa II es muy pequeña, no es posible sacar conclusiones con respecto al efecto de la tirosina, presente en el extremo carboxilo terminal del péptido, en dicha reacción. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que, *in vivo*, la mencionada tirosina afecte la fosforilación de alguna serina presente en la molécula de tubulina, la cual sea efectivamente sustrato de la caseínaquinasa II (como es el caso de la serina 444 de la subunidad β). Esta posibilidad puede apoyarse en el hecho de que los extremos carboxilo terminal de ambas subunidades de la tubulina se encuentran relativamente desplegados y con mayor libertad para realizar interacciones (Maccioni y col., 1986; Bryce y col., 1989). El posible efecto inhibitor del segmento carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina podría ser ejercido en forma intra o intermolecular.

Considerando esas posibilidades, se realizaron experimentos para ver si los péptidos de tubulina son o no inhibidores de la actividad de la caseínaquinasa II. Se utilizó caseína y péptido sustrato como sustratos y los resultados se muestran en la Tabla VII. En ella se observa que ambos péptidos son inhibidores de la caseínaquinasa II. La

TABLA VII: EFECTO INHIBIDOR DE LOS PEPTIDOS DE TUBULINA
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II

ADICION	SUSTRATO	
	CASEINA	PEPTIDO RRREEETEEEE
	% DE ACTIVIDAD	
NINGUNA	100	100
PEPTIDO DE TUBULINA SIN TIROSINA	77,4	20,9
PEPTIDO DE TUBULINA CON TIROSINA	65,5	17,1

La actividad se determinó según lo indicado en *Materiales y Métodos*, usando como sustrato caseína en una concentración de 5 mg/ml o péptido sustrato 2,4 mM.

Los péptidos de tubulina se adicionaron en una concentración final de 2 mM para el ensayo con caseína y de 0,9 mM para el ensayo con el péptido sustrato.

El 100% de actividad equivale a una incorporación de [³²P] fosfato de 5,6 pmoles/min cuando se usó caseína como sustrato y de 3,6 pmoles/min cuando se usó el péptido sustrato.

actividad de la enzima en presencia del péptido con tirosina es menor, tanto en la fosforilación de la caseína como en la del péptido sustrato. Sin embargo, las diferencias son pequeñas y no se puede concluir, sin lugar a dudas, si este péptido con tirosina es mejor inhibidor que el péptido que carece de ese residuo.

Esto motivó el estudio del tipo de inhibición que ejercen estos péptidos y la determinación de las constantes de inhibición.

En la Figura 25 se muestran los gráficos de Lineweaver y Burk obtenidos para el péptido que tiene tirosina y para aquel que carece de ella, respectivamente (A y B). Estos gráficos indican que ambos péptidos son inhibidores competitivos. Se determinó una K_i de $1,8 \pm 0,16$ mM para el péptido sin tirosina y una K_i de $1,3 \pm 0,07$ mM para el péptido con tirosina.

Las diferencias observadas entre los valores de K_i para estos péptidos son pequeñas, coincidiendo con lo observado en la Tabla VII. No se pueden sacar conclusiones fehacientes, sin embargo, tomando en consideración lo mencionado recientemente con respecto a la estructura de la tubulina, se da la posibilidad de que este segmento peptídico, al pertenecer al extremo carboxilo terminal de la subunidad α , posea en forma más efectiva un efecto inhibidor sobre la

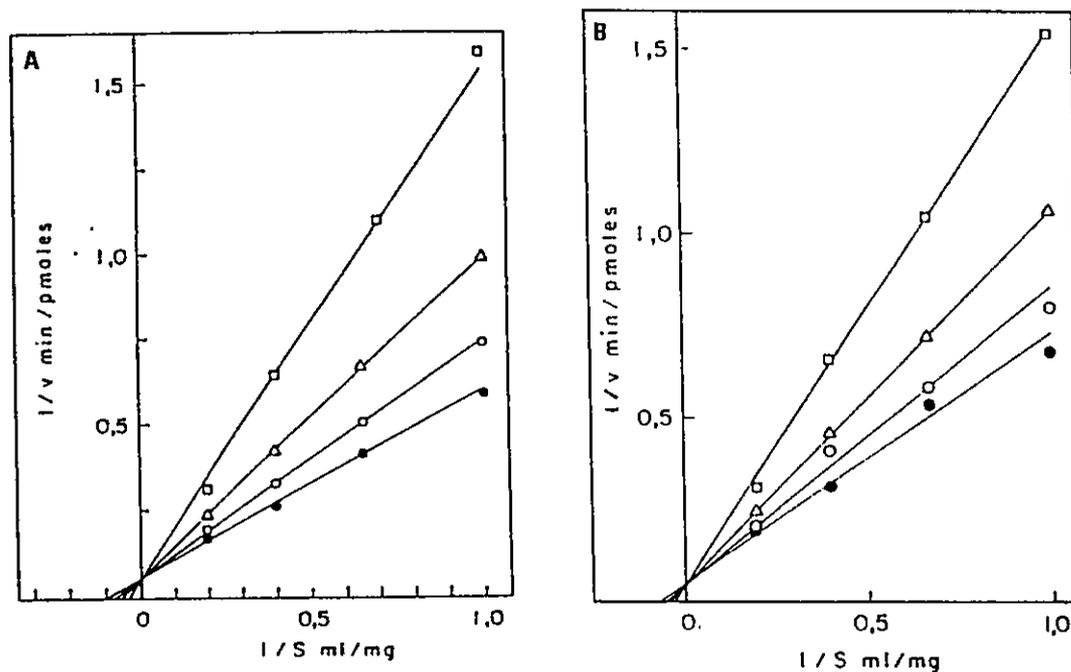


FIGURA 25: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II MEDIANTE LOS PEPTIDOS DE TUBULINA

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando como sustrato caseína.

A: Gráfico para el péptido de tubulina con tirosina terminal. La concentración del inhibidor fue: 0 mM (●); 0,5 mM (○); 1 mM (Δ) y 2 mM (□).

B: Gráfico para el péptido de tubulina sin tirosina terminal. La concentración del inhibidor fue: 0 mM (●); 0,5 mM (○); 1 mM (Δ) y 2 mM (□).

fosforilación de esta molécula y que este efecto sea más evidente si posee un residuo de tirosina en el extremo.

2. Estudios con ácido fólico y derivados.

Se buscó compuestos naturales de interés fisiológico, con características adecuadas para afectar a la caseínaquinasa II y que a la vez permitieran ver posibles relaciones de la enzima con otro tipo de vías metabólicas. Para ello se eligió estudiar los efectos de los derivados del ácido fólico y análogos.

2.a. Efecto de los derivados del ácido fólico y análogos sobre la caseínaquinasa II.

El ácido fólico, cuya estructura se puede ver en la Figura 26.A, adquiere una cadena γ -poliglutamilada al ir siendo glutamilados en forma sucesiva los residuos de ácido glutámico en su grupo γ -carboxilo, formando enlaces amido. Este proceso ocurre en el interior de la célula, y en él participa un sistema enzimático específico (Schirch y Strong, 1989; Mc. Guire y col., 1990).

Por lo general, se encuentra como una mezcla de derivados que contiene un promedio de 4-7 residuos de ácido glutámico, y se ha demostrado que, en la forma poliglutamilada, estos compuestos constituyen los verdaderos sustratos

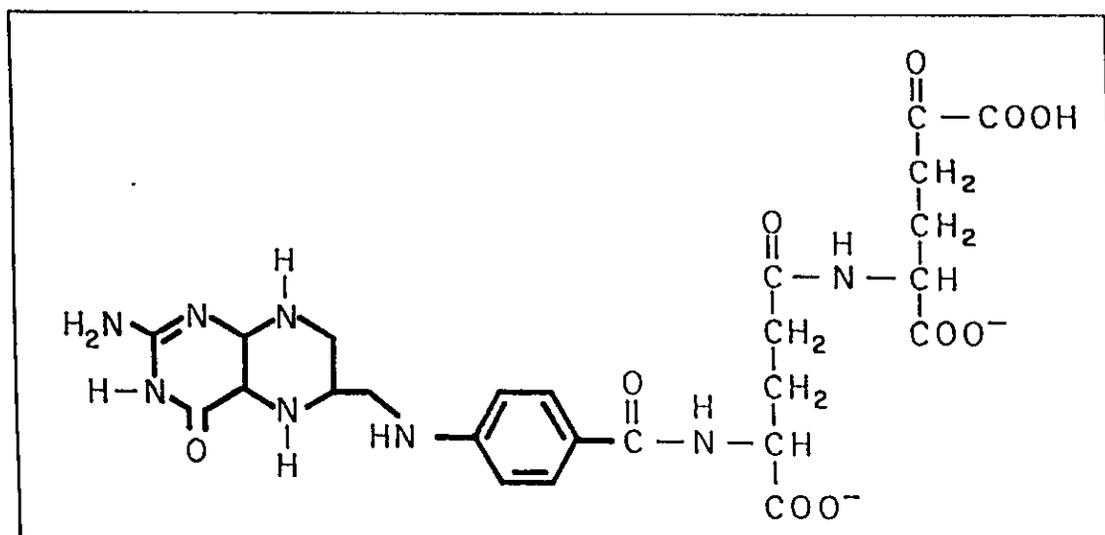


FIGURA 26.A: ESTRUCTURA DEL DERIVADO MONO- γ -GLUTAMILADO DEL ACIDO FOLICO

de las enzimas que participan en el metabolismo en la transferencia de un átomo de carbono (Schirch y Strong, 1989).

El metotrexato, droga utilizada para bloquear las funciones del ácido fólico, también es poliglutamilado en el interior de la célula (Schirch y Strong, 1989).

En la Figura 26.A se presenta la estructura básica del ácido fólico, el cual comprende un anillo pteridina y luego el ácido para-aminobenzoico unido por enlace peptídico a con un residuo de ácido glutámico. A continuación, en el grupo carboxilo y de este ácido glutámico, se une el siguiente ácido glutámico mediante enlace peptídico con su grupo α carboxilo. Así va ocurriendo, en forma sucesiva, la unión de los restantes residuos de ácido glutámico.

Los derivados glutamilados se nombran considerando esta estructura básica del ácido fólico. De esta forma el compuesto que en total posee dos residuos de ácido glutámico se denomina ácido- α -pteroil-L-glutamil-mono- γ -L-glutámico y el derivado con un total de tres residuos de ácido glutámico se denomina ácido- α -pteroil-L-glutamil-di- γ -L-glutámico.

Para nombrar a los derivados del metotrexato, cuya estructura se encuentra en la Figura 26.B, se mencionan las diferencias en el anillo pteridina y el resto se nombra en forma análoga a como se hizo con el ácido fólico. De esta manera, el derivado de metotrexato con un total de tres

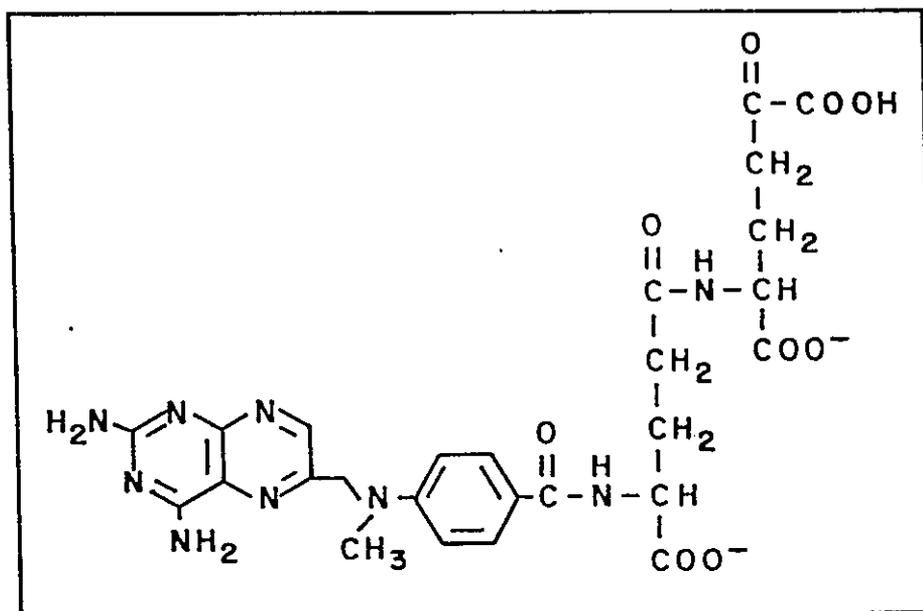


FIGURA 26.B: ESTRUCTURA DEL DERIVADO MONO- γ -GLUTAMILADO DEL METOTREXATO

residuos de ácido glutámico se denomina: ácido α -(4-amino-N¹⁰-metil-pteroil)- γ -glutamil-di- γ -L-glutámico.

En primer término, se estudió el efecto del número de residuos de ácido glutámico sobre el probable efecto inhibitor. Para efectuar este análisis, se utilizaron los derivados con 3, 5 y 6 residuos de ácido glutámico del ácido fólico y del ácido para-amino-benzoico y derivados con 2, 3, 6 y 7 residuos de ácido glutámico del metotrexato.

Para ver como influye en la inhibición la naturaleza del grupo aromático, se utilizaron los correspondientes derivados glutamilados del ácido para-amino-benzoico y además en este aspecto interesó estudiar el comportamiento de los derivados del metotrexato y para ello se utilizaron los derivados con 2, 3, 6 y 7 residuos de ácido glutámico.

Finalmente, con objeto comparativo, se vió el efecto de ácido hexa γ -glutámico .

En la Tabla VIII se muestra como afecta a la inhibición la longitud de la cadena de ácidos glutámicos, usando una concentración 1 mM de estos derivados. Se observa que, a medida que tenemos un número mayor de residuos de ácido glutámico, aumenta el efecto inhibitor. Esto ocurre tanto con los derivados del ácido fólico como con los derivados del ácido para-aminobenzoico.

También se puede observar que los derivados

TABLA VIII: EFECTO DE DERIVADOS DEL ACIDO FOLICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II

ADICION	% ACTIVIDAD
ácido- α -(p-amino benzoil-L-glutamil):	
-di- γ -L-glutámico	84
-tetra- γ -L-glutámico	70
-penta- γ -L-glutámico	54
ácido- α -(pteroil-L-glutamil):	
-di- γ -L-glutámico	60
-tetra- γ -L-glutámico	53
-penta- γ -L-glutámico	34

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó según lo descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de los diferentes derivados en una concentración final de 1 mM.

El 100% de actividad equivale a una incorporación de [32 P] fosfato entre 4-5 pmoles/min (en ausencia de los inhibidores).

glutamilados del ácido fólico son mejores inhibidores que los correspondientes derivados del ácido para-amino-benzoico.

Esto se puede observar mejor en la Figura 27, en la cual se graficó el efecto de distintas concentraciones de los derivados, con un total de 6 residuos de ácido glutámico, del ácido para-aminobenzoico, del ácido fólico y del metotrexato. Esta figura muestra que el derivado hexaglutamilado del metotrexato es el que tiene mayor efecto inhibitor, luego le sigue el derivado de ácido fólico, y por último, el derivado del ácido para-aminobenzoico. El ácido γ -hexaglutámico prácticamente no ejerce inhibición.

De estos resultados se puede concluir que a medida que aumenta la complejidad del grupo aromático presente, el efecto inhibitor se hace mayor. Además, se ve que la presencia del anillo aromático, con el grupo amino, también es necesaria para que exista efecto inhibitor. Esto se evidencia, porque el ácido γ -hexaglutámico no ejerce inhibición, a pesar de poseer el mismo número de residuos de ácido glutámico que los derivados estudiados.

Con el objeto de corroborar que el número de residuos de ácido glutámico, unido a un grupo aromático complejo, es importante en la capacidad inhibitor del compuesto, se estudió el efecto de los derivados poliglutamilados del metotrexato. Los resultados se muestran en la Figura 28, en la

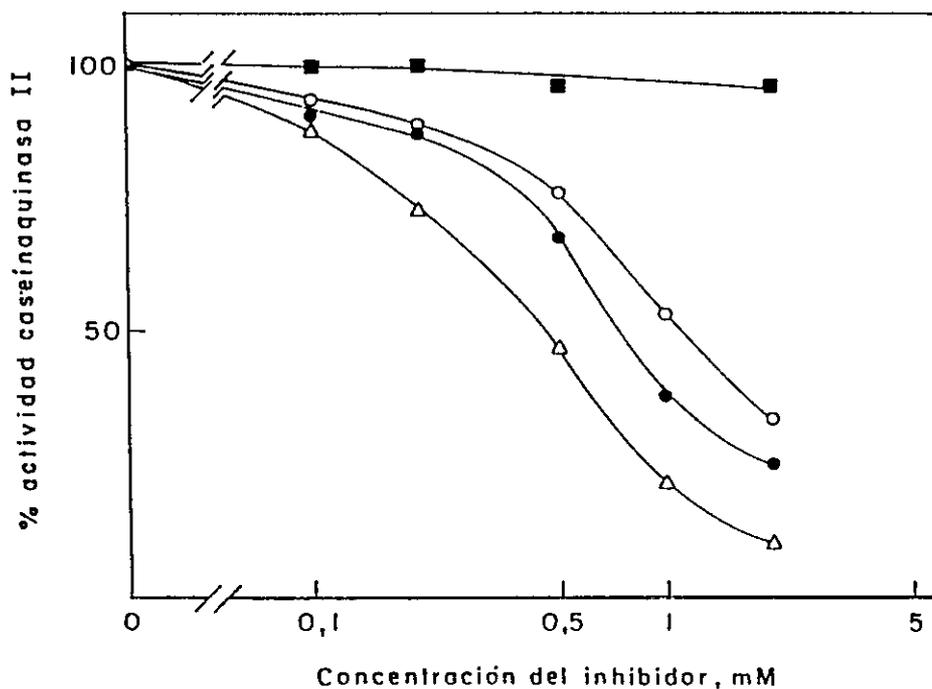


FIGURA 27: EFECTO DE COMPUESTOS PENTA- γ -GLUTAMILADOS DE ACIDO FOLICO Y DERIVADOS, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II.

La actividad de la caseínaquinasa se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, en presencia de distintas concentraciones de los siguientes inhibidores:

ácido hexa- γ -glutámico (■), ácido p-amino benzoil glutamil-penta- γ -glutámico (○), ácido penta- γ -glutamil fólico (●) y penta- γ -glutamil metotrexato (Δ). El 100% de actividad equivale a una incorporación de [32 P] fosfato entre 5 y 6 pmoles/min, y se determinó en ausencia de los inhibidores.

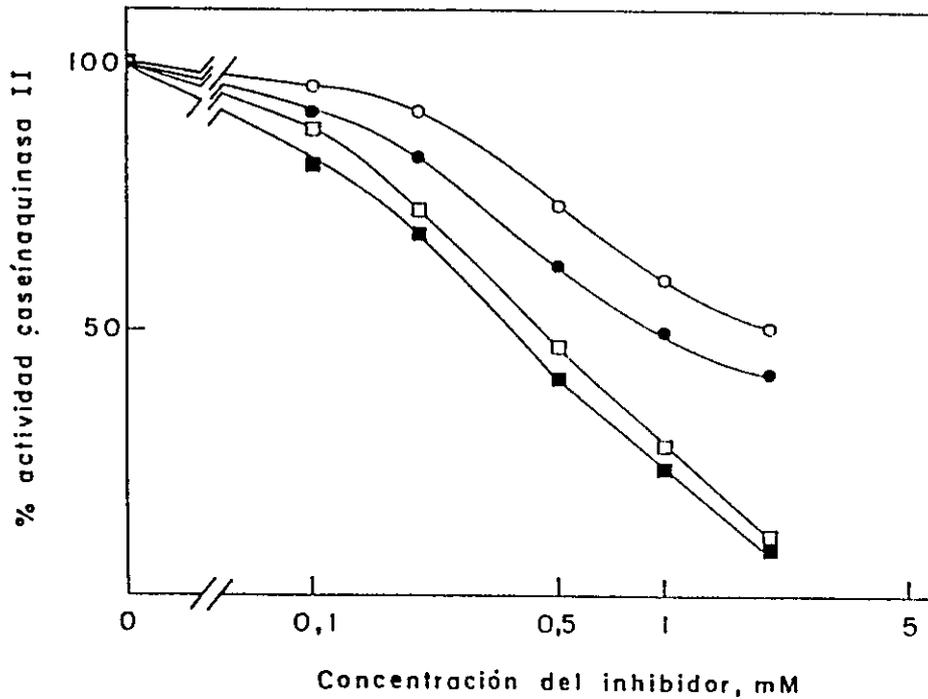


FIGURA 28: EFECTO DE DERIVADOS POLIGLUTAMILADOS DEL METOTREXATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CASEINAQUINASA II

La actividad de la caseínaquinasa II se determinó según lo descrito en *Materiales y Métodos*, en presencia de distintas concentraciones de los siguientes derivados:

di- γ -glutamil metotrexato (○), tri- γ -glutamil metotrexato (●), penta- γ -glutamil metotrexato (□) y hexa- γ -glutamil metotrexato (■). El 100% de actividad equivale a una incorporación de [32 P] fosfato entre 5 y 6 pmoles/min y se determinó en ausencia de los inhibidores.

cual se ve el efecto de los derivados con 2, 3, 6 y 7 residuos de ácido glutámico.

Los resultados obtenidos con estos derivados muestran, nuevamente, que un mayor número de ácidos glutámicos unidos al grupo aromático determina un efecto inhibitor mayor.

2.b. Determinación de las constantes de inhibición de los derivados del ácido fólico

Para conocer el tipo de inhibición que ejercen estos compuestos se eligió a dos de ellos, uno el derivado con 3 ácidos glutámicos del ácido para-aminobenzoico y el otro el derivado con 6 residuos de ácido glutámico del metotrexato. De esta forma, se tiene por un lado el caso de un derivado con un anillo más simple unido a una cadena corta de residuos de ácido glutámico, y por el otro, se tiene el análogo del metotrexato, el cual posee mayor efecto inhibitor, tanto por la complejidad del grupo aromático como por el largo de la cadena.

En la Figura 29.A se muestra el gráfico de Lineweaver y Burk para el derivado del metotrexato y en la 29.B, el gráfico para el derivado del ácido para-aminobenzoico.

Los resultados indican que la inhibición que ejercen estos compuestos es de tipo competitivo y las

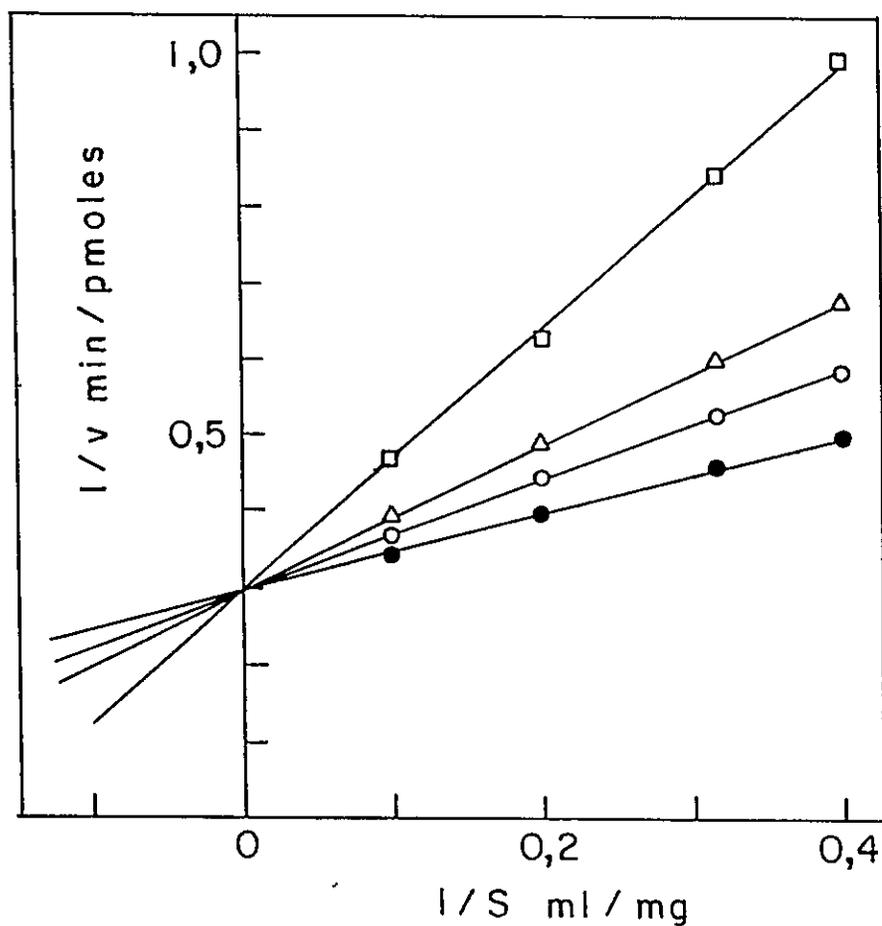


FIGURA 29 A: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II MEDIANTE PENTA- γ -GLUTAMIL METOTREXATO

La actividad se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando caseína como sustrato. La concentración del inhibidor fue: 0 mM (●); 0,05 mM (○); 0,1 mM (Δ) y 0,2 mM (□).

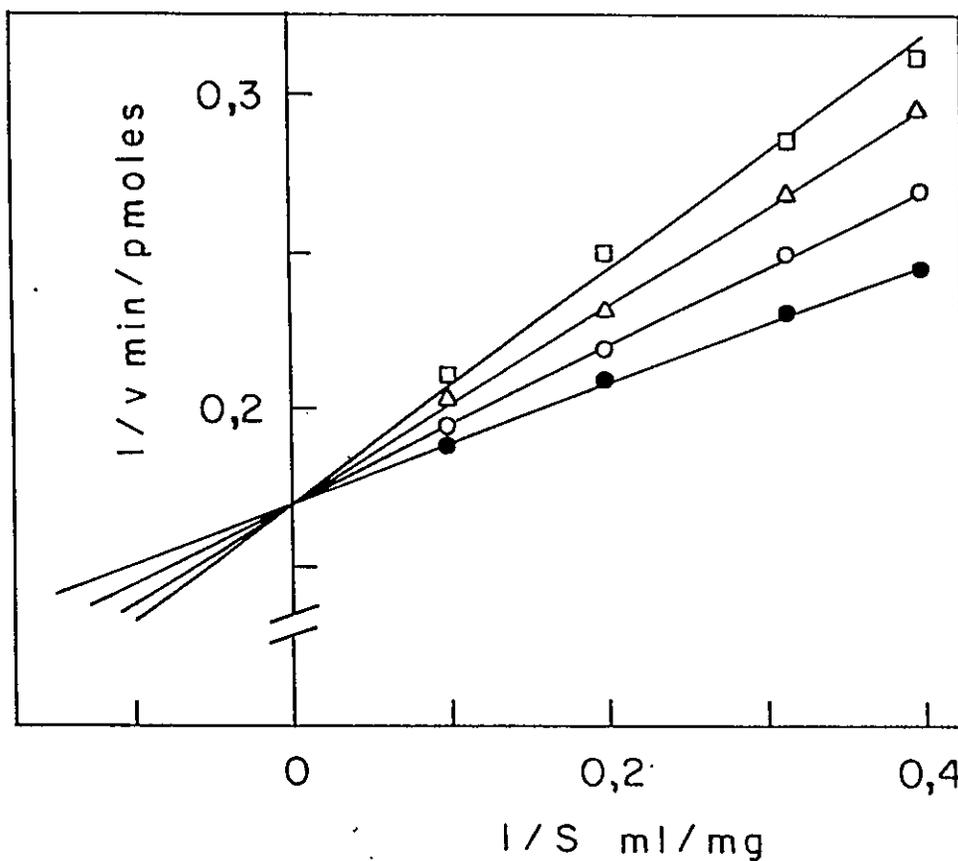


FIGURA 29 B: GRAFICO DE LINEWEAVER Y BURK PARA LA INHIBICION DE LA CASEINAQUINASA II MEDIANTE ACIDO PARA-AMINOBENZOIL-L-GLUTAMIL-DI- γ GLUTAMICO

La actividad se determinó como se indica en *Materiales y Métodos*, utilizando caseína como sustrato. La concentración del inhibidor fue: 0 mM (●); 0,5 mM (○); 1 mM (Δ) y 2 mM (□).

K_i obtenidas fueron de $87 \pm 0,006 \mu\text{M}$ para el metotrexato y de $2,1 \pm 0,17 \text{ mM}$ para el ácido para-aminobenzoico.

Los valores de K_i obtenidos están dentro del intervalo esperado para inhibidores con este tipo de estructura y complejidad, puesto que el K_i del derivado del ácido para-aminobenzoico tiene un valor superior a los K_i obtenidos para los péptidos constituidos por 2 tirosinas y 9 ácidos glutámicos, mientras el K_i del derivado del metotrexato tiene un valor inferior al K_i de dichos péptidos.

I. EFECTO DE INHIBIDORES DE TIROSINA PROTEÍNAQUINASAS SOBRE LA CASEÍNAQUINASA II

La sensibilidad de la caseínaquinasa II a secuencias peptídicas constituidas por ácido glutámico y tirosina, indica una posible analogía entre los sustratos de esta enzima y los de las tirosina proteínaquinasas, las cuales fosforilan tirosinas ubicadas en medio de secuencias de aminoácidos ácidos, como por ejemplo E E E Y E E E.

Si la caseínaquinasa II es inhibida competitivamente por secuencias que corresponden a secuencias que son a su vez sustrato de las tirosina proteínaquinasas, también podría suceder que inhibidores competitivos de las tirosina proteínaquinasas afectaran a la caseínaquinasa II.

Para obtener información con respecto a esto se

eligieron 2 inhibidores de las tirosina proteínasquinasa:

- genisteína, cuya estructura se encuentra en la Tabla IX. De acuerdo a información en la literatura, este compuesto es un inhibidor competitivo de la unión del ATP y posee un I_{50} entre 6 y 20 mM (Enright y Booth, 1991).

- metil-2,5-dihidroxicinamato, cuya estructura se muestra en la Tabla IX. También de acuerdo a la información de la literatura, este compuesto es un inhibidor competitivo con respecto a los sustratos peptídicos o polipeptídicos y no con respecto al ATP. Posee un I_{50} de 100 mM para la actividad tirosina proteínasquinasa del receptor de EGF (Enright y Booth, 1991).

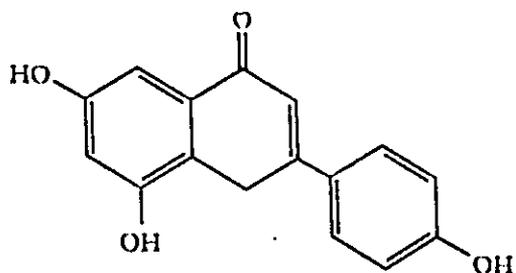
Los resultados obtenidos al probar estos compuestos como inhibidores de la actividad de la caseínaquinasa II, usando caseína como sustrato, se muestran en la Figura 30. En ella se grafica el porcentaje de actividad de la caseínaquinasa II en presencia de los inhibidores, con respecto a la actividad de la enzima en presencia del solvente de estos inhibidores (DMSO).

De acuerdo al gráfico, se obtiene un I_{50} de 500 μ M para genisteína y un valor de 300 μ M para el metil-2,5-dihidroxicinamato.

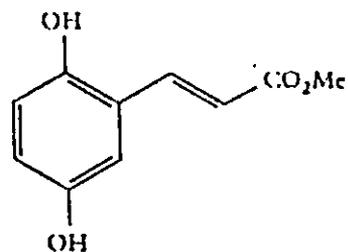
En la Tabla IX se comparan estos valores con los de la literatura para el I_{50} de estos inhibidores actuando sobre

TABLA IX: I_{50} DE INHIBIDORES DE TIROSINA PROTEINAQUINASAS

INHIBIDOR	TIROSINA PROTEINA- QUINASA (EGFR)	CASEINAQUINASA II	PQ A	PQ C
		I_{50} (μ M)		
GENISTEINA	15,4	500	400	> 925
METIL-2,5-dioH- CINAMATO	100	300	> 1000	> 1300



GENISTEINA

METIL-2,5-dihidroxi
CINAMATO

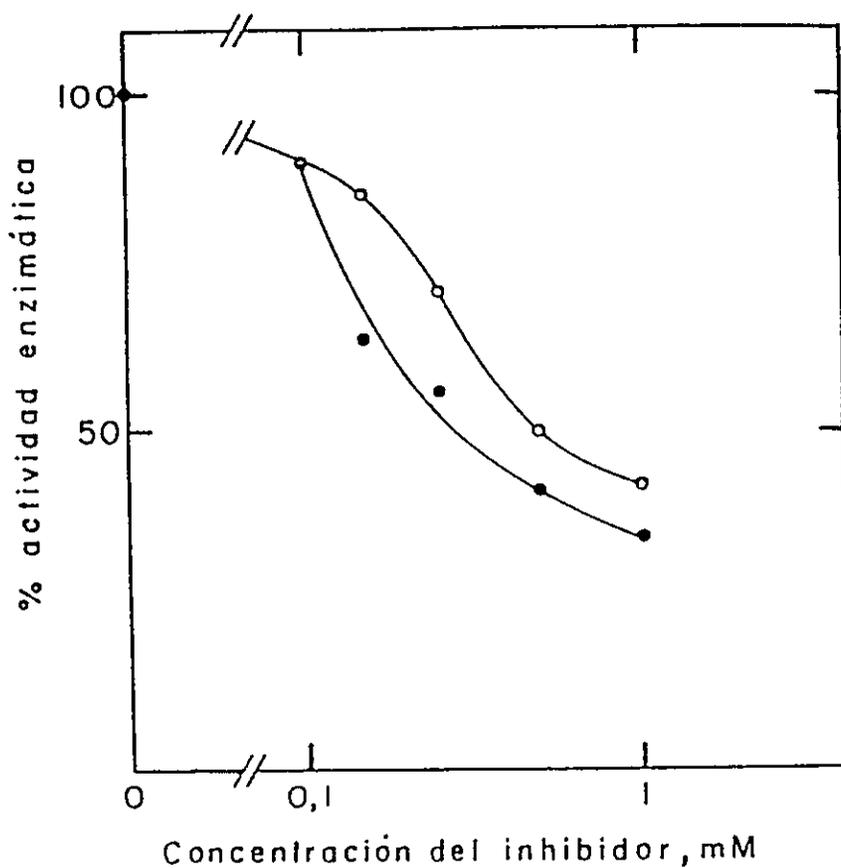


FIGURA 30: INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASEÍNAQUINASA II MEDIANTE GENISTEÍNA Y METIL 2,5-DIHIIDROXICINAMATO.

El ensayo se realizó como se describe en *Materiales y Métodos*, en presencia de distintas concentraciones de genisteína(○) y de metil 2,5-dihidroxicinamato(●).

El 100% de actividad equivale a una incorporación de [32 P] fosfato de 4 pmoles/min y se realizó en ausencia de inhibidores.

otras serina /treonina proteínquinasas, la proteínquina A y la proteínquina C.

Al efectuar esta comparación, se observa que el inhibidor que es competitivo con respecto al sustrato peptídico, el metil-2,5-dihidroxicinamato, presenta un valor de I_{50} aproximado al descrito para la tirosina proteínquina, y que es inferior a los valores de I_{50} obtenidos con la proteínquina A y la proteínquina C.

En cambio, el inhibidor genisteína, el cual es inhibidor competitivo con respecto al ATP para las tirosina proteínquinasas, presenta con la caseínquina II un I_{50} que es 30 veces superior al I_{50} para las tirosina proteínquinasas, y que se encuentra en el rango de los I_{50} descritos para la proteínquina A y la proteínquina C.

DISCUSION

A. LA PRESENCIA DEL RESIDUO DE TIROSINA EN SECUENCIAS DE RESIDUOS ACIDOS ES RECONOCIDA ESPECIFICAMENTE POR LA CASEINAQUINASA II.

Los resultados obtenidos con los polímeros polipeptídicos de aminoácidos ácidos muestran que la caseínaquinasa II de oocitos de *Xenopus laevis* es inhibida en forma competitiva por estos compuestos. En este aspecto presenta un comportamiento similar a otras caseínaquinasas II de diferentes fuentes (Meggio y col., 1983; Meggio y col., 1984; Marín y col., 1986)

En la subunidad α de la caseínaquinasa II se encuentra un segmento con una gran cantidad de residuos de lisinas y argininas. Este segmento básico se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal, a continuación de la lisina 68 que participa en la unión del ATP al sitio activo:

⁶⁴K V V V K I L K P V K K K K I K R E I K

Se considera que tanto la región del sitio activo de la enzima, como los sitios de fosforilación de los sustratos, como así mismo la región semejante al segmento consensual de fosforilación presente en los inhibidores, se encuentran expuestos al medio. Aún en esta situación, los pKa de los radicales de los residuos aminoacídicos de una proteína

pueden diferir de los valores que estos grupos presentan cuando se encuentran en los aminoácidos libres (no formando parte de una proteína). Sin embargo, postulando, para las mencionadas regiones, una determinada estructura, como por ejemplo de tipo helicoidal o bien algún tipo de lámina plegada (Perutz y col., 1993), en la cual los grupos cargados se encuentren alejados o dispuestos en una interrelación adecuada, se puede suponer para estas macromoléculas que el comportamiento ácido-base de los residuos (o de la mayoría de ellos) no difiere significativamente de los aminoácidos en solución acuosa. Así los grupos ε amino de las lisinas estarían protonados a pH fisiológico y al valor de pH utilizado en el ensayo. A la vez, a esos valores de pH, es posible que estén ionizados los grupos carboxílicos de los radicales de los aminoácidos ácidos, tanto de los sustratos como de los inhibidores. Esto hace prever que en la interacción de la caseínaquinasa II con los sustratos e inhibidores son importantes las fuerzas electrostáticas. Kamps y Sefton (Kamps y Sefton, 1986) propusieron una interacción de tipo iónico entre la caseínaquinasa II y sus sustratos.

Por otra parte, suponiendo variaciones significativas en los pKa de los grupos ácido-base, tanto de la enzima como de los sustratos e inhibidores, no se puede descartar interacciones de tipo puente de hidrógeno, como ocurre por ejemplo en las moléculas

transportadoras de fosfato (Luecke y Quiócho, 1990). Sin embargo, junto con todas estas consideraciones, es necesario considerar los estudios más recientes de Hu y Rubin (Hu y Rubin, 1990 b), los cuales muestran que el cambio en la subunidad α de las lisinas 74 y 75 por residuos de ácido glutámico, afecta la inhibición que ejerce la heparina sobre la actividad enzimática. Conjuntamente, los experimentos realizados en esta tesis con la subunidad α mutada (de *Xenopus laevis*), en la cual las lisinas 75 y 76 se cambiaron por ácido glutámico, concuerdan con lo anteriormente señalado. Esta subunidad α mutante es menos afectada que la subunidad α nativa, tanto por el ácido poliglutámico como por el copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1. Sería interesante analizar el efecto de estos inhibidores ácidos con otras mutantes de la subunidad α . Por ejemplo, utilizando enzimas "quimeras" en las cuales este dominio básico de la subunidad α de la caseínaquinasa II, estuviese reemplazado por el correspondiente dominio de la proteínaquinasa A, en el cual se encuentra la lisina 76 (ver Apéndice I); otra "quimera" semejante se podría realizar con el correspondiente dominio de la caseínaquinasa I de *Xenopus laevis* (secuenciada recientemente en este laboratorio por C. Tapia). El análisis de los resultados obtenidos con caseínaquinasas II "quimeras" de este tipo proporcionaría una valiosa información para

determinar la importancia de este sitio básico en la interacción de la enzima con los sustratos o inhibidores.

También son de interés los experimentos de inhibición de la enzima a diferentes concentraciones de KCl. Se observó que, al aumentar la fuerza iónica por sobre 0,2 M, junto con disminuir la actividad catalítica también se anula la inhibición que ejercen los polipéptidos ácidos.

La caseínaquinasa II requiere una concentración de sal entre 0,1 y 0,2 M de NaCl o KCl, tanto para la estabilización de su estructura tetramérica como para su actividad máxima (Desjardins y col., 1972; Hathaway y col., 1983; Glover, 1986). Por lo tanto, el intervalo óptimo de concentración de sal debe quedar establecido entre un mínimo necesario para la formación del tetrámero y un máximo que permita la unión de tipo iónico con el sustrato.

Los experimentos de inhibición a diferentes concentraciones de KCl indican que la fuerza iónica es un factor importante para la interacción del inhibidor con la enzima. Se observa que sobre 0,10 M y sobre 0,15 M de KCl, comienzan a disminuir las inhibiciones ejercidas respectivamente por el copolímero de ácido glutámico y tirosina y por el ácido poliglutámico. Los resultados indican que la interacción del inhibidor con la enzima debe ocurrir en un determinado intervalo de concentración salina, el cual

es próximo al óptimo para la actividad de la enzima. Esto permite concluir que condiciones de fuerza iónica favorables para la interacción entre la enzima y su sustrato, lo son también para la interacción de la enzima y los inhibidores polianiónicos utilizados.

Se puede postular que es preciso que los polipéptidos ácidos inhibidores establezcan interacciones de tipo iónico para que ejerzan su efecto inhibitor. Cabe señalar que el carácter competitivo determinado para ellos, no significa que necesariamente deben unirse al sitio activo de la enzima; sin embargo, las características estructurales deducidas de sus secuencias, permiten afirmar que es muy probable que ellos establezcan este tipo de unión con la caseínaquinasa II. Para corroborar este postulado podría analizarse tanto el efecto del pH como el de la temperatura en la inhibición que ejercen estos compuestos. Tal análisis permitiría confirmar que la mencionada interacción de la caseínaquinasa II con los polímeros ácidos, se establece entre los ya señalados residuos básicos que forman parte de su sitio activo y los residuos ácidos presentes en sus sustratos e inhibidores, si éstos se encuentran en forma iónica, en las condiciones del ensayo. La determinación de las K_s (o K_m) o de las K_i , a diferentes temperaturas, nos permiten calcular el valor del ΔH° , ya sea de la reacción $ES \rightleftharpoons E + S$, como de la

reacción $EI \rightleftharpoons E + I$ (Segal, 1975; Mc Gee y col., 1992). Este valor permite obtener información con respecto al tipo de interacción.

En los resultados obtenidos con los inhibidores polipeptídicos, el efecto del copolímero de ácido glutámico y tirosina llama la atención en forma especial.

Desde hace aproximadamente tres décadas, se ha descrito la inhibición de diversas enzimas por copolímeros de aminoácidos ácidos y aminoácidos hidrofóbicos. Sela y Steiner (Sela y Steiner, 1963) observaron que la lisozima es inhibida por copolímeros de ácido glutámico y tirosina, fenilalanina o leucina, con mayor eficiencia que con un homopolímero de ácido glutámico. Algo semejante se ha observado con tripsina y quimotripsina (Rigbi y Sela, 1964). En estos casos el aumento de la capacidad inhibidora del copolímero se atribuyó al hecho de que la presencia de aquellos aminoácidos hace que puedan establecerse interacciones de tipo hidrofóbico entre el inhibidor y la enzima.

En el caso de la caseínaquinasa II, el efecto inhibidor del copolímero de ácido glutámico y tirosina, específicamente cuando se encuentran en una razón de 4:1, es más de 200 veces superior al efecto del homopolímero de ácido glutámico. Este gran incremento en la capacidad inhibidora no es atribuible en forma exclusiva a interacciones de tipo

hidrofóbico o al carácter aromático de la tirosina, puesto que ni los copolímeros de ácido glutámico y alanina y de ácido glutámico y leucina, así como tampoco el copolímero de ácido glutámico y fenilalanina, todos en proporciones aminoacídicas semejantes, presentan un incremento notable de la capacidad inhibidora, si se comparan con el efecto del ácido poliglutámico.

Cuando la cadena poliglutamilada está interrumpida por aminoácidos neutros alifáticos, se observa un aumento en los valores de I_{50} , los cuales son incluso superiores a los obtenidos con el ácido poliglutámico. De esta manera, la disminución de la carga negativa en el copolímero, debida a la presencia de aminoácidos neutros, no es favorable para la interacción del copolímero con la enzima. Estos resultados están dentro de lo esperado dada la reconocida especificidad de la caseínaquinasa II, conforme a la cual la presencia de un aminoácido como alanina reemplazando a los aminoácidos ácidos en un péptido sustrato sintético R R R R S/T E E E (Kuenzel y col., 1987), disminuye notablemente la velocidad de fosforilación de éste.

Por otra parte, la inhibición que ejerce el polipéptido de ácido glutámico y fenilalanina es semejante a la del ácido poliglutámico. Esto descarta que el efecto observado sea consecuencia exclusiva del carácter aromático

del residuo, el cual le otorga al polipéptido inhibidor la posibilidad de interacción con residuos de igual naturaleza ubicados en el entorno del sitio activo. En cambio, sugiere más bien que el notable efecto inhibidor del copolímero de ácido glutámico y tirosina se debe a una interacción específica de la enzima con este residuo a través del grupo hidroxilo del anillo aromático de la tirosina. En este aspecto, sería interesante estudiar el efecto inhibidor de copolímeros de ácido glutámico y cisteína. Esto se propone debido a que es lógico suponer que en la interacción inicial entre la enzima y el sustrato, se establece un puente de hidrógeno en el cual participaría el grupo hidroxilo del aminoácido que va a ser fosforilado. Se sabe que el grupo hidroxilo puede establecer esta interacción de dos formas. esto es, proporcionando el hidrógeno (protón) o bien (debido a su electronegatividad y a que dispone de un par de electrones en uno de sus orbitales sp^3) atrayendo un hidrógeno (como protón) perteneciente a otro átomo. El grupo sulfhidrilo ocasionalmente, podría formar puente de hidrógeno (Voet y Voet, 1990), pero considerando la menor electronegatividad del átomo de azufre, existe menos posibilidades de que lo establezca atrayendo un hidrógeno pertenecientes a átomos de mayor electronegatividad, pero circunstancialmente, podría interactuar proporcionando el átomo de hidrógeno. Precisamente

este tipo de consideraciones, proporcionan un factor adicional de interés para efectuar este tipo de estudios.

Por otra parte, podría ser de utilidad comprobar que tanto la sustitución como la esterificación del grupo hidroxilo de la tirosina, disminuye o anula el efecto de la presencia de este residuo en el copolímero. Esto tiene particular interés en vista de las observaciones relacionadas con la regulación de muchas proteínas por el estado fosforilado de residuos de tirosina (ver más adelante).

Los resultados obtenidos en esta tesis son similares a los obtenidos y publicados por el grupo de Meggio y Pinna (Meggio y Pinna, 1989), casi simultáneamente con nuestras observaciones (Téllez, y col., 1990). Estos autores, utilizando la enzima de hígado de rata, observaron que la enzima de dicho origen es mucho más inhibida por el copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 que por el ácido poliglutámico. Además, observaron que un polipéptido de ácido glutámico y O-acetiltirosina ejerce un efecto inhibitorio incluso inferior al del homopolímero de ácido glutámico, lo cual también estaría señalando la importancia del grupo hidroxilo de la tirosina.

Los datos obtenidos utilizando la caseínaquinasa II de levadura, la cual presentó el mismo patrón de comportamiento frente al copolímero de ácido glutámico y tirosina

que la enzima de oocitos de *Xenopus laevis*, indican que dicho comportamiento constituye una característica general de las caseínaquinasas II.

Lo anterior es corroborado por el hecho de que la caseínaquinasa I, la cual es una proteínaquinasa que tiene, en términos generales, una especificidad semejante a la de la caseínaquinasa II puesto que cataliza la fosforilación de serinas ubicadas a continuación de residuos de aminoácidos ácidos, no es afectada en igual forma que la caseínaquinasa II por el copolímero de ácido glutámico y tirosina. Es preciso hacer notar que la caseínaquinasa I de *X.laevis*, secuenciada recientemente en nuestro laboratorio, no posee una secuencia básica cercana a la lisina del dominio II (equivalente a la lisina 68 de la caseínaquinasa II). Este dominio posee un carácter más bien hidrofóbico (Tapia, C., comunicación personal). La falta de sensibilidad de la caseínaquinasa I a este tipo de péptidos, junto con las evidencias que muestran que la proteínaquinasa A de conejo tampoco es inhibida por ellos (Gatica, M., comunicación personal), están indicando que el copolímero ácido glutámico:tirosina 4:1 no es capaz de afectar en forma similar a otras proteínaquinasas, sean éstas de especificidad semejante o diferente a la de la caseínaquinasa II.

Si lo señalado anteriormente se analiza junto con la

observación de que el copolímero de ácido glutámico y tirosina en proporción de 1:1 no posee una capacidad inhibidora superior a la del ácido poliglutámico, se puede deducir que la enzima tiene mayor afinidad por las secuencias de ácido glutámico y tirosina cuando los residuos aromáticos se encuentran separados por un promedio de 4 residuos ácidos. Si se acepta que la tirosina aumenta la afinidad en el copolímero debido a que es un aminoácido hidroxilado, surge la idea de que en el copolímero en proporción de 4:1 se dan secuencias correspondientes a un pseudosustrato y esa característica explicaría la marcada afinidad que tiene la caseínaquinasa II por ellas.

Esta hipótesis además se reafirma al comparar las formas que poseen las curvas de inhibición por los polipéptidos ácidos. El hecho de que la curva de inhibición por el copolímero de ácido glutámico y tirosina 4:1 tenga una pendiente mayor que la del ácido poliglutámico es indicativa de la mayor afinidad del copolímero por la enzima. Como se observa, un pequeño aumento en la concentración del inhibidor hace pasar abruptamente de una alta a una baja actividad enzimática. Por lo tanto, la enzima podría ser regulada mediante pequeñas variaciones de la concentración de moléculas que posean este tipo de secuencias.

B. PEPTIDOS SINTETICOS INDICAN QUE LA POSICION DEL RESIDUO DE TIROSINA, CON RESPECTO A LOS RESIDUOS ACIDOS, ES IMPORTANTE.

Los resultados obtenidos con péptidos inhibidores, en los cuales se mantuvo la proporción 4:1 de residuos de ácido glutámico y tirosina en una estructura mínima, aportan evidencias de que es importante la ubicación del residuo de tirosina en la secuencia de residuos ácidos. El efecto inhibidor del péptido Y_2E_9 es mayor al del péptido E_9Y_2 , y el efecto de este último es incluso levemente menor al del péptido que tiene las tirosinas intercaladas entre los ácidos glutámicos. Cabe señalar que si bien las diferencias en el efecto inhibidor que presentan estos péptidos no son muy marcadas, sí son consistentes.

Se debe considerar también que una disminución en el tamaño de la cadena peptídica se traduce en una disminución cuantitativa del efecto, de manera tal que los valores de I_{50} y K_i aumentan desde el nivel micromolar al milimolar. Esto es una característica de los péptidos sintéticos pequeños (6 a 10 aminoácidos) que actúan como sustratos o inhibidores (Meggio y col., 1984; Jakobi y Traugh, 1992; Bidwai y col., 1993).

Los experimentos realizados con los péptidos sintéticos apoyan la idea de que el residuo de tirosina, precediendo a residuos de aminoácidos ácidos en una secuencia,

hace de ésta un sitio semejante a la secuencia consensual de fosforilación de la caseínaquinasa II. Por otra parte, los resultados obtenidos con el péptido sintético que posee las tirosinas en el extremo carboxilo y que también es inhibidor de la enzima, abre la posibilidad de que la presencia de la tirosina en este extremo favorezca también la interacción con la enzima. Esto último es de interés con respecto a la molécula de tubulina, cuyo extremo carboxilo terminal de su subunidad α es rico en residuos ácidos y sufre una tirosinilación postraducciona. (Este aspecto se tratará con más detalle al discutir los resultados con la tubulina y los péptidos sintéticos de ella).

Los resultados de los estudios con los péptidos sustratos que poseen residuos de tirosina o fenilalanina (intercalados hacia el extremo amino terminal con respecto a la serina fosforilable), indican, en primer lugar, que el péptido con fenilalanina tiene valores de $K_{m_{ap}}$ y de $V_{max_{ap}}$ muy semejantes a los obtenidos con el péptido sustrato que carece de dichos residuos. Luego se destaca el que los péptidos con tirosina presenten una disminución en los valores de $K_{m_{ap}}$. Considerando a este parámetro indicativo de la afinidad de la enzima por el sustrato, la disminución en el valor refleja que la enzima aumenta su afinidad por los péptidos sustratos cuando en la secuencia de éstos está presente la tirosina.

Llama la atención que, en ambos casos, disminuye el valor de la $V_{max_{ap}}$. Cabe destacar que la diferencia entre los valores no es muy notable, por ello resulta adecuado analizar en conjunto las variaciones de ambos parámetros. De los valores obtenidos, es más evidente la disminución en la $K_{m_{ap}}$ del péptido con la tirosina separada de la treonina por dos ácidos glutámicos, lo que indica una mayor afinidad de la enzima por este péptido sustrato. En este caso además, la disminución en el valor de $V_{max_{ap}}$ no es muy marcada, de manera que su valor de V_{max}/K_m es superior a los valores que se obtienen con los demás péptidos. Si se considera el valor de V_{max}/K_m como una medida de la eficiencia catalítica de la enzima, los valores indican que la caseínaquinasa II presenta con este péptido una eficiencia catalítica que es dos veces superior a la que tiene con el péptido sustrato carente de aminoácidos aromáticos y con el péptido que tiene fenilalanina. Llaman la atención los resultados obtenidos utilizando el péptido que tiene la tirosina adyacente a la treonina el cual, si bien presenta un valor de $K_{m_{ap}}$ un poco menor, muestra una disminución mayor en el valor de la $V_{max_{ap}}$. Su valor de V_{max}/K_m indica que la caseínaquinasa II presenta con este péptido una eficiencia catalítica que es aproximadamente un tercio inferior. Con respecto a este resultado, se puede postular que la presencia de la tirosina adyacente a la treonina, si bien favorece la

afinidad de la enzima por este sustrato, interfiere en el mecanismo de la catálisis. Esta hipótesis abre un campo a numerosos e interesantes estudios de tipo cinético.

Por otra parte, dado que este tipo de secuencias se encuentran en moléculas naturales (ver más adelante en C.), y considerando que la caseínaquinasa II se encuentra ampliamente distribuida y que tiene una gran cantidad de sustratos, es lógico pensar que ellos mismos poseen factores estructurales que modulan su fosforilación por la enzima.

Los resultados anteriores muestran por lo tanto que, este tipo de secuencias correspondientes ya sea a sustratos o a inhibidores que poseen tirosina, están favorecidas en su interacción con la enzima. Esto es más notable si la tirosina se encuentra en una posición equivalente a la de una serina o treonina fosforilable.

Las estructuras primarias de las cadenas α y β de la tubulina presentan secuencias muy interesantes en relación con las observaciones de esta tesis con respecto a los inhibidores ácidos. Precisamente los análisis de dichas estructuras estimularon la realización de una serie de experimentos con la proteína tubulina (disponible en forma pura) y péptidos sintéticos diseñados basándose en la secuencia del extremo carboxilo terminal de la subunidad α . El hecho de que una tirosina se ligue, *in vivo*, al aminoácido carboxilo terminal

de la subunidad α y que esta modificación pueda estar relacionada con la regulación de la polimerización de la tubulina (Beltramo y col., 1987), también contribuyó al interés por analizar el efecto de estos péptidos.

Los resultados obtenidos usando tubulina como sustrato son difíciles de interpretar. Como ya se mencionó, en la célula existe un equilibrio entre una forma tirosinilada y otra destirosinilada de la tubulina, debido a la acción de dos enzimas de acciones opuestas, encargadas respectivamente, de ligar y de hidrolizar una tirosina en el extremo carboxilo de la subunidad α , respectivamente (Kumar y Flavin, 1981; Beltramo y col., 1987). Es muy intrigante el sentido fisiológico que pueda tener la presencia o la ausencia de esta tirosina en esa posición en la tubulina. Se sabe que esta proteína es sustrato de la caseínaquinasa II, la cual fosforila el extremo carboxilo terminal de su subunidad β (isoespecie β_3) en la serina 444 (Díaz-Nido y col., 1990). La secuencia de los últimos 16 residuos de este segmento donde se encuentra la serina es: EMYYEDDEEESESQGPK. Llama la atención el que la serina que es fosforilada (subrayada en la secuencia), no cumpla con el requisito (establecido consensualmente para que el residuo sea fosforilado por la caseínaquinasa II) de poseer un residuo ácido en el tercer lugar después de esta serina. Pero también es notable que

precediéndola se encuentre una gran cantidad de residuos ácidos y además esté presente una tirosina. Algo semejante podría estar sucediendo con el extremo carboxilo terminal de la subunidad α . En éste, donde la secuencia de sus últimos 32 aminoácidos es: FSEAREQMAALERDYEEVGVDSVEGEGEEEGEE(Y), se encuentra una serina (ser 439, la serina subrayada en la secuencia) la cual tampoco cumple con el requerimiento consensual; pero, al igual que la serina 444 de la subunidad β , también se encuentra inmersa en un medio con una gran cantidad de residuos ácidos y también está precedida por un residuo de tirosina. Debido a ello, se pensó que también podría ser fosforilada por la caseínaquinasa II en esa serina.

Los experimentos en los cuales la tubulina, tratada durante diferentes tiempos por carboxipeptidasa A, se utilizó como sustrato de la caseínaquinasa II, mostraron que fue más fosforilada por la acción de esta enzima mientras mayor era el tiempo de tratamiento con carboxipeptidasa A. Sin embargo, los resultados obtenidos con los péptidos sintéticos, modelados tomando como base el segmento carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina nativa, uno tirosinilado y el otro no, muestran que ninguno de los dos se comporta como buen sustrato de la caseínaquinasa II, de forma tal que no fue posible inferir que la fosforilación observada en la tubulina podía ocurrir en la señalada serina en el extremo carboxilo

terminal de la subunidad α . Pero, al analizar estos resultados negativos hay que tener en cuenta que los péptidos sintéticos poseen sólo los últimos 15 residuos del extremo carboxilo terminal de la subunidad α , de manera tal que carece de algunos residuos ácidos y de la mencionada tirosina precedente. Debido a esto y tomando en consideración las características estructurales de la tubulina y las modificaciones postraduccionales que tiene *in vivo*, no se puede afirmar pero tampoco descartar que *in vivo* la serina, ubicada en el extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina, sea fosforilada por la caseínaquinasa II. Por lo tanto tampoco se puede descartar la posibilidad de que esta situación sea modificada por la presencia de la tirosina en el extremo carboxilo de la misma subunidad α .

Por otra parte, dado que los péptidos de tubulina son inhibidores de la caseínaquinasa II, este segmento podría estar afectando la fosforilación por la caseínaquinasa II de otra u otras serinas ubicadas en otro dominio o subunidad de la tubulina (como es el caso de la serina 444 de la subunidad β), de manera tal que al estar tirosinilada la subunidad α podría disminuir la fosforilación de aquel otro sitio. Como se indicó anteriormente, el péptido tirosinilado presenta una capacidad inhibidora levemente superior. Es posible que, aún cuando esta diferencia es pequeña, esté reflejando algo que

ocurre en forma más ampliada con la molécula entera de tubulina en las condiciones que se dan en la célula. Al respecto cabe recordar que esta molécula sufre otras modificaciones postraduccionales, como las ya mencionadas acetilación y poliglutamilación (esta última en el residuo de ácido glutámico 445 del extremo carboxilo terminal de la subunidad α (Eddé y col., 1990)). Así, la presencia de .tirosina, en el extremo carboxilo terminal de la subunidad α , podría ser causa de que la proteína sea menos fosforilada por la caseínaquinasa II, dada la presencia de una secuencia con mayor capacidad inhibidora en la misma molécula sustrato. Sería interesante realizar mayores estudios al respecto y además dejar bien establecido si ocurre una fosforilación adicional de la tubulina en su subunidad α , y si ésta u otra fosforilación de la molécula por la caseínaquinasa II tiene un significado fisiológico. Los resultados en este aspecto, al integrarse con los provenientes de las investigaciones con respecto a las otras modificaciones, constituirían un aporte para aclarar la regulación del funcionamiento de la molécula de tubulina.

C. CONSIDERACIONES CON RESPECTO A LAS SECUENCIAS
INHIBIDORAS DE LA CASEINAQUINASA II Y SU PRESENCIA EN
MOLECULAS DE INTERES FISIOLÓGICO.

Además de la existencia de moléculas proteicas con segmentos de residuos ácidos, los cuales podrían comportarse como inhibidores de la caseínaquinasa II, se puede postular que algunas proteínas poseen en su estructura segmentos con la secuencia consensual de fosforilación vecina a una secuencia inhibidora. También es posible pensar que en un mismo segmento, ya sea en forma sobrepuesta o adyacente, se encuentre una secuencia consensual de fosforilación y una secuencia inhibidora de la enzima. De esta manera, la fosforilación previa de un residuo de tirosina o uno de serina en este segmento de la molécula, podría mediar el paso de molécula sustrato a molécula inhibidora, o viceversa.

Esta hipótesis es apoyada por los resultados de Meggio y col. (Meggio y col., 1991), los cuales muestran que tanto una serina como una tirosina fosforiladas pueden reemplazar eficientemente al ácido glutámico en la secuencia consensual de fosforilación de la caseínaquinasa II. Si esta situación es válida para la secuencia fosforilable, de igual forma podría ser válida para una secuencia inhibidora.

De esta forma, en toda proteína sustrato de la caseínaquinasa II, una vez fosforilada por ésta, la secuencia

consensual puede constituir un segmento capaz de inhibirla.

Por otra parte, la secuencia consensual de fosforilación de muchas tirosina proteínquinasas corresponde a tirosinas inmersas en secuencias de aminoácidos ácidos (E E E Y E E), secuencias que a su vez son inhibidoras de la caseínaquinasa II.

Tomando en cuenta estas consideraciones, es posible postular la existencia de secuencias constituidas por largas series de residuos de aminoácidos ácidos junto a residuos de tirosina, o bien junto a tirosinas y serinas o treoninas, y que estas secuencias constituyan sustratos o inhibidores de la caseínaquinasa II, dependiendo de su estado de fosforilación.

Considerando estas posibilidades, se buscó secuencias de este tipo en los bancos de datos de secuencias de proteínas. En esta búsqueda se encontraron numerosas secuencias que cumplen con los requisitos necesarios. De ellas se seleccionaron algunas proteínas que se consideraron de interés y que se muestran a continuación:

Proteínaquinasa A	*
(subunidad catalítica)	PGDTSNFDDYEEEEIRV <u>S</u> INEK
	*
Lipocortina	ENEEQEYVQT

	*
Receptor EGF	EEKEYHAE
	*
CQ II, subunidad β	EVDEDYIQD
Factor de transcripción del virus H. Simplex	* * YPEEYAEEL
	*
DNA polimerasa	DDYEEEE
	*
Tubulina, cadena β_4	DATAEEEGEMYEDDEEESESQGPK
	*
Tubulina, cadena α	FSEAREQMAALERDYEEVGVDSVEGEGEEEGEE
Proteínaquinasa dependiente de cGMP	* * EETHYENGEY
Proteína Myc	YDYDYDS...YFYFEEEE... TSSDSEEEQEEDDEE
	*
Fenilalanina 4-hidroxilasa	EYTEEEE
Proteína del canal de sodio	* EESEIEEEYSPSEQDDLAKEEEEEEEEPEE
Antígeno T medio virus polioma	* YPESDQD...EPLLEEEEEEY

S, T: sitio de fosforilación por CQ II.

*

Y: tirosina insertada en secuencias de aminoácidos ácidos.
(posible sustrato de tirosina proteínquinasas)

Al realizar este análisis, llama mucho la atención que las proteínas que presentan las secuencias requeridas cumplen diversas funciones importantes en la célula, pero además, es muy interesante el hecho de que constituyen un conjunto numeroso.

Deteniéndose a analizar algunas de ellas, tenemos el caso del antígeno T medio del virus polioma: vemos que la serina está precedida por una tirosina en la secuencia consensual de fosforilación por la caseínaquinasa II. Esto, de acuerdo a lo observado a través de nuestros resultados, podría ser favorable para la acción de la enzima. Por otro lado, la molécula posee una secuencia semejante a la del extremo carboxilo terminal de la subunidad α de la tubulina. Este segmento podría afectar la fosforilación de la serina, actuando como un inhibidor de la caseínaquinasa II. Si la tirosina es fosforilada por la acción de una tirosina proteínquinasasa, el efecto inhibidor podría disminuir, proporcionando mejores condiciones para la fosforilación de la mencionada serina.

En el caso de la subunidad catalítica de la proteínquinasa A se puede apreciar que entre dos serinas, que cumplen el consenso de fosforilación por la caseínquinasa II, se encuentra una secuencia en la cual el residuo de tirosina está ubicado entre dos residuos de ácido aspártico y cuatro residuos de ácido glutámico, de manera que esta secuencia constituye una secuencia de "seudosustrato" que podría afectar la fosforilación de las serinas en torno a ella. Si la tirosina está fosforilada, la secuencia se presenta más favorable para la acción de la caseínquinasa II.

Algo semejante podría suceder con la proteína del canal de sodio. En este caso se encuentran tres residuos de serina que pueden ser fosforilados por la caseínquinasa II. En el interior del segmento encontramos una tirosina, próxima a la segunda y tercera serina. De acuerdo a nuestras observaciones al estudiar la fosforilación de los péptidos sustrato que poseen tirosina, la presencia de este residuo de tirosina es favorable para la fosforilación del tercer residuo de serina. Pero a la vez, esa misma tirosina puede no ser favorable para la fosforilación de la primera serina, menos aún si las dos serinas adyacentes a la tirosina se encuentran fosforiladas.

Lo que ocurre con la cadena β de la tubulina es interesante pues cuando se ensaya *in vitro* un péptido que

tiene la secuencia EMYEDDEESESQGPK, la serina señalada es la serina 444 fosforilada por la caseínaquinasa II (Díaz-Nido y col., 1990), a pesar de no cumplir con la secuencia consensual de fosforilación (S X X E/D). Sería de interés estudiar si la tirosina presente en la secuencia tiene o no alguna influencia sobre este hecho.

Si bien es cierto que este análisis no tiene el apoyo de evidencias experimentales directas, estas ideas concuerdan con la hipótesis de una posible participación de la caseínaquinasa II en procesos reguladores mediados por múltiples fosforilaciones, en los que intervienen otras proteínaquinasas, incluyendo tirosina proteínaquinasas y además proteínafosfatasas.

D. EFECTO DE DERIVADOS POLIGLUTAMILADOS DEL ACIDO FOLICO.

Los resultados obtenidos con los derivados del ácido fólico son interesantes ya que muestran el efecto de un tipo de moléculas no proteicas, pero con estructuras que presentan similitud con la del péptido inhibidor Y_2E_9 . Poseen un grupo con anillos aromáticos, en los cuales se encuentran grupos hidroxilos o aminos, junto a la cadena polianiónica constituida por residuos de ácido glutámico unidos mediante enlaces γ peptídicos.

Al analizar la acción de estos derivados, se observa

que la presencia del grupo aromático, junto a la cadena polianiónica, es muy importante para la interacción con la enzima. En efecto, aún cuando a mayor número de residuos de ácido glutámico la inhibición es mayor, es evidente que una cadena de hasta seis residuos de ácido glutámico, por sí sola, no es capaz de ejercer un efecto inhibitor (en el intervalo de concentración utilizado). El efecto sólo se logra si tiene un anillo aromático unido.

Llama la atención el hecho de que sea suficiente la presencia del anillo bencénico con el grupo amino en posición para, del ácido para-aminobenzoico, para que se manifieste un efecto inhibitor. Al parecer, el grupo amino aromático podría reemplazar al grupo hidroxilo aromático en las interacciones. Esto también se evidencia en el caso del metotrexato, el cual posee un grupo amino en el carbono 4 del anillo pteridina, reemplazando al grupo cetona. Esta sustitución es la única diferencia que presenta el metotrexato en el anillo pteridina con respecto al ácido fólico y a ella se le podría atribuir la capacidad que tiene el metotrexato para competir eficientemente con el ácido fólico. De igual manera, esto se estaría manifestando en su interacción con la caseínaquinasa II, pues sus derivados son mejores inhibidores que los correspondientes derivados poliglutamilados del ácido fólico.

No se sabe si la interacción que presentan estos

compuestos con la caseínaquinasa II puede ocurrir *in vivo*. Las concentraciones de los derivados poliglutamilados del ácido fólico, en la célula se encuentran en un intervalo entre 15 y 35 μM (Schirch y Strong, 1989), el cual se encuentra por debajo del valor de las K_i determinadas para estos derivados (87 μM para el derivado hexaglutamilado del metotrexato y 2,1 mM para el derivado hexaglutamilado del ácido paraaminobenzoico). Por otra parte, los valores de las K_m aparentes de la caseínaquinasa II por sus sustratos proteicos son pequeños (entre 50 nM y 20 μM) (Ou y col., 1992). Sin embargo, existe la posibilidad de que estos derivados presenten, en determinadas situaciones un aumento de la concentración en alguna zona o compartimiento celular. A la vez, hay que considerar que siendo la inhibición competitiva, si la concentración de los sustratos proteicos es baja con respecto al valor de su K_m , se podría obtener una inhibición eficiente puesto que la relación entre estos parámetros y la fracción de inhibición (i) (el valor de i al ser multiplicado por 100 da el porcentaje de inhibición) está dado por la siguiente ecuación:

$$i = [I] / ([I] + K_i(1 + [S]/K_m)) \quad (\text{Segal, 1975})$$

Esta relación indica que un valor alto en la concentración de inhibidor aumenta la fracción de inhibición, pero también muestra que ésta es favorecida si la concentración de sustrato

es pequeña.

También es interesante que el grado de poliglutamilación de estos compuestos puede definir la afinidad que tienen por ellos las enzimas que participan en la transferencia de unidades de un átomo de carbono (Schirch y Strong, 1989). Por ejemplo, en el caso de la serina:glicina hidroximetiltransferasa mitocondrial se encuentra una disminución de 200 veces en la constante de disociación del complejo binario cuando se va desde el folato con un residuo de ácido glutámico hasta el derivado con seis residuos (Strong y col., 1989). Si en la célula estos compuestos se encuentran firmemente unidos a algunas enzimas, es posible que en esta forma, es decir, como derivados poliglutamilados unidos a moléculas proteicas, constituyan mejores inhibidores de la caseínaquinasa II.

Aunque puede suponerse la existencia de una relación entre los cofactores de las enzimas responsables de la síntesis de las bases nitrogenadas y la caseínaquinasa II, con los datos disponibles en la actualidad no se puede establecer, con propiedad, el sentido fisiológico que podría tener la inhibición de la enzima por estos compuestos. Sin embargo, llama la atención que un tipo de estructura muy particular, como lo es una secuencia de aminoácidos ácidos precedida por un grupo aromático, sean reconocidas específicamente por

enzimas completamente diferentes en su función, como lo son la caseínaquinasa II y las enzimas que participan en la transferencia de un átomo de carbono.

Además, mediante los estudios mencionados anteriormente, resulta digna de consideración la posibilidad de que en la célula existan distintos tipos de compuestos cuyas estructuras se adapten a la particular especificidad de la caseínaquinasa II, y en esa forma contribuyan a su regulación.

E. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE TIROSINA PROTEÍNAQUINASAS, GENISTEINA Y 2,5-DIHIIDROXIMETILCINAMATO, SOBRE LA CASEÍNAQUINASA II.

A raíz de los estudios y observaciones efectuados en esta tesis, se evidencia una relación entre la caseínaquinasa II y la familia de las tirosina proteínaquinasas. La relación entre ellas abarca el aspecto de la especificidad. En efecto, como las proteínas sustratos de algunas tirosina proteínaquinasas poseen la tirosina fosforilable inmersa en secuencias de aminoácidos ácidos, es posible que, debido a dicha secuencia, esa misma proteína sea inhibidora de la caseínaquinasa II. En este sentido, no se puede descartar la posibilidad inversa, esto es, que un sustrato de la caseínaquinasa II se comporte como inhibidor de alguna o

algunas tirosina proteínasas. (Proyectándose a futuro, la investigación de este aspecto podría constituir un aporte significativo en el establecimiento de una relación entre la caseínaquinasa II y la familia de las tirosina proteínasas). Además, existe la posibilidad de que las tirosina proteínasas y la caseínaquinasa II sean inhibidas por el mismo tipo de compuestos. Esto motivó el estudio del efecto de inhibidores de las tirosina proteínasas sobre la caseínaquinasa II.

El estudio con el 2,5- dihidroximetil-cinamato muestra que este compuesto, que es un inhibidor competitivo para el sustrato proteico de las tirosina proteínasas, es capaz de inhibir a la caseínaquinasa II a concentraciones comparables a las que inhiben a las tirosina proteínasas (Enright y Booth, 1991). En cambio, el compuesto genisteína, el cual es un inhibidor competitivo de la unión del sustrato nucleotídico, no es capaz de inhibir a la caseínaquinasa II, dentro del intervalo de concentración al cual inhibe a las tirosina proteínasas. Indudablemente, se requiere estudiar más acabadamente cómo se está ejerciendo esta inhibición sobre la caseínaquinasa II, y en forma paralela, realizar lo mismo con una o más tirosina proteínasas para efectuar una comparación más adecuada.

Considerando estos datos, junto con los resultados

obtenidos utilizando polipéptidos y péptidos inhibidores, se puede pensar que existe cierta semejanza estructural entre el sitio catalítico de la caseínaquinasa II y el de algunas tirosina proteínaquinasas. Una similitud de este tipo es muy difícil de establecer, porque, como ya se señaló en la Introducción, existe una gran homología entre los dominios catalíticos de las serina/treonina proteínaquinasas y las tirosina proteínaquinasas, y no se ha logrado definir en estos dominios qué secuencia o secuencias podrían ser responsables de la diferenciación de la especificidad (Hanks y Quinn, 1991; Lindberg y col., 1992). De este modo se ha postulado que en dicha diferenciación estarían participando otros dominios o subunidades de la enzima.

F. INFLUENCIA DE LA SUBUNIDAD β DE LA CASEINAQUINASA II EN EL RECONOCIMIENTO DE LAS SECUENCIAS CON TIROSINA.

Los estudios realizados utilizando los inhibidores peptídicos y polipeptídicos constituidos por residuos de ácido glutámico y de tirosina sobre la subunidad α de la caseínaquinasa II, aportan mayor información con respecto a las determinantes de la especificidad de la enzima.

En primer lugar, se observa que la subunidad α catalítica es menos sensible que la holoenzima a la inhibición por el copolímero de ácido glutámico y tirosina (4:1) y la

disminución del efecto inhibitor es de un orden de magnitud. Esto es más sugerente si se considera que, en contrapartida, la subunidad α es más sensible al ácido poliglutámico, de manera que las diferencias observadas en los efectos no pueden atribuirse a que la subunidad α posea, en general, una sensibilidad menor a los inhibidores polipeptídicos.

A su vez, los resultados con los péptidos inhibidores constituidos por 9 residuos de ácido glutámico y 2 de tirosina, aportan mayor evidencia de que se trata de una pérdida selectiva de la afinidad de la subunidad α por secuencias constituidas por tirosina seguida de un grupo de residuos de aminoácidos ácidos, o sea, por secuencias tipo seudosustrato.

El hecho de que, con la subunidad α , estas secuencias con tirosina aún presenten un efecto inhibitor algo mayor al de las secuencias de ácido poliglutámico, podría atribuirse a que la tirosina, en el péptido o en el polipéptido, está contribuyendo a que estos adopten una estructura más adecuada para interactuar con la enzima. Considerado en esta forma, se podría descartar que el leve incremento en la inhibición se deba a un efecto adicional, causado por una interacción específica entre el grupo hidroxilo de la tirosina y el sitio catalítico de la enzima.

La pérdida de la sensibilidad de la subunidad α a

ser inhibida más eficientemente por secuencias en las cuales la tirosina está reemplazando al aminoácido fosforilable alifático, hace pensar que la subunidad β está contribuyendo a la sensibilidad de la holoenzima. Esta idea es apoyada por los experimentos de reconstitución utilizando las dos subunidades, en los cuales se observó una recuperación de dicha sensibilidad.

En cierta medida, los estudios con los péptidos inhibidores en presencia de Mn^{+2} y en presencia de distintas concentraciones de Mg^{+2} , apoyan la idea de que la subunidad β es necesaria para la especificidad "fina" de la caseínaquinasa II. Hathaway y Traugh (Hathaway y Traugh, 1984 a) postularon la existencia de 2 sitios para Mg^{+2} , uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. Este último explicaría el alto requerimiento de Mg^{+2} de la enzima (7 a 10 mM). En el modelo planteado por estos autores, la espermina (policación) podría sustituir parcialmente el requerimiento de Mg^{+2} y competiría con él por la misma forma de la enzima. Actualmente, se sabe que la espermina y otros policationes interactúan con la subunidad β de la enzima (Traugh y col., 1990). Se puede postular que el Mg^{+2} se une a la subunidad β en forma semejante a como lo hacen los policationes, de manera que, el Mg^{+2} en alta concentración, le otorgaría a la subunidad β una conformación adecuada para que, a su vez, la holoenzima

adquiera la conformación óptima para la unión con el sustrato.

En los experimentos en los que se estudió el efecto de los péptidos inhibidores Y_2E_9 y E_9Y_2 sobre la holoenzima, se observó que a medida que disminuye la concentración de Mg^{+2} la enzima pierde, en gran medida, la sensibilidad a ser inhibida en forma discriminada por estos péptidos. Es así como se hace menor la diferencia entre la capacidad inhibidora de estos péptidos. Los resultados anteriores concuerdan con los ya comentados, obtenidos cuando se ensayó la acción de estos péptidos sobre la subunidad α sola. Así, es posible postular que, a bajas concentraciones de Mg^{+2} , disminuye el efecto de la subunidad β sobre la subunidad α . En este punto es necesario tener en cuenta que puede existir una interacción entre los péptidos inhibidores y el Mg^{+2} , y que ésta puede ser importante en la unión con la enzima. Para aclarar este aspecto se podría analizar la actividad enzimática modificando las proporciones de los inhibidores con respecto al ión metálico. Sin embargo, lo observado con el Mn^{+2} es congruente con lo postulado. Este ión metálico puede sustituir al Mg^{+2} en la formación de un complejo con el sustrato nucleotídico, pero no sería capaz de reemplazarlo en su acción sobre la subunidad β . De esta forma, es lógico que los resultados obtenidos con Mn^{+2} sean similares a los obtenidos a bajas concentraciones de Mg^{+2} . Con respecto a estos resultados, es interesante hacer

notar además que la utilización de Mn^{+2} , en complejo con el nucleótido como sustrato, caracteriza a numerosas tirosina proteínquinasas las cuales usan de preferencia este metal (Hunter y Cooper, 1985).

La hipótesis de la contribución de la subunidad β a la afinidad de la caseínaquinasa II por sus sustratos es apoyada por los experimentos de Meggio y col. (Meggio y col., 1992. a), en los cuales se muestra que la velocidad de fosforilación de algunos péptidos sintéticos es estimulada varias veces por polilisina, la cual como ya se dijo, interactúa con la subunidad β . Llama especialmente la atención el caso del péptido sustrato con la secuencia S A A E A A, la cual cumple con el requerimiento mínimo de poseer un aminoácido ácido en la tercera posición a contar de la serina fosforilable. La velocidad de fosforilación de este péptido aumenta 11,6 veces en presencia de polilisina, observándose una disminución de 4 veces en el valor de la K_m .

Sin embargo, el uso del efecto estimulador de la polilisina como criterio para establecer la importancia de la subunidad β en aumentar la eficiencia de la caseínaquinasa II para fosforilar un sustrato, requiere de cierta precaución. En muchos casos no es posible descartar que este polipéptido básico esté interactuando además (o exclusivamente) con el sustrato. Así ocurre con el caso de un tridecapéptido

sintético, cuya estructura posee la secuencia de la calmodulina que es fosforilada por la caseínaquinasa II. La fosforilación de este tridecapéptido, catalizada por la subunidad α de la caseínaquinasa II, es estimulada aproximadamente tres veces por polilisina, en cambio, la fosforilación de la calmodulina misma no es estimulada por este polipeptido. (Meggio y col., 1992 a).

Las evidencias analizadas, junto a otras, indican que la subunidad β no sólo da estabilidad a la enzima sino que tiene un papel en la especificidad de la reacción (Meggio y col., 1992 b). La unión de la subunidad β con la subunidad α catalítica le proporcionaría a la enzima una conformación en la cual el sitio activo presentaría sus plenas características de especificidad. Esta idea es apoyada por los estudios mediante dicroísmo circular (Meggio y col., 1992 a), que indican que la unión de la subunidad β a la subunidad α de la enzima conduce a un aumento considerable en su estructura de α -hélice.

Por otra parte, la información disponible con respecto a la autofosforilación de la subunidad β , que muestra que la polilisina disminuye esta reacción (Meggio y Pinna, 1984; Meggio y col., 1992 a), es contradictoria. Ambos temas requieren mayores estudios para su mejor comprensión. En nuestro laboratorio se obtuvo una información diferente con

respecto al efecto de esta polimerización sobre la autofosforilación de la subunidad β de la caseínaquinasa II de oocitos de *X. laevis* (Hinrichs y col., 1993). En efecto, en este caso la autofosforilación de la subunidad β no es inhibida por esta polimerización. Por otra parte, también los resultados de nuestro laboratorio (Hinrichs y col., 1993) indican que la autofosforilación de la subunidad β no es necesaria para que ésta adquiera la capacidad de estimular a la subunidad α . Los resultados obtenidos muestran que una subunidad β mutante que carece del sitio de autofosforilación conserva su capacidad de estimular a la subunidad α .

G. INTERES FISIOLÓGICO DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS.

La relación entre la caseínaquinasa II y las tirosina proteínasquinasa ha sido propuesta en esta tesis, basada en la sensibilidad que muestra la caseínaquinasa II frente a compuestos tirosinilados. Recientemente, se ha descrito la existencia de un grupo de enzimas que son capaces de fosforilar no solamente tirosina, sino a su vez serinas o treoninas en sustratos naturales, sintéticos o bien en forma intramolecular (autofosforilación). Estas enzimas han sido llamadas proteínasquinasa de doble especificidad ("dual-specificity kinases") (Featherstone y Russel, 1991; Parker y

col., 1992; Piwnica-Worms, 1992). Hasta el momento son muy pocas en número, pero llama la atención que algunas de ellas, como la proteínquinasa wee-1, tienen importancia en el ciclo celular. El número de estas proteínquinasas analizadas, a nivel de estructura aminoacídica, es todavía muy limitado para hacer comparaciones de dominios específicos con los otros tipos de proteínquinasas. Sin embargo, los estudios filogenéticos de Hanks y col. (Hanks y col., 1988; Hanks y Quinn, 1991) presentan a la caseínquinasa II próxima a estas proteínquinasas de especificidad dual. Estos nuevos antecedentes abren muchas interrogantes con respecto a las proteínquinasas, incluso en el aspecto evolutivo. Si las tirosina proteínquinasas surgen paralelamente con la necesidad de la relación intercelular (a través de mecanismos a nivel de la membrana celular), se puede pensar que estas proteínquinasas son posteriores que las serina/treonina proteínquinasas. Un proceso evolutivo podría originar o eventualmente conservar enzimas con especificidad dual.

La caseínquinasa II no es una enzima de especificidad dual. Sin embargo, dado que ella es capaz de reconocer al residuo de tirosina en secuencias acídicas, el sitio activo de la enzima debe poseer alguna similitud con el de las tirosina proteínquinasas. El papel de la subunidad β en el reconocimiento de estas secuencias es importante. Con

respecto a este punto, se hace evidente que la enzima, al tener una estructura oligomérica, presenta ventajas en cuanto a estabilidad y a regulación. En este último aspecto la subunidad β no sólo tiene un papel en la interacción con moléculas reguladoras a nivel de secuencias ajenas al sitio activo, sino que también participaría en la conformación de éste, otorgándole así a la enzima la plenitud de sus características de especificidad y afinidad.

Así, con los resultados de esta tesis, podemos hacer las siguientes consideraciones: la caseínaquinasa II reconoce secuencias peptídicas más complejas que las constituidas sólo por residuos de aminoácidos ácidos. La introducción de los grupos fenólicos de los residuos de la tirosina entre los residuos de ácido poliglutámico, incrementa la afinidad de la enzima por dichos polipéptidos. Lo mismo ocurre con los anillos aromáticos sustituidos en el caso de los derivados poliglutamilados del ácido fólico.

El reconocimiento de la caseínaquinasa II de sus sustratos e inhibidores, en el cual la subunidad β reguladora juega un papel importante, también incluye una selección preferencial de los péptidos que contienen el residuo de tirosina en el extremo amino terminal de la secuencia de ácidos glutámicos. Esta ubicación relativa de la tirosina es igual a la que tienen la serina o la treonina en los péptidos

sustratos junto a los aminoácidos ácidos. Por lo tanto, proponemos que los péptidos inhibidores que contienen residuos de tirosina y de ácidos glutámicos en esa posición actúan como seudosustratos. Esta proposición adquiere importancia en vista del reciente descubrimiento de enzimas de especificidad dual, las cuales pueden a la vez fosforilar serinas, treoninas y tirosinas.

Finalmente, al analizar los antecedentes y los resultados presentados en esta tesis, se hace evidente que existen numerosas incógnitas con respecto a la caseínaquinasa II, tanto en lo que se refiere a su función como a su relación con las otras proteínaquinasas. Por otra parte, el mismo auge en la investigación de esta enzima y demás proteínaquinasas, junto con incrementar el conocimiento sobre ellas, hace surgir nuevas interrogantes, lo cual motiva a continuar en su estudio como enzima clave en la regulación metabólica.

H. PROYECCIONES DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN ESTA TESIS.

Como se mencionó anteriormente, son numerosos los aspectos interesantes con respecto a la caseínaquinasa II y su función que requieren de mayores estudios. Muchos de ellos están siendo investigados actualmente en nuestro laboratorio. A raíz de ellos y de los resultados de esta tesis, es posible ampliar los estudios sobre la especificidad

de la enzima, utilizando los recursos con que cuenta este laboratorio. En efecto, tanto la subunidad α como la subunidad β de la caseínaquinasa II de *Xenopus laevis* fueron clonadas y expresadas en nuestro laboratorio (Jedlicki y col., 1992), disponiéndose en la actualidad de estas dos subunidades, tanto con sus secuencias nativas como mutadas (Hinrichs, M.V., comunicación personal; Jedlicki, A.M., comunicación personal), lo cual permite profundizar en el estudio de la función de cada subunidad de la enzima y la relación entre ellas.

Los antecedentes con respecto a la subunidad β han dejado bien establecido su papel en lo que se refiere a la actividad y la estabilidad de la caseínaquinasa II. Está claro que su presencia en el tetrámero, no sólo aumenta la actividad catalítica de la holoenzima (comparada con la subunidad α) sino que también es necesaria para definir la especificidad de la enzima. Sin embargo, es importante enfatizar otros aspectos de la función de la subunidad β . Estudios recientes con mutantes, en las cuales se ha delecionado o bien se ha introducido mutaciones en la secuencia de la subunidad β (Boldyreff y col., 1992), han aclarado la función de la región rica en aminoácidos ácidos ⁵⁵DLEPDEELEDNPQNQSD⁷⁰. Esta región ha sido postulada como un segmento que regula negativamente a la caseínaquinasa II, esto es, sería un seudosustrato, cuya

acción inhibitoria sería liberada por la asociación de la enzima con un sustrato ácido, o bien por efecto de activadores de tipo catiónico o policatiónico. Sin embargo, estos estudios sugieren que esta región puede además participar en la formación de la estructura tetramérica de la enzima. También se observa que las deleciones o mutaciones en esta región ácida de la subunidad β hacen que la oligomerización se dificulte. De éstas, la mutación más crucial es la que cambia los aminoácidos ácidos de las posiciones 63 y 64 por alanina, puesto que al realizar con esta mutante los experimentos de oligomerización, se observa que permanecen subunidades a libres sin oligomerizarse. Estos experimentos hacen que a la subunidad β , y en particular, a este segmento ácido se le atribuya una función adicional (además de un papel modulador de la actividad enzimática actuando como seudosustrato). Esta estaría relacionada con la oligomerización de la holoenzima.

Estos estudios, relativamente recientes, pueden corroborarse y ampliarse mediante experimentos con los inhibidores polipeptídicos ricos en aminoácidos ácidos. Se puede postular que la región rica en aminoácidos ácidos de la subunidad β sirve como una especie de templado para facilitar la oligomerización. Siendo así, tanto el ácido poliglutámico como el copolímero de ácido glutámico y tirosina podrían realizar esta función, así como también los péptidos

inhibidores más pequeños podrían realizarla.

Experimentos utilizando estos péptidos o polipéptidos ácidos, en ausencia de la subunidad β , podrían mostrar si ellos influyen o no en la oligomerización de las subunidades α de la caseínaquinasa II y también podrían indicar si pueden ellos sustituir a la subunidad β en esa función. Estos experimentos, utilizando los péptidos o polipéptidos ácidos, también podrían realizarse en presencia de la subunidad β y en este caso sería de interés efectuar algunas modificaciones. Por ejemplo:

- a. en presencia de diferentes proporciones de subunidad β y en especial en proporciones limitantes de subunidad β .
- b. en presencia de subunidades β con distintas mutaciones en la región rica en aminoácidos ácidos (la región entre los aminoácidos 55 y 70).

También se podría utilizar la subunidad β nativa en presencia de polilisina. Si esta polilisina se une a la región acídica de la subunidad β , su presencia podría interferir en el ensamblaje de las subunidades. En este aspecto, se puede estudiar si los polipéptidos ácidos, por competencia, son capaces de revertir el posible efecto inhibitorio que podría tener la polilisina en la tetramerización de la caseínaquinasa II. Las situaciones descritas, basadas en la lógica de las interacciones de las subunidades de la

caseínaquinasa II con moléculas afines con una u otra subunidad, hacen prever resultados que se contraponen con los efectos que ejercen los polipéptidos ácidos y básicos sobre la actividad enzimática. Sin embargo, la posibilidad de que con los experimentos mencionados se obtengan resultados controversiales, aumenta el interés por realizarlos, tanto en la forma planteada como con modificaciones adecuadas para aclarar las controversias. De todas formas, es posible que en el caso de la caseínaquinasa II exista un balance entre inhibición y activación por una determinada molécula, dependiendo de factores tales como su disponibilidad, concentración o condiciones del medio o compartimiento en el cual se encuentra.

Por otra parte, como es sabido, la oligomerización es favorecida por una concentración de sal (NaCl o KCl) superior a 0,1 M. En este aspecto sería interesante analizar si los péptidos o polipéptidos ácidos pueden contrarrestar un efecto adverso debido a una concentración salina inferior.

Si con este tipo de experimentos se observa que los péptidos o los polipéptidos ácidos influyen en la oligomerización de la caseínaquinasa II, es posible proyectar estos resultados, postulando que numerosas proteínas que poseen largas secuencias de aminoácidos ácidos pueden influenciar la oligomerización de la caseínaquinasa II, y así

participar en otra forma en la regulación de la enzima. Desde este punto de vista, se trataría de una situación en la cual las proteínas que poseen secuencias acídicas y por ello tienen la potencialidad de inhibir la actividad enzimática, también podrían constituir un factor favorable para la formación del tetramero y, en esta forma, originar una enzima plenamente activa. Tal como se discutió anteriormente, la acción en uno u otro sentido podría depender de factores ambientales o de la concentración de estas proteínas ácidas. Además, indudablemente en forma más estricta, dependería de la disponibilidad de subunidad β libre.

Al mencionar este último punto, es indispensable referirse al aspecto de la regulación de la expresión de las subunidades de la caseínaquinasa II. Es lógico pensar que ambas subunidades se sintetizan en proporciones adecuadas para formar el tetramero. Estudios muy recientes indican que la subunidad α de la caseínaquinasa II regula la expresión de la subunidad β (Robitzki y col., 1993), actuando como un factor de transcripción. En esta forma ocurriría la expresión coordinada de ambas subunidades de la enzima. Cuando existe un exceso de subunidad α libre, se une al promotor del gen de la subunidad β , produciendo la activación de la transcripción. Por otra parte, un exceso de subunidad β libre puede unirse a la subunidad α unida a la región promotora del DNA,

liberándola y a la vez formando así el tetrámero enzimático activo.

Actualmente aún se desconoce cómo la subunidad β logra liberar a la subunidad α del DNA. La disociación podría ocurrir gracias a que la región acídica de la subunidad β compite con el DNA por la unión a la subunidad α . Si la liberación sucede en esta forma, la subunidad β podría ser reemplazada por polipéptidos o péptidos ácidos.

Además, también sería interesante estudiar si los polipéptidos y péptidos que contienen tirosina, poseen esta capacidad para liberar a la subunidad α del DNA, y ver si en esto son similares o diferentes a los que carecen de este aminoácido. Esta hipótesis se basa en la homología de las bases púricas y pirimidínicas con los anillos aromáticos de la tirosina. También se apoya en los experimentos de Gatica y col. (Gatica y col., 1989) en los que se observa que oligonucleótidos ricos en la base uracilo son buenos inhibidores de la caseínaquinasa II. La utilización de este tipo de compuestos impediría la regulación coordinada de la expresión de ambas subunidades.

En esta forma, los estudios realizados en esta tesis con los péptidos y polipéptidos ricos en aminoácidos ácidos, además de lo que establecen con respecto a la especificidad y a la regulación de la caseínaqui-

nasa II, abren un nuevo enfoque con respecto a la regulación de la enzima, como lo es la posible regulación a nivel de su expresión y oligomerización.

CONCLUSIONES

El trabajo presentado en esta tesis permite concluir lo siguiente:

1. La caseínaquinasa II reconoce específicamente la tirosina inmersa en secuencias de ácido glutámico. Estas secuencias son potentes inhibidores de la enzima.
2. Los grupos aromáticos sustituidos, como los que existen en derivados poliglutamilados del ácido fólico, también incrementan la capacidad inhibidora de las secuencias polianiónicas.
3. La enzima interactúa preferentemente con péptidos que tienen tirosinas en el extremo amino terminal de los grupos de ácidos glutámicos. Este reconocimiento se asemeja a su interacción con péptidos sustratos compuestos por serinas o treoninas y ácidos glutámicos.
4. La subunidad β de la caseínaquinasa II influye en el reconocimiento de la tirosina en péptidos ricos en residuos ácidos y en la discriminación de la posición de esa tirosina en secuencias inhibidoras.

BIBLIOGRAFIA

- Ackerman, P. y Osheroff, N. (1989) Regulation of casein kinase II activity by epidermal growth factor in human A-431 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**: 11958-11965.
- Agostini, P., Vandenheede, J.R., Goris, J., Meggio, F., Pinna, L.A. y Mereevede, W. (1987) The ATP, Mg-dependent protein phosphatase: regulation by casein kinase. *FEBS Lett.* **224**: 385-390.
- Arce, C.A., Rodriguez, J.A., Barra, H.S. y Caputto, R. (1975). Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4 dihidroxyphenyl alanine as single units into brain tubulin. *Eur. J. Biochem.* **59**: 145-149.
- Baltensperger, K., Lewis, R. L., Woon, C-W., Vissavajjhala, P., Ross, A. H. y Czech, M. P. (1992). Catalysis of serine and tyrosine autophosphorylation by the human insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7885-7889.
- Barbosa, M., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J., Lowy, D. y Vousden, K. (1990) The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1A and SV40 large T antigen contains separate domains for Pb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **9**: 153-160.
- Beltramo, D.M., Arce, C.A. y Barra, H.S. (1987) Tubulin, but not microtubules, is the substrate for tubulin: tyrosine ligase in mature avian erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **262**: 15673-15677.
- Bidwai, A.P., Hanna, D.E. y Glover, C.V.C. (1992) Purification and characterization of casein kinase II from Δ cka2 *Saccharomices cerevisiae* rescued by *Drosophila* CKII subunits. *J. Biol. Chem.* **267**: 18790-18796.
- Bidway, A.P., Reed, J.C. y Glover, C.V.C. (1993) Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 265-270.

- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L.A. y Issinger, O-G. (1992) Casein kinase II structure-function relationship: creation of a set of mutants of the β subunit that variably surrogate the wild type β subunit function. Arch. Biochem. Biophys. Comunn. 188:228-234.
- Bouret, R.B., Borkovich, K.A. y Simon, M.I. (1991) Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. Ann. Rev. Biochem. 60: 401-441.
- Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H.K., Angel, P., Woodgett, J.R. y Hunter, T. (1991) Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-fos at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. Cell 64: 573-584.
- Burzio, L.O. y Koide, S.S. (1976) Isolation and characterization of *Xenopus laevis* oocytes nucleus. Arch. Biol. Med. Exper. 10: 22-27.
- Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M. O. y Olson, M. O. (1987) Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type N II protein kinase. Biochemistry 26: 7876-7883.
- Carroll, D., Santoro, N. y Marshack, D.R. (1988) Regulating cell growth: Casein kinase II dependent phosphorylation of nuclear oncoproteins. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol LII pp. 91-95.
- Carroll, D. y Marshak, D.R. (1989) Serum-stimulated cell growth causes oscillations in casein kinase II activity J. Biol. Chem. 264: 7345-7348.
- Cartwright, C.A., Simantov, R., Kaplan, P.L., Hunter, F. y Eckhart, W. (1987) Alteration in pp60^{c-src} accompany differentiation of neurons from rat embryo striatum. Mol. Cell. Biol. 7: 1830-1840.
- Clairborne, C.V.C., Sheltin, E.R. y Brutlag, E.R. (1983) Purification and characterization of a type II casein kinase from *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 258: 3258-3265.

- Cobb, M.H., Sang, B.C., González, R., Goldsmith, E. y Elles, L. (1989) Autophosphorylation activates the soluble cytoplasmic domain of the insulin receptor in an intermolecular reaction. *J. Biol. Chem.* **264**: 18701-18701.
- Cochet, C. y Chambaz, E.M. (1983) Oligomeric structure and catalytic activity of G type casein kinase. *J. Biol. Chem.* **258**: 1403-1406.
- Collet, M.S. y Erickson, R.L. (1978) Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **75**: 2021-2024.
- Corbett, A.H., De Vore, R.F. y Osheroff, N. (1992) Effect of casein kinase II mediated phosphorylation on the catalytic cycle of topoisomerase II. Regulation of enzyme activity by enhancement of ATP hidrolysis. *J. Biol. Chem.* **267**: 20513-25018.
- Cornish-Bowden, A. (1974) A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem. J.* **137**: 143-144.
- Crews, C. M., Alessandrini, A. A. y Erikson, R. L. (1991) Mouse Erk-1 gene product is a serine/threonine protein kinase that has the potential phosphorylate tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8845-8849.
- Csermely, P., Schnaider, T., Cheatman, B., Olson, M.O.J. y Kahn, C.R. (1993) Insulin induces the phosphorylation of nucleolin. A possible mechanism of insulin-induced RNA efflux from nuclei. *J. Biol. Chem.* **268**: 9747-9752.
- Dahmus, M.L. (1981) Purification of ascites tumor RNA polymerase II by protein kinase. *Biochemistry* **15**: 1821-1829.
- De Benedette, M. y Snow, E.C. (1991) Induction and regulation of casein kinase II during B lymphocyte activation. *J. Immunol.* **147**: 2839-2845.

- Díaz-Nido, J., Serrano, L., López-Otin, C., Vanderkerckhove, J. y Avila, J. (1990) Phosphorylation of a neuronal-specific β -tubulin isotype. *J. Biol. Chem.* 265: 13949-13954.
- Dumont, J. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). Stages of oocytes in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153-180.
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J-P., Desbruyers, E., Gros, F. y Derroulet, P. (1990) Postranslational glutamylation of α -tubulin. *Science* 247: 83-85.
- Edelman, A.M., Blumenthal, D.K. y Krebs, E.G. (1987) Protein serine threonine kinase. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 567-613.
- Enright, W. J. y Booth, P. (1991) Specificity of inhibitors of tyrosine kinase. *Focus.* 13: 79-83.
- Featherstone, C y Russel, P. (1991) Fission yeast p107^{weel} mitotic inhibitor is a tyrosine-serine kinase. *Nature* 349: 808-811.
- Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G.N y Chambaz, E.M. (1991) Coexpression of both α and β subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry* 30: 11133-11140.
- Findik, D. y Presek, P. (1988) Zn^{+2} enhances protein tyrosine kinase activity of human platelet membranes. *FEBS Letts.* 235: 51-56.
- Fiol, C.J., Mahrenholz, A.M., Wang, Y., Roeske, R.W. y Roach, P.J. (1987) Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. *J. Biol. Chem.* 262: 14042-14098.
- Gatica, M., Allende, C.C., Antonelli, M. y Allende, J.E. (1987) Polylysine containing peptides, including the carboxy-terminal segment of the human c-K-ras 2 protein, affect the activity of some key membrane enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 324-328.

- Gatica, M., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1989) Nucleic acids can regulate the activity of casein kinase II. FEBS Lett. 255: 414-418.
- Gatica, M., Hinrichs, M.V., Jedlicki, A.M., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1993) Effect of metal ions on the activity of casein kinase II from *Xenopus laevis*. FEBS Lett. 315: 173-177
- Glover, C.V.C., Shelton, E.R. y Brutlag, D.L. (1983) Purification and characterization of a type II casein kinase from *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 258: 3258-3265.
- Glover, C.V.C. (1986) A filamentous form of *Drosophila* casein kinase II. J. Biol. Chem. 261: 14349-14354.
- Grande, J., Pérez, M., Plana, M. y Itarte, E. (1989) Acute effects of insulin and glucagon on hepatic casein kinase II in adult fed rats. Arch. Biochem. Biophys. 275: 478-485.
- Gurdon, J.B. (1976) Injected nuclei in frog oocytes: fate, enlargement and chromatin dispersal. J. Embryol. Exp. Morph. 36: 523-540.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 241: 42-52.
- Hanks, S.K. y Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. En Methods in Enzymology 200: 38-62.
- Hathaway, G.M. y Traugh, J.A. (1979) Cyclic nucleotide-independent protein kinases from rabbit reticulocytes. Purification of casein kinases. J. Biol. Chem. 254, 762-768.
- Hathaway, C.M., Lubben, T.H. y Traugh, J.A. (1980) Inhibition of casein kinase II by heparin. J. Biol. Chem. 255: 8038-8041.

- Hathaway, G.M., Zoller, M.J. y Traugh, J.A. (1981) Identification of the catalytic subunit of casein kinase II by affinity labeling with 5'-p-fluorosulfonylbenzoil adenosine. *J. Biol. Chem.* 256: 11442 - 11446.
- Hathaway, G.M. y Traugh, J.A. (1982) Casein kinases - Multipotential protein kinases. En "Current Topics in Cellular Regulation" (Stadtman, E. y Horecker, B. eds.) Academic Press, New York, vol. 21: 101-127.
- Hathaway, G.M. y Traugh, J.A. (1983) Casein kinase II. En "Methods in Enzymology. Hormone Action: Protein Kinases" (Corbin, J.D. y Hardman, J.G., eds.) Academic Press, New York, Vol. 99 pp 317-331.
- Hathaway, G.M. y Traugh, J.A. (1984 a) Interaction of polyamines and magnesium with casein kinase II. *Arch. Biochem. Biophys.* 233: 133-138.
- Hathaway, G.M. y Traugh, J.A. (1984 b) Kinetics of activation of casein kinase II by polyamines and reversal of 2,3-bisphosphoglycerate inhibition. *J. Biol. Chem.* 259: 7011-7015.
- Hathaway, G.M. y Traugh, J.A. (1984 c) Regulation of casein kinase II by 2,3-bisphosphoglycerate in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* 259: 2850-2855.
- Heller/Harrison, R.A., Mersner, H. y Czech, M.P. ((1989) Cloning and characterization of a cDNA encoding the β subunit of human casein kinase II. *Biochemistry* 28: 9053-9058.
- Heller/Harrison, R.A. y Czech, M.P. (1991) Enhanced casein kinase II activity in COS/1 cells upon overexpression of either its catalytic or noncatalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 266: 14435-14439.
- Hinrichs, M.V., Jedlicki, A., Téllez, R., Pongor, S., Gatica, M., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1993) Activity of recombinant α and β subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*. *Biochemistry* 32: 7310-7316.

- Hu, E. y Rubin, C.S. (1990 a) Casein kinase II from *Caenorhabditis elegans*. J. Biol. Chem. 265: 5072-5079.
- Hu, E. y Rubin, C.S. (1990 b) Expression of wild-type and mutated forms of the catalytic (α) subunit of *Caenorhabditis elegans* casein kinase II in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265: 20609-20615.
- Hunter, T. y Sefton, B.M. (1980). Transforming gene product of rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1311-1315.
- Hunter, T. y Cooper, J.A. (1985) Protein tyrosine kinases. Ann. Rev. Biochem. 54: 897-930.
- Hunter, T. y Karen, M. (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. Cell 70: 375/387.
- Issinger, O-G., Brockel, C., Boldyreff, B. y Pelton, J.T. (1972) Characterization of the α and β subunits of casein kinase II by far-UV CD spectroscopy. Biochemistry 31: 6098-6103.
- Jacob, S.T., Rose, K.M. y Canellakis, Z.N. (1983) Effects of spermidine and its monoacetylated derivatives on phosphorylation by nuclear protein kinase NII. Advances in Polyamine Research Bachrach U, Kaye, A y Chayen R. Eds. Raven Press New York. Vol. 4 pp. 631-646.
- Jakobi, R. y Traugh, J. A. (1992) Characterization of the phosphotransferase domain of casein kinase II by site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 267: 23894-23902.
- Jedlicki, A., Hinrichs, M.V., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1992) The cDNAs coding for the α - and β -subunits of *Xenopus laevis* casein kinase II. FEBS Lett. 297: 280-284.
- Jordan, G. (1987) At the heart of the nucleolus. Nature 329: 489-490.
- Kalderon, D. y Smith, A.E. (1984) *In vitro* mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV⁴⁰ large T antigen. Virology 139: 109-114.

- Kamps, M.P. y Sefton, R.M. (1986) Neither arginine nor histidine can carry out the function of lysine 295 in the ATP binding site of p60^{src}. *Mol. Cell. Biol.* 6: 751-757.
- Kandrór, K.V., Benumov, A.O. y Stepanov A.S. (1989) Casein kinase II from *Rana temporaria* oocytes. *Eur. J. Biochem.* 180: 441-448.
- Kennelly, P.J. y Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinase and protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 266: 15555-15558.
- Klarlund, J.K. y Czech, M.P. (1989) Insulin-like growth factor I and insulin rapidly increase casein kinase II activity in BALB/c 3T3 fibroblast. *J. Biol. Chem.* 263: 15872-15875.
- Krebs, E.G. y Bravo, J.A. (1979) Phosphorylation -dephosphorylation of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 923-959.
- Krek, W., Maridor, G. y Migg, E.A. (1992) Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme. *J. Cell. Biol.* 116: 43-45.
- Kuenzel, E.A. y Krebs, E.G. (1985) A synthetic peptide substrate specific for casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 737-741.
- Kuenzel, E.A., Mulligan, J.A., Sommercorn, J. y Krebs, E.G. (1987) Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 262: 9130-9140.
- Kumar, N. y Flavin, M. (1981) Preferential action of a brain deetyrosinolytic carboxipeptidase on polymerized tubulin. *J. Biol. Chem.* 256: 7678-7686.
- Lee, C., Yun, Y., Hoeffler, J. y Habener, J. (1990) Cyclic AMP responsive transcriptional activation of CREB/327 involves interdependent phosphorylated subdomains. *EMBO J.* 9: 4455-4465.

- Leiva, L., Carrasco, D., Taylor, A., Veliz, M., Gonzalez, C., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1987) Casein kinase II is a major protein phosphorylating activity in the nuclei of *Xenopus laevis* oocyte. *Biochem. Int.* 14: 707-714.
- Lewin, B. (1990) Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners and substrates. *Cell* 61: 743-752.
- Lin, W.-J., Tuazon, P.T. y Traugh, G.T. (1991) Characterization of the catalytic subunit of casein kinase II expressed in *Escherichia coli* and regulation of activity. *J. Biol. Chem.* 266: 5664-5669.
- Lindberg, R.A., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1992) Dual specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *TIBS* 17: 114-118.
- Litchfield, D.W., Lozeman, F.J., Piening, C., Sommercorn, J., Takio, K., Walsh, K.A. y Krebs, E.G. (1990 a) Subunit structure of casein kinase II from bovine testis. *J. Biol. Chem.* 265: 7638-7644.
- Litchfield, D. W., Arendt, A. Lozeman, F. J., Krebs, E.G., Hargrave, P.A. y Palczewskik (1990 b) Synthetyc phosphopeptides are substrates for casein kinase II. *FEBS Lett.* 261: 117-120.
- Litchfield, D.W., Lozeman, F.J., Cicirelli, M.F., Harrylock, M., Ericsson, L.H., Pianning, C.J. y Krebs, E.G. (1991) Phosphorylation of the β subunit of casein kinase II in human A431 cells. *J. Biol. Chem.* 266: 20380-20389.
- Litchfield, D.W., Lüscher, B., Lozeman, F.J., Eisenman, R.N. y Krebs, E.G. (1992) Phosphorylation of casein kinase II by p34^{cdc2} *in vitro* and at mitosis. *J. Biol. Chem.* 267: 13943-13951.
- Lorenz, P., Pepperkok, R., Ansorge, W. y Pyerin, W. (1993) Cell Biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against human casein kinase II subunit β demonstrate participation of the kinase in mitogenic signaling. *J. Biol. Chem.* 268: 2733-2739.

- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lozeman, F.J., Litchfield, D.W., Piening, C., Takio, K., Walsh, K.A. y Krebs, E.G. (1990) Isolation and characterization of human cDNA clone encoding the α and the α' subunits of casein kinase II. *Biochemistry* 29: 8436-8447.
- Luecke, H. y Quioco, F.A. (1990). High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature*. 347: 402-406.
- Lüscher, B., Christenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G. y Eisenman, R.N. (1990) Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* 344: 517-522.
- Mamrack, M.D. (1989) Stimulation of enzymatic activity in filament preparations of casein kinase II by polylysine, melithin, and spermine. *Mol. Cell. Biochem.* 85: 147-157.
- Marais, R.M., Hsuan, J.J., McGuigan, C., Wynne, J. y Treisman, R. (1992) Casein kinase II phosphorylation increases the rate of serum response factor-binding site exchange. *EMBO J.* 11: 97-105.
- Marchiori, F., Meggio, F. y Marin, O. (1988) Synthetic peptides substrates for casein kinase II. Assesment of minimum structural requirements for phosphorylation. *Biochem. Biophys. Acta.* 971: 332-338.
- Maridor, G., Park, W., Krek, W. y Nigg, E.A. (1991) Casein kinase II: cDNA sequences, developmental expression and tissue distribution of mRNAs for α , α' and β subunits of the chicken enzyme. *J. Biol. Chem.* 266: 2362-2368.
- Marin, O., Meggio, F., Marchiori, F., Bown, G. y Pinna, L.A. (1986) Site specificity of casein kinase 2 (TS) from rat liver cytosol. *Eur. J. Biochem.* 160: 239-244.
- Mc Donald, O.B., Bannen, Y.A., Reynolds, C.A. y Sahyoun, N. (1991) Activation of casein kinase II by sphingosine. *J. Biol. Chem.* 266: 21773-21776.

- Mc Gee, M.P., Li, L.C. y Xiong, H. (1992) Diffusion control in blood coagulation. *J. Biol. Chem.* 267: 24333-24339.
- Mc Guire, J.J., Haile, W.H., Bey, P. y Corward, J.K. (1990) D L-3,3-difluoro-glutamate: an enhancer of folylpolyglutamate elongation. *J. Biol. Chem.* 265:14073-14079.
- Meggio, F., Pinna, L.A., Marchiori, F. y Borin, G. (1983) Polyglutamyl peptides: a new class of inhibitors of type-2 casein kinases. *FEBS Lett.* 162: 235-238.
- Meggio, F. y Pinna, L.A. (1984) Subunit structure and autophosphorylation mechanism of casein kinase-TS (type- 2) from rat liver cytosol. *Eur. J. Biochem.* 145: 593-599.
- Meggio, F., Marchiori, F., Borin, G., Chessa, G. y Pinna, L.A. (1984) Synthetic peptides including acidic clusters as substrates and inhibitors of rat liver casein kinase TS (type-2). *J. Biol. Chem.* 259: 14576-14579.
- Meggio, F. y Pinna, L.A. (1989) Random tyrosine and glutamic acid containing polymers are very powerful inhibitors of casein kinase II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1010: 128-130.
- Meggio, F., Perich, J.W., Meyer, H.E., Hoffmann-Posorske, E., Lennon, D.P.W., Johns, R.B. y Pinna, L.A. (1989) Synthetic fragments of β -casein as model substrates for liver and mammary gland casein kinases. *Eur. J. Biochem.* 186: 459-464.
- Meggio, F., Perich, J.W., Reynolds, E.C. y Pinna, L.A. (1991) Phosphotyrosine as a specificity determinant for casein kinase II, a growth related ser/thre-specific protein kinase. *FEBS Lett.* 279: 307-309.
- Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Marchiori, F., Perich, J.W., Issinger, O.G. y Pinna, A. (1992 a) The effect of polylysine on casein kinase 2 activity is influenced by both the structure of the protein peptide substrates and the subunit composition of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 205: 939-945.

- Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Pinna, L.A. y Issinger, O-G. (1992 b) Role of the β subunit of casein kinase II on the stability and specificity of the recombinant reconstituted enzyme. *Eur. J. Biochem.* **204**: 293-297.
- Meisner, H., Heller-Harrison, R., Buxton, J. y Czech, M.P. (1989) Molecular cloning of the human casein kinase II α subunit. *Biochemistry* **28**: 4072-4076.
- Mills, G. B., Schmandt, R., Mc Gill, M., Amendola, A., Hill, M., Jacobs, K., May, C., Rodricks, A. M., Campbell, S. y Hogg, D. (1992) Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation *J. Biol. Chem.* **267**: 16000-16006.
- Miyata, Y. y Hara, I. (1992) The 90 kDa heat shock protein HSP 90, binds and protects casein kinase II from self aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.* **267**: 7042-7047.
- Mülner-Lorillon, O., Marot, J., Cayla, X., Pouhle, R. y Belle, R. (1988) Purification and characterization of a casein kinase type II enzyme from *Xenopus laevis* ovary. *Eur. J. Biochem.* **171**: 107-117.
- Mülner-Lorillon, O., Cormier, P., Labbe, J., Dorée, M., Poulhe, R., Osborne, H. y Belle, R. (1990) M-phase specific cdc-2 kinase phosphorylates the beta subunit of casein kinase II and increases casein kinase II activity. *Eur. J. Biochem.* **193**: 529-534.
- Nakawaga, J.P., Dorée, M., Labbe, J. y Nigg, E. (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M-phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61**: 591-602.
- Nath, J. y Flavin, M. (1980) An apparent paradox in the occurrence, and the *in vivo* turnover, of C-terminal tyrosine in membrane-bound tubulin of brain. *J. Neurochem.* **35**: 693-706.
- Ou, W-J., Thomas, D.Y., Bell, A.W. y Bergeron, J.J.M. (1992) Casein kinase II phosphorylation of signal sequence receptor α and the associated membrane chaperone calnexin. *J. Biol. Chem.* **267**: 23789-23796.

- Padmanabha, R. y Glover, C.V.C. (1987) Casein kinase II of yeast contains two distinct α polypeptides and a usually large β subunit. *J. Biol. Chem.* 262: 1829-1835.
- Padmanabha, A., Wu, J. L-P., Hanna, D.E. y Glover, C.V.C. (1990) Isolation, sequencing and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4089-4099.
- Palen, E. y Traugh, J.A. (1991) Phosphorylation of casein kinase II. *Biochemistry* 30: 5586-5590.
- Parker, L.L., Atherton-Fessler, S. y Piwnica-Worms, H. (1992) p107^{wee1} is a dual specificity kinase but phosphorylates p34^{cdc2} on tyrosine 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2917-2921.
- Pena, J.M., Itarte, E., Domingo, A. y Cusso, R. (1983) Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate dependent and independent protein kinases in human leukemia cells. *Cancer Res.* 43:1172-1175.
- Pérez, M., Grande, J. e Itarte, E. (1987) Developmental changes in rat hepatic casein kinases 1 and 2. *Eur. J. Biochem.* 170: 493-498.
- Perich, J.W., Meggio, F., Reynolds, E.C., Marin, O. y Pinna, L.A. (1992) Role of phosphorylated aminoacyl residues in generating atypical consensus sequences which are recognized by casein kinase II but not by casein kinase I. *Biochemistry* 31: 5893-5897.
- Perutz, M.F., Staden, R., Moens, L. y De Baere, I. (1993) Polar zippers. *Current Biology* 3 :249-253.
- Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34^{cdc2} - cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257: 1955-1957.
- Plana, M., Guasch, M.D. e Itarte, E. (1982) Modulators of rat liver cytosol casein kinases 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 1284-1290.

- Prowald, K., Fisher, H. e Issinger, O.G. (1984) Enhanced casein kinase II activity in human tumour cell cultures. FEBS Lett. 176: 479-483.
- Prywes, R. y Roeder, R.G. (1986) Inducible binding of factor to the c-fos enhancer. Cell 47: 777-784.
- Rigby, M., y Sela, M. (1964) Inhibition of trypsin by copolymers of glutamic acid and other amino acids. Biochemistry 3: 629-636.
- Rihs, H.P., Jans, D.A., Fan, H. y Pelers, R. (1991) The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of SV 40 T-antigen. EMBO J. 10: 633-639.
- Risnik, V.V., Adam, G., Guser, N.B. y Freedrich, P. (1988) Casein kinase I and II bound to pig brain microtubules. Cell. Mol. Neurobiol. 8: 315-324.
- Robitzki, A., Bodenbach, L., Voss, H. y Pyerin, W. (1993) Human casein kinase II. The subunit α protein activates transcription of the β gene. J. Biol. Chem. 268: 5694-5702.
- Rossomando, A., Wu, J., Weber, M. J. y Sturgell, T. W. (1992) The phorbol ester-dependent activator of the mitogen-activated protein kinase p42^{mapk} is a kinase with specificity for the threonine and tyrosine regulatory sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5221-5225.
- Rubin, C.S. y Rosen, O.M. (1975) Protein phosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 44: 831-879.
- Saltzman, A.G. y Weinmann, R. (1989) Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. FASEB J. 3: 1723-1733.
- Saxena, A., Padmanabha, R., Glover, C.V.C. (1987) Isolation and sequencing of cDNA clones encoding alpha and beta subunits of *Drosophila melanogaster* casein kinase II. Mol. Cell. Biol. 7: 3409-3417.

- Schirch, V. y Strong, W.B. (1989) Interaction of fo-lylpolyglutamates with enzymes of one-carbon metabolism. Arch. Biochem. Biophys. 269: 371-380.
- Schneider, H.R., Reichert, G.H. y Issinger, O.-G. (1986) Enhanced casein kinase II activity during mouse embryogenesis. Eur. J. Biochem. 161: 733-738.
- Segal, I.H. (1975) En "Enzyme kinetics" (Wiley and Sons, Inc. eds.). Wiley Interscience Publication. New York.
- Sela, M. y Steiner, L.A. (1963) Inhibition of lysozyme by some copolymers of amino acids. Biochemistry 2: 416-421.
- Serrano, L. y Avila, J. (1985) The interaction between subunits in the tubulin dimer. Biochem. J. 230: 551-556.
- Soderling, T.R. (1990) Protein kinases regulation by autoinhibitory domains J. Biol. Chem. 264:8443-8446.
- Sommercorn, J. y Krebs, E.G. (1987) Induction of casein kinase II during differentiation of 3T3/L1 cells. J. Biol. Chem. 262: 3835/3843.
- Sommercorn, J., Mulligan, J.A., Lozeman, F.J. y Krebs, E.G. (1987) Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8834-8838.
- Stern, D.F., Zheng, P., Beidler, D.R. y Zerillo, C. (1991) Spk1, a new kinase from *Saccharomyces cerevisiae*, phosphorylates proteins on serine, threonine and tyrosine. Mol. Cell. Biol. 11: 987-1001.
- Strong, W.B., Cook, R. y Schirch, V. (1989) Interaction of tetrahydropteroyl glutamates with two enzymes from mitochondria. Biochemistry 28: 106-114.
- Takayama, S., White, M. F. y Kahn, C. R. (1988) Phorbol ester-induced serine phosphorylation on the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. J. Biol. Chem. 263: 3440-3447.

- Takio, K., Kuenzel, E.A. Walsh, K.A. y Krebs, E.G. (1987) Amino acid sequence of the β subunit of bovine lung casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 4851-4855.
- Taylor, A., Allende, C.C, Weinman, R. y Allende, J.E. (1987) The phosphorylation of nucleoplasmin by casein kinase-2 is resistant to heparin inhibition. *FEBS Lett.* **226**: 109-114.
- Taylor, S.S. (1989) cAMP dependent protein kinase. Model for an enzyme family. *J. Biol. Chem.* **264**: 8443-8466.
- Taylor, S.S. Buechler, J.A. y Yonemoto, W. (1990) cAMP-dependent kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **59**: 971-1001.
- Télliez, R., Gatica, M., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1990) Copolymers of glutamic acid and tyrosine are potent inhibitors of oocyte casein kinase. *FEBS Lett.* **265**: 113-116.
- Traugh, J.A., Lin, W.-J., Takada-Axelrod, F. y Tuazon, P.T. (1990) Importance of subunit interactions in regulation of casein kinase II. *En* "Biology and Medicine of Signal Transduction" (Nishizuka Y. et al., eds.). Raven Press, New York, págs. 224-228.
- Treisman, R. (1986) Identification of a protein binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* **46**: 567-574.
- Tuazon, P.T. y Traugh, J.A. (1991) Casein kinase I and II Multipotential serine protein kinases: structure, function and regulation. *En* "Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research" (Greengard, P. y Robinson, G.A., eds.) Raven Press, New York, Vol. **20**: 123-164.
- Valenzuela, P., Quiroga, M., Zaldívar, J., Rutler, W.J., Kirschner, M.W. y Cleveland, D.W. (1981) Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by α and β tubulin mRNAs. *Nature* **289**: 650-655.

- Voet, D. y Voet, J.G., (1990). En «Biochemistry» (Wiley and Sons, Inc. eds.) Wiley Interscience Publication. New York.
- Walseth, T.F. y Johnson, R.A. (1979) The enzymatic preparation of ^{32}P nucleoside triphosphates, cyclic ^{32}P -GMP. *Biochim. Biophys. Acta.* 562: 11-31.
- Wu, J. L-P., Padmanabha, R. y Glover, C.V.C. (1988) Isolation, sequencing and disruption of CKA 1 gene encoding the α subunit of yeast casein kinase II. *Mol. Cell. Biol.* 8: 4981-4990.
- Zandomeni, R., Zandomeni, M.C, Shugar, D. y Weinman R. (1986) Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6 dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polimerase II. *J. Biol. Chem.* 261: 3414-3419.

APENDICE I : Secuencia de los dominios o subunidades catalíticas de diferentes serina/treonina proteínquinasas y tirosina proteínquinasas. Obtenido de Hanks y col. 1988.

APPENDIX I

46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

APENDICE II : Secuencia de las subunidades catalíticas a de caseínaquinasas II de diferente origen. Obtenido de Jedlicki y col., 1992.

Xenopus M-SGPFVFSRARVYTDVNTHRFRDYWDYESHVVEWGNQDDYQLVRKLGKGYSEVFEAINIT
 Human1E.....
 Human2 .FGPAAG.....AE..SL.S.E.....A..FS.....
 Drosophila.-TL.--.A.....A.K.DE.....NY..D.....
 C.Elegans .--FFIF.....AE..FS...E.....A.MI...QI.....GFKMS

Xenopus NNEKVVVKILKPKVKKKKIKREIKILENLRGGFNII TLADIVKDFVSRTPALVFEHVNNTD
 Human1
 Human2 ...R.....V.....T...K.I.T.....K.....YI.....
 DrosophilaTT..C.....T...LAV.....I.....
 C.Elegans TD.....I.....T...L.V...I.....I.....S.

Xenopus FKQLYQTLTDYDIRFYMYEILKALDYCHSMGIMHRDVKFHNVMIDHEHRKLRLLIDWGLAE
 Human1
 Human2I..F.....L.....K.....QAK.....
 Drosophila.....E..Y.L.F.L.....N.....
 C.ElegansS.....Y.L.L.....F..Q.....A.K.E.....

Xenopus FYHFGQEYNVRVASRYFKGFELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMLASMIFRKEPFFHGHNDNYD
 Human1
 Human2A.....R.....Q.....
 Drosophila.....
 C.ElegansR.D.....C.....

Xenopus QLVRIAKVLGTEDLYDYIDKYNIELDPRFNDILGRHSRKRWERFVHSENQHLVSPFALDF
 Human1
 Human2E..G.L.K..H.D..H.....Q.....N.I...R.....L
 Drosophila.....E..A.L.....D.....H..Q.....D.....
 C.ElegansDE..E..AR.H.D.....I.A.....T.....

Xenopus LDKLLRYDHQTRLTAREAMDHPYFYFIVKDGSRMAALICFVAAHPSVAPV
 Human1S.....E.....TV....A..GSSSM.GGST.VSSANMMSSGISSVFT
 Human2Q...K...E.....V..E..QFC.DNAVLS.GLTAAR
 Drosophila.....VD.....A....I....NG.MNFNNQQ
 C.ElegansAE....Q...G.E..R.V.EAHA.ANGTEQADGQGA.S.SGQSSDAKIDGA

APPENDICE II

APENDICE III : Secuencias de las subunidades β reguladoras de caseínaquinasas II de distintas especies. Obtenidas de Jedlicki y col., 1992.

Humano MSSSEVSWISWFCGLRGNEFFCEVDEDIQDKFNLTGLNEQVPHYRQALDMILDLEPDE
 Bovino S.....
 Drosofila VT.....N.....ED
 Pollo
 Xenopus

Humano ELEDNPNQSDLIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMLEKYQQGDFGYCPRVYCENQPML
 Bovino
 Drosofila L...MT.....I...T...H.....S...
 Pollo
 Xenopus

Humano PIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVYTPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRFRKPA
 Bovino
 Drosofila .L.....T...I.....T
 Pollo
 Xenopus

Humano NQFVPRLYGFKIHAMAYQLQLQAASNFRKSPVKTIR
 Bovino P.....
 Drosofila SL...I.....A...M.LRAKN
 Pollo P.....
 Xenopus P.....M.

APENDICE III