

UCH-FC
DOC-B
C313
C.1

ESTUDIOS SOBRE FOSFATIDILINOSITOL QUINASAS Y SOBRE LA
INCORPORACION DE INOSITOL A FOSFATIDILINOSITOLES EN OOCITOS DE
Xenopus laevis TRATADOS CON HORMONAS

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

DANIEL CARRASCO RIVEROS



Marzo 1990

Profesor patrocinante: Dr. Jorge E. Allende R.

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

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

RUBEN DANIEL CARRASCO RIVEROS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de 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 abril de 1990

Director de Tesis

Dr. Jorge Allende R. -----

Comisión Informante de Tesis

Dra. Cecilia Hidalgo T. -----

Dr. Nihaldo Inestroza C. -----

Dr. Tito Ureta A. -----

Dr. Luis Valladares B. -----



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



AGRADECIMIENTOS

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

Quiero expresar también mis agradecimientos a mis compañeros de Laboratorio, Marta Gatica, Marcelo Antonelli, Rowena Tellez, María Victoria Hinrichs, Juan Olate, Aída Taylor y María Jedlicki, por su apoyo y calidad humana.

A Germaine Jacob, mi reconocimiento por lo que fue nuestra amistad y por su contribución a este trabajo.

A Pilar Carvallo, por su colaboración en la discusión de esta Tesis.

A María Angélica Carrasco y Ximena Sánchez por su colaboración y asistencia técnica en el desarrollo experimental de este trabajo.

A Luis Arenas, por su desinteresada compañía y ayuda en la realización de algunos experimentos.

Quiero hacer extensivo también mis agradecimientos:

Al Departamento de Bioquímica y a todos sus miembros, por las facilidades que no dudaron en otorgarme en todo momento.

A José Mondaca por su diligencia en la confección de las figuras que acompañan esta Tesis.

A Titina Cerda por su excelente trabajo en la transcripción de esta Tesis.

A Yamila

A Daniel

A Pablo

A Matias

A mis padres

INDICE DE MATERIAS

	página
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
SUMMARY	xix
INTRODUCCION	1
A. METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS DE INOSITOL EN EL MECANISMO DE ACCION HORMONAL	1
1. Activación de fosfolipasa C	2
2. Hidrólisis de Ptd Ins (4,5)P ₂	6
3. Síntesis de Ptd Ins (4,5) P ₂	8
B. EL OOCITO DE <u>Xenopus laevis</u> Y EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCION HORMONAL	12
1. Efecto de progesterona e insulina en el oocito de <u>Xenopus laevis</u>	13
2. Efecto de acetilcolina en el oocito de <u>Xenopus</u> <u>laevis</u>	18
OBJETIVOS DE LA TESIS	21
MATERIALES Y METODOS	23
A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	23
B. SINTESIS DE NUCLEOTIDOS RADIOACTIVOS	24

1. Síntesis de (μ - 32 P)ATP y (μ - 32 P)GTP	24
2. Análisis y pureza de los nucleótidos radiactivos..	25
C. PREPARACION DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE OOCITOS Y HUEVOS DE <u>Xenopus laevis</u> CON ACTIVIDAD PTD INOSITOL QUINASAS	26
1. Obtención de ovario de <u>Xenopus laevis</u>	26
2. Obtención de oocitos	26
3. Obtención de huevos desprovistos de gelatina ...	27
4. Fraccionamiento celular	27
D. ENSAYO DE LA FOSFORILACION DE FOSFOLIPIDOS DE INOSITOL EN MEMBRANAS AISLADAS	28
1. Incubación de membranas	28
2. Extracción de los fosfolípidos de inositol en membranas aisladas	29
3. Separación cromatográfica de los fosfatidil- inositol polifosfatos	31
E. MARCACION DE FOSFOINOSITIDOS Y SINTESIS DE INOSITOL FOSFATOS EN OOCITOS INTACTOS	31
1. Obtención y separación de oocitos en estado VI..	31
2. Microinyección de oocitos	32
3. Incubación de oocitos	32
4. Homogenización de oocitos y separación de fases	32
5. Extracción de la fase orgánica y separación cromatográfica de los fosfoinosítidos	33

6. Extracción de la fase acuosa y separación cromatográfica de los inositol fosfatos	34
F. DETECCIÓN DE MADURACION DE OOCITOS	35
G. CUANTIFICACION DE LOS PRODUCTOS RADIATIVOS	35
H. AUTORRADIOGRAFIAS	36
I. DETERMINACION DE PROTEINAS	36
J. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.....	37
RESULTADOS	38
A. ESTUDIOS DE LAS QUINASAS RESPONSABLES DE LA SINTESIS DE FOSFATIDILINOSITOLES POLIFOSFATOS DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE <u>Xenopus laevis</u>	38
1. Identificación de las actividades Ptd Inositol quinasas en membranas de oocitos	38
2. Caracterización de la Ptd Ins quinasa en membranas de oocitos. Ensayo y factores que controlan su actividad	39
2.1 Dependencia de la concentración de proteínas de membranas	39
2.2 Dependencia del tiempo de incubación	43
2.3 Fosfatidilinositol exógeno como sustrato para la quinasa	43

2.4	Efecto de cationes en la formación de (γ ATP)	
	Ptd Ins (4)P	45
2.5	Requerimiento de nucleótidos y efecto de GTP- γ -S en la formación de (γ ATP)Ptd Ins(4)P	45
2.6	Efecto de fosfolípidos en la formación de (γ ATP)Ptd Ins(4)P	49
2.7	Efecto de poliaminas en la síntesis de (γ ATP) Ptd Ins(4)P	49
2.8	Efecto de neomicina en la síntesis de (γ ATP) Ptd Ins(4)P	53
2.9	Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato sobre la síntesis de Ptd Ins(4)P	53
2.10	Efecto de hormonas en la formación de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins(4,5)P ₂	56
3.	Degradación de (γ ATP)Ptd Ins (4)P preformado...	56
3.1	Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato	58
3.2	Efecto de polilisina	58
3.3	Efecto de progesterona	58
4.	Comparación de las actividades Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa en membranas de oocitos y huevos de <u>Xenopus laevis</u>	62
B.	ESTUDIOS DEL METABOLISMO DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE INOSITOL EN OOCITOS DE <u>Xenopus laevis</u>	64
1.	Síntesis de fosfatidilinositol fosfatos en oocitos intactos	64

1.1 Incorporación de (³ H)mio-inositol y ³² P-fosfato en los fosfolípidos de inositol	64
1.2 Cinética de incorporación de (³ H)mio-inositol en fosfolípidos de inositol	64
2. Efecto de hormonas y acetilcolina en la síntesis de fosfatidilinositol fosfatos en oocitos intactos	68
2.1 Efecto de progesterona	68
2.2 Efecto de acetilcolina	71
2.3 Efecto de insulina	76
3. Producción de inositol fosfatos en oocitos de <u>Xenopus laevis</u> . Efecto de progesterona y acetilcolina	77
 DISCUSION	 80
 A. SINTESIS IN VITRO DE Ptd Ins(4)P Y Ptd Ins(4,5)P ₂ USANDO MEMBRANAS DE OOCITOS DE <u>Xenopus laevis</u>	 80
1. Localización y actividad relativa de las fosfatidilinositol quinasas	80
2. Propiedades de la Ptd Ins quinasa	83
3. Efecto de acetilcolina, progesterona e insulina en la síntesis de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P ₂	96
4. Posible activación de las fosfatidilinositol quinasas durante la maduración del oocito de <u>Xenopus laevis</u>	99

B. INCORPORACION DE (³ H)MIO-INOSITOL EN FOSFATIDIL- INOSITOL FOSFATOS <u>IN VIVO</u> USANDO OOCITOS DE <u>Xenopus laevis</u>	101
1. Microinyección e incorporación de (³ H)mio- inositol en Ptd Ins, Ptd Ins(4) y Ptd Ins (4,5)P ₂	101
2. Posible interconexión entre las vías de transducción de señales utilizadas por la progesterona y la acetilcolina en el oocito de <u>Xenopus laevis</u>	105
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFIA	115

LISTA DE TABLAS

página

TABLA I.	Efecto de cationes y nucleótidos sobre la actividad Ptd Ins quinasa de membranas de oocitos de <u>Xenopus laevis</u>	48
TABLA II.	Incorporación de (³ H)Inositol en fosfatidilinositoles. Efecto de hormonas y acetilcolina	73

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

	página
ESQUEMA I. Metabolismo de los fosfolípidos de inositol	3
ESQUEMA II. Aspectos moleculares del mecanismo acción de acetilcolina, progesterona e insulina en el oocito de <u>Xenopus laevis</u> ...	14
ESQUEMA III. Metodología para el estudio de la síntesis de fosfatidilinositoles en membranas de oocitos y en oocitos intactos de <u>Xenopus laevis</u>	30
ESQUEMA IV. Modelo de interconexión o diálogo entre las vías de transducción de señales utilizadas por progesterona y acetilcolina	112
FIGURA 1. Autorradiografía de los productos fosforilados y analizados por cromatografía en placa fina	40
FIGURA 2. Efecto de la concentración de proteína de membrana sobre la síntesis de (³² P)Ptd Ins(4)P	41
FIGURA 3. Efecto del tiempo de incubación sobre la síntesis de (³² P)Ptd Ins(4)P	42
FIGURA 4. Efecto de Ptd Ins exógeno en la síntesis de (³² P)Ptd Ins(4)P	44

FIGURA 5.	Efecto de cationes divalentes en la formación de (³² P)Ptd Ins(4)P	46
FIGURA 6.	Gráfica de Lineaweaver-Burk de la dependencia de la velocidad de síntesis de (³² P)Ptd Ins (4)P de la concentración de (μ - ³² P)ATP ...	47
FIGURA 7.	Efecto de fosfolípidos en la síntesis de Ptd Ins(4)P	50
FIGURA 8.	Efecto de poliamina sobre la síntesis de (³² P)Ptd Ins(4)P	51
FIGURA 9.	Gráfica de Lineweaver-Burk de la dependencia de la velocidad de síntesis de (³² P)Ptd Ins (4)P de la concentración de (μ - ³² P)ATP en ausencia o presencia de poliaminas.....	52
FIGURA 10.	Efecto de neomicina en la síntesis de (³² P)Ptd Ins (4)P	54
FIGURA 11.	Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato sobre la síntesis de (³² P)Ptd Ins(4)P	55
FIGURA 12.	Cromatografía en placa fina de los lípidos de membrana fosforilados. Efecto de hormonas	57
FIGURA 13.	Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato en la degradación de (³² P)Ptd Ins(4)P	59
FIGURA 14.	Efecto de polilisina en la degradación de (³² P)Ptd Ins(4)P	60
FIGURA 15.	Degradación de (³² P)Ptd Ins(4)P. Efecto de progesterona	61

FIGURA 16.	Actividad específica de las enzimas Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa de membranas de oocitos y huevos de <u>Xenopus</u> <u>laevis</u>	63
FIGURA 17.	Síntesis de fosfatidilinositol fosfatos en oocitos intactos	65
FIGURA 18.	Incorporación de (H^3)mio-inositol en lípidos totales en función del tiempo	67
FIGURA 19.	Incorporación de (H^3)mio-inositol en fosfa- tidil inositoles. Efecto de progesterona....	69
FIGURA 20.	Incorporación de (H^3)mio-inositol en lípidos totales durante la maduración meiótica	70
FIGURA 21.	Efecto de cicloheximida en la síntesis de fosfatidilinositoles en oocitos sometidos a maduración con progesterona o insulina....	72
FIGURA 22.	Incorporación de (H^3)mio-inositol en fosfa- tidilinositoles. Efecto de acetilcolina	74
FIGURA 23.	Incorporación de (H^3)mio-inositol en fosfo- lípidos totales. Efecto de progesterona o acetilcolina a tiempos cortos de incuba- ción	75
FIGURA 24.	Efecto de progesterona en la producción de inositol fosfatos en oocitos de <u>Xenopus</u> <u>laevis</u> . Análisis por HPLC	78
FIGURA 25.	Producción de inositol fosfatos en oocitos de <u>Xenopus laevis</u> en presencia de acetil- colina. Análisis por HPLC	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina 5-difosfato
AP	Acido fosfatidico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPasa	ATP hidrolasa
cAMP	Adenosina 3'-5'-monofosfatociclico
células CHO	Células de ovario de Hamster
CDP	Citidindifosfoglucosa
cpm	Cuentas por minuto
μ Ci	Microcurie
DAG	Diacilglicerol
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	Acido etilenglicoltetraacético
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GTP- γ -S	Guanosina 5'-(γ -tio) trifosfato
HCG	Gonadotropina coriónica humana
HEPES	Acido 2-hidroxietilpiperapina-N'-2-etano sulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IGF	Factor de crecimiento análogo a insulina
Ins	Mio-inositol
Ins(4)P	Mio-inositol 4-monofosfato
Ins(1,4)P ₂	Mio-inositol 1,4-difosfato
Ins(1,4,5)P ₃	Mio-inositol 1,4,5-trifosfato

MPF	Factor promotor de maduración
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Parametilsulfonil fluoruro
POPOP	1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)benceno
POP	2,5-defniloxasol
Ptd Col	Fosfatidilcolina
Ptd Ins	Fosfatidilinositol
Ptd Ins(4)P	Fosfatidilinositol 4-fosfato
Ptd Ins(4,5)P ₂	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
Ptd Ser	Fosfatidil serina
rpm	Revoluciones por minuto
TPA	12-O-tetradecanoforbol 12-acetato
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

En este trabajo de tesis se estudió la posible participación de los fosfatidilinositoles en la maduración meiótica del oocito de Xenopus laevis en dos etapas y a través de dos estrategias experimentales diferentes.

En la primera de ellas y como una etapa preliminar a los estudios realizados con oocitos intactos, se estudió la síntesis de fosfatidilinositolpolifosfatos en membranas aisladas de oocitos e incubadas con (γ - 32 P)ATP. En la segunda etapa de la tesis, se estudió la síntesis de fosfatidilinositolfosfatos en oocitos intactos microinyectados con (3 H)mio-inositol.

Los estudios realizados con membranas aisladas indican la presencia de dos actividades enzimáticas, la Ptd Ins quinasa y la Ptd Ins 4-fosfatoquinasa, responsables de la síntesis de Ptd Ins(4)P y Ptd Ins (4,5)P₂, respectivamente. La incubación de las membranas con (γ - 32 P)ATP produce mayoritariamente Ptd Ins(4)P y una pequeña cantidad de Ptd Ins (4,5)P₂.

Se caracterizó la actividad mayoritaria responsable de la síntesis de Ptd Ins(4)P encontrándose que la enzima posee alguna de las características de estas enzimas en otros sistemas. La enzima requiere Mg²⁺ o Mn²⁺ para su actividad, utiliza ATP pero no GTP como sustrato dador de fosfato y tiene para el nucleótido una K_m aparente de aproximadamente 50 μ M. La enzima es estimulada por polilisina y poliornitina, pero es inhibida por 2,3-bisfosfoglicerato, neomicina y altas concentraciones de Ca²⁺. Los estudios realizados en presencia de GTP- γ -S, sugieren que

una proteína G no estaría involucrada en la regulación de la actividad Ptd Ins quinasa de oocito o que por lo menos dicha proteína no estaría activa en la preparación de membranas utilizadas.

También se identificó en membranas de oocitos una actividad hidrolítica que da cuenta de la pérdida de la marca en el (^3H)Ptd Ins(4)P preformado. Los productos de esta reacción no han sido identificados hasta el momento, desconociéndose si la reacción es catalizada por una fosfolipasa C o una fosfomonoesterasa.

Los resultados indican que la inhibición de la actividad hidrolítica no es responsable del aumento en la formación de Ptd Ins (4)P observado en presencia de polilisina. Tampoco un aumento en la hidrólisis de Ptd Ins(4)P preformado da cuenta del efecto inhibitorio de 2,3-bisfosfoglicerato en la síntesis de Ptd Ins (4)P.

Las actividades de Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa no son afectadas por la presencia de progesterona en el medio de incubación; sin embargo, se observó un aumento de aproximadamente 3-4 veces en la formación de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ en membranas aisladas de oocitos madurados por acción de progesterona, con respecto a lo encontrado en membranas de oocitos no maduros.

Los estudios realizados con oocitos intactos mostraron que la incubación de estas células con progesterona, insulina o acetilcolina estimulan la incorporación de (^3H)mio-inositol en Ptd Ins, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂. En el caso de progesterona, este efecto, se acompaña además de un aumento en la

producción de Ins (4)P, Ins (1,4)P₂ e Ins (1,4,5)P₃, indicando que esta hormona, al igual que acetilcolina, promueve en el oocito de Xenopus un aumento en el recambio de los fosfatidilinositoles.

El efecto de progesterona es específico, ya que no puede ser reproducido por otras hormonas esteroidales y a diferencia de lo observado con acetilcolina es indirecto, puesto que requiere que se produzca previamente síntesis protéica. La respuesta a progesterona se detecta después de 3 hr de poner en contacto al oocito con la hormona, alcanza un máximo después de 4-5 hrs y es bloqueada por inhibidores de la síntesis protéica. El efecto de insulina tiene características similares.

El efecto de acetilcolina sobre la incorporación de (³H)mioinositol a los fosfatidilinositoles, en cambio, es mucho más rápido y antecede a la respuesta a progesterona, ya que alcanza un máximo a las 1.5 hr luego de iniciada la incubación de los oocitos con el neurotransmisor y no es bloqueado por inhibidores de la síntesis proteica.

En base a estos resultados, y junto con la observación que acetilcolina acelera la maduración de los oocitos tratados con progesterona, se ha fortalecido la postulación de que existiría una posible vía de interconexión o diálogo entre los sistemas de transducción de señales utilizados por progesterona y acetilcolina en el oocito de Xenopus laevis.

SUMMARY

The synthesis of phosphatidylinositol polyphosphates using isolated oocyte membranes incubated with (γ - ^{32}P)ATP, was studied in the first stage of the Thesis. In the second stage, the synthesis of phosphatidylinositol phosphate using intact oocytes microinjected with (^3H)myo-inositol was studied.

Studies performed with isolated membranes indicate the presence of two enzymatic activities, the Ptd Ins kinase, and the Ptd Ins 4-phosphate kinase, which are responsible for the synthesis of Ptd Ins (4)P and of Ptd Ins (4,5) P_2 , respectively. The incubation of membranes with (γ - ^{32}P)ATP produces mainly Ptd Ins (4)P and a small quantity of Ptd (4,5) P_2 .

The main activity responsible for the phosphorylation of Ptd Ins, the Ptd Ins kinase, was characterized in detail and it was found that the enzyme shows some of the characteristics of similar enzymes found in other systems. This enzyme requires Mg^{2+} or Mn^{2+} for its activity. It uses ATP but not GTP as a phosphate donor substrate and it has an apparent K_m for ATP of about 50 μM . This enzyme is strongly stimulated by polylysine and polyornithine but it is inhibited by 2,3-biphosphoglycerate, neomycin and high Ca^{2+} concentrations. Studies made in the presence of GTP- γ -S suggest that a G protein is not involved in the regulation of the oocyte Ptd Ins kinase activity or at least that such a protein is not active in our membrane preparations.

Also, a hydrolytic activity towards phosphatidyl inositol-4 phosphate was detected in oocyte membranes. It accounts for the significant loss of radioactivity observed with pre-formed (^{32}P)

Ptd Ins (4)P. The products of this reaction have not been identified yet, so that it is unknown whether this hydrolytic reaction is catalyzed by a phospholipase C or by a phosphomonoesterase. Our results show, however, that inhibition of this hydrolytic activity is not responsible for the increase in the Ptd Ins (4) formation that was observed in the presence of polylysine. Neither is an increase in the hydrolysis of Ptd Ins (4)P responsible for the inhibitory effect of 2,3 bisphosphoglycerate in the synthesis of Ptd Ins (4)P.

Ptd Ins kinase and Ptd Ins 4-phosphate kinase activities are not affected by the presence of progesterone in the incubation medium, however, a 3-4 fold increase in the formation of Ptd Ins (4)P and Ptd Ins (4,5)P₂ was observed when using membranes isolated from oocytes that were matured by means of progesterone action as compared with immature oocyte membranes.

Studies with intact oocytes showed that the incubation of these cells with progesterone or acetylcholine stimulates the incorporation of (³H) myo-inositol in Ptd Ins, Ptd Ins (4)P and Ptd Ins (4,5)P₂. Besides this effect, there is an increase in the release of Ins (4)P, Ins (1,4)P₂ and Ins (1,4,5)P₃, showing that progesterone, as well as the acetylcholine, promote an increase in the phosphatidylinositol turnover in Xenopus laevis oocytes.

The progesterone effect is specific. It can not be observed with other steroid hormones. In addition, this effect appears to be indirect since the stimulation observed with progesterone-induced maturation requires previous protein synthesis, in that inhibition of protein synthesis completely block the increase.

The response to progesterone was found after 3 hours of treatment of the oocyte with the hormone and it reached a maximum after 4-5 hours.

On the other hand, the acetylcholine effect is fast. A maximum stimulation is obtained after 2 hours exposure of the oocyte to the neurotransmitter. It also differs in that it is not blocked by inhibitors of the protein synthesis.

These results, together with the fact that the acetylcholine accelerates the oocyte maturation treated with progesterone, strengthen the idea that there may be interaction and "cross-talk" between the transduction systems used by progesterone and acetylcholine in the Xenopus laevis oocyte.

INTRODUCCION

A. METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS DE INOSITOL EN EL MECANISMO DE ACCION HORMONAL

En los últimos años se ha establecido claramente que la acción de una serie de señales externas sobre la membrana celular tiene como consecuencia un aumento en el metabolismo de los fosfolípidos de inositol y un incremento en la concentración del calcio intracelular (Berridge e Irvine, 1989; Downes, 1989). Se ha detectado un incremento en el metabolismo de estos fosfolípidos, en respuesta a una gran variedad de estímulos tales como hormonas (Bone y col. 1984; Koréh y Mónaco, 1986), neurotransmisores (Berridge y col. 1983) y factores de crecimiento (Berridge y col. 1984; Auger y col. 1989). También se ha encontrado un efecto parecido en células transformadas por virus oncogénicos (Kato y col., 1987; Jackowski y col., 1986).

Los fosfolípidos de inositol son una fracción minoritaria de los fosfolípidos de la célula; constituyen aproximadamente el 5% del total pero su recambio es mucho más rápido que el de los otros lípidos de membrana (Hokin, 1985).

Existen observaciones experimentales que sugieren la existencia de dos conjuntos diferentes de fosfatidilinositoles. Un conjunto minoritario, que constituye aproximadamente el 10 a 20% del total, parece estar involucrado en la respuesta hormonal (Mónaco, 1987; Mónaco y col., 1983). Este conjunto sensible a la acción de una señal extracelular, estaría confinado

exclusivamente en la membrana plasmática (Rana y col., 1986a).

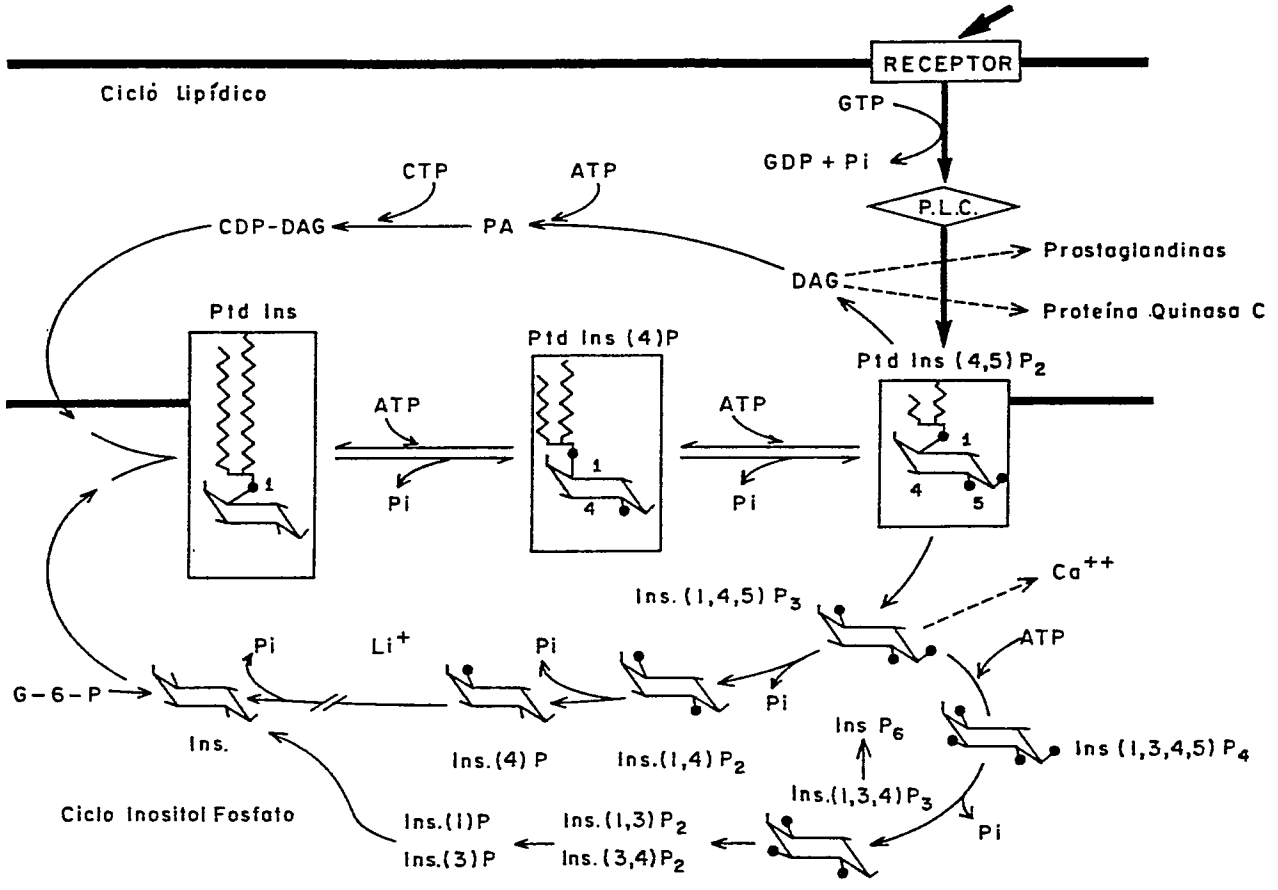
El esquema I representa los resultados de un gran número de estudios experimentales, y muestra el consenso de opinión sobre alguna de las complejas vías metabólicas que participan en la síntesis y degradación de los fosfolípidos de inositol. La estimulación del metabolismo de estos fosfolípidos puede ser sistematizada en 3 etapas: activación de la fosfolipasa C mediada por el receptor de la señal extracelular, hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (Ptd Ins (4,5)P₂) para dar inositol trisfosfato (Ins (1,4,5)P₃) y diacilglicerol (DAG) y por último la resíntesis de los fosfatidilinositol polifosfatos de manera de poder restablecer los niveles de Ptd Ins (4,5)P₂.

1. Activación de la fosfolipasa C

La estimulación de la enzima fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al Ptd Ins (4,5)P₂, constituye una etapa fundamental en el sistema de transducción de señales en que participan los fosfolípidos de inositol (Majerus y col., 1986; Rhee y col., 1989).

Hasta el momento se han purificado y caracterizado fosfolipasas C proveniente de fracciones citoplasmáticas de varios tipos celulares (Bennett y Crooke, 1987; Rebecchi y Rosen, 1987; Fukui y col., 1988).

También la presencia de fosfolipasa C unida a una fracción particulada, ha sido demostrada por las observaciones que Ptd Ins (4,5)P₂ puede ser hidrolizado al estimular membranas aisladas con el agonista (Harden y col., 1987; Sommermeyer y col. 1989). La fosfolipasa C unida a la membrana ha sido purificada a



ESQUEMA I. Metabolismo parcial de los fosfolipidos de inositol

partir de cerebro de bovino (Katan y Parker, 1987) y de plaquetas humanas (Banno y col. 1988). Estudios bioquímicos e inmunológicos indican que la enzima unida a la membrana corresponde a una de las especies encontradas en el citoplasma, sugiriendo que su asociación con la membrana puede ser reversible (Lee y col. 1987; Kozawa y col. 1987).

Existen datos experimentales que indican que la activación de la fosfolipasa C (PLC) por el receptor estaría mediada, al menos en algunos casos, por una proteína regulada por GTP, denominada proteína Gp (Melin P-M. y col., 1986; Cockroft, 1987; Allende, J.E., 1988). Estos estudios demuestran que la enzima es inactiva a los niveles de calcio encontrados en el interior de la célula, a menos que esta enzima interactúe con un proteína Gp (Smith y col. 1986). Pruebas indirectas sobre un posible papel de proteínas G en el control de la actividad de la fosfolipasa C provienen de experimentos realizados en presencia de análogos de GTP o de la toxina de B. pertussis. Se ha comprobado que la hidrólisis de Ptd Ins (4,5)P₂ en membranas premarcadas con (³²P) fosfato o (³H) inositol es estimulada por GTP o sus análogos no hidrolizables (González y Crews, 1985; Harden y col. 1987; Sommermeyer y col. 1989). Además, en algunos tipos celulares tales como leucitos (Smith y col., 1987) y células plasmáticas (Nakamura y Ui, 1985), el efecto de señales externas sobre la liberación de Ins(1,4,5)P₃ puede ser bloqueado si las células son pre-tratadas con la toxina de B. pertussis.

El producto del oncogen ras, la proteína P21, está funcionalmente relacionada con proteínas G (Barbacid, 1987). Se ha abordado el estudio de la posible participación de ras en el

sistema de transducción de señales que involucra a los fosfolípidos de inositol, y así se ha observado en células transformadas que ras estaría aumentando el recambio de dichos compuestos (Fleischman y col. 1986; Wolfman y Macara, 1987). Además, la microinyección de la proteína P21 en el oocito de Xenopus parece inducir un aumento en la síntesis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y diacilglicerol (Lacal y col. 1987).

Los estudios con toxina de B. pertussis indican que existe cierto grado de heterogeneidad en las proteínas Gp. Recientemente se ha comprobado la existencia de al menos dos tipos de proteínas Gp en células CHO de ovario de hamster en cultivo, las cuales pueden ser diferenciadas por su sensibilidad a la inhibición con la toxina. Además se comprobó que estas proteínas Gp pueden acoplar selectivamente diferentes receptores con la PLC (Ashkenazi y col. 1989).

El hecho que, en algunos tipos celulares, la estimulación de la PLC no sea sensible a la acción de la toxina de B. pertussis, sugiere también la existencia de otros mecanismos para su activación, independientes de proteínas Gp. La evidencia experimental indica que el aumento en el metabolismo de los fosfolípidos de inositol observado en presencia del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Wahl y Carpenter, 1988) o en presencia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (López-Rivas y col. 1987), puede ser consecuencia de la activación de la enzima por fosforilación.

Los receptores de los factores de crecimiento EGF y PDGF tienen actividad tirosina quinasa y ha sido demostrado que esta actividad es necesaria para promover el aumento en el recambio de

los fosfolípidos de inositol (Escobedo y col. 1988; Moolenaar y col. 1988). También se ha encontrado que la fosfolipasa CII, una de las isoenzimas encontradas en cerebro de rata, es fosforilada in vivo e in vitro por acción del receptor de los factores EGF y PDGF (Meisenhelder y col. 1989; Margolis y col. 1989; Nishibe y col., 1989).

El mecanismo por el cual termina la acción de fosfolipasa C es desconocido hasta la fecha; sin embargo la evidencia experimental sugiere que la proteína quinasa C podría estar involucrada en el desacoplamiento de la proteína G (Orellana y col. 1987; Smith y col. 1987).

2. Hidrólisis de Ptd Ins (4,5)P₂

La hidrólisis de Ptd Ins (4,5)P₂ catalizada por la fosfolipasa C genera dos moléculas con características de segundos mensajeros: el diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato. El diacilglicerol, que puede provenir también de la hidrólisis de fosfatidilinositol (Ptd Ins), fosfatidilinositol 4 monofosfato (Ptd In (4)P (Majerus y col. 1986) y otros fosfolípidos (Besterman y col. 1986; Saltiel y col. 1987), interactúa con la proteína quinasa C y con ello activa la fosforilación de varias proteínas involucradas en procesos reguladores y proliferativos. Es importante señalar que los ésteres de forbol, que son factores promotores tumorales, tienen una estructura análoga al diacilglicerol y también activan a la proteína quinasa C (Nishizuka, 1986).

La producción de Ins (1,4,5)P₃, estimula la liberación de Ca²⁺ desde depósitos intracelulares (Putney y col. 1989;

Berridge, 1987). Inicialmente se pensó que Ca^{2+} era liberado exclusivamente desde el retículo endoplásmico, pero recientemente se ha sugerido que provendría también desde un organelo denominado tentativamente "calciosoma" (Volpe y col. 1988).

El calcio liberado al interior de la célula puede estar involucrado en la regulación de un número importante de enzimas incluyendo a la proteína quinasa C mencionada previamente y otras proteína quinasas dependientes de calcio y calmodulina (Nishizuka, 1989; Adelstein y Klee, 1981; Nairn y col. 1985; Kikkawa y col., 1989).

El Ins (1,4,5)P_3 promueve la liberación de calcio a través de su interacción con un receptor específico de membrana (Spat y col., 1985; Supattapone y col., 1988). La unión de Ins (1,4,5)P_3 a su receptor aumentaría la salida de calcio al interior de la célula desde un reservorio intracelular como consecuencia de la apertura de un canal de Ca^{2+} , el cual parece estar estrechamente asociado con el receptor de Ins (1,4,5)P_3 (Ehrlich y Watras, 1988)

Se han descrito dos vías independientes para la metabolización de Ins (1,4,5)P_3 , ambas generan compuestos que no movilizan calcio desde depósitos intracelulares (Downes, 1989). Por una parte Ins (1,4,5)P_3 es desfosforilado a Ins (1,4)P_2 por una "5 fosfatasa" extremadamente activa (Downes y col. 1982). Esta enzima es fosforilada in vitro en múltiples sitios por la proteína quinasa C, lo cual aumenta varias veces su actividad. Se piensa que éste sería un mecanismo para controlar los niveles de Ins(1,4,5)P_3 intracelular (Connolly y col. 1987). El Ins (1,4)P_2 es posteriormente desfosforilado a Ins por acción de

fosfatasas específicas, algunas de ellas tienen la característica de ser inhibidas por Li^+ (Majerus, 1988; Berridge y Downes, 1989).

Además de estas fosfatasas se ha descrito una quinasa que transfiere un fosfato desde el ATP a la posición 3 del $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ para formar $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ (Batty y col. 1985; Irvine y col. 1986). Esta vía es particularmente interesante porque la quinasa puede ser regulada por Ca^{2+} /Calmodulina (Yamaguchi y col. 1988) y porque se ha propuesto que $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ estimularía la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula desde el exterior (Irvine y Moor, 1986) y que sería en parte responsable de las oscilaciones del Ca intracelular (Berridge e Irvine, 1989).

Las rutas metabólicas en que participan los inositolfosfatos han resultado ser altamente complejas; hasta el momento, alrededor de 20 derivados de los inositolfosfatos han sido descritos en distintos tejidos, desde mono a hexafosfatos, pero poco se conoce acerca de su rol fisiológico y cómo éstos son sintetizados (Majerus y col. 1988).

3. Síntesis de $\text{Ptd Ins}(4,5)\text{P}_2$

La tercera etapa del metabolismo de los fosfolípidos de inositol es la resíntesis de los fosfatidilinositol polifosfatos, de manera que los niveles de $\text{Ptd Ins}(4,5)\text{P}_2$ puedan ser restablecidos.

La reacción inicial de la secuencia metabólica en la síntesis de los fosfatidilinositoles la constituye una etapa reversible catalizada por la enzima CDP diacilglicerol mioinositol fosfatidiltransferasa (Ptd Ins sintetasa). Esta enzima

sintetiza Ptd Ins a partir de inositol y CDP diacilglicerol (CDP-DAG) y ha sido identificada tanto en el retículo endoplásmico como en la membrana plasmática de células GH_3 (Imai y Gershengorn, 1987a). La enzima es inhibida por su producto Ptd Ins, y se ha propuesto que la resíntesis de Ptd Ins(4,5) P_2 es consecuencia de la remoción de la inhibición por producto, en la medida que el nivel de Ptd Ins decrece durante la activación de la fosfolipasa C (Imai y Gershengorn, 1987b).

Junto con esta reacción que conduce a la síntesis neta de Ptd Ins se ha descrito el intercambio de inositol en Ptd Ins. Este proceso es catalizado al parecer por una enzima, ocurre en ausencia de CDP-DAG y no conduce a la síntesis neta de Ptd Ins (Bleasdale y Wallis, 1981).

El Ptd Ins (4,5) P_2 , es generado a partir de Ptd Ins por la fosforilación sucesiva en los hidroxilos 4 y 5 del inositol. Estas reacciones son catalizadas por dos enzimas diferentes, la Ptd Ins quinasa y la Ptd Ins 4-fosfato quinasa.

La Ptd Ins quinasa que cataliza la formación de Ptd Ins (4)P, es una enzima que está unida a membranas. Ha sido encontrada en muchos tejidos, en diferentes compartimientos celulares y en la membrana plasmática (O'Shea y col. 1986; Imai y col. 1986; Suárez-Quiam y col. 1987; Cockcroft y col. 1985; Schäfer y col., 1987; Porter y col. 1988).

Por otro lado, la Ptd Ins 4-fosfato quinasa, responsable de la síntesis de Ptd Ins (4,5) P_2 , ha sido encontrada en membranas y en el citoplasma de diferentes sistemas (Van Rooijen y col. 1985; Imai y col. 1986; Cochet y Chambaz, 1986; Van Dongen y col. 1985; Lundberg y col. 1987; Ling y col. 1989), pero la relación entre

la enzima soluble y la asociada a membrana es poco clara.

El mecanismo para regular la resíntesis de Ptd Ins (4,5)P₂ no ha sido bien definido hasta el momento. Se ha discutido la posibilidad que la hidrólisis de Ptd Ins (4,5)P₂ remueva la inhibición por producto de la Ptd Ins quinasa y de la Ptd Ins 4-fosfato quinasa al descender los niveles de este lípido (Van Rooijen y col. 1985; Smith y Wells, 1983). Sin embargo, la naturaleza fisicoquímica y los niveles fisiológicos a los cuales Ptd Ins (4,5)P₂ inhibe las quinasas es desconocido.

Resultados experimentales indican que un mecanismo adicional para la resíntesis de Ptd Ins (4,5)P₂ podría operar a través de la activación de las Ptd Ins quinasas.

Recientemente se ha discutido la posibilidad que las Ptd Ins quinasas puedan ser reguladas por proteínas G. Se ha observado que la incorporación de ³²P desde (γ -³²P) ATP en Ptd Ins (4,5)P₂ es incrementada por GTP- γ -S en membranas de cerebro de rata (Smith y Jen Chang, 1989).

Las poliaminas espermina y espermidina, que se ha postulado jugarían un importante papel regulatorio en varios aspectos del metabolismo y proliferación celular (Tabor y Tabor, 1984), aumentan la actividad de las Ptd Ins quinasas. Se ha encontrado que las poliaminas estimulan la fosforilación de Ptd Ins en membranas aisladas de células A431 (Vogel y Hoppe, 1986) y en membranas de oocitos de Xenopus laevis (Gatica y col. 1987). También las poliaminas activan la enzima Ptd Ins 4-fosfato quinasa purificada de cerebro de rata (Lundberg y col. 1986).

También se ha sugerido la posibilidad que las Ptd Ins quinasas puedan ser activadas por fosforilación. Se ha

identificado una Ptd Ins quinasa que copurifica con el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la proteína pp60^{src}, homólogo celular de la proteína del virus del sarcoma de Rous. Tanto el receptor de PDGF como la proteína pp60^{src} tienen actividad tirosina quinasa y fosforilan proteínas con actividad Ptd Ins quinasas (Kaplan y col. 1987; Courtneidge y Heber, 1987). Se ha comprobado que esta Ptd Ins quinasa es diferente de las previamente descritas y fosforila específicamente la posición 3 del inositol generando un nuevo producto, no identificado previamente, el Ptd Ins (3)P (Whitman y col. 1988). Además, se ha demostrado que inmunoprecipitados de células tratadas con el factor PDGF contienen una actividad Ptd Ins quinasa que utiliza como sustratos al Ptd Ins (4)P y al Ptd Ins (4,5)P₂ para generar dos nuevos productos: Ptd Ins (3,4)P₂ y Ptd Ins (3,4,5)P₃. Se piensa que estos fosfolípidos son mediadores en la acción mitogénica del PDGF (Auger y col. 1989).

Resulta interesante destacar que el receptor de insulina posee una actividad tirosina quinasa que copurifica con una actividad Ptd Ins quinasa (Sale y col. 1986).

Un mecanismo adicional para la resíntesis de Ptd Ins (4,5)P₂ puede involucrar a la proteína quinasa C. Se ha observado que los ésteres de forbol, que activan a la proteína quinasa C, producen un aumento en los niveles de fosfatidilinositoles en células intactas (Boon y col. 1985; de Chaffoy de Courcelles y col. 1984; Halenda y Feinstein, 1984). Sin embargo, no existe hasta el momento evidencia directa para la acción de proteína quinasa C sobre las Ptd Ins quinasas.

Junto con las quinasas responsables de la síntesis de Ptd

Ins(4)P, Ptd Ins(4,5)P₂ se han identificado fosfomonosterasas que participan su desfosforilación (Knowles y Lawrence, 1985). Aunque las propiedades de estas fosfatasas han sido descritas, muy poco se sabe respecto de su real importancia en la mantención de los niveles de estos fosfolípidos.

B. EL OOCITO DE Xenopus laevis Y EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ACCION HORMONAL

El oocito de Xenopus laevis en estado VI es una célula de gran tamaño con un diámetro aproximado de 1200 a 1500 μ , sincronizada y detenida fisiológicamente en la profase de la primera división meiótica.

Los oocitos pueden responder espontáneamente in vitro a la acción de progesterona, insulina y acetilcolina, para las cuales existen receptores específicos concentrados en el polo animal de la célula (Sadler y Maller, 1982; Maller y Koontz, 1981; Kusano y col., 1982). Además, mediante la microinyección de mRNA específicos aislados de diferentes tejidos se ha logrado la expresión funcional de otros receptores, convirtiendo al oocito en una célula capaz de responder a una gran variedad de neurotransmisores (Gundersen y col. 1983; Sumikawa y col. 1984; Sugiyama y col. 1987; Kaneko y col. 1987; Dascal y col. 1986; Hirono y col. 1987; Kline y col. 1988; Nomura y col. 1987).

Estas características han convertido al oocito de Xenopus en un prototipo de modelo experimental que ha permitido estudiar los

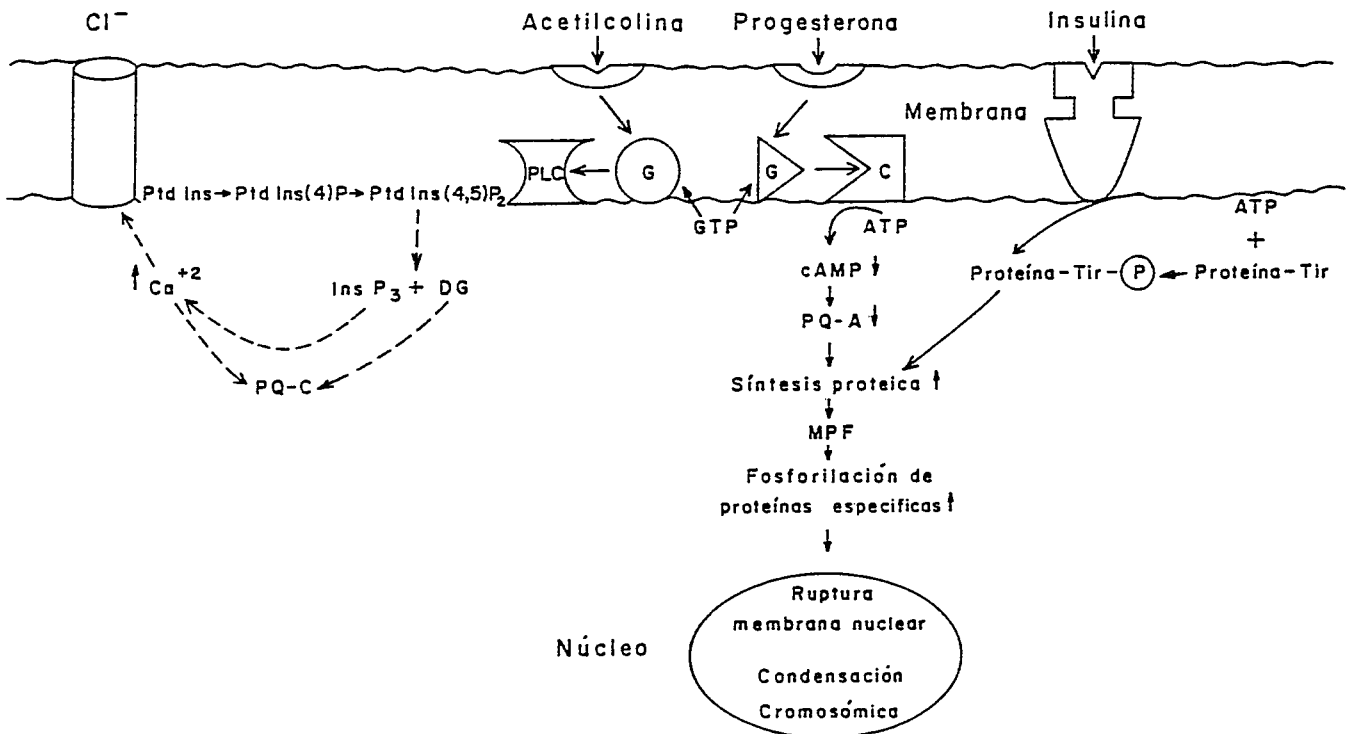
mecanismos de acción hormonal (Maller, 1985; Snutch, 1988) y los factores que controlan la división celular (Featherstone, 1989; Dunphy y Newport, 1988; Ford, 1985; Marx, 1989).

1. Efecto de progesterona e insulina en el oocito de Xenopus laevis

En presencia de progesterona o insulina el oocito reinicia la meiosis para detenerse nuevamente en la metafase de la segunda división meiótica. Este proceso, que transforma al oocito en un huevo con la capacidad de ser fecundado e iniciar la embriogénesis, se conoce como maduración meiótica (Maller, 1985).

El detalle de los mecanismos moleculares de cómo progesterona e insulina inducen maduración del oocito aún no ha sido dilucidado por completo. A continuación se resumen algunos de los aspectos más relevantes respecto del mecanismo de acción de estas hormonas en el oocito. Esquema II.

A diferencia de lo establecido para la acción de las hormonas esteroidales en otros sistemas, en los cuales existe una interacción de un receptor intracelular con la cromatina y por consiguiente la activación de determinados genes (Evans, 1988), en el oocito de Xenopus la progesterona tiene su sitio de acción en la membrana plasmática en donde existe un receptor para ella (Sadler y Maller, 1982). Progesterona inhibe la enzima adenililciclase reduciendo los niveles intracelulares de cAMP (Jordana y col., 1981a, b y 1982). Esta inhibición requiere la participación de una proteína G, pero que es diferente a la subunidad de la adenililciclase asociada con la inhibición



ESQUEMA II. Aspectos moleculares del mecanismo de acción de acetilcolina, progesterona e insulina en el oocito de *Xenopus laevis*. (PLC, fosfolipasa C; G, proteína G; C, adenililciclasa; PQ-C, proteína quinasa C; PQ-A, proteína quinasa A; DG, diacilglicerol; Ins P₃, inositol (1,4,5) trisfosfato; MPF, factor promotor de maduración).

hormonal en otros sistemas, puesto que el tratamiento de las membranas de oocito con toxina de B. pertussis no reduce la inhibición de la ciclase por la progesterona (Olate y col. 1984). Se ha observado que la maduración inducida por la progesterona es inhibida por la microinyección de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP y es inducida, en ausencia de la hormona, si se microinyecta la proteína reguladora de la proteína quinasa (Maller y Krebs, 1977).

Aproximadamente 2 horas después de exponer el oocito a progesterona se produce un aumento de alrededor de 2 veces en la síntesis proteica (Bravo y col. 1978) que es regulada post transcripcionalmente (Wasserman y col., 1982). Si se agrega inhibidores de la síntesis proteica antes de las 2 hr de haber tratado el oocito con progesterona se bloquea la maduración (Bravo y col., 1978).

Posterior a la inducción de la síntesis proteica y coincidente con la ruptura de la membrana nuclear, hecho que define a la maduración del oocito, se detecta en el citoplasma de la célula un factor promotor de maduración (MPF). Cuando se microinyecta en el oocito un extracto citoplasmático preparado a partir de oocitos maduros y que contiene el MPF, se detecta un aumento significativo en la fosforilación de proteínas (Cicirelli y col., 1988; Lohka y col., 1987) y se induce rápidamente la ruptura de la membrana nuclear en ausencia de progesterona o síntesis proteica (Masui y Market, 1971).

Recientemente se ha podido establecer que MPF es una proteína quinasa (Lohka y col., 1987, 1988) y es homólogo de la proteína P^{34} cdc2, el producto del gen cdc2⁺ de levadura y que

también juega un papel fundamental en el control de la división en estas células (Newport y col. 1988).

El mecanismo de acción de insulina en el oocito de Xenopus ha sido menos estudiado que el de progesterona; sin embargo, las evidencias indican que estas hormonas operarían a través de vías diferentes.

Para inducir la maduración del oocito se requieren altas concentraciones de insulina ($EC_{50} = 103 \text{ nM}$). Esto ha hecho suponer que su efecto está mediado por la unión a un receptor para un factor de crecimiento análogo a la hormona peptídica denominado IGF-1 (Maller y Koontz, 1981). El receptor de insulina y el de otros factores de crecimiento tienen actividad tirosina quinasa intrínseca (Helden y Westermarck, 1984) que se supone es responsable de alguno de los efectos de la hormona (Morgan y Roth, 1987). De manera análoga a cómo ha sido descrito en otros sistemas, en el oocito el efecto de insulina es dependiente de la actividad tirosina-quinasa del receptor. Se ha demostrado que la microinyección de anticuerpos que inhiben específicamente la actividad quinasa del receptor de insulina y de los receptores de IGF bloquea la maduración inducida por insulina (Morgan y col. 1986).

Resulta importante señalar en relación a la acción de insulina en el ovocito de Xenopus, que la microinyección de proteína quinasa C aislada de cerebro de rata acelera marcadamente la maduración de oocito inducida por insulina, sin embargo no tiene efecto sobre la acción de progesterona (Stith y Maller, 1987).

También se ha observado que la microinyección de anticuerpos

monoclonales contra el producto del oncogen *ras*, previo a la adición de insulina inhibe la maduración meiótica, mientras que el anticuerpo no bloquea la maduración inducida por progesterona (Korn y col. 1987; Deshpande y Kung, 1987).

Birchmeir y col. (1985) habían demostrado previamente que la microinyección de la proteína P21 producto del oncogen *ras* induce maduración del oocito; la proteína producto del oncogen activado por mutación del aminoácido 12 es 100 veces más activa que su análoga, producto del proto-oncogen que contiene glicina en dicha posición. Su efecto no se acompaña de un descenso en los niveles de cAMP pero, de manera análoga a cómo ocurre con la progesterona, es dependiente de la producción de MPF. Estudios realizados por Allende y col. (1988), muestran que la proteína *ras* oncogénica induce la maduración del oocito, incluso en ausencia de síntesis proteica.

Resulta interesante señalar que el producto del proto-oncogen *mos*, la proteína pp^{39^{mos}}, es activamente traducida durante la inducción de la síntesis proteica en oocitos que maduran por acción de progesterona (Sagata y col., 1988). También se ha demostrado que la microinyección del mRNA de *mos* en el oocito, activa al MPF e induce la ruptura de la membrana nuclear en ausencia de la hormona (Sagata y col., 1989). La inhibición de la traducción del mRNA de *mos*, que se consigue al microinyectar el desoxioligonucleótido complementario del mRNA de *mos*, inhibe también la maduración del oocito inducida por insulina (Sagata y col., 1988).

Estos resultados, junto a los obtenidos por Birchmeier y col. (1985), citados previamente, han hecho suponer que si bien

progesterona e insulina desencadenan la maduración del oocito a través de vías diferentes, ambas requieren finalmente de la activación de MPF. Este último hecho estaría mediado por la proteína pp^{34^{cdc2}}.

2. Efecto de acetilcolina en el oocito de Xenopus laevis

La respuesta del oocito de Xenopus a acetilcolina ha sido bastante estudiada, por cuanto fue en esta célula donde se demostró por primera vez una conexión directa entre el metabolismo de los fosfolípidos de inositol y la respuesta electrofisiológica inducida por un neurotransmisor.

Cuando se trata oocitos con acetilcolina se detecta una respuesta electrofisiológica bastante compleja, como consecuencia de un aumento del flujo del ión cloruro a través de la membrana (Kusano y col. 1982).

Oron y col. fueron los primeros en observar un aumento en la producción de Ins (1,4,5)₃ en oocitos incubados en presencia de acetilcolina y que la inyección intracelular de Ins (1,4,5)P₃ remedia la respuesta electrofisiológica inducida por el neurotransmisor (Oron y col. 1985). Tanto el efecto de acetilcolina como el de Ins(1,4,5)P₃ son dependientes de un aumento de calcio intracelular (Gillo y col. 1987).

Hasta el momento, se piensa que los eventos ocurren de acuerdo a la siguiente secuencia: unión de acetilcolina al receptor, activación de fosfolipasa C, hidrólisis de Ptd Ins (4,5)P₂, aumento en los niveles intracelulares de Ins (1,4,5)P₃, liberación de calcio desde los depósitos y activación de un canal de cloruro dependiente de Ca²⁺ (Takahashi y col. 1987).

Se ha demostrado que la magnitud de la corriente de Cl^- es proporcional a la concentración intracelular de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Gillo y col., 1987). Así, cuantificando el flujo de Cl^- se tiene una medida indirecta de la producción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y la actividad fosfolipasa C.

Utilizando esta aproximación, se ha obtenido información experimental que indica la posible participación de una proteína G en la activación de fosfolipasa C en el oocito de Xenopus.

Recientemente se ha demostrado que la microinyección de las subunidades β de la proteína G aisladas de eritrocito humano o cerebro de bovino inhiben la respuesta electrofisiológica inducida por acetilcolina (Moriarty y col. 1988). Estas observaciones indican que la asociación del complejo β inhiben la transducción de la señal al asociarse con la subunidad α , de manera análoga a como ocurre en el sistema de la adenililciclase (Gilman, 1987). Utilizando oocitos de Xenopus microinyectados con mRNA de cerebro de rata, con el objeto de expresar nuevos receptores se ha podido comprobar que la microinyección de GTP- γ -S remedia la respuesta del oocito a acetilcolina (Dascal y col., 1986; Kaneko y col., 1987; Nomura y col. 1987). Además, incubando el oocito con toxina de B. pertussis se reduce la respuesta al neurotransmisor (Dascal y col., 1986; Kaneko y col., 1987; Nomura y col., 1987; Moriarty y col., 1988).

A pesar que la respuesta del oocito a acetilcolina está bien caracterizada, poco se sabe respecto al papel fisiológico de los receptores colinérgicos muscarínicos en estas células. Aún cuando el oocito no madura por acción de acetilcolina, se ha observado que la maduración inducida por progesterona es

acelerada si la célula es tratada simultáneamente con el neurotransmisor (Dascal y col., 1984). Este resultado sugiere que alguno de los productos de la hidrólisis de Ptd Ins (4,5)P₂ debe estar involucrado con alguna vía secundaria utilizada por el oocito durante su maduración.

Los datos experimentales que se citan a continuación apoyan la posibilidad que el recambio de los fosfolípidos de inositol esté involucrado en la maduración del oocito de Xenopus.

La microinyección de Ins(1,4,5)P₃ en el oocito, antes de la adición de progesterona o insulina, aceleran la maduración (Stith y Maller, 1985).

Al tratar oocitos con 12-O-tetradecanoforbol 12-acetato (TPA), un éster de forbol análogo estructural del diacilglicerol, se induce la maduración (Stith y Maller, 1987). Este resultado, sin embargo, no ha sido reproducido en nuestro laboratorio (C. Allende, comunicación personal).

La incubación del oocito con altas concentraciones de Ca²⁺ o en presencia del ionóforo A23187 induce maduración (Baltier y col., 1977, Wasserman y Masui, 1975; Wasserman y col., 1980). Además, Moreau y col. (1980) han detectado un aumento transitorio en el Ca²⁺ intracelular en oocitos tratados con progesterona.

Por último, resulta interesante señalar que la proteína pp60^{v-src}, la forma oncogénica de la proteína pp60^{c-src} y que fosforila a una Ptd Ins quinasa, con lo cual copurifica, acelera marcadamente la maduración inducida por progesterona al ser microinyectada en el oocito (Spivack y col., 1984). Llama la atención que el MPF purificado, fosforila a la proteína pp60^{c-src} en los mismos sitios donde es fosforilada durante la mitosis de

fibroblastos (Shenoy y col. 1989).

OBJETIVOS DE LA TESIS

Como hemos visto en la Introducción, los fosfolípidos de inositol juegan un papel importante en la transducción de una gran variedad de señales. Las quinasas responsables de la síntesis de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ tienen un papel protagónico al proporcionar el sustrato de la fosfolipasa C para la generación de moléculas encargadas de transmitir la información al interior de la célula. La información obtenida a partir del efecto de algunos oncogenes y factores de crecimiento, sugiere la posibilidad que un aumento en el metabolismo de los fosfolípidos de inositol pueda ser consecuencia directa de la estimulación en la actividad de estas quinasas.

La maduración meiótica del oocito de Xenopus laevis puede ser inducida o acelerada por diferentes agentes. Esto ha permitido realizar estudios comparativos y poder establecer así, una relación entre el fenómeno de maduración y los mecanismos por los cuales actuarían diferentes hormonas.

Además, evidencia experimental de tipo indirecta sugiere la posibilidad que el recambio de los fosfolípidos de inositol esté involucrado en la maduración meiótica. Todo parece indicar que existirían vías de intercomunicación o diálogo entre el sistema de transducción de acetilcolina y el utilizado por progesterona.

De acuerdo con estos antecedentes, los objetivos o propósitos de esta tesis son:

a) Estudiar las propiedades de las quinasas responsables de la síntesis de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ en membranas aisladas y buscar diferencias en la actividad de estas enzimas en relación a la maduración del oocito.

b) Estudiar la síntesis de fosfatidilinositol fosfatos en oocitos intactos a fin de evaluar en condiciones fisiológicas el efecto de acetilcolina, progesterona e insulina sobre el metabolismo de éstos fosfolípidos y su posible participación en el proceso de maduración meiótica del oocito inducido por progesterona o insulina.

MATERIALES Y METODOS

A. REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION

ADP, GTP, GDP, GTP- γ -S, ATP, DTT, EDTA, EGTA, polilisina, poliornitina, poliarginina, neomicina, Ptd Ins, Ptd Ins (4)P, Ptd Ins (4,5)P₂, Ptd Ser, Ptd Col, progesterona, acetilcolina, 17 α -etinilestradiol, gonadotrofina coriónica (humana), insulina (de cerdo), Tris-HCl, HEPES, colagenasa (Tipo IA), 2,3 bifosfoglicerato, piruvato de sodio, formiato de amonio, PMSF, tolueno, PPO, POPOP, sacarosa, Tritón X-100, PMSF, ciclohemixida, placas cromatográficas de silica gel, fueron obtenidas de Sigma Chemical Co.

3-fosfogliceroaldehido-deshidrogenasa (de levadura), L- α -fosfogliceroldeshidrogenasa (de músculo de conejo), lactato deshidrogenasa (de corazón de porcino), fosfotriosa isomerasa (de músculo de conejo), 3-fosfoglicerato-quinasa, L- α -fosfoglicerol (grado A), fueron adquiridos en Calbiochem Behring Corp.

Metanol, cloroformo, acetona, oxalato de potasio, placas cromatográficas de polietilen-iminocelulosa de E. Merck A.G.

Los compuestos radiactivos D-mio(2-³H)-inositol 1-monofosfato (1 Ci/mmol), D-mio (2-³H)-inositol 1,4-bisfosfato (1 Ci/mmol), D-mio (2-³H) Inositol 1,4,5 trisfosfato (1 Ci/mmol), D-mio (2-³H)-inositol (199 Ci/mmol), ³²Pi y el reactivo fluorográfico Amplify, fueron obtenidos de Amersham.

La columna de intercambio aniónico "Partisil 10 SAX" para HPLC, se obtuvo de Whatman.

Las placas de incubación Petri Dish 1008 se obtuvieron de

Div. Becton, Dickinson y Co.

Las placas para autorradiografías X-OMAT-XAR-5 fueron obtenidas de KODAK.

Las sales inorgánicas (grado analítico) y los ácidos inorgánicos y orgánicos se obtuvieron de Baker, Merck y Sigma.

Las hembras adultas de Xenopus laevis fueron adquiridas de South African Snake Farm, Cape Province, R.S.A.

B. SINTESIS DE NUCLEOTIDOS RADIATIVOS

1. Síntesis de (μ - ^{32}P)ATP y (μ - ^{32}P)GTP.

Para la síntesis de (μ - ^{32}P)ATP se utiliza el método descrito por Walseth y Johnson (1979), basado en una serie de reacciones enzimáticas de la vía glicolítica. Este consiste en neutralizar la solución ácida de $^{32}P_i$ en HCl 0,2 N (50 mCi), a pH 8 con NaOH 2 N. Luego se incuba a 30°C por 1 hr en un medio que contiene Tris HCl 80 mM, pH 9,0; DTT 10 mM; α -L-fosfoglicerol 0,24 mM; NAD⁺ 1 mM; MgCl₂ 20 mM; ADP 0,1 mM; piruvato de sodio 2 mM; fosfoglicerol-deshidrogenasa 14 μ g/ml (0,8 unidad); fosfotriosa isomerasa 140 ng/ml (0,7 unidad); 3-fosfogliceraldehido deshidrogenasa 14 μ g/ml (1,1 unidad); 3-fosfoglicerato-quinasa 1,4 μ g/ml (0,6 unidad); y lactato deshidrogenasa 7 μ g/ml (3,5 unidades), en un volumen final de reacción de 1 ml. Las enzimas utilizadas están suspendidas en sulfato de amonio, por lo cual previo a su utilización se

centrifugan a 7.000 x g por 10 min. El residuo se resuspende en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0; DTT 1 mM y se adicionan a la mezcla de reacción. La reacción de fosforilación de ADP se detiene por calentamiento a 100°C por 2 min. El (γ - 32 P)GTP se sintetiza por el mismo procedimiento, pero se utiliza GDP en lugar de ADP.

Este procedimiento permite obtener entre un 80 - 90% de radiactividad incorporada el nucleótido.

2. Análisis y pureza de los nucleótidos radiactivos

La determinación de la pureza de los nucleótidos sintetizados, así como la incorporación de la marca radiactiva en los productos (γ - 32 P)ATP y (γ - 32 P)GTP, se realiza por cromatografía ascendente en placas de polietilén iminocelulosa. La separación de los nucleótidos se realiza utilizando como solvente una solución de KH_2PO_4 1 M, pH 3,5, durante 45 minutos, con lo cual el ATP migra con una distancia relativa (R_f) entre 0,4 y 0,5 y el GTP entre 0,3 y 0,35.

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

C. PREPARACION DE MEMBRANAS PLASMATICAS DE OOCITOS Y HUEVOS DE Xenopus laevis CON ACTIVIDAD PTD INOSITOL QUINASAS.

1. Obtención de ovario de Xenopus laevis

Hembras adultas se anestesian por hipotermia a 4°C, el ovario se extrae quirúrgicamente y se corta en pequeños trozos. Los trozos de ovario se lavan con una solución salina de Barth para anfibios y se mantienen en esta solución a 4°C. La composición de la solución de Barth es Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; MgSO₄ 0,82 mM; CaCl₂ 0,74 mM; KCl 1.0 mM; Ca(NO₃)₂ 0,33 mM; NaCl 88 mM; NaHCO₃ 2,4 mM.

2. Obtención de oocitos

Los oocitos desfoliculados se obtienen por el siguiente procedimiento enzimático: el ovario cortado en pequeños trozos se incuba a 25°C durante 3 hrs con agitación suave en 50 ml de una solución que contiene: CaCl₂ 1 mM, NaCl 110 mM; HEPES 10 mM, pH 8,0 y 2 mg/ml de colagenasa. Posteriormente, los oocitos disociados se lavan exhaustivamente con solución Barth para eliminar la colagenasa y se agita nuevamente en la misma solución durante otras 3 hrs para desprender el resto de células foliculares. Los oocitos de mayor tamaño correspondientes a los estados V y VI descritos por Dumont (1972), se separan de los oocitos de menor tamaño filtrados a través de una malla de nylon (Nitex) de 700 µm.

3. Obtención de huevos desprovistos de gelatina

Los procedimientos se realizan de acuerdo a lo descrito por Newport y Kirschner (1982).

Para inducir ovulación en una hembra adulta de Xenopus laevis se inyectan 500 unidades de gonadotropina coriónica humana en 500 μ l de agua destilada a 23°C. Con tal objeto se utiliza una jeringa hipodérmica que se inyecta bajo el tegumento de la pierna. La ovulación se produce a las 12-24 hr y es ayudada ejerciendo presión con los dedos a los costados del abdomen del anfibio.

Con el objeto de eliminar la cubierta de gelatina, los huevos se incuban durante 5 min y con agitación suave en 50 ml de una solución de cisteína HCl al 2% neutralizada a pH 7,8 con NaOH. Posteriormente, los huevos se lavan varias veces con solución Barth con el objeto de descartar la gelatina y la cisteína. Finalmente se guardan a 10°C hasta el momento de usar.

4. Fraccionamiento celular

Las membranas se preparan de acuerdo al método descrito por Jordana y col. (1984).

Todas las manipulaciones se realizan a 4°C. Los oocitos se homogeneizan en un volumen de una solución que contiene HEPES 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 0,25 mM y sacarosa 0,88 mM (solución A). La homogeneización se lleva a cabo en un homogeneizador Dounce, con 10 pasadas del vástago A y 10 pasadas del vástago B. El extracto resultante se centrifuga por 15 minutos a 1.000 x g, se separa el sobrenadante teniendo la precaución de no incluir parte del precipitado y los lípidos

concentrados en la superficie y se centrifuga nuevamente por 20 minutos a 20.000 x g. Se toma el nuevo sobrenadante y se centrifuga por 2 hrs a 100.000 x g. En esta última centrifugación se obtienen 3 fracciones: un sedimento bien adherido al fondo del tubo, una fracción de aspecto "algodonoso" por encima del sedimento y un sobrenadante transparente. Se extrae la fracción "algodonosa" y se diluye a 0,22 mM sacarosa con una solución que contiene: HEPES 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; PMSF 0,25 mM; DTT 1 mM (solución B) y se centrifuga por 2 hrs a 100.000 x g. Bajo estas condiciones se obtiene un sedimento adherido al fondo del tubo y un sobrenadante. Finalmente, el sedimento se resuspende en la solución C que contiene HEPES 50 mM, pH 8,0; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; PMSF 0,25 mM y sacarosa 0,22 M a una concentración de proteínas de entre 15 a 20 mg/ml y se guarda en volúmenes de 200 µl a -80°C hasta su uso.

D. ENSAYO DE LA FOSFORILACION DE FOSFOLIPIDOS DE INOSITOL EN MEMBRANAS AISLADAS

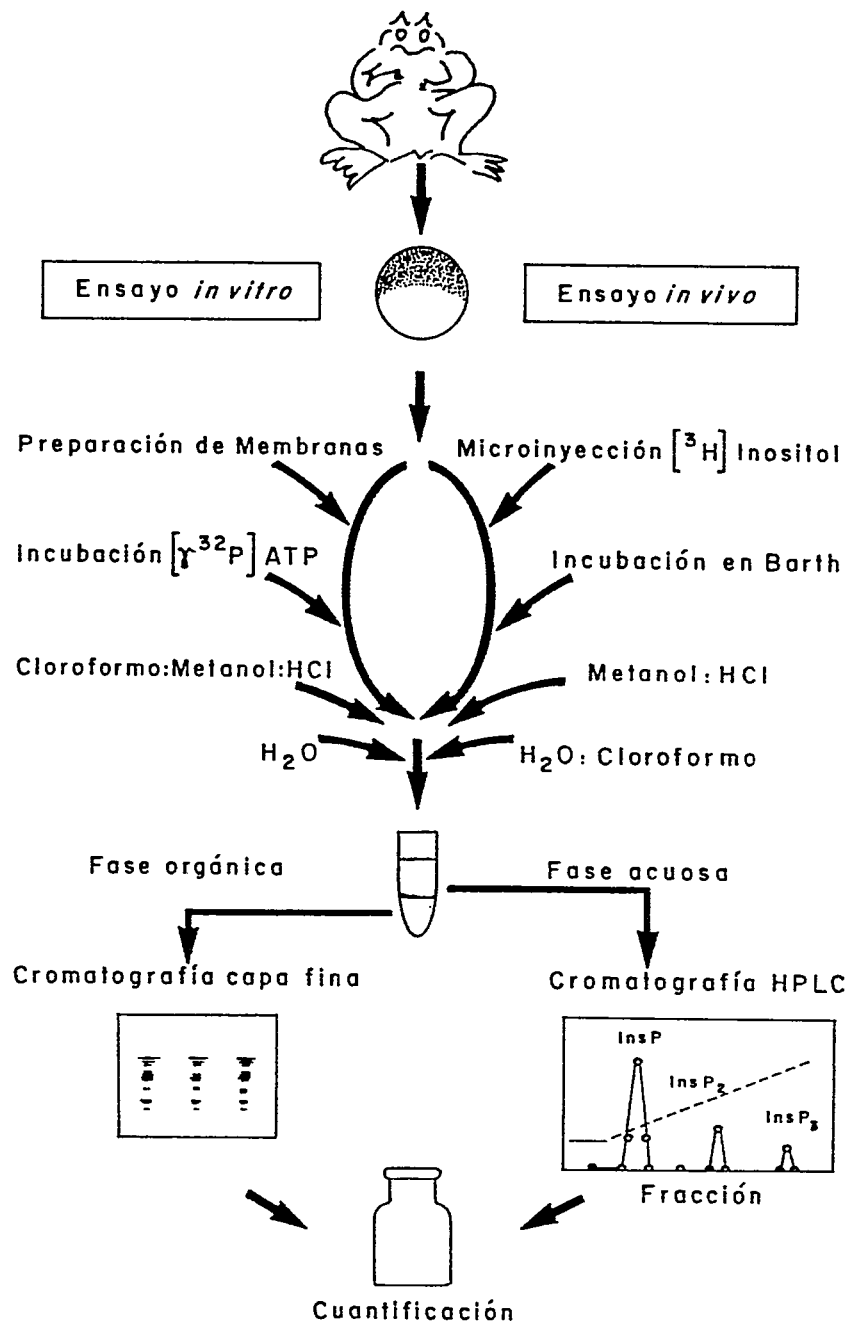
1. Incubación de membranas

Los ensayos se realizan según lo descrito por Lundberg y col. (1985) con algunas modificaciones (Esquema III). En general la dispersión de los duplicados para el ensayo fue inferior al 10%. Después de preincubar 45 µl de medio de ensayo a 30°C durante 1 minuto, la reacción se inicia por la adición de 5 µl

de proteína de membrana (50 - 100 µg) para obtener un volumen final de 50 µl de medio standard que contiene: HEPES 25 mM (pH 7,5); DTT 1 mM; MgCl₂ 20 mM (3²P)ATP 100 µM (300 - 2.000 cpm/mol). Se continúa la reacción durante 3 min y se detiene por la adición de 400 µl de una mezcla de cloroformo metanol HCl (100:200:0,1 vol/vol).

2. Extracción de los fosfolípidos de inositol en membranas aisladas

Los fosfolípidos fosforilados se extraen y analizan de acuerdo al siguiente procedimiento (Esquema III). Una vez detenida la reacción se adiciona 50 µl de agua destilada, la solución se agita y se mantiene durante 15 - 30 min a 25°C. Posteriormente, se agrega 100 µl de cloroformo y 100 µl de agua destilada y después de agitar vigorosamente se centrifuga a 3.000 x g durante 3 min. Este procedimiento permite separar la fase acuosa superior, la fase orgánica inferior y la interfase con proteínas. Se aísla la fase orgánica y la fase acuosa se vuelve a extraer con 100 µl de cloroformo. Se juntan las fases orgánicas y se lavan con 100 µl de agua saturada en cloroformo. Luego de agitar es centrifugada a 3.000 x g durante 3 min, se remueve y descarta la fase acuosa. La fase orgánica libre de agua que contiene los fosfolípidos se seca con N₂ gaseoso y resuspende en 50 µl de cloroformo.



ESQUEMA III. Metodología para el estudio de la síntesis de fosfatidilinositoles en membranas de oocitos y en oocitos intactos de Xenopus laevis.

3. Separación cromatográfica de los fosfatidilinositol polifosfatos.

A la solución de cloroformo que contiene los productos fosforilados se le agrega 2 µg de Ptd Ins-(4)P y Ptd Ins-(4,5)P₂, utilizados como marcadores, los lípidos fosforilados se separan de acuerdo a lo descrito por Machicao y Weiland (1984). La muestra lipídica se aplica en una placa cromatográfica de sílica gel de alta resolución que ha sido recorrida en una solución de oxalato de potasio 1% metanol H₂O (2:3 vol/vol) y calentada durante 30 min a 100°C. La placa posteriormente se desarrolla durante 60 min con una mezcla de solventes que contiene Cloforormo:acetona:metanol:ácido acético:H₂O (40:15:13:12:8 vol/vol). Después de esta etapa las placas se secan y se introducen en una cámara con I₂ para identificar los marcadores. Luego se somete a autorradiografía con placas Kodak X-Omat. Las áreas correspondientes a las manchas radiactivas y que comigran con Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ se extraen de las placas y se les determina la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

F. MARCACION DE FOSFOINOSITIDOS Y SINTESIS DE INOSITOL FOSFATOS EN OOCITOS INTACTOS.

1. Obtención y separación de oocitos en estado VI

Se extrae el ovario de una hembra adulta como ha sido

descrito previamente. Los oocitos se separan del ovario manualmente, en presencia de la cubierta de células foliculares utilizando pinzas de relojero Dumont #5 y observándolos bajo una lupa. Se seleccionan los oocitos de estado VI de 1,2 mm de diámetro, se mantienen a 10°C en solución Barth para ser utilizados antes de 1 hr en los experimentos de microinyección y síntesis de Ptd Inositolfosfatos.

2. Microinyección de oocitos

Los oocitos de estado VI sin desfolicular son microinyectados en el citoplasma mediante una aguja capilar con 50 nl de una solución de Tris HCl 20 mM (pH 7,2), NaCl 70 mM, que contiene 10 µCi de (³H) mio-inositol por µl. Para este objetivo se utiliza una bomba de microinyección Narishige, USA, Inc.

3. Incubación de oocitos

Una vez microinyectados los oocitos fueron incubados en grupos de 8 o 16, en pequeñas placas de plástico Petri Dish 1008 a 24°C en 5 ml de solución Barth en presencia o ausencia de las hormonas.

4. Homogenización de oocitos y separación de fases

La extracción de la fase orgánica que contienen los fosfolípidos y de la fase acuosa que contienen los inositolfosfatos se realiza de acuerdo a lo descrito por Lacal y col. (1987) (Esquema III).

Una vez terminada la incubación los oocitos se homogeneizan en tubos Eppendorf con 440 µl de metanol HCl 1 N (10:1 vol/vol),

en seguida se adiciona 600 μ l de cloroformo y la suspensión resultante se agita durante 1 hr a 25°C. Posteriormente se agrega 160 μ l de agua desionizada, se agita y congela a -80°C durante 15 min. Luego de esta etapa se descongela la muestra y se centrifuga a 3.000 x g durante 3 min. Con este procedimiento se forman 3 fases: una superior acuosa, una interfase de naturaleza protéica y una fase inferior orgánica.

5. Extracción de la fase orgánica y separación cromatográfica de los fosfoinosítidos

Se colecta la fase orgánica, y el resto de la muestra se vuelve a extraer con 100 μ l de cloroformo. Posteriormente se juntan ambas fases orgánicas y se agrega 220 μ l de HCl 0,1 N. Luego de agitar vigorosamente y centrifugar a 3.000 x g durante 3 min se colecta la fase clorofórmica y se evapora a sequedad con N_2 gaseoso. Finalmente se resuspende en 50 μ l de cloroformo que contiene 2 μ g de cada uno de los siguientes marcadores: Ptd Ins, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ y se guarda a -20°C hasta su uso.

La fase orgánica preparada previamente se divide en alícuotas de 26 μ l. Una alícuota se utiliza para cuantificar la incorporación de (³H)mio-inositol, en fase orgánica total.

Los lípidos contenidos en el resto de la muestra, se separan cromatográficamente en placas de sílica gel de acuerdo al procedimiento descrito en D-3. Una vez identificado los lípidos por exposición al vapor de I₂, las áreas correspondientes a los fosfolípidos que comigran con Ptd Ins, Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂ se extraen de las placas y se determina la incorporación de (³H)mio-inositol en un contador de centelleo

líquido.

6. Extracción de la fase acuosa y separación cromatográfica de los inositol fosfatos

El resto de la muestra que contiene la fase acuosa y las proteínas se centrifuga a 14.000 x g durante 10 min; con este procedimiento se obtiene un sedimento adherido al fondo del tubo y un sobrenadante. Se colecta el sobrenadante, se evapora a sequedad con N_2 gaseoso y se resuspende en 200 μ l de un amortiguador Tris HCl 20 mM (pH 7.2) que contiene NaCl 70 mM y los nucleótidos AMP, ADP y ATP en concentración de 100 μ M utilizados como marcadores. En estas condiciones la muestra se congela a -20°C hasta su uso.

El análisis de las fases acuosas conteniendo los inositolfosfatos se realiza de acuerdo a lo descrito por Irvine y col. (1985) (Esquema III). Se utiliza una columna cromatográfica de intercambio aniónico Partisil SAX-10 de 0,46 cm x 25 cm y un cromatógrafo líquido de alta presión.

La columna se calibra previamente usando como marcadores AMP, ADP, ATP, (^3H)mio-inositol 1-fosfato, (^3H)mio-inositol 1,4-bisfosfato y (^3H)mio-inositol 1,4,5-trisfosfato.

Las fases acuosas preparadas previamente se descongelan y se inyectan en la columna y se eluyen con un flujo de 1,25 ml/min, de acuerdo al siguiente programa: la columna se lava durante 6 min con agua desionizada. Posteriormente, durante un intervalo de 24 min se pasa a través de la columna un gradiente lineal, el cual comienza con agua hasta llegar a un 100% de formiato de amonio 1 M ajustado a pH 3,7 con ácido ortofosfórico. El flujo

del amortiguador formiato/fosfato se mantiene durante 5 min para posteriormente reducirlo linealmente hasta agua pura en 2 min. Finalmente, a objeto de preparar la columna para una nueva inyección, se lava durante 10 min con agua desionizada.

El eluido se colecta en fracciones de tiempo de 0,25 min y se sigue la elución de los marcadores AMP, ADP y ATP por su detección espectrofotométrica a 260 nm.

A las fracciones así obtenidas se les mide la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

F. DETECCION DE MADURACION DE OOCITOS

Como método de análisis para ver maduración de oocitos se usa la aparición de una mancha blanca en el polo animal de la célula. Morgan y col. (1986) demostraron que la aparición de esta mancha se correlaciona con la ruptura de la membrana nuclear y se observa bajo el microscopio después de 4 a 6 hrs de tratar el oocito con insulina o progesterona. La disolución de la membrana nuclear se comprueba fijando las células con TCA al 5% y después de romperlas se observa bajo microscopio.

G. CUANTIFICACION DE LOS PRODUCTOS RADIATIVOS

La radiactividad de las fracciones orgánicas y las muestras extraídas de las placas cromatográficas se cuantifican en un contador de centelleo líquido Delta 300, con 3 ml de una mezcla

de centelleo que contiene 0,08 gr de POPOP y 3,92 gr de PPO por litro de tolueno.

A las fracciones acuosas del eluido de la columna de HPLC se le adicionan 0,5 ml de agua desionizada y se cuantifica la radiactividad en presencia de 10 ml de liquido de centelleo, Tritón X-100 (2:1 vol/vol).

H. AUTORADIOGRAFIAS

Las placas cromatográficas que contienen los fosfolípidos marcados con ^{32}P se exponen a autorradiografía durante 12 hrs a -80°C , utilizando películas X-OMAT-XAR-5.

Cuando se utiliza tritio para marcar los fosfatidilinositoles, las placas cromatográficas se sumergen en 50 ml de un reactivo fluorográfico, "Amplify" de Amersham durante 30 min a 25°C . Posteriormente estas placas se secan a temperatura ambiente y se exponen durante 20 días a -80°C .

Las autorradiografías se revelan de acuerdo a los procedimientos fotográficos usuales.

I. DETERMINACION DE PROTEINAS

La determinación de proteínas se realizó por el método descrito por Bradford (1976).

J. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los datos obtenidos de experimentos en velocidad inicial se graficaron usando la transformación lineal de Lineweaver y Burk (1934). Las constantes cinéticas se calcularon a partir de las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones obtenidas de las gráficas anteriores. Las curvas se ajustaron a los valores experimentales por medio del método de regresión lineal.

Para determinar la significancia de los resultados en los estudios de desfosforilación de (^{32}P) Ptd Ins(4)P, se usó la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon, para 2 muestras independientes (Hollander y Wolfe).

RESULTADOS

A. ESTUDIOS DE LAS QUINASAS RESPONSABLES DE LA SINTESIS DE FOSFATIDILINOSITOLES POLIFOSFATOS DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE Xenopus laevis.

Los estudios realizados en la primera parte de esta Tesis, tienen por objeto identificar las quinasas responsables de la síntesis de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ en membranas aisladas de oocitos de Xenopus laevis. Definir las condiciones apropiadas para ensayar sus actividades y poder evaluar in vitro la acción de hormonas y algunos agentes que alteran el metabolismo de los fosfolípidos de inositol. Por último, examinar posibles cambios en la actividad Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4 fosfato-quinasa después de la maduración meiótica del oocito inducida por progesterona.

1. Identificación de las actividades Ptd Inositol quinasas en membranas de oocitos.

Con el objeto de identificar las quinasas responsables de la síntesis de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂, se extrajeron los fosfolípidos fosforilados de las membranas después de incubárlas con (γ -³²P)ATP.

La autorradiografía mostrada en Figura 1 indica que la incubación de las membranas de oocitos con (γ -³²P)ATP produce

mayoritariamente Ptd Ins(4)P y una pequeña cantidad de Ptd Ins (4,5)P_e. En general, más del 90% de la radiactividad recuperada después de la extracción y separación cromatográfica de los fosfolípidos corresponde a Ptd Ins (4)P y sólo un 3 a 5% corresponde a Ptd Ins (4,5)P_e. La adición de un extracto citoplasmático al medio de incubación no modificó sustancialmente estos resultados.

Al calentar las membranas o al incubarlas con EDTA se inhibe la incorporación de (³²P) en Ptd Ins (4)P, pero la presencia de Mn²⁺ puede reemplazar al Mg²⁺ en esta reacción.

2. Caracterización de la Ptd Ins quinasa en membranas de oocitos. Ensayo y factores que controlan su actividad.

Siendo el Ptd Ins (4)P el producto mayoritario en la reacción de fosforilación en membranas de oocito y de acuerdo a lo señalado en la Introducción acerca de la relación entre la Ptd Ins quinasa y algunos agentes mitogénicos, nos pareció interesante poder definir las condiciones adecuadas para el ensayo de esta quinasa, a fin de evaluar algunos factores que pudieran regular su actividad.

2.1. Dependencia de la concentración de proteínas de membranas

La Figura 2 muestra la dependencia de la reacción de fosforilación del Ptd Ins endógeno de las membranas con respecto a la concentración de proteínas de membranas. La formación de

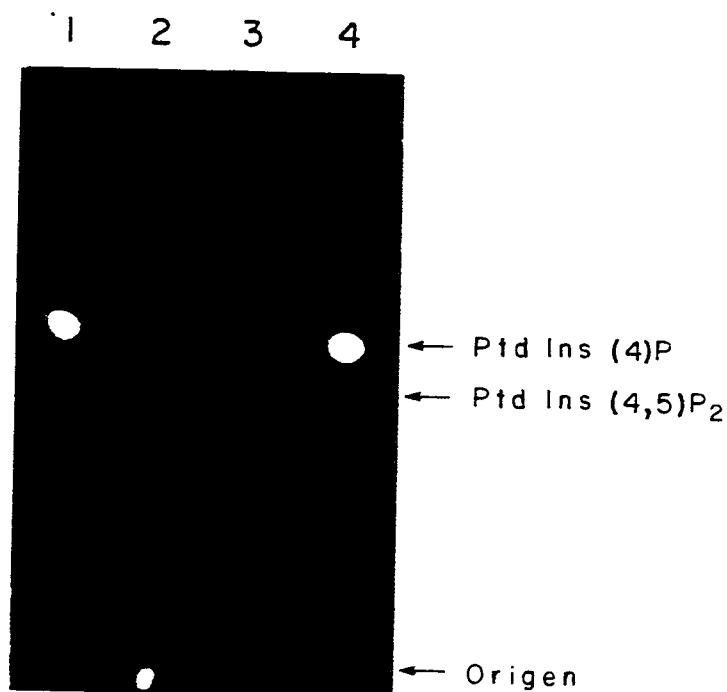


FIGURA 1. Autoradiografía de los productos fosforilados y analizados por cromatografía en placa fina. Carril 1: experimento control, se incubaron aproximadamente 75 μ g de proteínas de membranas con (γ - 32 P)ATP durante 3 min a 30°C de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Carril 2: las membranas usadas fueron previamente calentadas a 80°C durante 5 min. Carril 3: se agregó EDTA para alcanzar una concentración de 20 mM en el medio de incubación. Carril 4: se utilizó MnCl_2 10 mM en vez de MgCl_2 en el medio de incubación. La reacción fue terminada por la adición de cloroformo:metanol:HCl y los fosfolípidos extraídos fueron separados por cromatografía en placa fina. La placa fue expuesta para autoradiografía y se identificaron los productos radiactivos de acuerdo a la migración de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ utilizados como marcadores.

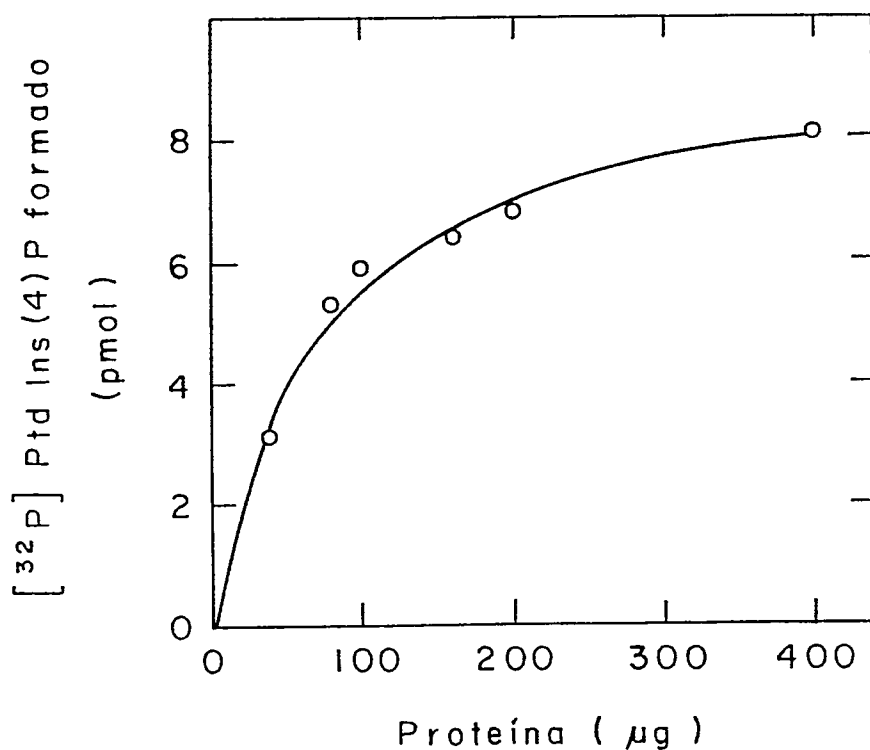


FIGURA 2. Efecto de la concentración de proteína de membrana sobre la síntesis de (^{32}P) Ptd Ins (4)P. El ensayo para la síntesis de (^{32}P) Ptd Ins (4)P se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, salvo que se utilizaran diferentes cantidades de proteínas de membrana. Una vez detenida la reacción se extrajeron los fosfolípidos y se separaron por cromatografía en placa fina. Las placas fueron sometidas a autorradiografía y la radiactividad correspondiente a la mancha que comigraba con el Ptd Ins (4)P se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

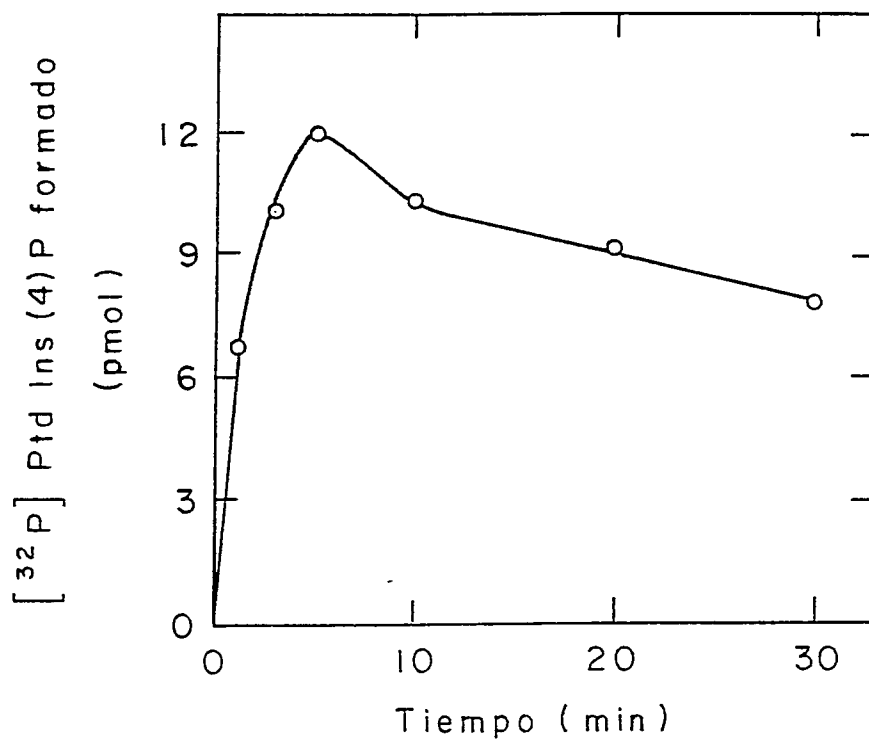


FIGURA 3. Efecto del tiempo de incubación sobre la síntesis de (³²P)Ptd Ins (4)P: El ensayo para la síntesis y cuantificación de (³²P)Ptd Ins (4)P se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, salvo que las membranas fueran incubadas a diferentes tiempos.

(^{32}P)Ptd Ins (4)P es lineal hasta los 100 μg de proteína, alcanzando un máximo alrededor de los 300 μg . De acuerdo a estos resultados los ensayos siguientes se realizaron con 50 - 100 μg de proteína.

2.2. Dependencia del tiempo de incubación

En la Figura 3 se muestra la dependencia de la reacción de fosforilación con respecto al tiempo de incubación. La reacción es inicialmente muy rápida alcanzando un máximo alrededor de los 5 minutos. Después de los 6 min de incubación, se observa una pérdida en el (^{32}P)Ptd Ins (4)P formado. En el ensayo estandar para la quinasa, la incubación se realizó durante 3 min.

2.3. Fosfatidilinositol exógeno como sustrato para la quinasa

Los ensayos previos se realizaron con el Ptd Ins endógeno de la preparación de membranas. Para examinar si el Ptd Ins agregado exógenamente podía ser utilizado como sustrato para la quinasa, se estudió la síntesis de Ptd Ins (4)P después de adicionar Ptd Ins.

En la Fig. 4 se observa un incremento de aproximadamente 2 veces en la formación de (^{32}P) Ptd Ins (4)P cuando se agrega sustrato exógeno al medio de incubación. Se alcanza un máximo de actividad a una concentración de 50 μM de Ptd Ins.

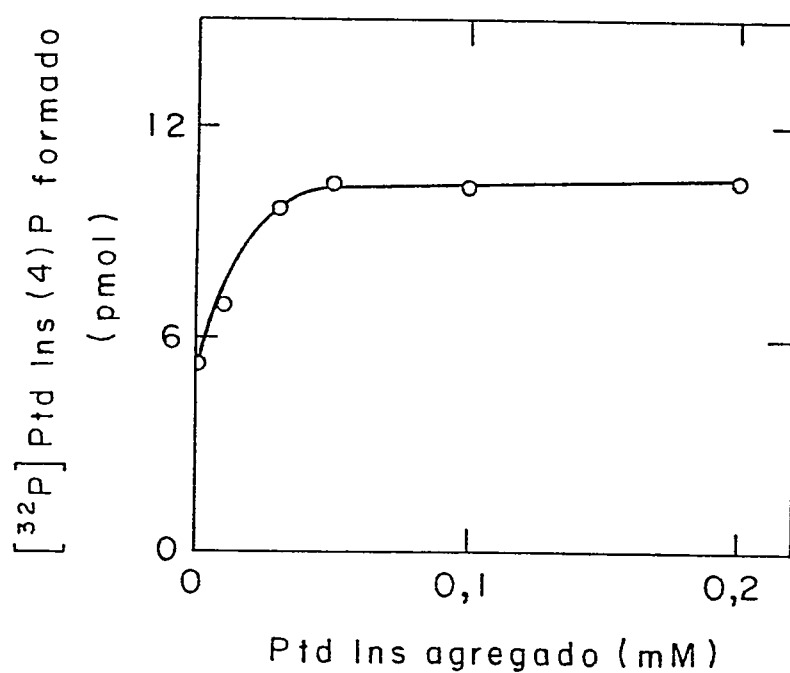


FIGURA 4. Efecto de Ptd Ins exógeno en la síntesis de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins (4)P}$. La reacción de fosforilación y cuantificación del producto se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, salvo que al medio de incubación se agregó diferentes cantidades de Ptd Ins exógeno. La suspensión de Ptd Ins fue sonicada antes de añadirla a la mezcla de reacción.

2.4. Efecto de cationes en la formación de (γ - P) Ptd Ins (4)P

Se estudió el efecto de cationes sobre la fosforilación de Ptd Ins endógeno. La actividad relativa de la enzima en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} se muestra en la Figura 5. Aunque ambos cationes divalentes permiten actividad, se obtiene mayor producción de (γ - P) Ptd Ins (4)P en presencia de Mg^{2+} .

La Tabla I muestra que hay una disminución del producto formado en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} y un efecto contrario se observa en presencia de un agente quelante del catión. Bajo las mismas condiciones de ensayo Li^+ no tuvo efecto.

2.5. Requerimiento de nucleótidos y efecto de GTP- γ -S en la formación de (γ - P) Ptd Ins(4)P

Como muestra la Tabla I (γ - P) GTP no puede sustituir al ATP como dador de fosforilo, pero se comporta como un inhibidor competitivo con respecto a ATP (Fig. 6). La K_m aparente calculado para ATP fue 50 μM y la K_i aparente para GTP fue aproximadamente 200 μM .

Un análogo no hidrolizable de GTP, el GTP- γ -S no mostró efecto en la formación de (γ - P)Ptd Ins (4)P (Tabla I).

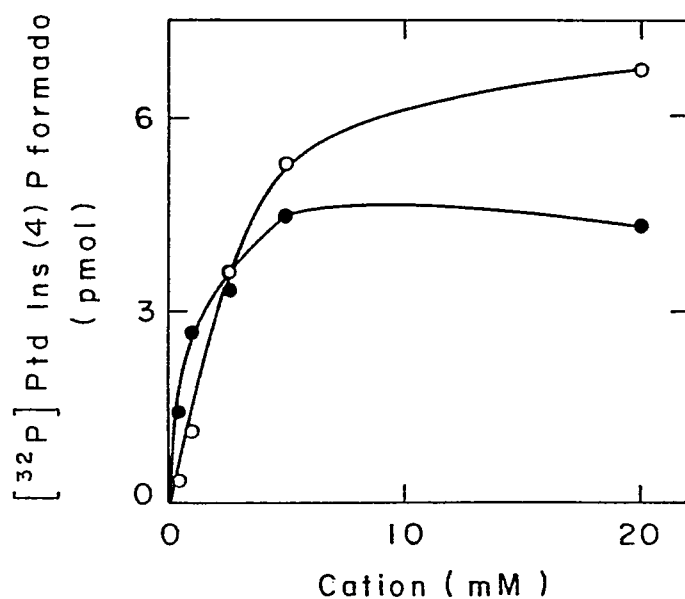


FIGURA 5. Efecto de cationes divalentes en la formación de (³²P)Ptd Ins (4)P. La reacción de fosforilación y cuantificación del producto se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, excepto que la incubación de las membranas se realizó en presencia de diferentes concentraciones de MgCl₂ (o) o MnCl₂ (●).

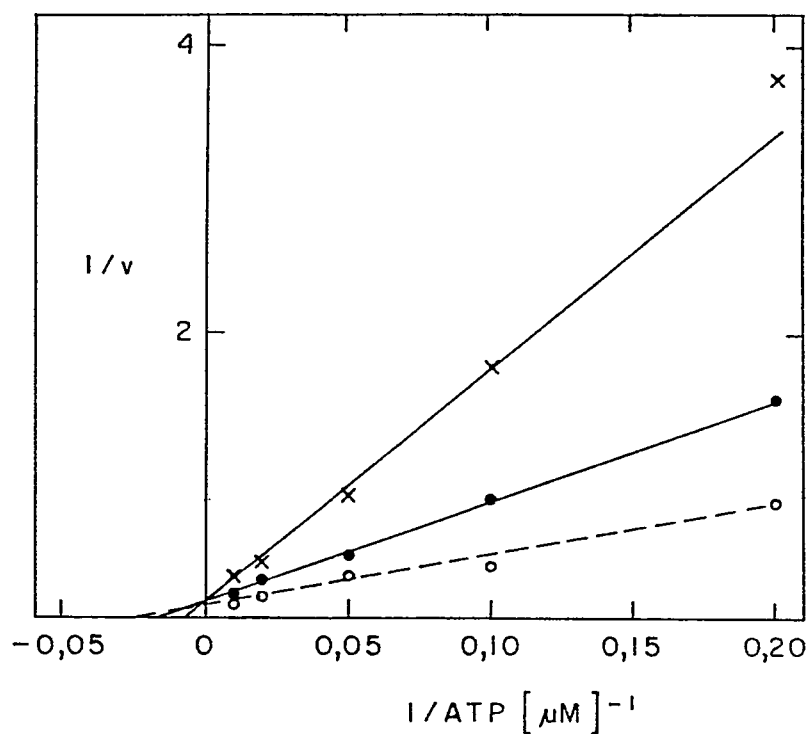


FIGURA 6. Gráfica de Lineweaver-Burk de la dependencia de la velocidad de síntesis de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins}(4)\text{P}$ con la concentración de $(^{32}\text{P})\text{ATP}$. Los ensayos se realizaron con 50 μg de proteína de membrana de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, usando diferentes concentraciones de $(^{32}\text{P})\text{ATP}$ en ausencia de GTP (o) o en presencia de 50 μM GTP (●) o 200 μM GTP (x). Se calculó los pmoles de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins}(4)\text{P}$ producido en los 3 min de incubación y los resultados se expresaron en un gráfico de dobles recíprocos.

TABLA I

Efecto de cationes y nucleótidos sobre la actividad
Ptd Ins quinasa de membrana de oocito de
Xenopus laevis

Modificación	(32 P)Ptd Ins (4) formado % de la actividad control*
--------------	---

Control	100
(γ - 32 P)GTP	<5
+ GTP 50 μ M	58
+ GTP -S 10 μ M	95
+ CaCl ₂ 100 μ M	74
+ EGTA 0,3 mM	135
+ LiCl 2 mM	100

*El (32 P)Ptd Ins (4)P formado se determinó de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos, en presencia de los compuestos señalados, excepto donde (γ - 32 P)GTP reemplazó al (γ - 32 P)ATP.

El experimento se realizó con duplicados y los resultados representan el porcentaje promedio del producto formado respecto del control. Bajo las condiciones de ensayo la dispersión de los duplicados fue inferior al 10%.

2.6. Efecto de fosfolípidos en la formación de (32 P)Ptd Ins (4)P

Se estudió el efecto de varios fosfolípidos sobre la reacción de fosforilación. Ptd Ser, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins(4,5)P_e estimulan la reacción; sin embargo, Ptd Col no la afecta en un rango similar de concentración. La Figura 7 muestra el efecto de Ptd Ser y Ptd Ins (4,5)P_e. Las concentraciones de Ptd Ins (4,5)P requeridas para la estimulación fueron menores que para Ptd Ser, alcanzando un máximo a 300 μ M y decayendo rápidamente a mayores concentraciones.

2.7. Efecto de poliaminas en la síntesis de (32 P)Ptd Ins (4)P

La presencia de polilisina a concentraciones críticas puede afectar drásticamente la incorporación de (32 P) en el Ptd Ins(4,5)P en la reacción catalizada por la Ptd Ins quinasa.

La Figura 8 muestra el efecto de algunos policationes en esta reacción. En 8A y 8B puede verse que tanto polilisina como poliornitina pueden estimular casi 3 veces la reacción a concentraciones de 50-60 μ M; concentraciones mayores son inhibitorias. Sin embargo, poliarginina presenta sólo un moderado efecto inhibitorio a similares concentraciones.

Se realizó un análisis cinético del efecto de polilisina y poliornitina sobre la velocidad de fosforilación a diferentes concentraciones de ATP. La Figura 9 muestra un gráfico de dobles recíprocos de los resultados obtenidos. Se observa que la presencia de los polipéptidos básicos no afecta la K_m aparente para ATP, el cual es aproximadamente 50 μ M. La estimulación

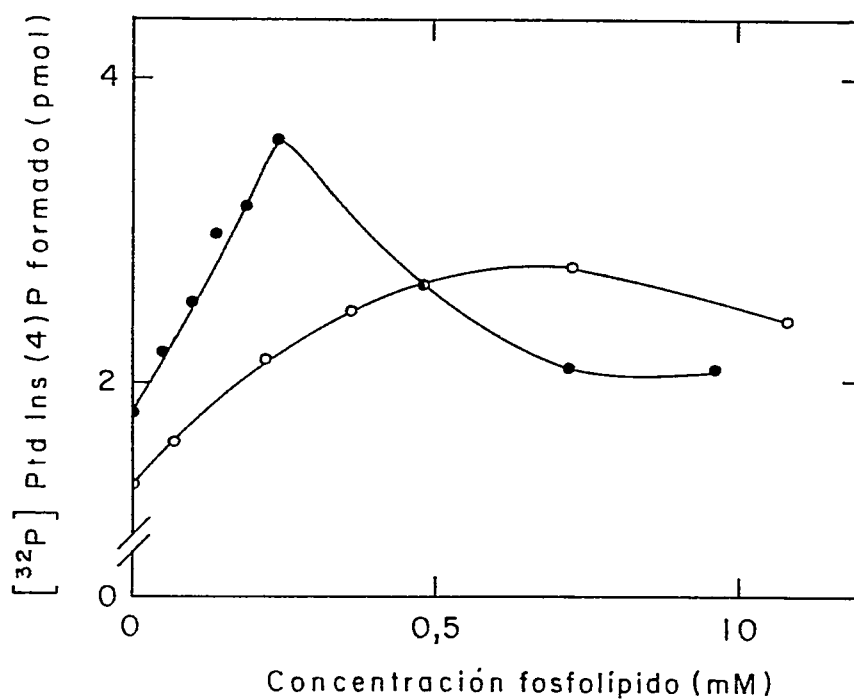


FIGURA 7. Efecto de fosfolípidos en la síntesis de Ptd Ins(4)P. Las reacciones se realizaron en presencia de 50 μ g de proteínas de membrana como se describe en Materiales y Métodos, excepto por la adición de diferentes concentraciones de Ptd Ser (o) o Ptd Ins (4,5)P_E (●) en la mezcla de reacción. La suspensión de fosfolípidos fue sonicada antes de su adición.

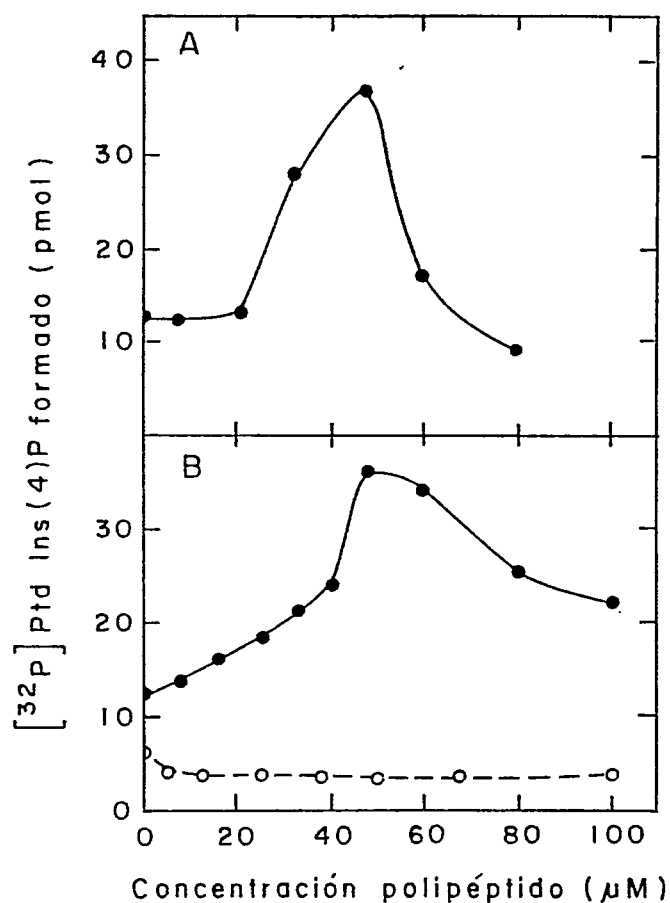


FIGURA 8. Efecto de poliaminas sobre la síntesis de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins (4)P}$. Las reacciones para la síntesis y cuantificación de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins (4)P}$ fueron realizadas de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos excepto que se incluyó Ptd Ins exógeno $0,6 \text{ mM}$ en la mezcla de reacción. En A se emplearon diferentes concentraciones de polilisina. En B, se usaron dos polimeros: poliornitina (\bullet) y poliarginina (\circ). Polilisina, poliornitina y poliarginina fueron obtenidos de Sigma y tenían pesos moleculares, determinados por viscosidad, de 24 kDa , 24 kDa y 40 kDa , respectivamente.

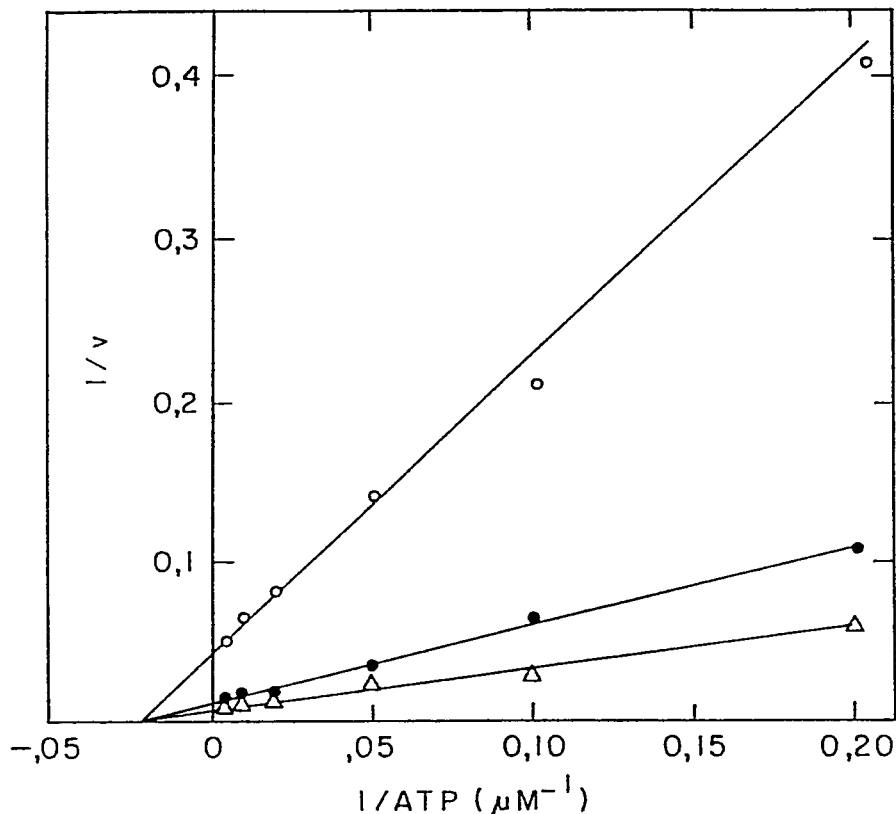


FIGURA 9. Gráfica de Lineweaver-Burk de la dependencia de la velocidad de síntesis de $(^3H)Ptd\ Ins(4)P$ con la concentración de $(^3H-^3P)ATP$ en ausencia o presencia de poliaminas. Las reacciones para la síntesis y cuantificación de $(^3H)Ptd\ Ins(4)P$ se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos adicionando $Ptd\ Ins\ 0,6\ mM$ exógeno y utilizando diferentes concentraciones de ATP . Se calculó los pmoles de $(^3H)Ptd\ Ins(4)P$ producidos en los 3 min de incubación en ausencia (o) o en presencia de polilisina $45\ \mu M$ (●) o poliornitina $45\ \mu M$ (Δ).

observada es debido a un incremento de aproximadamente 4 veces en la velocidad máxima de la reacción. Un resultado similar se obtuvo con diferentes concentraciones del otro sustrato Ptd Ins (datos no mostrados).

2.8. Efecto de neomicina en la síntesis de (32 P)Ptd Ins (4)P

Neomicina, un aminoglicósido, el cual se sabe afecta el metabolismo de los fosfatidilinositoles, tiene un efecto bifásico sobre la actividad de Ptd Ins quinasa (Fig. 10). A bajas concentraciones puede estimular un 50% mientras que a concentraciones sobre 0.5 mM es inhibitorio. Las concentraciones más altas de este antibiótico reducen los niveles de Ptd Ins (4)P formado a valores inferiores que el control.

2.9. Efecto 2,3-bisfosfoglicerato sobre la síntesis de Ptd Ins (4)P

2,3-bisfosfoglicerato ha sido descrito previamente, como un fuerte inhibidor de las enzimas "5-fosfomonoesterasas" que hidroliza Ins (1,4,5)P₃ a Ins (1,4)P₂ (Downes y col., 1982). En esta tesis también se estudió el efecto de 2,3-bisfosfoglicerato sobre la síntesis de Ptd Ins (4)P observándose que es también un potente inhibidor de la reacción de fosforilación de Ptd Ins, a concentraciones milimolares. Como se observa en la Figura 11, 2,3-bisfosfoglicerato a una concentración de 2 mM inhibe aproximadamente un 50% la formación de Ptd Ins (4)P.

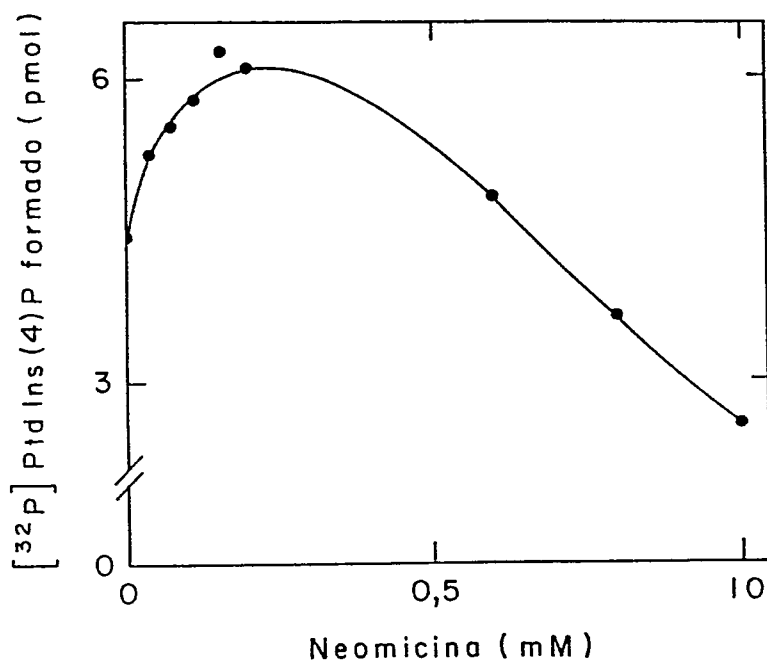


FIGURA 10. Efecto de neomicina en la síntesis de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins (4)P}$. Los ensayos para la actividad Ptd Ins quinasa se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, excepto que se agregaron distintas concentraciones de neomicina a la mezcla de reacción.

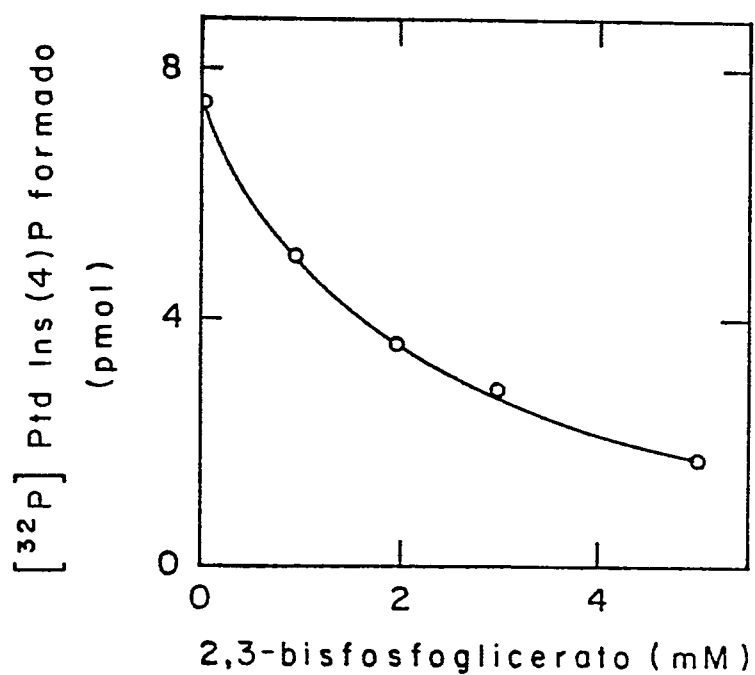


FIGURA 11. Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato sobre la síntesis de (^{32}P)Ptd Ins (4)P. Los ensayos para la actividad Ptd Ins quinasa se realizaron de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos, excepto que se adicionaron diferentes concentraciones de 2,3-bisfosfoglicerato a la mezcla de reacción.

2.10. Efecto de hormonas en la formación de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P_e.

La autorradiografía de la Figura 12 muestra que la adición de progesterona, insulina o acetilcolina al medio de incubación no tiene efecto sobre la formación de (³²P)Ptd Ins (4)P. Aparentemente, estas hormonas tampoco tienen efecto sobre la síntesis de (³²P)Ptd Ins (4,5)P_e. Las diferencias observadas para la síntesis de (³²P)Ptd Ins (4)P están dentro del error experimental esperado para el ensayo.

3. Degradación de (³²P)Ptd Ins (4)P preformado

Con el objeto de averiguar la causa del efecto de polilisina y 2,3 -bisfosfoglicerato en la reacción de formación de (³²P)Ptd Ins(4)P se estudió la pérdida de (³²P)Ptd Ins (4)P en presencia de estos agentes.

Se estudió la pérdida de (³²P)Ptd Ins (4)P detectada en la Fig. 3, después de diluir el ATP radiactivo. En estos experimentos a la mezcla de reacción preincubada durante 3 minutos se agregó un exceso de ATP frío para impedir nueva incorporación de (³²P) y se siguió en el tiempo la caída de la radiactividad presente en Ptd Ins (4)P.

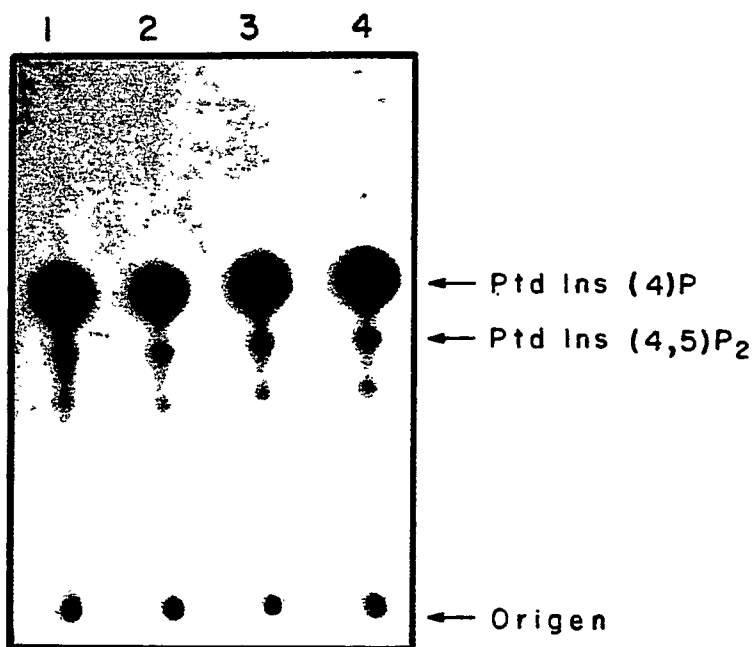


FIGURA 12. Cromatografía en placa fina de los lípidos de membrana fosforilados. Efecto de hormonas. Aproximadamente 75 μg de proteína de membrana fueron incubadas con (γ - ^{32}P)ATP por 3 min a 30°C en ausencia (1) o en presencia de 10 μM de cada uno de los siguientes agentes: acetilcolina (2), insulina (3), o progesterona (4). La reacción fue terminada y los lípidos se analizaron por cromatografía en placa fina como se describe en Materiales y Métodos. Después de la autorradiografía las áreas correspondientes al (^{32}P)Ptd Ins (4)P fueron extraídas de la placa y se cuantificó la radiactividad.

El experimento se realizó con duplicados y se consigna entre paréntesis el porcentaje promedio del producto Ptd Ins(4)P formado respecto del control. 1 (100%), 2 (88%), 3 (99%), 4 (95%).

3.1. Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato

De acuerdo a lo observado en la Figura 13, no existe diferencias significativas en la cinética de la pérdida de radiactividad debido a la presencia de 2,3-bisfosfoglicerato. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de 2,3-bisfosfoglicerato en la reacción de fosforilación no es debido a un aumento en la velocidad de la pérdida de radiactividad de (^{32}P)Ptd Ins (4)P.

3.2. Efecto de polilisina

La Figura 14 muestra la pérdida de radiactividad en presencia y ausencia de polilisina. La pérdida de radiactividad en (^{32}P)Ptd Ins (4)P no se acompaña de un aumento significativo en la aparición de Ptd Ins (4,5) P_2 . A pesar que se observa un aumento en la pérdida de radiactividad en (^{32}P)Ptd Ins(4)P, en presencia de polilisina, el análisis estadístico indica que las diferencias no son significativas. De esta manera, el aumento en la formación de Ptd Ins (4)P, observado en Figura 8A, no se explica por una disminución en la velocidad de pérdida de la radiactividad del (^{32}P)Ptd Ins (4)P.

3.3 Efecto de Progesterona

Se estudió también el efecto de progesterona sobre la pérdida de (^{32}P)Ptd Ins(4)P. La Figura 15 muestra que la adición de progesterona no afecta la reacción hidrolítica detectada después de los 5 min de incubación y que da cuenta de la pérdida de (^{32}P)Ptd Ins(4)P. Tampoco se observó un aumento significativo

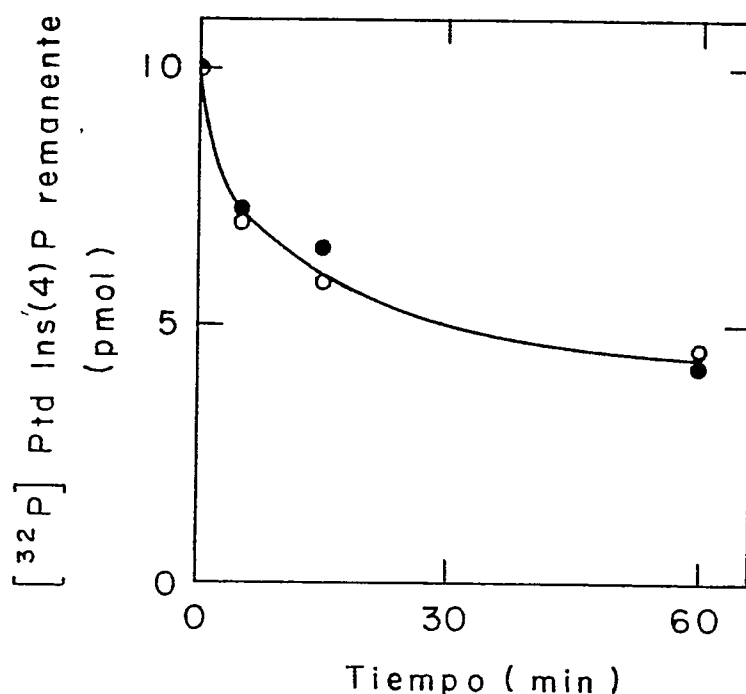


FIGURA 13. Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato en la degradación de (³²P)Ptd Ins (4)P. Para obtener formación de (³²P)Ptd Ins (4)P las membranas fueron preincubadas durante 3 min en presencia de (³²P)ATP de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Seguidamente, a tiempo cero en el gráfico, con el objeto de bloquear nueva formación de (³²P)Ptd Ins (4)P se agregó ATP no radiactivo. A un conjunto de tubos junto con el ATP no radiactivo se adicionó 2,3-bisfosfoglicerato (●); este último no se agregó en los tubos control (○). La concentración final de ATP y 2,3 bisfosfoglicerato alcanzada en la mezcla de reacción fue de 10 mM y 5 mM, respectivamente. Se detuvieron las reacciones a los tiempos indicados en el gráfico y se cuantificó el (³²P)Ptd Ins (4)P remanente de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

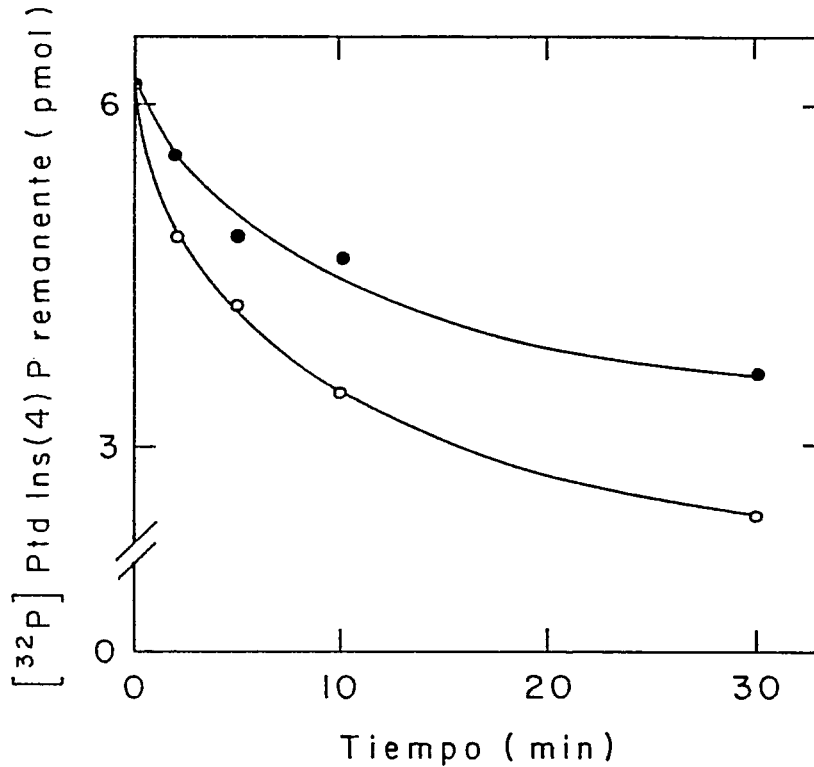


FIGURA 14. Efecto de polilisina en la degradación de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins (4)P}$. Para obtener formación de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins (4)P}$ las membrans fueron preincubadas durante 3 min en presencia de $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$. Seguidamente, a tiempo cero en el gráfico, con el objeto de bloquear nueva formación de $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins (4)P}$ se agregó ATP no radiactivo. A un conjunto de tubos junto con el ATP no radiactivo se adicionó polilisina (○), este último no se agregó a los tubos control (●). La concentración final de ATP y polilisina alcanzada en la mezcla de reacción fue de 10 mM y 20 μM respectivamente.

Se detuvieron las reacciones a los tiempos indicados en el gráfico y se cuantificó el $(^{32}\text{P})\text{Ptd Ins (4)P}$ remanente. De acuerdo al análisis estadístico, descrito en Materiales y Métodos, las diferencias no son significativas.

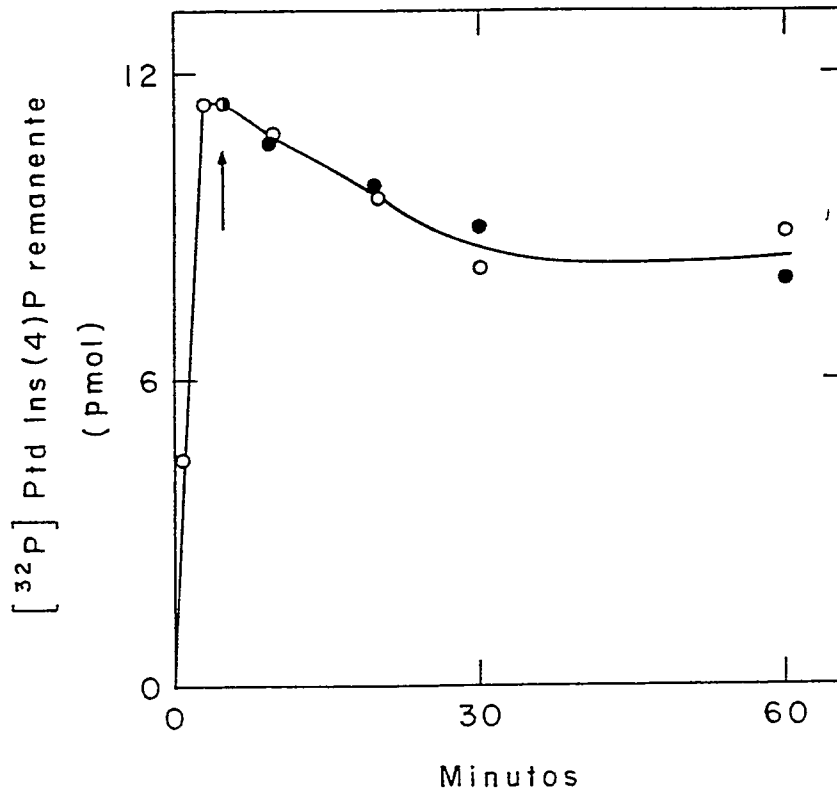


Figura 15. Degradación de (^{32}P)Ptd Ins (4)P. Efecto de progesterona. Se incubaron membranas en presencia de (γ - ^{32}P)ATP de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos para obtener formación de (^{32}P)Ptd Ins(4)P. A los 3 min de incubación (señalados por la flecha), a un conjunto de tubos se adicionó progesterona alcanzando una concentración final de 10 μM en la mezcla de reacción (○); mientras que progesterona no se adicionó a los tubos control (●). Se detuvieron las reacciones a los tiempos indicados en el gráfico y se cuantificó el (^{32}P)Ptd Ins(4)P remanente.

en la aparición de Ptd Ins (4,5)P₂ (datos no mostrados).

4. Comparación de las actividades Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa en membranas de oocitos y huevos de Xenopus laevis

Las actividades relativas de las enzimas Ptd Ins quinasa, Ptd Ins 4-fosfato quinasa presentes en las membranas del oocito y huevo de Xenopus laevis, se muestran en la Fig. 16.

Al analizar A y B se puede comprobar que tanto en el oocito como en el huevo de Xenopus se produce mayoritariamente Ptd Ins (4)P y una pequeña cantidad de Ptd Ins (4,5)P₂.

En 16A, se observa que la actividad específica de la Ptd Ins quinasa presente en la preparación de membranas de oocitos madurados in vitro por acción de progesterona, es aproximadamente 2 veces superior a la encontrada en las membranas de oocitos no maduros. También se observó un incremento de casi 3 veces en la actividad específica de la otra quinasa, Ptd Ins 4-fosfato quinasa (Fig. 16B).

Idénticos resultados se obtuvieron con membranas de oocitos ovulados por acción de gonadotrofina coriónica (datos no mostrados).

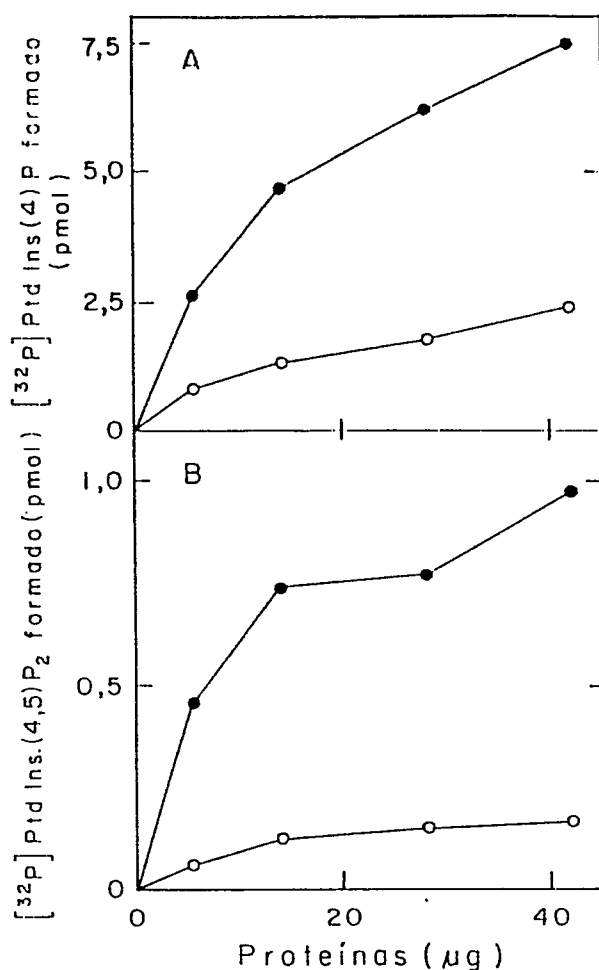


FIGURA 16. Actividad específica de las enzimas Ptd Ins-quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa de membrana de oocito y huevo de Xenopus laevis. A partir de una rana adulta de Xenopus laevis se obtuvieron oocitos etapa VI, exhaustivamente defoliculados. Se prepararon membranas a partir de una fracción de oocitos tratados con progesterona 10 µM hasta su maduración y a partir de una fracción de oocitos no tratados con la hormona.

Se determinó la formación de (³²P)Ptd Ins (4)P (A) y (³²P)Ptd Ins (4,5)P₂ (B) con distintas cantidades de proteínas de membranas de oocitos maduros (●) o no tratados con progesterona (○).

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

B. ESTUDIOS DEL METABOLISMO DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE INOSITOL EN OOCITOS DE Xenopus laevis.

Los estudios realizados en esta segunda parte de la Tesis, tienen por objeto, evaluar la acción de acetilcolina y hormonas que participan normalmente en el proceso de maduración meiótica del oocito de Xenopus laevis sobre el metabolismo de los fosfolípidos de inositol. Se estudia el efecto de estos agentes en la incorporación de (^3H)mio-inositol en fosfatidilinositoles y en la producción de inositolfosfatos después de microinyectar (^3H)mio-inositol en el citoplasma de la célula.

1. Síntesis de fosfatidilinositol fosfatos en oocitos intactos.

1.1 Incorporación de (^3H)mio-inositol y (^{32}P)fosfato en los fosfolípidos de inositol

En una etapa preliminar de los estudios con oocitos intactos se analizó la síntesis de fosfatidilinositoles utilizando dos precursores diferentes. En la Figura 17 se muestra una autorradiografía de los distintos fosfolípidos de inositol formados durante la incubación del oocito en presencia de (^{32}P)fosfato (A) y después de microinyectar (^3H)mio-inositol (B).

En ambos casos se observa que el producto formado mayoritariamente es el Ptd Ins, además se conserva la relación entre el Ptd Ins (4)P y el Ptd Ins (4,5)P₂ encontrado durante la incubación de las membranas con (γ - ^{32}P)ATP (Fig. 1).

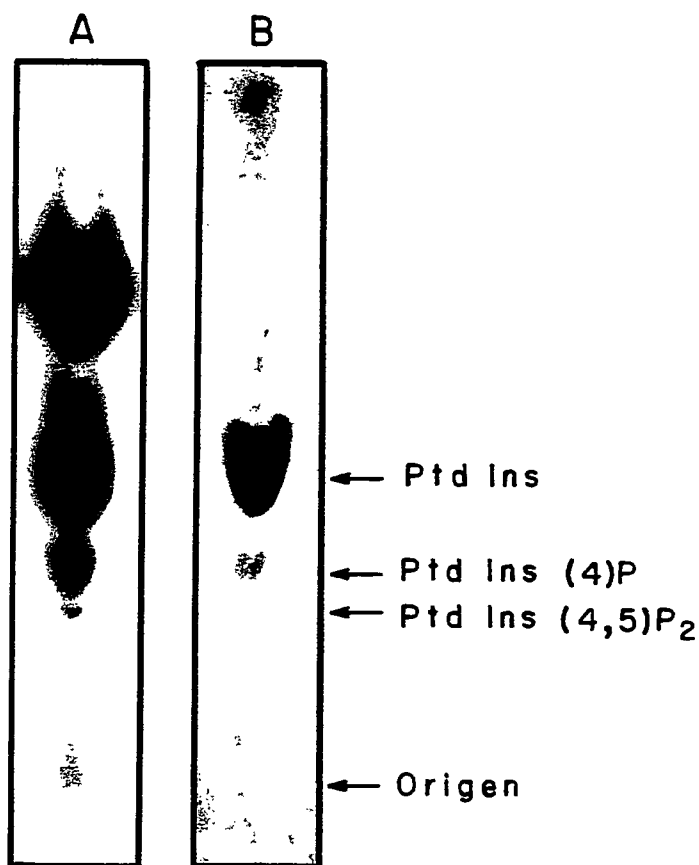


FIGURA 17. Síntesis de fosfatidilinositol fosfatos en oocitos intactos. En A se incubaron 10 oocitos desfoliculados en 1 ml de solución Barth que contenía 3 μ Ci de (32 P) fosfato. En B se microinyectaron 8 oocitos, sin desfolicular con 0,25 μ Ci de (3 H)mio-inositol. Después de 15 hrs de incubación a 25°C, los oocitos fueron homogeneizados, se extrajeron los lípidos y éstos se resolvieron por cromatografía en placa fina de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

En A, la placa fue expuesta a autorradiografía durante 12 hr; y en B la placa fue tratada previamente con una solución intensificadora durante 30 min y luego expuesta a autorradiografía durante 5 días.

Después de la autorradiografía, las áreas correspondientes a los diferentes fosfolípidos fueron extraídos de la placa y se cuantificó la radiactividad incorporada. Los resultados obtenidos al microinyectar (^3H)mio-inositol se señalan a continuación: (^3H)Ptd Ins (11780 cpm); (^3H)Ptd Ins (4)P (1720 cpm); (^3H)Ptd Ins (4,5) P_2 (283 cpm). La eficiencia de conteo para las muestras con tritio extraídas desde las placas de sílica fue cercana al 12%.

1.2. Cinética de incorporación de (^3H)mio-inositol en los fosfolípidos de inositol

Se determinó la eficiencia relativa en la marcación de los fosfolípidos de inositol mediante dos procedimientos diferentes: microinyectando o incubando externamente los oocitos con (^3H)mio-inositol.

La Figura 18 muestra que aunque ambos procedimientos permiten marcación, se alcanza un nivel muy superior y a tiempos más cortos cuando el precursor es introducido al interior de la célula, a pesar de que se utilizó una cantidad de isótopo por oocito cuatro veces menor.

Al determinar la distribución de la marca en Ptd Ins, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5) P_2 se encontró que esto era similar en los dos procedimientos utilizados para el marcaje.

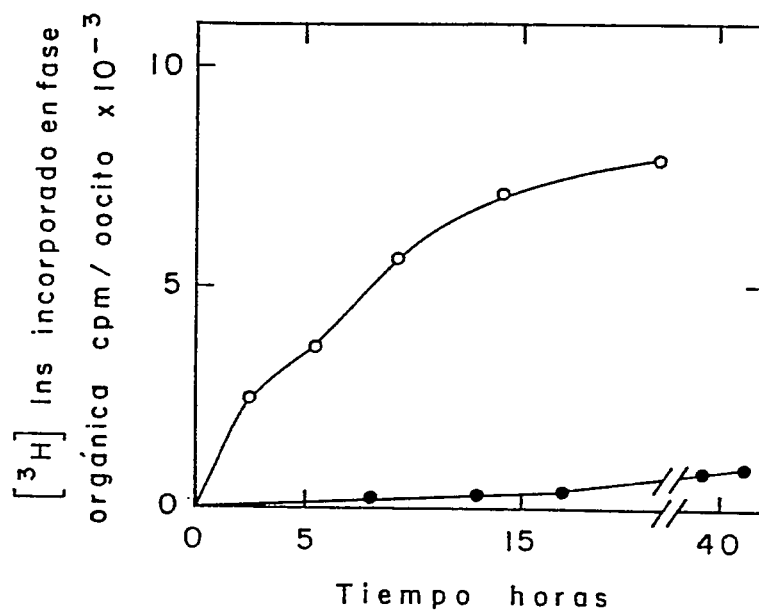


FIGURA 18. Incorporación de (³H)mio-inositol en lípidos totales en función del tiempo. Un grupo de 300 oocitos previamente desfoliculados se incubó en 3 ml de solución Barth que contenía 300 μ Ci/ml de (³H)mio-inositol (●). Otro grupo de 50 oocitos sin desfolicular fue microinyectado con 0,25 μ Ci de (³H)mio-inositol (o). A los tiempos de incubación indicados en el gráfico se tomaron 8 oocitos de cada grupo y se cuantificó la incorporación de la marca en lípidos totales de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados están referidos a la radiactividad incorporado en un oocito.

2. Efecto de hormonas y acetilcolina en la síntesis de fosfatidilinositol fosfatos en oocitos intactos

Para estudiar el efecto de progesterona, insulina y acetilcolina en la síntesis de fosfatidil inositol fosfatos se utilizó un enfoque cinético. Los oocitos fueron microinyectados con (^3H)mio-inositol y se determinó la incorporación del compuesto radiactivo en Ptd Ins, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ a diferentes tiempos después de iniciada la incubación con la hormona pero antes de alcanzar el equilibrio isotópico.

2.1. Efecto de progesterona

La incubación de oocitos con la progesterona induce un aumento en la síntesis de fosfatidil inositol fosfatos. Como se observa en la Figura 19 hay un aumento de aproximadamente 2 veces en la incorporación de (^3H)mio-inositol en Ptd Ins, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ en los oocitos tratados con la hormona. Este efecto es detectado después de 3 hr de iniciada la incubación, alcanza un máximo entre las 4 y 6 hr y decae posteriormente a los niveles observados en los oocitos control (Fig. 20A). Cabe destacar que la mayor incorporación descrita previamente coincide con el máximo porcentaje de maduración (Fig. 20B).

La incorporación de (^3H)mio-inositol en Ptd Ins, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ se redujo a los niveles observados en el control cuando se incubaron simultáneamente oocitos con progesterona y cicloheximida a una concentración inhibitoria de

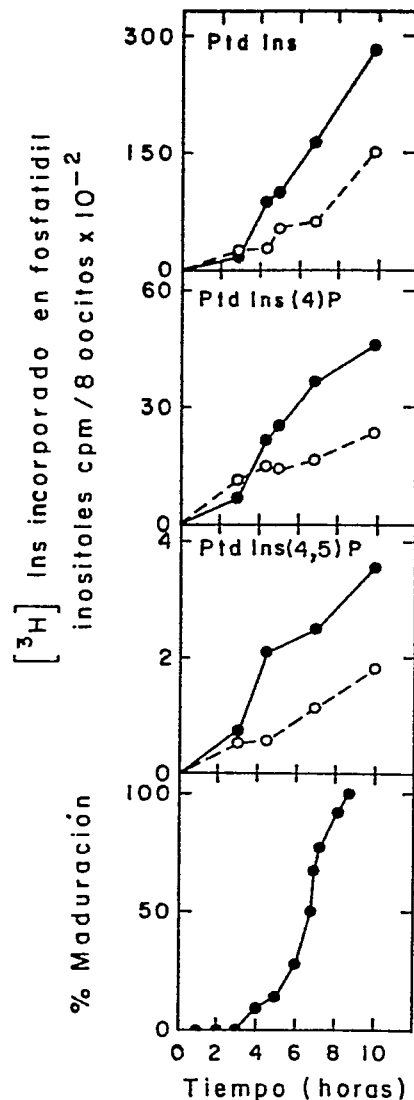


FIGURA 19. Incorporación de (^3H)mio-inositol en fosfatidilinositoles. Efecto de progesterona. Oocitos etapa VI seleccionados y separados manualmente desde el ovario fueron microinyectados con 0,25 μCi de (^3H)mio-inositol e incubados a 25°C en ausencia (o) o en presencia de progesterona $10 \mu\text{M}$ (●). A los tiempos de incubación indicados en el gráfico 8, se tomaron grupos de 8 oocitos y se cuantificó la incorporación de la marca en Ptd Ins, Ptd Ins(4)P y en Ptd Ins(4,5)P, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. La curva de maduración se confeccionó determinando el porcentaje de oocitos que presentaban una mancha blanca en el polo animal.

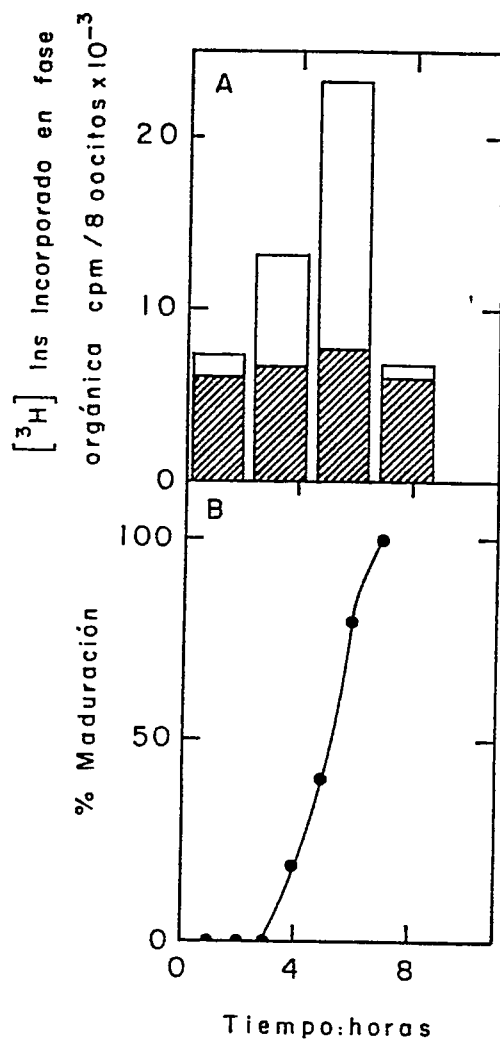


FIGURA 20. Incorporación de (³H)mio-inositol en lípidos totales durante la maduración meiótica. En A se incubaron oocitos en ausencia (▨) o en presencia de progesterona 10 μM (□). A distintos tiempos de iniciada la incubación se microinyectaron grupos de 8 oocitos con 0,25 μCi de (³H)mio-inositol. Después de 2 hr de la microinyección, se cuantificó la marca incorporada en fase orgánica total de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. En B se determinó el porcentaje de oocitos que presentaban mancha blanca en el polo animal a distintos tiempos de iniciada la incubación con progesterona.

la síntesis protéica (Fig. 21A). Bajo estas condiciones tampoco se observó maduración de los oocitos.

El estradiol, una hormona esteroideal que no induce maduración del oocito y utilizado como control, no tuvo efecto en la síntesis de fosfatidil inositol fosfatos, incluso después de 10 hr de incubación (Tabla II).

2.2. Efecto de acetilcolina

De manera análoga a lo observado con progesterona, acetilcolina induce un aumento en la incorporación de (^3H)mio-inositol en Ptd Ins, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ (Fig. 22). Este efecto es rápido y tiende a alcanzar un máximo después de 2 hr de poner los oocitos en contacto con el neurotransmisor. Las células utilizadas como control, maduraron por acción de progesterona, lo cual no ocurrió con acetilcolina.

A diferencia de lo observado con la progesterona, el efecto de la acetilcolina no es revertido si los oocitos son tratados simultáneamente con un inhibidor de la síntesis protéica (Tabla II).

Un experimento comparativo del efecto de progesterona y acetilcolina a tiempos cortos de incubación, en el que se utilizaron oocitos provenientes del mismo ovario se muestra en la Figura 23. De acuerdo a lo descrito previamente, la acetilcolina estimula rápidamente la incorporación de (^3H)mio-inositol, a los 30 min de iniciada la incubación se observa una clara diferencia

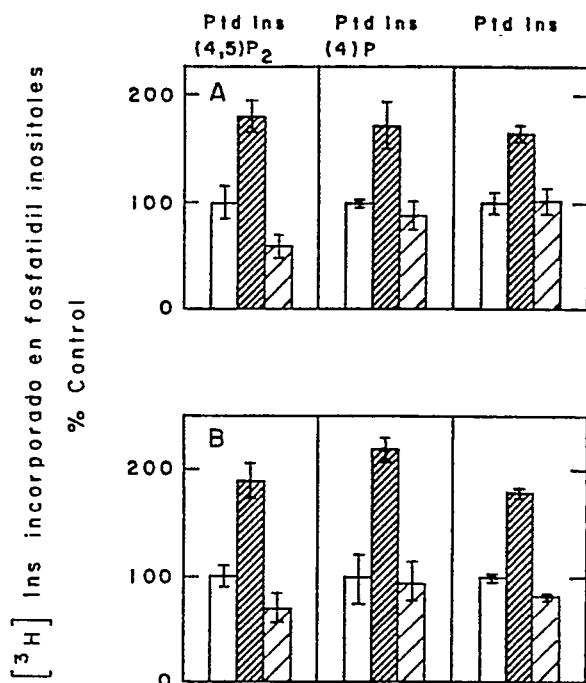


FIGURA 21. Efecto de cicloheximida en la síntesis de fosfatidil inositoles en oocitos sometidos a maduración con progesterona (A) o insulina (B). Se microinyectaron oocitos con 0.25 μCi de (^3H)mio-inositol, y se incubaron en grupos de a 8, en ausencia de hormonas y/o cicloheximida (\square), en presencia de hormonas 10 μM (▨), o en presencia de hormona 10 μM y cicloheximida 10 μM (▩). Después de 8 hrs de incubación y una vez detectada la maduración en aquéllos oocitos tratados sólo con hormona, se cuantificó la incorporación de (^3H)mio-inositol en Ptd Ins, Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂. Las barras representan el promedio de dos determinaciones \pm la dispersión y se expresaron en relación a la incorporación de la marca en el experimento control.

TABLA II

Incorporación de (^3H)Inositol en fosfatidil inositoles.

Efecto de hormonas y acetilcolina

	Radiactividad Fase orgánica cpm/8 oocitos	% de la marca respecto del control
A		
Control	12.600 \pm 200	100
Acetilcolina 10 μM	31.700 \pm 2200	258
Acetilcolina 10 μM + Cicloheximida 10 μM	31.800 \pm 1800	259
B		
Control	14.700 \pm 3000	100
Progesterona 10 μM	29.300 \pm 500	200
Estradiol 10 μM	18.000 \pm 1900	129

Se microinyectaron oocitos etapa VI con 0,25 μCi de (^3H)mioinositol y se incubaron en ausencia (control) o en presencia de diferentes compuestos. Al terminar la incubación se tomaron grupos de 8 oocitos y se cuantificó la radiactividad incorporada en lípidos totales de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. En A la incubación se realizó durante 2 hr y en B hasta detectar un 100% de maduración en los oocitos tratados con progesterona. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones \pm la desviación estándar.

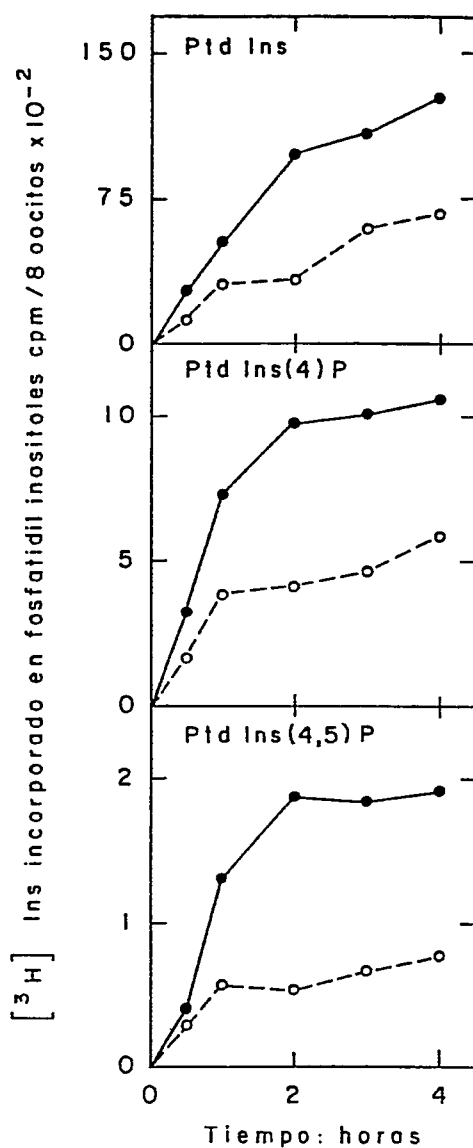


FIGURA 22. Incorporación de (^3H)mio-inositol en fosfatidilinositoles. Efecto de acetilcolina. Los oocitos etapa VI seleccionados y separados manualmente desde un ovario fueron microinyectados con 0,25 μCi de (^3H)mio-inositol. Posteriormente, grupos de oocitos se incubaron en ausencia (○) o en presencia de acetilcolina 10 μM (●). A los tiempos de incubación indicados en el gráfico, se tomaron 8 oocitos de cada grupo y se determinó la radiactividad incorporada en Ptd Ins, Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂ de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

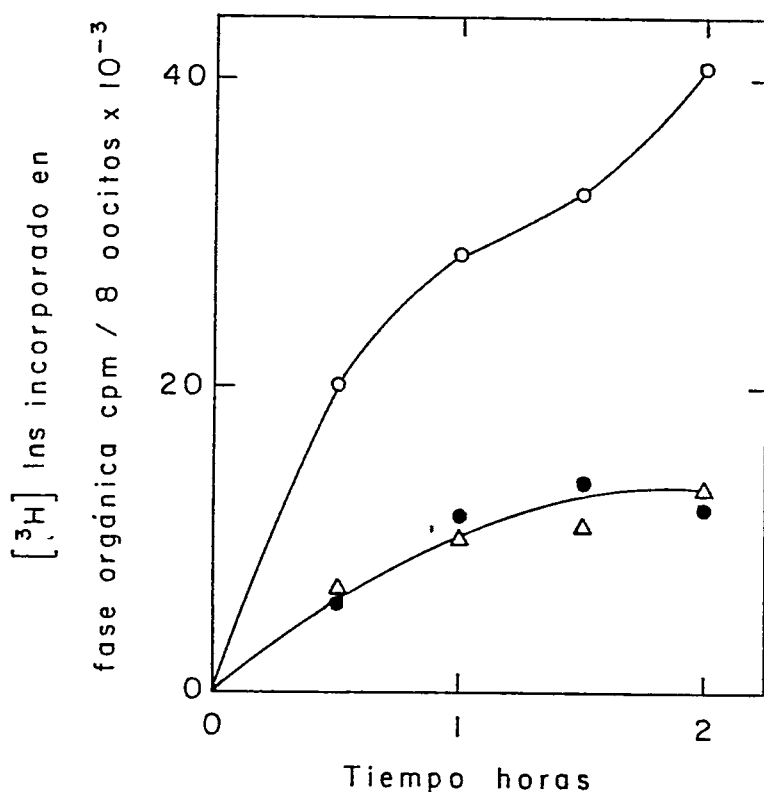


FIGURA 23. Incorporación de (³H)mio-inositol en fosfolípidos totales. Efecto de progesterona o acetilcolina a tiempos cortos de incubación. Oocitos etapa VI seleccionados y separados manualmente desde un ovario fueron microinyectados con 0,25 μ Ci de (³H)mio-inositol. Posteriormente se incubaron en ausencia (Δ) o en presencia de progesterona 10 μ M (●) o acetilcolina 10 μ M (○). A los tiempos de incubación indicados en el gráfico se tomaron grupos de 8 oocitos y se determinó la radiactividad incorporada en fase lipídica total de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

con respecto a los oocitos tratados con progesterona, estos últimos maduraron después de 6 hr de incubación. No se detectaron diferencias significativas entre los oocitos control y los tratados con progesterona antes de las 2 hr de iniciada la incubación.

2.3 Efecto de insulina

La insulina, que induce la maduración meiótica del oocito de Xenopus laevis aparentemente por vía diferente a la utilizada por la progesterona (ver Introducción), también aumenta la síntesis de fosfatidil inositol fosfatos. Como se observa en la Figura 21B, hay un incremento de alrededor de 2 veces en la incorporación de (³H)mio-inositol en Ptd Ins, Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ en oocitos madurados por acción de insulina. De manera análoga a lo descrito con la progesterona, este efecto es bloqueado si los oocitos son tratados simultáneamente con un inhibidor de la síntesis protéica.

3. Producción de inositol fosfatos en oocitos de Xenopus laevis. Efecto de progesterona y acetilcolina

Como complemento de los estudios del metabolismo de los fosfatidilinositoles se investigó la producción de inositol-fosfatos en oocitos microinyectados con (^3H)mio-inositol e incubados en presencia de progesterona o acetilcolina.

En la Figura 24 se muestra los niveles de inositol fosfatos después de 5 hr de incubar los oocitos en ausencia (A) o en presencia de progesterona (B). En presencia de la hormona se encontró un aumento del 103% en Ins (4)P , 73% en Ins (1,4)P_2 y un 65% en Ins (1,4,5)P_3 en relación al control no tratado con progesterona.

En oocitos tratados durante 2 hrs con acetilcolina, también se encontró un aumento de Ins fosfatos (Fig. 25R).

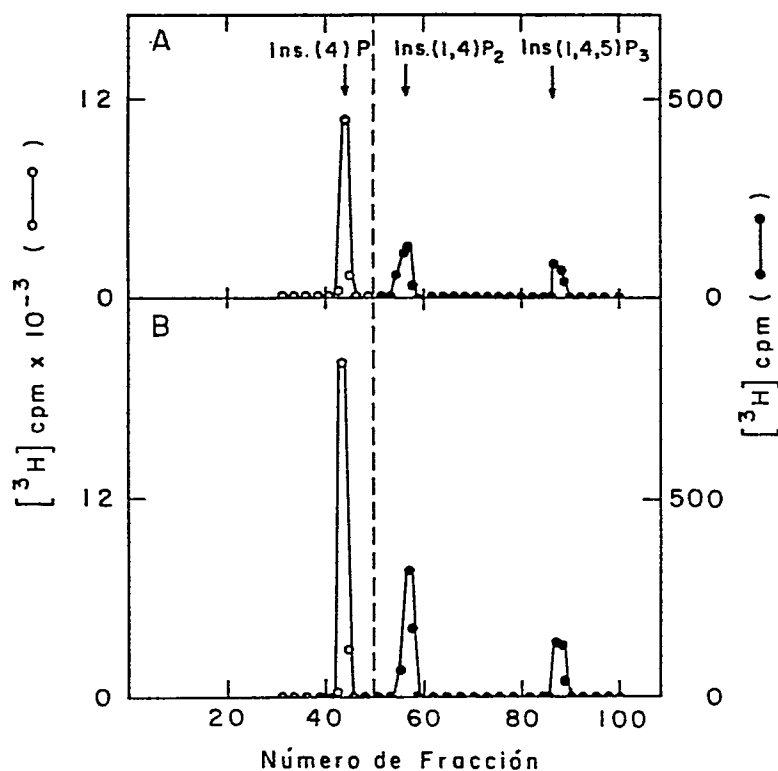


FIGURA 24. Efecto de progesterona en la producción de inositol fosfatos en oocitos de *Xenopus laevis*. Análisis por HPLC. Oocitos etapa VI seleccionados y separados manualmente desde un ovario fueron microinyectados 0,25 μ Ci de (3 H)mio-inositol. Posteriormente grupos de 16 oocitos se incubaron en ausencia (A) o en presencia de progesterona 10 μ M (B). Después de 5 hr, cuando un 50% de los oocitos tratados con la hormona habían madurado, se determinó la producción de (3 H)mio-inositol fosfatos utilizando una columna Partisil 10 SAX de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los valores determinados en los oocitos control fueron Ins (4)P (11400 cpm), Ins (1,4,)P₂ 350 cpm, Ins (1,4,5)P₃, 220 cpm.

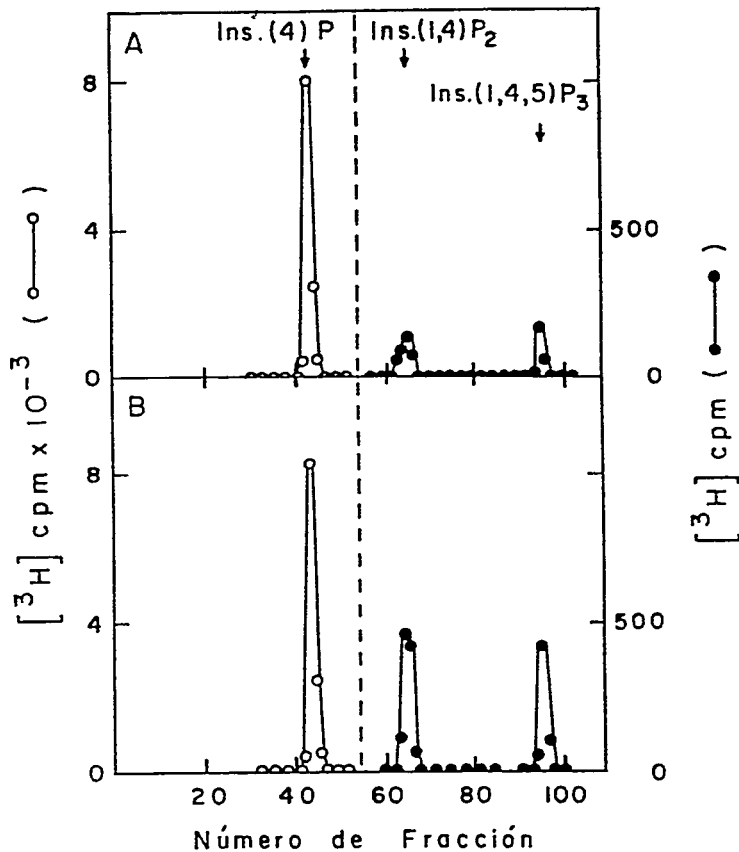


FIGURA 25. Producción de inositol fosfatos en oocitos de Xenopus laevis en presencia de acetilcolina. Análisis por HPLC. Oocitos etapa VI seleccionados y separados manualmente desde un ovario fueron microinyectados con 0,25 μCi de $(^3\text{H})\text{mio-inositol}$. Posteriormente, grupos de 16 oocitos se incubaron en ausencia (A) o en presencia de acetilcolina 10 μM . Después de 2 hr de incubación se determinó la producción de $(^3\text{H})\text{mio-inositol}$ utilizando una columna Partisil 10-SAX de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

DISCUSION

A. SINTESIS IN VITRO DE PTD INS(4)P_e USANDO MEMBRANAS DE OOCITOS DE Xenopus laevis.**1. Localización y actividad relativa de las fosfatidilinositol quinazas.**

En esta tesis se ha descrito la presencia de las enzimas Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa en membranas aisladas de oocitos de Xenopus laevis (Fig. 1). La enzima Ptd Ins quinasa es responsable de la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP al Ptd Ins para generar Ptd Ins(4)P y la enzima Ptd Ins 4-fosfato quinasa, a su vez, fosforila el Ptd Ins(4)P a Ptd Ins(4,5)P_e.

Los resultados presentados en esta Tesis constituyen la primera caracterización de las fosfatidilinositol quinazas en anfibios. En muchos aspectos la enzima de oocitos de Xenopus se parece a la descrita en mamíferos (O'Shea y col., 1986; Jergil y Sundler, 1983).

En la preparación de membranas se utilizó el procedimiento descrito por Jordana y col. (1982) que proporciona una fracción altamente enriquecida en membrana plasmática, de acuerdo al criterio morfológico y al contenido de la enzima adenilciclase utilizada como marcador. Esto nos hace suponer que las actividades enzimáticas descritas previamente, estarían asociadas a la membrana plasmática del oocito; sin embargo, no es posible descartar, de acuerdo a éstos resultados, la posibilidad que pertenezcan a una fracción microsomal contaminante. La enzima

Ptd Ins quinasa ha sido encontrada en otros tipos celulares en la membrana plasmática (Imai y col., 1985) pero también en el Aparato de Golgi, en los lisosomas y en membranas de túbulo transverso (Carrasco y col., 1988; Collins y Wells, 1983; Jergil y Sundler, 1983). La Ptd Ins 4-fosfato quinasa por su parte, ha sido descrita principalmente en membrana plasmática y en el citoplasma (Vogel y Hoppe, 1986; Lundberg y col., 1986), pero además, en otros sistemas membranosos (Quist y col., 1989; Carrasco y col., 1988).

La adición de un extracto citoplasmático cuando se incubaron membranas en presencia de (M_{32P})ATP no modificó significativamente la cantidad ni la relación de Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂ formados. Tampoco se observaron mayores diferencias cuando se utilizó membranas plasmáticas aisladas manualmente desde el oocito (datos no mostrados). Estos resultados nos hacen suponer, con cierto grado de seguridad, que las enzimas descritas previamente se encuentran realmente asociadas a la membrana plasmática del oocito.

De manera análoga a cómo ocurre en membranas plasmáticas de células A431 (Vogel y Hoppe, 1986), la incubación de membranas de oocito con (M_{32P})ATP resulta en la marcación mayoritaria de Ptd Ins(4)P. Muy poco Ptd Ins(4,5)P₂ radiactivo fue encontrado bajo las condiciones de ensayo utilizadas.

La presencia de una fosfolipasa C altamente activa que hidroliza preferencialmente Ptd Ins(4,5)P₂ en las membranas de oocitos y células A431, podría explicar estas diferencias. La fosfolipasa C ha sido encontrada asociada a la membrana plasmática en algunas células pero no en otras (Bennet y Crooke,

1987; Rebecchi y Rosen, 1987). También las diferencias observadas pueden ser atribuidas a la ausencia de la Ptd Ins 4-fosfato quinasa en las membranas de oocitos. Esta enzima ha sido encontrada en la fracción soluble de otras células (Imai y col., 1986).

Con el fin de poder descartar estas posibilidades se incubaron oocitos intactos con (32 P)fosfato (Fig. 16A). En estas condiciones, también el Ptd Ins (4,5)P₂ radiactivo se encontró en concentraciones muy bajas. Todo parece indicar que en el oocito de Xenopus la enzima Ptd Ins 4-fosfato quinasa es menos activa o se encuentra en menor cantidad que la Ptd Ins quinasa.

Gumbe y Lowenstein (1986) han descrito la fosforilación no enzimática de Ptd Ins y Ptd Ins(4)P en presencia de ATP, en una reacción catalizada por iones divalentes. Cuando las membranas de oocito fueron inactivadas por calentamiento a 100°C durante 5 min no hubo síntesis de éstos fosfolípidos (Fig. 1, Carril 2), lo que descartaría el papel de esta reacción no enzimática bajo nuestras condiciones.

Como un pre-requisito para estudiar el metabolismo de los fosfatidilinosítoles en oocitos intactos se ha estudiado los factores que controlan in vitro la actividad Ptd Ins quinasa, presente en la preparación de membranas.

Junto con la reacción de síntesis de Ptd Ins(4)P, se ha detectado también en membranas de oocito una actividad hidrolítica que da cuenta de la pérdida de marca desde el (32 P) Ptd Ins(4)P preformado (Fig. 3). Hasta el momento no se han examinado los productos de degradación y se desconoce por lo tanto, si la reacción ocurre por acción de una fosfomonoesterasa o

una fosfolipasa C. Sin embargo, la pérdida de Ptd Ins(4)P no puede ser atribuida a una reacción de deacilación por cuanto no se han identificado en las placas cromatográficas productos de reacción con un Rf correspondiente a un lisoderivado.

Se ha comprobado que la hidrólisis de Ptd Ins(4)P es consecuencia de la acción de fosfomonoesterasas en membrana plasmática de células de astrocitoma humano (Knowles y Lawrence, 1985), y en la envoltura nuclear de hepatocitos de rata (Smith y Wells, 1984).

Cualquiera sea la naturaleza de esta reacción en las membranas de oocito, es importante tener en cuenta su existencia al interpretar el efecto de determinados agentes sobre la síntesis de Ptd Ins(4)P. Sin embargo, las velocidades de incorporación de fosfato ^{32}P son mucho más rápidas que las de pérdida de la radiactividad incorporada al Ptd Ins(4)P y los ensayos de la Ptd Ins quinasa se realizan con incubaciones de 3 minutos. Esta condición reduce considerablemente la incidencia de la actividad hidrolítica en los estudios que miden la incorporación de (^{32}P).

2. Propiedades de la Ptd Ins quinasa

2.1 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad Ptd Ins quinasa

La actividad Ptd Ins quinasa es dependiente de la presencia

de ion Mg^{2+} o Mn^{2+} , siendo Mg^{2+} más eficiente (Fig. 5). De igual manera a lo observado en gránulos de células plasmáticas la enzima alcanza su máxima actividad a una concentración de 20 mM de Mg^{2+} . En el mismo sistema Mn^{2+} reemplaza completamente al Mg^{2+} y se alcanza una respuesta máxima a una concentración de 2 mM (Kurosawa y Parker, 1986). Concentraciones similares de Mg^{2+} para alcanzar un máximo de actividad son requeridos por la enzima presente en lisosoma de hígado de rata (Collins y Wells, 1983). La influencia de Mg^{2+} sobre la actividad Ptd Ins quinasa ha sido estudiada como un posible mecanismo de regulación en la enzima purificada desde útero de bovino (Porter y col., 1988). La enzima tiene un comportamiento alostérico por efecto de Mg^{2+} . Sin embargo, se desconoce el significado biológico de estas observaciones por cuanto la concentración del ión en la célula es relativamente estable.

A diferencia de lo que ocurre con Mg^{2+} el nivel de Ca^{2+} en el citoplasma aumenta en respuesta a una gran variedad de señales, en particular, en respuesta a agentes que alteran el metabolismo de los fosfolípidos de inositol (Introducción). La posibilidad de que Ca^{2+} pueda regular la actividad de las fosfatidilinositol quinasa ha sido estudiada por varios autores. Tooke y col. (1984) observaron un descenso de aproximadamente 20 veces en la actividad Ptd Ins quinasa en membrana plasmática de un tumor de células B, cuando la concentración de Ca^{2+} se aumentó desde 1 a 5 μM . La inhibición de esta enzima por concentraciones fisiológicas del catión ha sido observada también en otros sistemas (Collins y Wells, 1983; O'Shea y col., 1986; Kurosawa y Parker, 1986, Carrasco y col., 1988). Consistente con

estas observaciones se ha encontrado que la actividad Ptd Ins quinasa es estimulada por un antagonista de calmodulina (Toke y col., 1984). También otros autores han observado que la fosforilación de Ptd Ins (4)P es dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (Hayashi y Amarawa, 1985).

En nuestro trabajo con membranas de oocito se encontró que Ca^{2+} inhibe la enzima pero a concentraciones mucho más altas que las fisiológicas. Sin embargo, también se observó que EGTA estimula significativamente a esta quinasa. La estimulación observada en presencia de EGTA (Tabla I) puede deberse a la quelación de Ca^{2+} presente en la preparación de membranas. La posibilidad que Ca^{2+} pueda fisiológicamente regular esta quinasa, a través de la interacción con un tercer componente tal como calmodulina, proteína quinasa C o a través de una interacción directa con la enzima, debe ser estudiada con la enzima purificada y en condiciones que se pueda conocer la concentración real de Ca^{2+} en el medio de reacción.

Se ha estimado que la concentración intracelular de Mg^{2+} es de aproximadamente 0,37 mM (Corkey y col., 1986). Además, se sabe que en otros sistemas, altas concentraciones de este catión antagonizan la inhibición por Ca^{2+} de la Ptd Ins quinasa en otros sistemas (Forbes y col., 1988). Los estudios con la enzima de oocito se realizaron en presencia de 10 mM de Mg^{2+} ; por esta razón sería necesario evaluar el efecto de Ca^{2+} a menores concentraciones de Mg^{2+} .

2.2 K_m para ATP de la enzima Ptd Ins quinasa

La K_m aparente para ATP, determinada para la enzima de oocito (Fig. 6) ($50 \mu\text{M}$) no es muy diferente de la K_m aparente determinado para las enzimas encontradas en hepatocitos de rata y linfocitos T de ratón, las cuales son $90 \mu\text{M}$ y $140 \mu\text{M}$ respectivamente (O'Shea y col., 1986; Gergil y Sundler, 1983).

La formación de Ptd Ins(4)P no aumenta linealmente con la cantidad de proteína de membrana utilizada en la reacción de fosforilación (Fig. 2). Esto podría atribuirse a que alguno de los sustratos se hace limitante al transcurrir la reacción. De hecho, Hidalgo y col. (1983) han descrito la presencia de una actividad Mg-ATPasa en membranas de túbulo transverso de músculo esquelético de rana, la cual hidroliza el ATP presente en la solución. Con el objeto de mantener una concentración constante del sustrato ATP, estos autores han utilizado Tritón X-100; este último, inhibe la Mg-ATPasa (Hidalgo y col., comunicación personal), pero no la Ptd Ins quinasa (Collins y Wells, 1983). Aún cuando los ensayos para la actividad Ptd Ins quinasa de oocito se realizaron en ausencia de un sistema regenerador de ATP, o de Tritón X-100, se utilizaron concentraciones altas de ATP de $100 \mu\text{M}$. Bajo estas condiciones y con $50 \mu\text{g}$ de proteína de membrana en el medio de incubación la reacción de fosforilación es lineal hasta los 5 min de incubación (Fig. 3). El ensayo estandar usa sólo 3 minutos de incubación.

Bajo las condiciones de ensayo utilizadas para la enzima de oocito se encontró que el GTP no es utilizado como sustrato dador de fosfato; aunque sí es un inhibidor competitivo del ATP. Esta

característica es diferente de la enzima de linfocito T de ratón (O'Shea y col., 1986) que sí puede utilizar GTP como dador de fosfato.

2.3 Efecto de fosfolípidos sobre la actividad Ptd Ins quinasa

Aunque se desconocen los factores que controlan in vivo la actividad Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa, se dispone de alguna información respecto de la regulación in vitro por fosfatidilinositoles polifosfatos. Mac Donald y col. (1985) han observado que la actividad Ptd Ins quinasa ensayada en presencia de detergentes en una fracción membranosa de células transformadas, es inhibida por Ptd Ins(4)P. También se ha observado que la enzima Ptd Ins 4-fosfato quinasa obtenida de un sobrenadante de células de retina de bovino y ensayada con sustrato exógeno, es inhibida por Ptd Ins(4,5)P₂ (Van Rooijen y col., 1985).

Estos resultados han sugerido la posibilidad de que in vivo estas enzimas sean inhibidas por su respectivos productos. Esta hipótesis es atractiva, porque es consistente con la idea de que un aumento en la fosforilación de Ptd Ins a Ptd Ins(4)P y a Ptd Ins(4,5)P₂ en la célula intacta puede ser consecuencia de la remoción de la inhibición por producto de las quinasas en la medida que el Ptd Ins (4,5)P₂ es hidrolizado por la fosfolipasa C.

Contrariamente a lo descrito previamente, Imai y col. (1986) utilizando membranas plasmáticas de células GH₃ encontraron que tanto la actividad Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa

son estimuladas por Ptd Ins(4,5)P₂. El experimento se realizó utilizando los sustratos lipídicos endógenos presentes en la preparación de membranas y en ausencia de detergentes.

Los estudios presentados en esta Tesis están más de acuerdo con estos últimos autores pues también muestran que la actividad Ptd Ins quinasa es estimulada por la adición de Ptd Ins(4,5)P₂ al medio de reacción (Fig. 7). Sin embargo, a diferencia de lo observado por Imai y col. el efecto de este fosfolípido es menos específico por cuanto Ptd Ser y Ptd Ins(4)P también estimulan significativamente la reacción de fosforilación.

El significado fisiológico de que Ptd Ins(4,5)P₂ y Ptd Ins(4)P estimulen la actividad de la enzima dentro de la membrana plasmática es poco claro. Nuestros resultados y los de Imai y col. (1986), sugieren que en la medida que los niveles de Ptd Ins(4,5)P₂ disminuyen, las actividades Ptd Ins quinasa in vivo deben decrecer en vez de aumentar. Este efecto de inhibir la resíntesis de Ptd Ins(4,5)P₂ podría ser un mecanismo para limitar la generación de Ins(1,4,5)P₃ durante exposición prolongada de la célula a un agente que actúa a través de la hidrólisis de Ptd Ins(4,5)P₂, lo que llevaría a una "desensibilización" del sistema.

Sin embargo, la interpretación de éstos resultados y la comparación del efecto de fosfolípidos sobre la actividad de estas enzimas es complicado y debe realizarse con precaución, puesto que se han utilizado diferentes métodos y condiciones experimentales. En particular, el uso de distintos detergentes en algunas de las incubaciones puede alterar profundamente los resultados obtenidos con fosfolípidos exógenos.

Por otro lado, no puede descartarse la posibilidad que el

efecto observado pueda ser consecuencia de una alteración en la composición fosfolipídica de la membrana y reflejo de variaciones en la fluidez de la membrana (Yeagle, 1989) y no a un efecto directo del fosfolípido sobre la quinasa. En tal sentido es importante señalar que Shutz y col. (1982) han observado que Ptd Ins(4,5)P₂ aumenta la movilidad lateral de proteínas de membrana en eritrocitos.

De manera análoga a como ocurre con la Ptd Ins quinasa, en otros sistemas, la enzima de oocito utiliza como sustrato el Ptd Ins endógeno presente en la preparación de membranas. Al agregar Ptd Ins exógeno, se observó una estimulación considerable de la actividad de la quinasa (Fig. 4). La interpretación de estos resultados es ambigua. Podría ocurrir que la enzima utiliza el Ptd Ins exógeno como sustrato receptor de fosfato o podría ser que este lípido, al igual que los derivados más fosforilados también estimule la actividad enzimática. Para dilucidar estas alternativas se podría usar Ptd Ins tritiado y tratar de ver su conversión a Ptd Ins(4)P o alternativamente, las membranas deberían ser tratadas con la enzima fosfolipasa C previo a la reacción de fosforilación. Este procedimiento removería específicamente el grupo inositol de los fosfolípidos endógenos y ha sido utilizado con este propósito con membranas de Golgi en hepatocitos de rata (Gergil y Sundler, 1983).

2.4 Posible regulación por proteínas G de la enzima Ptd Ins quinasa

Los mecanismos que regulan la síntesis de fosfatidil

inositol polifosfatos no han sido hasta la fecha definidos adecuadamente. La posibilidad que la actividad Ptd Ins quinasa pueda ser controlada por proteínas G fue examinada en membranas de oocitos, pero los resultados fueron negativos. (Tabla I). Recientemente se ha informado que GTP- γ -S aumenta la actividad Ptd Ins 4-fosfato quinasa en membranas de placenta humana (Urumow y Wieland, 1986) y en membranas de cerebro de rata (Smith y Chang, 1989). También se ha encontrado que el factor de crecimiento epidermal induce un aumento en la actividad Ptd Ins quinasa en células A431 (Pike y Eakes, 1987) presumiblemente a través de una proteína G. Resultados similares sobre esta quinasa se han observado en hepatocitos por acción de glucagón (Whipps y col., 1987).

La falta de efecto de GTP- γ -S en la síntesis de Ptd Ins(4)P en nuestros experimentos con membranas de oocitos sugiere que una proteína G no estaría involucrada directamente en la activación de la Ptd Ins quinasa en estas células. Esta sugerencia resulta fortalecida por el hecho que GTP- γ -S sí activa la adenililciclase de esa misma preparación de membranas de oocito que contiene varias proteínas G (Olate y col., 1984).

2.5 Efecto de poliaminas sobre la actividad Ptd Ins quinasa

Las poliaminas espermina, espermidina y putrescina se encuentran ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos y se cree que juegan un papel regulatorio muy importante en varios aspectos del metabolismo y proliferación celular (Tabor y Tabor,

1984). Las poliaminas también han sido involucradas en el proceso de maduración meiótica del oocito de Xenopus laevis (Sunkara y col., 1981).

Vogel y Hoppe (1986) encontraron un efecto estimulatorio de poliaminas incluyendo polilisisina y poliarginina sobre la fosforilación de Ptd Ins en membranas de células A431. También encontraron un efecto similar con histona H₁ la cual posee secuencias ricas en polilisisinas.

Resultados similares se han observado con la actividad Ptd Ins 4-fosfato quinasa de cerebro de rata en presencia de espermina y espermidina (Lundberg y col., 1986).

Recientemente se ha observado que poliaminas y un polipéptido sintético correspondiente a los 14 aminoácidos del extremo carboxílico del producto del protooncogen C-Ki-ras 2 tiene la capacidad de estimular la actividad Ptd Ins quinasa en membranas de oocitos de X. laevis (Gatica y col., 1987; Carrasco y col., 1988).

Los resultados presentados en esta Tesis confirman y extienden las observaciones previas del efecto estimulatorio de poliaminas sobre la actividad de la Ptd Ins quinasa presente en membranas de oocitos (Fig. 8) y sugieren que la sensibilidad de las Ptd Ins quinasas a poliaminas podría ser una característica común de estas enzimas.

Los resultados incluyen una importante observación que muestran que la estimulación por polilisisina de la fosforilación de Ptd Ins no es debida a la inhibición de la reacción hidrolítica que es responsable por la pérdida de radiactividad del (³²P) Ptd Ins(4)P formado. En efecto, el análisis

estadístico indica que polilisina no altera la velocidad de pérdida de radiactividad (Fig. 14), un hallazgo que sugiere que la enzima responsable de la reacción hidrolítica, presente en la membrana del oocito, no es afectada por poliaminas. Es especialmente importante notar que el 200% de aumento en la reacción de fosforilación, llevada a cabo en presencia del polímero, no puede ser explicado en base a la regeneración de sustrato adicional para la quinasa.

Los resultados del efecto de polilisina y poliornitina sobre la velocidad de la reacción de fosforilación a diferentes concentraciones de ATP (Fig. 9), sugieren que el efecto de estas poliaminas no es debido a un cambio en la afinidad relativa de la enzima por su sustrato sino más bien debido al aumento en la eficiencia del proceso catalítico.

Puesto que estos experimentos han sido realizados con una preparación de membranas, es imposible llegar a conclusiones definitivas acerca de la naturaleza molecular del mecanismo por el cual las poliaminas pueden afectar la actividad de la Ptd Ins quinasa. El hallazgo que poliarginina no tenga un efecto similar, sin embargo, indica que la carga de poliaminación no es el único factor responsable de su efecto.

La estimulación causada por poliamina puede estar relacionada a un efecto de poliaminación sobre la estructura de la membrana o puede ser debida a un efecto sobre la estructura de la enzima. La capacidad de polilisina para romper membranas celulares ha sido bien documentada desde los trabajos originales de Quinton y Philpott (1973). Recientemente, poliornitina ha sido usada para permeabilizar membranas y transformar células

animales con DNA foráneo (Bond y Wold, 1987).

En relación a la posibilidad que poliaminas afecten la estructura de la enzima y por ende su actividad, se ha descrito que polilisisina estimula la actividad de varias enzimas de membrana. Gatica y col. (1987), han observado que polilisisina estimula la actividad de la adenililciclase presente en membranas de oocitos de Xenopus. Más recientemente se ha visto que polilisisina también estimula la actividad tirosina-quinasa del receptor de insulina; probablemente, a través de la interacción entre la poliamina cargada positivamente y una región acídica altamente conservada en receptores con actividad tirosina-quinasa (Morrison y col., 1989).

También se ha observado que polilisisina actúa sobre la caseína quinasa II aislada desde una fracción soluble de corazón de bovino, aumentando varias veces su actividad (Mamrack, 1989).

Es interesante señalar que Mastoporan, la toxina peptídica del veneno de avispa es capaz de activar directamente una proteína G. Se ha demostrado que Mastoporan posee una estructura α -hélice anfifílica, semejante al segmento citoplasmático del receptor β adrenérgico a través del cual el receptor interactúa con la proteína G (Higashijima y col., 1988).

Se ha especulado que polilisisina podría estar imitando el papel de una molécula efectora de importancia fisiológica al tener un dominio o segmento estructural común. Si se intenta dar una interpretación fisiológica al efecto de poliaminas sobre la actividad Ptd Ins quinasa y su relación con el proceso de maduración meiótica, debe tenerse en cuenta que la inducción de la enzima ornitina descarboxilasa, responsable de la síntesis de

poliaminas, ocurre alrededor de 4 hr después de exponer el oocito a progesterona (Sunkara y col., 1981).

2.6 Efecto de neomicina sobre la actividad Ptd Ins quinasa

La neomicina es un antibiótico aminoglicosídico que inhibe el metabolismo de los fosfolípidos de inositol en una gran variedad de tejidos (Downes y Michell, 1981; Marche y col., 1983) y que une directamente a Ptd Ins polifosfatos (Williams y Schacht, 1986). A bajas concentraciones la neomicina se une selectivamente a Ptd Ins(4,5)P₂ inhibiendo la fosfolipasa C y la liberación de Ins(1,4,5)P₃ (Carney y col., 1985).

Los resultados presentados en la Fig. 10 confirman observaciones previas sobre la inhibición de la fosforilación de Ptd Ins, a concentraciones de neomicina superiores a 0,5 mM, en fibroblastos tratados con el antibiótico (Carney y col., 1985).

La inhibición de la quinasa por neomicina es probablemente consecuencia de la interacción de Ptd Ins con altas concentraciones de la droga (Williams y Schacht, 1986), lo cual disminuye la disponibilidad del sustrato; sin embargo, no puede descartarse un efecto directo de la droga sobre la enzima (posiblemente debido a una analogía estructural entre el antibiótico y la cabeza del fosfolípido).

El efecto estimulatorio a bajas concentraciones del antibiótico sobre las Ptd Ins quinasa no ha sido observado previamente y puede ser consecuencia de la acción de dos procesos, un aumento en la actividad Ptd Ins quinasa o una

disminución en la hidrólisis del Ptd Ins(4)P preformado.

Se ha demostrado en otros sistemas que la hidrólisis de Ptd Ins(4)P, catalizada por una fosfomonoesterasa, es inhibida por bajas concentraciones de neomicina (Schacht, 1976; Smith y Wells, 1984), posiblemente debido también a una interacción entre el antibiótico y el sustrato fosfolipídico.

Resulta particularmente interesante señalar en relación al efecto de neomicina y el metabolismo de los fosfoinosítidos en el oocito de Xenopus, que la microinyección del antibiótico en estas células inhibe la respuesta electrofisiológica a agentes muscarínicos (Kaneko y col., 1987) y la maduración meiótica del oocito (Stith y Maller, 1987).

2.7 Efecto de 2,3-bisfosfoglicerato sobre la actividad Ptd Ins quinasa

Un hallazgo interesante es el efecto inhibitorio de 2,3-bisfosfoglicerato sobre la Ptd Ins quinasa en membranas de oocito (Fig. 11). Este hallazgo es especialmente interesante porque 2,3-bisfosfoglicerato es un intermediario metabólico que alcanza concentraciones superiores a 3 mM en algunas células como los eritrocitos (Bunn y col., 1974). Se ha encontrado que este compuesto es un potente inhibidor de proteínas quinasas y caseína quinasa II (Hathaway y Traugh, 1984). Más relevante, sin embargo, es el hecho que 2,3-bisfosfoglicerato inhibe la enzima 5-fosfomonoesterasa que hidroliza $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ a $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ (Downes y col., 1982; Rana y col., 1986). Este hallazgo ha inducido a varios investigadores a incluir 2,3-bisfosfoglicerato

(2 mM) en la mezcla de incubación usada para estudiar la liberación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ después de tratar la preparación de membranas con agentes que promueven la liberación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

Los resultados de la Fig. 11 demuestran que además de inhibir la hidrólisis de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, la actividad Ptd Ins quinasa puede ser también afectada por la presencia de 2,3-bisfosfoglicerato. Además, este efecto en la síntesis de Ptd $\text{Ins}(4)\text{P}$ no puede atribuirse a un aumento en la hidrólisis del Ptd $\text{Ins}(4)\text{P}$ preformado (Fig. 13). Nuestro resultado, por lo tanto, indica que la utilización de este compuesto para el estudio de la fosfolipasa C podría llevar a conclusiones erradas, pues a las concentraciones que se utiliza estaría también inhibiendo casi totalmente a la Ptd Ins quinasa.

3. Efecto de acetilcolina, progesterona e insulina en la síntesis de Ptd $\text{Ins}(4)\text{P}$ y Ptd $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$.

Estudios realizados in vivo con oocitos de Xenopus intactos, han demostrado que acetilcolina estimula una fosfolipasa C y la producción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Oron y col., 1985; Moriarty y col., 1988).

Sin embargo, se desconoce el efecto del neurotransmisor sobre la síntesis de fosfatidilinositol polifosfatos tanto in vivo como en una preparación de membranas de oocito. Puesto que la síntesis de Ptd $\text{Ins}(4)\text{P}$ y Ptd $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ en membranas de

ocitos es rápida, es posible que las enzimas Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa sean importantes en la regulación del metabolismo de los fosfatidilinositol polifosfatos. Estas actividades determinan la concentración de Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂ en la membrana y podrían indirectamente modular la velocidad de hidrólisis al controlar el aporte de sustrato a fosfolipasa C.

Al estudiar el efecto de acetilcolina sobre la síntesis de Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂ en membranas aisladas de oocito, no se observó un efecto significativo en la síntesis de ambos fosfolípidos respecto al control no tratado con la hormona (Fig. 12). Dunlop y Malaisse (1985) han observado una pérdida importante de Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂ premarcados en membranas de célula pancreática de rata por acción de carhamilcolina. Como se ha descrito en la Introducción, está claramente demostrado que la acetilcolina actuaría en el oocito in vivo mediante la activación de la fosfolipasa C que liberaría Ins (1,4,5)P₃. Este causaría un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular, lo que finalmente abriría canales de Cl⁻. Este hecho se contrapone, de cierta manera, con nuestros datos experimentales en los que no se detecta un efecto de la acetilcolina sobre las fosforilaciones de fosfatidilinositol fosfato y fosfatidilinositol 4-fosfato.

Este resultado negativo obtenido in vitro podría explicarse de diversas maneras:

- El efecto del neurotransmisor podría estar enmascarado, por cuanto, simultáneamente con un aumento en la síntesis de Ptd inositolpolifosfatos puede haber un aumento en la conversión de

Ptd Ins(4)P a Ptd Ins(4,5)P₂ el que estaría siendo hidrolizado por la fosfolipasa C.

- Por otro lado, es posible que la cadena de reacciones para la síntesis de Ptd Ins(4,5)P₂, a partir de Ptd Ins, esté interrumpida por la virtual ausencia de la enzima Ptd Ins-4 fosfato quinasa en nuestra preparación de membranas. Además, esta enzima podría estar inactiva bajo las condiciones de ensayo utilizadas.

- Por último, la fosfolipasa C puede estar ausente en la preparación de membranas, o las condiciones de ensayo no fueron las apropiadas para su actividad.

Resultaría interesante, por lo tanto, en futuros experimentos poder evaluar el efecto de acetilcolina en membranas de oocitos preincubados con (γ -³²P)ATP, a fin de comprobar si el neurotransmisor induce la pérdida de Ptd Ins (4)P y Ptd Ins (4,5)P₂ premarcados y la aparición de inositol fosfatos en la fase acuosa.

A pesar de que no se ha demostrado en otros sistemas un efecto de progesterona en la síntesis y degradación de fosfatidilinositol polifosfatos, los estudios de Stith y Maller (1987) sugieren la participación de estos fosfolípidos en la maduración meiótica de oocitos de Xenopus incubados con progesterona. Nuestros estudios realizados con membranas de oocitos muestran que progesterona no tiene un efecto directo en la síntesis de fosfatidil inositol polifosfatos (Fig. 12) ni en la hidrólisis de Ptd Ins(4)P (Fig. 15). Estos resultados indicarían que los fosfatidilinositol polifosfatos no serían parte del sistema transductor de la señal generada por la unión

de progesterona a su receptor. Sin embargo, no es posible descartar que estén involucrados en alguna de las etapas inducidas secundariamente por la hormona durante la maduración.

En diversas células se ha estudiado también un posible efecto de insulina sobre el recambio de fosfoinosítidos encontrándose un aumento de la síntesis de novo de Ptd Ins, Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂ (Pennington y Martin, 1985; Farese y col., 1982; pero no en otras (Sakai y Wells, 1986; Taylor y col., 1985). Además, se ha encontrado que el receptor de insulina que es una proteína tirosina quinasa está asociado con una actividad Ptd Ins quinasa (Machicao y Weiland, 1984; Sale y col., 1986).

Cuando se estudió el posible efecto de insulina en membranas de oocito no se encontró un aumento en la síntesis de Ptd Ins(4)P ni Ptd Ins(4,5)P₂ (Fig. 12). Estos resultados coinciden con lo observado en membranas plasmáticas de hígado de rata (Taylor y col., 1985).

4. Posible activación de las fosfatidilinositol quinasas durante la maduración meiótica del oocito de Xenopus laevis.

Se ha observado que el producto de algunos oncogenes con actividad tirosina quinasa y factores de crecimiento estimulan la síntesis de fosfatidilinositol polifosfatos, ya sea porque presentan actividad Ptd Ins quinasa o porque controlan estas quinasas celulares. Esto sugiere la idea que las Ptd Ins quinasas juegan un papel en el control del desarrollo y

proliferación celular (Whitman y col., 1986).

La división meiótica del oocito de X. laevis es una etapa fundamental en el desarrollo del anfibio y constituye un modelo apropiado para medir cambios cuantitativos en la actividad de las quinasas responsables de la síntesis de fosfatidil inositol polifosfatos, en dos etapas diferentes del desarrollo.

Los resultados de la Fig. 16 muestran que hay un notorio aumento en la formación de Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂ en membranas de oocitos maduros respecto a lo observado en membranas de oocitos no maduros. Estos cambios pueden ser interpretados como consecuencia de un aumento en la cantidad o actividad de las enzimas Ptd Ins quinasa y Ptd Ins 4-fosfato quinasa en el oocito maduro. Se ha comprobado un aumento en la síntesis proteica que es regulada post-transcripcionalmente 2-3 hr después de iniciada la maduración meiótica del oocito por progesterona (Bravo y col., 1978; Wasserman y col., 1982). Es posible suponer que en esta etapa se produce un aumento en la síntesis de las Ptd Ins quinasas o se sintetiza un activador responsable del aumento en la formación de Ptd Ins(4) y Ptd Ins(4,5)P₂. El hecho que progesterona no tenga efecto directo sobre las membranas (Fig. 12) favorece la hipótesis que durante la maduración del oocito se produce un cambio que afecta la actividad de las quinasas.

Los cambios en la actividad Ptd Ins 4-fosfato quinasa no son debidos probablemente a un aumento en la concentración del sustrato, ya que se ha demostrado que los niveles de Ptd Ins(4)P no cambian durante la maduración del oocito (Le Peuch y col., 1985). Esto no puede ser aseverado para la actividad Ptd Ins quinasa, por cuanto se desconoce si los niveles de Ptd Ins

aumentan durante la maduración.

Varela y col. (1987) también han detectado profundos cambios en la actividad de Ptd Ins quinasa durante las distintas etapas del desarrollo en Dictyostelium discoideum.

R. INCORPORACION DE (^3H)MIO-INOSITOL EN FOSFATIDILINOSITOL FOSFATO IN VIVO USANDO OOCITOS DE Xenopus laevis

1. Microinyección e incorporación de (^3H)mio-inositol en Ptd Ins, Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂

Los estudios de microinyección han permitido evaluar la acción de algunos agentes sobre la incorporación de (^3H)mio-inositol en fosfatidilinositol fosfatos en oocitos intactos.

Análogamente a lo observado previamente con membranas aisladas, la incorporación de la marca en condiciones de equilibrio isotópico es mayor en Ptd Ins(4)P que en Ptd Ins(4,5)P₂ (Fig. 17B). Estos resultados no concuerdan con las observaciones de Lacal y col. (1987) quienes utilizando el mismo procedimiento para la síntesis y extracción de los fosfolípidos encontraron una relación opuesta. Hasta el momento no hay explicación para estas discrepancias, ya que incluso en oocitos incubados con (^3P) fosfato hemos encontrado que hay mayor incorporación de la marca en Ptd Ins(4)P que en Ptd Ins (4,5)P₂ (Fig. 17A).

La incorporación de (^3H)mio-inositol en Ptd Ins puede ser consecuencia de 2 reacciones enzimáticas. La enzima Ptd Ins sintetasa cataliza una de las reacciones, utiliza CDP-diacilglicerol e inositol como sustratos; esta enzima ha sido encontrada en el retículo endoplásmico y en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares (Imai y Gershergorn, 1985; Takenawa y col. 1977). La otra reacción enzimática no conduce a la síntesis neta de Ptd Ins; esta segunda reacción ocurre en ausencia de CDP-diacilglicerol y es responsable del intercambio de inositol en Ptd Ins (Takenawa y col., 1977; Bleasdalh y Wallis, 1981). Cuando membranas de oocitos fueron incubadas con (^3H)mio-inositol y posteriormente se agregó un exceso de mio-inositol no radiactivo, los niveles de radiactividad del Ptd Ins no fueron afectados durante la incubación con el compuesto no radiactivo (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la incorporación de (^3H)mio-inositol en Ptd Ins no es debida al intercambio de inositol y que la enzima de recambio no estaría en forma activa en las membranas de oocitos.

Aún cuando la incubación de oocitos de Xenopus con (^3H)mio-inositol ha sido utilizado rutinariamente para la marcación de los fosfoinositidos, no se ha estudiado la captación de mio-inositol en estas células (Nomura y col., 1987; Oron y col., 1985). Los resultados de la Fig. 18 indican que la captación de (^3H)mio-inositol al interior de la célula es una etapa limitante para la síntesis de fosfoinositidos en oocitos incubados con el precursor.

Prepie y col. (1982) han comprobado que la captación de mio-

inositol en hepatocitos de rata es un proceso pasivo y ocurre a través de un sistema transportador específico. La K_m aparente para mio-inositol de este transportador es de aproximadamente 0,4 mM. También se ha comprobado en estas células que el transporte de mio-inositol es alterado significativamente por una serie de agentes entre los que destacan epinefrina, angiotensina y glucagon.

A fin de evitar posibles diferencias en la incorporación de (3H)mio-inositol en fosfoinosítidos, como consecuencia de un efecto de progesterona o acetilcolina en el transporte del precursor radiactivo, este último fue introducido al interior del oocito mediante microinyección. Una reducción en la captación de glucosa, durante la maduración del oocito, por efecto de progesterona ha sido demostrado previamente (Carvallo y col., 1981).

Nuestros resultados dejan en evidencia algunas de las ventajas de la microinyección de un intermediario relativamente impermeable a la célula. La inyección de (3H)mio-inositol evita el proceso de transporte a través de la membrana plasmática, el que puede ser alterado por una gran variedad de factores. Se alcanzan fácilmente concentraciones apropiadas del precursor en el interior de la célula, lo que permite además, utilizar un número reducido de células. Con práctica y una manipulación cuidadosa, la reproducibilidad de los experimentos es extraordinariamente buena.

En general, la microinyección de oocitos de anfibio ha sido utilizada ampliamente para el estudio del metabolismo intermediario (Ureta y Radojkovic, 1979), los factores que

controlan la expresión génica (Gurdon y Milton, 1981) y la migración intracelular de proteínas nucleares (De Robertis y col., 1978).

Además, el hecho que el oocito de Xenopus rápidamente sintetice proteínas funcionales cuando son microinyectados con mRNA foráneos, ha permitido estudiar algunos canales iónicos (Dascal y col., 1987), el mecanismo de acción de hormonas y neurotransmisores (Snutch 1988) y el control del ciclo celular (Featherstone, 1989).

Alguna de las desventajas de la microinyección de oocitos como método de estudio proviene de las observaciones realizadas en oocitos de Rana pipiens por Miller y col. (1984). Estos autores encontraron que después de la microinyección de los oocitos, en un medio acuoso, hay pérdida del material microinyectado y cambios en la distribución de solutos intracelulares, lo cual podría ser deletereo para el metabolismo de la célula. Sin embargo, los autores encontraron que la pérdida de material podría ser controlada si los oocitos son incubados en aceite de parafina.

En nuestros experimentos los oocitos microinyectados con (^3H)mio-inositol se incubaron en ausencia de aceite de parafina, por cuanto comprobamos que bajo nuestras condiciones experimentales, no había pérdida del material radiactivo, incluso después de varias horas de incubación.

La reproducibilidad de los experimentos fue muy buena y los oocitos en que se detectaba pérdida de vitelo eran descartados.

Es posible también que mediante la técnica de microinyección el compuesto no sea introducido en el compartimiento apropiado.

Se sabe que los compuestos son almacenados y participan en determinados compartimientos metabólicos (Ureta y Radojkovic, 1979).

Es importante destacar, como una futura proyección de los resultados de esta tesis y en relación a la microinyección de mRNA, el coinyectar (^3H)mio-inositol y el mRNA de la sub-unidad α de una proteína G_0 de oocitos de Xenopus y poder evaluar la participación de esta proteína en el sistema de la fosfolipasa C. El gen de la subunidad α de la proteína G_0 de oocitos ha sido recientemente clonado por Olate y col. (1989).

2. Posible interconexión o diálogo entre las vías de transducción de señales utilizadas por la progesterona y acetilcolina en el oocito de Xenopus laevis

Uno de los aspectos más interesantes de esta Tesis resulta del análisis comparativo del efecto de progesterona, insulina y acetilcolina en la incorporación de (^3H)mio-inositol en fosfatidilinositoles en oocitos intactos.

El aumento en la incorporación de (^3H)mio-inositol en fosfatidilinositoles aparece después de 3 hr de iniciada la exposición del oocito con progesterona (Fig. 19), alcanza un máximo que coincide con la ruptura de la membrana nuclear (Fig. 20) y es bloqueado si se utilizan inhibidores de la síntesis proteica (Fig. 21 A). Estos resultados indican que el efecto de la progesterona es consecuencia probablemente de la síntesis de un factor proteico. Se ha señalado previamente que

aproximadamente 2 a 3 hr después de tratar los oocitos con la hormona, se produce un aumento en la síntesis proteica que precede a la aparición de la actividad MPF y a la fosforilación de proteínas específicas del oocito (Cicirelli y col., 1988; Wasserman y col., 1982).

El efecto de progesterona sobre la incorporación de (^3H)mio-inositol en fosfatidilinositoles se acompaña de un aumento en la hidrólisis de $\text{Ptd Ins}(4,5)\text{P}_2$ como lo demuestra la mayor producción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$ e $\text{Ins}(4)$ en oocitos tratados con la hormona (Fig. 24B).

Estos resultados considerados en conjunto, demuestran que durante la maduración meiótica del oocito de Xenopus, inducido por progesterona, se produce un aumento en el metabolismo de los fosfolípidos de inositol. Además, sugieren que la hidrólisis de $\text{Ptd Ins}(4,5)\text{P}_2$ y la producción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ o diacilglicerol es una etapa necesaria para la maduración.

A diferencia de lo observado con progesterona, la acetilcolina tiene un efecto rápido en la incorporación de (^3H)mio-inositol a fosfatidilinositol fosfatos y alcanza un máximo antes de las 2 hrs de iniciada la incubación de los oocitos con el neurotransmisor (Fig. 22, Fig. 23). Además el incremento causado por acetilcolina no depende de la síntesis de proteínas (Tabla II).

El mecanismo de acción de acetilcolina en el oocito de Xenopus ha sido estudiado previamente y se ha comprobado que ocurre por la unión del neurotransmisor a un receptor de superficie y la activación de la fosfolipasa C a través de una proteína G, que es sensible a la toxina de B. pertussis (Moriarty

y col., 1988). Los resultados obtenidos por Oron y col. (1985) y los mostrados en la Fig. 25B indican que el neurotransmisor induce en el oocito, al igual que progesterona, un aumento en el recambio de los fosfoinosítidos y en la producción de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

Maller y col. (1984) observaron que la maduración meiótica del oocito de Xenopus inducida por progesterona, es acelerada, si los oocitos son tratados simultáneamente con acetilcolina. También se ha comprobado que la microinyección de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ acelera este proceso (Stith y Maller, 1987).

Estas observaciones y nuestros resultados, aunque no lo prueban, pueden ser explicados si se postula la existencia de una vía de interconexión o diálogo entre las vías de transducción de señales utilizadas por progesterona y acetilcolina (Esquema IV).

1. Acetilcolina por sí sola no promueve la maduración del oocito; sin embargo, la maduración por progesterona es acelerada por acetilcolina y por $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ que es un 2º mensajero de la vía de transducción de señales de acetilcolina. Este hecho nos sugiere que si bien acetilcolina no es responsable de la maduración, la vía de formación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y DAG inducida por el neurotransmisor es importante para la maduración.

La acetilcolina aceleraría la maduración al estimular la formación de $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ y DAG, mediante la activación de la fosfolipasa C. Ambos segundos mensajeros son activadores de la proteína quinasa C ($\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_2$) mediante la liberación de Ca^{2+} intracelular. La proteína quinasa C a su vez, participaría en la fosforilación de alguna de las proteínas requeridas durante la

maduración por progesterona, estableciéndose así un diálogo entre ambas vías de transducción.

A este respecto, existen en la literatura antecedentes de diálogo entre distintos sistemas de transducción de señales en diversos sistemas, oocitos (Otte y col., 1989), células de pituitaria (Carvallo y Aguilera, 1990), células de Leydig (Ulisse y col., 1989). En estos sistemas la vía de transducción de señales dependiente de adenililciclase es estimulada por activadores de la proteína quinasa C, como TPA y análogos de DAG. Estos autores sugieren un diálogo entre dos sistemas efectores, uno acoplado a adenililciclase, AMPc y proteína quinasa A y el otro, acoplado a la vía de Ins (1,4,5)P₃, DAG y proteína quinasa C. También se ha discutido la posibilidad de diálogo en oocitos, entre las vías de transducción de señales dependientes de proteína G, una sensible a la acción de la toxina de B. pertussis y otra no sensible (Moriarty y col., 1989).

Algunos autores han observado la fosforilación por la proteína quinasa C de la sub-unidad α de una proteína G_i (Katada y col., 1985), de la sub-unidad catalítica de la adenililciclase (Yoshimasa y col., 1987) y de una isoenzima de la fosfolipasa C (Bennett y Crocke, 1987).

Según estos antecedentes, es posible suponer que la proteína quinasa C activada por DAG podría estimular la vía de la progesterona a nivel de una proteína G u otros pasos en la cascada de reacción gatillada por la progesterona.

2. Por otro lado, al tratar los oocitos sólo en presencia de progesterona, se encontró un aumento de la incorporación de (³H)mio-inositol tanto en los fosfolípidos de inositol como en

Ins (1,4,5)P₃. Este aumento ocurre luego de 3 a 4 hrs de incubar con la hormona y es bloqueado por inhibidores de la síntesis protéica, sugiriendo que este efecto puede estar mediado por un factor protéico probablemente MPF u otra proteína quinasa activada o sintetizada en este tiempo.

Esta proteína con actividad quinasa podría estimular directa o indirectamente la fosfolipasa C, y la producción de DAG e Ins (1,4,5)P₃. A su vez, el aumento en la incorporación de (³H)mioinositol en los fosfolípidos de inositol, detectado en nuestros experimentos, puede ser secundaria a la hidrólisis de Ptd Ins (4,5)P₂.

La activación de fosfolipasa C, podría ocurrir a través de diferentes mecanismos. Existe evidencia experimental que indica que la fosfolipasa C es fosforilada in vivo e in vitro por acción de proteínas con actividad tirosina quinasa (Margolis y col., 1989; Nishibe y col., 1989; Meisenhelder y col., 1989).

También la fosfolipasa C podría ser activada indirectamente a través de una proteína G. Al respecto, se sabe que las proteínas G son sustratos in vitro de la proteína quinasa C (Katada y col., 1985; Sagi-Eisenberg, 1989) y de proteínas con actividad tirosina quinasa tales como el receptor de insulina y el receptor de IGF-1 (Zick y col., 1987; Zick y col., 1986).

Además, la fosfolipasa C podría ser activada indirectamente por un aumento en la disponibilidad del sustrato. Esto podría ser consecuencia a la vez, de un aumento en la síntesis o de la activación de las enzimas involucradas en la formación de Ptd Ins(4,5)P₂. En este sentido resulta interesante señalar que el producto de algunos oncogenes puede acelerar el recambio de los

fosfoinosítidos al estimular las Ptd Ins quinasas y ésto parece ser suficiente para la expresión del fenotipo transformado (Whitman y col., 1986). Se ha demostrado también que una Ptd Ins quinasa es el sustrato para la actividad tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y de la proteína pp60^{v-src} (Kaplan y col., 1987; Curtneidge y Hebe, 1987). La microinyección de la proteína pp60^{v-src} en el oocito de Xenopus acelera marcadamente la maduración inducida por progesterona (Spivack y col., 1989).

La conexión entre estas vías de transducción de señales proporcionaría al oocito la posibilidad de amplificar su respuesta a la señal generada por progesterona, e ilustra la complejidad y variedad de mecanismos que han desarrollado las células para regular la respuesta hormonal.

Sería importante precisar en futuros experimentos, cambios en la actividad de la fosfolipasa C durante la maduración meiótica del oocito y poder correlacionarlos con la fosforilación u otro tipo de modificación covalente de alguno de los elementos del complejo de la fosfolipasa C.

Es importante destacar que el efecto de insulina en la incorporación de (³H)mio-inositol en los fosfolípidos de inositol (Fig. 21B), puede ser explicado también si se postula una vía de interconexión análoga a la propuesta para progesterona. Este último resultado es particularmente interesante porque, a pesar que la progesterona e insulina utilizan vías diferentes de maduración, ambas vías requerirían la participación de los fosfatidilinositol fosfatos.

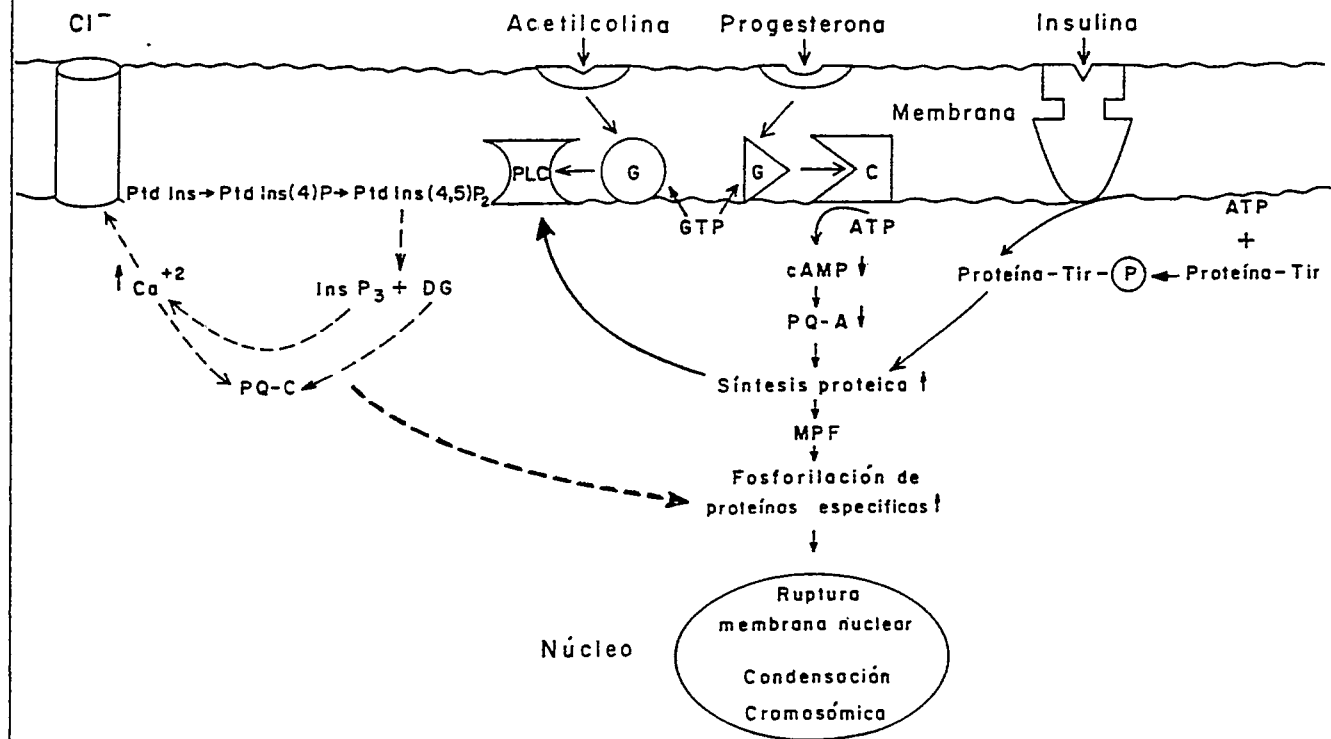
Para inducir la maduración del oocito, fue necesario

utilizar altas concentraciones de insulina (10 μ M). Esta observación es explicable en parte, si se considera la baja afinidad de la hormona por el receptor ubicado en la superficie del oocito. Se ha determinado que con insulina se alcanza la mitad de la respuesta máxima a una concentración de 103 nM. En cambio, el factor de crecimiento, tipo 1, análogo de insulina (IGF₁), es un potente inductor de la maduración meiótica del oocito; alcanzando la mitad de la respuesta máxima a una concentración de 0,4 nM.

Estos resultados han hecho suponer que la acción de insulina está mediada por la unión a un receptor para el IGF₁ (Maller y Koontz, 1981).

Nuestros resultados no permiten descartar la posibilidad que también ocurra un aumento en la síntesis de novo de fosfatidilinositol fosfato, durante la maduración del oocito inducida por progesterona o insulina.

Carvallo y col. (1981) han observado que al madurar el oocito, se cierra a la captación de nutrientes. Este hecho resulta interesante porque se produce coincidente con la ruptura de la membrana nuclear e indica que en este momento se producen drásticos cambios en la permeabilidad de la membrana, que podrían ser atribuidos a cambios en su composición fosfolipídica.



ESQUEMA IV. Modelo de interconexión o diálogo entre las vías de transducción de señales utilizadas por progesterona y acetilcolina.

CONCLUSIONES

A. Estudios con membranas de oocitos de Xenopus laevis.

Las membranas aisladas de oocitos contienen las quinasas necesarias para la síntesis de Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂. En membranas de oocitos maduros, estas enzimas presentan una mayor actividad (3 a 4 veces superior a la encontrada en membranas de oocitos no maduros).

La incubación de membranas con (μ -³²P)ATP produce mayoritariamente Ptd Ins(4)P y una pequeña cantidad de Ptd Ins(4,5)P₂.

Progesterona, insulina y acetilcolina y GTP- μ -S no tienen efecto in vitro sobre la actividad de las quinasas en membranas aisladas.

B. Estudios con oocitos intactos de Xenopus laevis

Al microinyectar (³H)mio-inositol en el oocito hay incorporación de la marca en Ptd Ins, Ptd Ins(4)P y Ptd Ins(4,5)P₂. Esta incorporación es mucho más eficiente que cuando se incuban los oocitos con el precursor externamente.

La incorporación de (³H)mio-inositol es aumentada en un 100% en estos fosfolípidos por progesterona. El efecto es máximo a las 4-5 hr de iniciada la incubación con la hormona, es posterior a la inducción de la síntesis proteica y coincidente con la

ruptura de la membrana nuclear.

Insulina también aumenta la incorporación de (^3H)mio- inositol y su efecto requiere de síntesis protéica.

La incorporación de (^3H)mio-inositol es aumentada por acetilcolina casi 2 veces. El efecto es más rápido, que el observado con progesterona y alcanza un máximo después de 2 hrs de iniciada la incubación con el neurotransmisor y no requiere de síntesis protéica.

De acuerdo a lo descrito en la literatura, se observó un aumento en la síntesis de inositolfosfatos en los oocitos tratados con la acetilcolina, pero también se observó un efecto parecido en los oocitos tratados con progesterona, lo cual estaría indicando que tanto acetilcolina como progesterona promueven un aumento en el recambio de los fosfatidilinositoles.

Al respecto, los resultados pueden ser explicados si se postula la existencia de una vía de interconexión o diálogo entre la vía utilizada por acetilcolina y la utilizada por progesterona.

BIBLIOGRAFIA

Adelstein, R.S. y Klee, C.B. (1981). Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. J. Biol. Chem. 256: 7501 - 7509.

Allende, C.C., Hinrichs, M.V., Santos, E. y Allende, J.E. (1988). Oncogenic ras protein induces meiotic maturation of amphibian oocytes in the presence of protein synthesis inhibitors. FEBS Lett. 234: 426 - 430.

Allende, J.F. (1988). GTP-mediated macromolecular interacciones: the common features of different systems. FASEB J. 2: 2356 - 2367.

Ashkenazi, A., Peralta, F.G., Winslow, J.W., Ramachandran, J. y Capon, D.J. (1989). Functionally distinct G proteins selectively couple different receptor to PI hydrolysis in the same cell. Cell 56: 487 - 493.

Auger, K.R., Serunian, L.A., Soltoff, S.P., Libby, P. y Cantley, L.C. (1989). PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. Cell 57: 167 - 175.

Baltus, E., Hanocq-Quertier, J., Pays, A. y Brachet, J. (1977). Ionic requirements for induction of maturation (meiosis) in full-grown and medium-sized *Xenopus laevis* oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 3461-3465.

Ranno, Y., Yada, Y. y Nozawa, Y. (1988) Purification and characterization of membrane-bound phospholipase C specific for phosphoinositides from human platelets. J. Biol. Chem. 263: 11459-11465.

Barbacid, M. (1987) Ras genes. Ann. Rev. Biochem. 56: 779 - 827.

Batty, I.R., Nahorski, S.R. y Irvine R.F. (1985). Rapid formation of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate following muscarinic receptor stimulation of rat cerebral cortical slices. Biochem. J. 232: 211- 215.

Bennet, C.F. y Crooke S.T. (1987). Purification and characterization of a phosphoinositide-specific phospholipase C from guinea pig uterus. J. Biol. Chem. 262: 13789 - 13797.

Berridge, M.J. (1987) Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. Ann. Rev. Biochem. 56: 159 - 193.

Berridge, M.J., Dawson, R.M., Downes, C.P., Heslop, J.P. y Irvine, R.F. (1983) Changes in the level of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* 212: 473-482.

Berridge, M.J., Downes, C.P. y Hanley, M.R. (1989) Neural and developmental actions of lithium: A unifying hypothesis. *Cell* 59: 411 - 419.

Berridge, M.J., Heslop, J.P., Irvine, R.F. y Brown K.D. (1984) Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cell in response to platelet-derived growth factor. *Biochem. J.* 222: 195-201.

Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197 - 205.

Besterman, J.M., Duronio, V. y Cuatrecasas, P. (1986) Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: A pathway for generation of a second messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6785 - 6789.

Birchmeir, C., Broek, D. y Wigler, M. (1985) RAS proteins can induce meiosis in Xenopus oocytes. *Cell* 43: 615 - 621.

Bleasdale, J.F. y Wallis, P. (1981) Phosphatidylinositol-inositol exchange in rabbit lung. *Biochim. Biophys. Acta* 664: 428 - 440.

Bone, E.A., Fretten, P., Palmer, S., Kirk, CH.J. y Michell, R.H. (1984) Rapid accumulation of inositol phosphates in isolated rat superior cervical simpathetic ganglia exposed to V_1 - vasopressin and muscarinic cholinergic stimule. *Biochem. J.* 221: 803 - 811.

Bond, V.C. y Wold, B. (1987) Poly-L-ornithine-mediated transformation of mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2286-2293.

Boon, A.M. Beresford, B.J. y Mellors, A. (1985) A tumor promoter enhances the phosphorylation of polyphosphoinositides while decreasing phosphatidylinositol labeling in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 129: 431 - 438.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive methods for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 - 254.

Bravo, R., Otero, C., Allende, C. y Allende, J. (1978) Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline, and papaverine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1242 - 1246.

Bunn, H.F., Seal, N.S. y Scott, A.F. (1974) The role of 2,3 diphosphoglycerate in mediating hemoglobin function of mammalian red cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 241: 498-512.

Carney, D.H., Scott, D.L., Gordon, F.A. y La Belle, E.F. (1985) Phosphoinositides in mitogenesis: neomycin inhibits thrombin-stimulated phosphoinositide turnover and initiation of cell proliferation. *Cell* 42: 479 - 488.

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

Carrasco, M.A., Magendzo, K., Jaimovich, E. e Hidalgo, C. (1988) Calcium modulation of phosphoinositide kinase in transverse tubule vesicles from frog skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 262: 360 - 366.

Carvallo, P., De Albuja, C.M., Allende, C. y Allende, J.E. (1981) Hormonal regulation of glucose uptake by amphibian follicles. *Exp. Cell. Res.* 136: 215-223.

Carvallo, P. y Aguilera, G. (1989) Protein kinase C mediates the effect of vasopressin in pituitary corticotrophs. *Mol. Endocrinol.* 12:1935 - 1943

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

Cochet, C. y Chambaz, E.M. (1986) Catalytic properties of a purified phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from rat brain. *Biochem. J.* 237: 25 - 31.

Cockcroft, S. (1987) Polyphosphoinositide phosphodiesterase: regulation by a novel guanine nucleotide binding proteins, Gp. *Trend. Biochem. Sci.* 12: 75 - 78.

Cockcroft, S., Taylor, J.A. y Judah, J.D. (1985) Subcellular localization of inositol lipid kinases in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 845: 163 - 170.

Collins, Ch.A. y Wells W.W. (1983) Identification of phosphatidylinositol kinase in rat liver lysosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 258: 2130 - 2134.

Connolly, T.M., Bansal, V.S., Bross, T.E., Irvine, R.F. y Majerus, P.W. (1987) The metabolism of tris- and tetraphosphates of inositol by 5-phosphomonoesterase and 3-kinase enzymes. *J. Biol. Chem.* 262: 2146 - 2149.

Corkey, B.E., Duszynski, J., Rich, T.L., Matschinsky, B. y Williamson, J.R. (1986) Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261: 2567-2574.

Courtneidge, S.A. y Heber, A. (1987) An 81 Kd protein complexed with middle T antigen and pp60^{src}: A possible phosphatidylinositol kinase. Cell 50: 1031 - 1037.

Dascal, N. (1987) The use of Xenopus oocytes for the study of ion channels. Critical. Rev. Biochem. 22: 317 - 387.

Dascal, N., Ifune, C., Hopkins, R., Snutch, T.P., Lübbert, H., Davidson, N., Simon, M.I. y Lester, H.A. (1986) Involvement of a GTP-binding protein in mediation of serotonin and acetylcholine responses in Xenopus oocytes infected with rat brain messenger RNA. Mol. Brain. Res. 1: 201 - 209.

Dascal, N., Yekuel, R. y Oron, Y. (1984) Acetylcholine promotes progesterone-induced maturation of Xenopus oocytes. J. Exp. Zool. 230: 131 - 135.

de Chaffoy de Courcelles, D., Roevens, P. y Van Belle, H. (1984) 1-oleyl-2-acetyl-glycerol (OAG) stimulates the formation of phosphatidylinositol 4-phosphate in intact human platelets. Biochem. Biophys. Res. Commun. 123: 589-595.

De Robertis, E.M., Longsthorpe, R.F. y Gurdon, J.B. (1978) Intracellular migration of nuclear proteins in Xenopus oocytes. Nature 272: 254-256.

Deshpande, A.K. y Kung, H.F. (1987) Insulin induction of *Xenopus laevis* oocyte maturation is inhibited by monoclonal antibody against p21 ras proteins. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1285 - 1288.

Downes, C.P. (1989) The cellular function of myo-inositol. *Biochem. Soc. Trans.* 17: 259 - 268.

Downes, C.P. y Michell, R.H. (1981) The polyphosphoinositide phosphodiesterase of erythrocyte membranes. *Biochem. J.* 198: 133 - 140.

Downes, C.P., Mussat, M.C. y Michell, R.H. (1982) The inositol trisphosphate phosphomonoesterase of the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.* 203: 169 - 177.

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

Dunlop, M.E. y Malaisse, W.J. (1986). Phosphoinositide phosphorylation and hydrolysis in pancreatic islet cell membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 421 - 429.

Dunphy, W.G., Brizuela, L., Beach, D. y Newport, J.W. (1988) The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54: 423 - 431.

Dunphy, W.G. y Newport, J.W. (1988) Unraveling of mitotic control mechanisms. *Cell* 55: 925-928.

Ehrlich, B.F. y Watras, J. (1988) Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature* 336: 583-586.

Escobedo, J.A., Barr, P.J. y Williams, L.T. (1988) Role of tyrosine kinase and membrane-spanning domains in signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Mol. Cell Biol.* 8: 5126-5131.

Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor super-family. *Science* 240: 889-895.

Farese, R.V., Larson, R.E. y Sabir, M.A. (1982) Insulin acutely increases phospholipids in the phosphatidate-inositide cycle in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 257: 4042 - 4045.

Featherstone, C. (1989) The complexities of the cell cycle. *Trends Biochem. Sci.* 14: 85-87.

Fleischman, L.F., Chahwala, S.B. y Cantley, L. (1986) Ras transformed cells: altered levels of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and catabolites. *Science* 231: 407 - 410.

Ford, C.C. (1985) Maturation promoting factor and cell cycle regulation. *J. Embryol. exp. Morph.* 89: 271 - 284.

Fukui, T., Lutz, R.J. y Lowenstein, J.M. (1988) Purification of a phospholipase C from rat liver cytosol that act on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 4-phosphate. *J. Biol. Chem.* 263: 17730 - 17737.

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

Gilman, A.G. (1987) G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649.

Gillo, R., Lass, Y., Nadler, F. y Oron, Y. (1987) The involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium in the two-component response to acetylcholine in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 392: 349-361.

González, R.A. y Crews, F.T. (1985) Guanine nucleotides stimulate production of inositol trisphosphate in rat cortical membranes. *Biochem. J.* 232: 799-804.

Gumber, S. y Lowenstein, J.M. (1986) Non-enzymic phosphorylation of polyphosphoinositides and phosphatidic acid is catalyzed by divalent metal ions. *Biochem. J.* 235: 617 - 619.

Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1983) Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in Xenopus oocytes. Proc. R. Soc. (Lond.) B 219: 103 - 109.

Gurdon, J.B. y Melton, D.A. (1981) Gene transfer in amphibian eggs and oocytes. Ann. Rev. Genet. 15: 189 - 218.

Halenda, S.P. y Feinstein, M.B. (1984) Phorbol myristate acetate stimulates formation of phosphatidyl inositol 4-phosphate and phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate in human platelets. Biochem. Biophys. Res. Commun. 124: 507 - 513.

Harden, T.K., Stephens, L., Hawkins, P.T. y Downes, C.P. (1987) Turkey erythrocyte membranes as a model for regulation of phospholipase C by guanine nucleotides. J. Biol. Chem. 262: 9057 - 9061.

Hathaway, G.M. y Traugh, J.A. (1984) Regulation of casein-kinase II by 2,3-bisphosphoglycerate in erythroid cells. J. Biol. Chem. 259: 2850 - 2855.

Hayashi, F. y Amakawa, T. (1985) Calcium- and calmodulin dependent phosphorylation of diphosphoinositide in acetylcholine receptor-rich membranes from electroplax of Narke japonica. J. Neurochem. 45: 124 - 131.

Heldin, C.H. y Westermark, B. (1984) Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes. Cell 37: 9 - 20.

Hidalgo, C., González, M.E., Lagos, R. (1983) Characterization of the Ca^{2+} - or Mg^{2+} - ATPase of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem. 258: 13937-13945.

Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., Ross, E.M. (1988) Mastoporan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). J. Biol. Chem. 263: 6491 - 6494.

Hirono, Ch., Ito, I. y Sugiyama, H. (1987) Neurotensin and acetylcholine evoke common responses in frog oocytes injected with rat brain messenger ribonucleic acid. J. Physiol. (Lond.) 382: 523 - 535.

Hokin, L.E. (1985) Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. Ann. Rev. Biochem. 54, 205 - 235.

Hollander, M. y Wolfe D. (1972) Non Parametric Statistical Methods. Wiley & Sons, New York.

Imai, A. y Gershengorn, M.C. (1987a) Independent phosphatidylinositol synthesis in pituitary plasma membrane and endoplasmic reticulum. Nature 325: 726 - 728.

Imai, A. y Gershengorn, M.C. (1987b) Regulation by phosphatidylinositol of rat pituitary plasma membrane and endoplasmic reticulum phosphatidylinositol synthase activities. J. Biol. Chem. 262: 6457 -6459.

Imai, A., Rebecchi, M.J. y Gershengorn, M.C. (1986) Differential regulation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate of pituitary plasma-membrane and cytosolic phosphoinositide kinases. *Biochem. J.* 240: 341 - 348.

Irvine, F.R., Ånggård, E.E., Letcher, A.J. y Downes, C.P. (1985) Metabolism of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4-trisphosphate in rat parotid glands. *Biochem. J.* 229: 505 - 511.

Irvine, R.F., Letcher, A.J., Heslop, J.P. y Berridge, M.J. (1986) The inositol tris/tetrakisphosphate pathway-demonstration of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 3-kinase activity in animal tissues. *Nature* 320: 631 - 634.

Irvine, R.F. y Moor, R.M. (1986) Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca^{2+} . *Biochem. J.* 240: 917 - 920.

Jackowski, S., Rettenmier, C.W., Sherr, Ch.J. y Rock, Ch.O. (1986) A guanine nucleotide-dependent phosphatidylinositol 4,5-diphosphate phospholipase C in cells transformed by the v-fms and v-fes oncogenes. *J. Biol. Chem.* 261: 4978 - 4985.

Jergil, R. y Sundler, R. (1983) Phosphorylation of phosphatidylinositol in rat liver Golgi. *J. Biol. Chem.* 258: 7968 - 7973.

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

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

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

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

Kaneko, S., Kato, K., Yamagishi, S., Sugiyama, H. y Nomura, Y. (1987) GTP-binding proteins Gi and Go transplanted onto Xenopus oocyte by rat brain messenger RNA. Mol. Brain Res. 3: 11-19.

Kaplan, D.R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Pallas, D.C., White, M., Cantley, L. y Roberts, T.M. (1987) Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 Kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. Cell 50: 1021 - 1029.

- Katada, T., Gilman, A.G., Watanabe, Y., Bauer, S. y Jacobs, K.H. (1985) Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. Eur. J. Biochem. 151: 431 - 437.
- Katan, M. y Parker, P.J. (1987) Purification of phosphoinositide-specific phospholipase C from a particulate fraction of bovine brains. Eur. J. Biochem. 168: 413 - 418.
- Kato, M., Kawai, S. y Takenawa, T. (1987) Altered signal transduction in erb B-transformed cells. Implication of enhanced inositol phospholipid metabolism in erb B-induced transformation. J. Biol. Chem. 262: 5696 - 5704.
- Kikkawa, U., Kishimoto, A. y Nishizuka, Y. (1989) The proteins kinase C family: heterogeneity and its implications. Annu. Rev. Biochem. 58: 31 - 44.
- Kline, D., Simoncini, L., Mandel, G., Maue, R.A., Kado, R.T. y Jeffe L.A. (1988) Fertilization events induced by neurotransmitters after injection of mRNA in Xenopus eggs. Science 241: 464 - 467.
- Knowles, A.F. y Lawrence, C.M. (1985) Enzymatic synthesis and hydrolysis of (32 P) phosphatidylinositol phosphate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 129: 220 - 225.

Koréh, K. y Monaco, M.E. (1986) The relationship of hormone-sensitive and hormone-insensitive phosphatidylinositol to phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate in the WRK-1 Cell. J. Biol. Chem. 261: 88 - 91.

Korn, L.J., Siebel, Ch.W., McCormick, F. y Roth, R.A. (1987) Ras p21 as a potential mediator of insulin action in *Xenopus* oocytes. Science 236: 840 - 843.

Kozawa, O., Hishijima, M., Tanimoto, T., Ohmori, T., Takai, Y. (1987) Similar physical and kinetic properties of rat brain synaptic membrane and cytosol phosphoinositide phospholipases C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 145: 218 - 227.

Kurosawa, M. y Parker, Ch.W. (1986) A phosphatidylinositol kinase in rat mast cell granules. J. Immunol. 136: 616 - 622.

Kusano, K., Miledi, R. y Stinnakre, J. (1982) Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. J. Physiol. (Lond.) 328: 143 - 170.

Lacal, J.C., De la Peña, P., Moscat, J., García-Barreno, P., Anderson, P.S. y Aaronson, S.A. (1987) Rapid stimulation of diacylglycerol production in *Xenopus* oocytes by microinjection of H-ras-p21. Science 238: 533 - 536.

Lee K-Y., Ryu, S.H., Suh, P-G, Choi, W.Ch., y Rhee, S.G. (1987) Phospholipase C associated with particulate fractions of bovine brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5540-5544.

Le Peuch, C.J., Picard, A., y Dorée, M. (1985) Parthenogenetic activation decreases the polyphosphoinositide content of frog eggs. FEBS Lett 187: 61 - 64.

Lineweaver, H. y Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56: 658 - 666.

Ling, L.E., Schulz, J.T. y Cantley, L.C. (1989) Characterization and purification of membrane-associated phosphatidyl inositol-4-phosphate kinase from human red blood cells. J. Biol. Chem. 264: 5080 - 5088.

Lohka, M.J., Hayes, M.K., Maller, J.L. (1988) Purification of maturation promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3009 - 3013.

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

López-Rivas, A., Mendoza, S.A., Nanberg, E., Sinnott-Smith, J. y Rozengurt, E. (1987) Ca²⁺-mobilizing actions of platelet-derived growth factor differ from those of bombesin and vasopressin in Swiss 3T3 mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 5768 -

5772.

Lundberg, G.A. Jergil, B. y Sundler, R. (1985) Subcellular localization and enzymatic properties of rat liver phosphatidyl inositol-4-phosphate-kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 846: 379 - 387.

Lundberg, G.A., Jergil, B. y Sundler, R. (1986) Phosphatidyl-inositol-4-phosphate kinase from rat brain. Activation by polyamines and inhibition by phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate. *Eur. J. Biochem.* 161: 257 - 262.

Mac Donald, M.L., Kuenzel, E.A., Glomset, J.A. y Krebs, E.G. (1989) Evidence from two transformed cell lines that the phosphorylations of peptide tyrosine and phosphatidylinositol are catalyzed by different proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82: 3993 - 3997.

Machicao, F. y Wieland, O.H. (1984) Evidence that the insulin receptor-associated protein kinase acts as a phosphatidylinositol kinase. *FEBS Lett.* 175: 113 - 116.

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

Maller, J.L. y Koontz, J.W. (1981) A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin. Dev. Biol. 85: 309 - 316.

Maller, J. y Krebs, E. (1977) Progesterone-stimulated meiotic cell division in Xenopus oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 252: 1712 - 1218.

Majerus, P.W., Connolly, T.M., Bansal V.S., Inhorn, R.C., Roos, T.S. y Lips, D.L. (1988) Inositol phosphates: Synthesis and degradation. J. Biol. Chem. 263: 3051 - 3054.

Majerus, P.W., Connolly, T.M., Dickmyn, M., Roos, T.S., Bross, T.E., Ishii, H., Bansal, U.S. y Wilson, D.B. (1986) The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. Science 234: 1519 - 1526.

Mamrack, M.D. (1989) Stimulation of enzymatic activity in filament preparations of casein kinase II by polylysine, melittin, and spermine. Mol. Cell. Biochem. 85: 147 - 157.

Marche, X., Koutouzov, S. y Girard, A. (1983) Impairment of membrane phosphoinositide metabolism by aminoglycoside antibiotics: Streptomycin, amikacin, kanamycin, dibekacin, gentamicin and neomycin. J. Pharmacol. Exp. Therap. 227: 415 - 420.

Margolis, B., Rhee S.G., Felder, S., Mervic, M., Lyall, R., Levitski, A., Ullrich, A, Zilberstein, A. y Schlessinger, J. (1989) EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: A potential mechanisms for EGF receptor signaling. Cell 57: 1101 - 1107.

Marx, J.L. (1989) The Cell cycle coming under control. Science 245: 252 - 255.

Masui, Y. y Market, C.L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool. 177: 129 - 140.

Meisenhelder, J., Suh, P-G., Rhee, S.G. y Hunter, T. (1989) Phospholipase C- β is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein tyrosine kinases in vivo and in vitro. Cell 57: 1109 -1122.

Miller, D.S., Lau, Y-T. y Horowitz, S.R. (1984) Artifacts caused by cell microinjection. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 1426 - 1430.

Melin, P-M., Sundler, R. y Jergil, B. (1986) Phospholipase C in rat liver plasma membranes. Phosphoinositide specificity and regulation by guanine nucleotides and calcium. FERS Lett. 198: 85- 88.

Mónaco, M.E. (1982) The phosphatidylinositol cycle in WRK-1 cells. Evidence for a separate, hormone-sensitive phosphatidylinositol pool. *J. Biol. Chem.* 257: 2137 - 2139.

Mónaco, M.E. (1987) Inositol metabolism in WRK-1 cells. Relationship of hormone-sensitive to-insensitive pools of phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 262: 13001 - 13006.

Mónaco, M.E. y Woods, D. (1983) Characterization of the hormone-sensitive phosphatidylinositol pool in WRK-1 cells. *J. Biol. Chem.* 258: 15125-15129.

Moolenaar, W.H. Bierman, A.J., Tilly, B.C., Verlaan, I., Defize, L.H., Honegger, A.M., Ullrich, A. y Schlessinger, J. (1988) A point mutation in the ATP-binding site of the EGF receptor abolishes signal transduction. *EMBO J.* 7: 707 - 710.

Moreau, M., Vilain, J.P. y Guerrier, P. (1980) Free calcium changes associated with hormone action in amphibian oocytes. *Dev. Biol.* 78: 201 - 214.

Morgan, D.D., Ho, L., Korn, L.J. y Roth, R.A. (1986) Insulin action is blocked by a monoclonal antibody that inhibits the insulin receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 328 - 332.

Morgan, D.O. y Roth, R.A. (1987) Acute insulin requires insulin receptor kinase activity: Introduction of an inhibitory monoclonal antibody into mammalian cells blocks the rapid effects of insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 41 - 45.

Moriarty, T.M., Gillo, B., Carty, D.J. Premont, R.T., Landau, E.M. e Iyengar, R. (1988) B subunits of GTP-binding proteins inhibit muscarinic receptor stimulation of phospholipase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8865 - 8869.

Moriarty, T.M., Sealfon, S.G., Carty, D.S., Roberts, J.L., Iyengar, R. y Landau, E.M. (1989) Coupling of exogenous receptors to phospholipase C in Xenopus oocytes through pertussis toxin-sensitive and-insensitive pathways. Cross-talk through heterotrimeric G-proteins. J. Biol. Chem. 264: 13524 - 13530.

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

Nairn, A.C., Bhagat, R. y Palfrey, H.C. (1985) Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100.000 substrate in mammalian tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7939 - 7943.

Nakamura, T. y Ui, M. (1985) Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown arachidonic acid release, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin. J. Biol. Chem. 260: 3584 - 3593.

Newport, J. y Kirschner, M. (1982) A major developmental transition in early Xenopus embryos. I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. Cell 30: 675 - 686.

Nishibe, S., Wahl, M.I., Rhee, S.G. y Carpenter, G. (1989) Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II in vitro by the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 264: 10335 - 10338.

Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. Science 233: 305 - 312.

Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature 308: 693 - 698.

Nomura, Y., Kaneko, S., Kato, K., Yamagishi, S. y Sugiyama, H. (1987) Inositol phosphate formation and chloride current responses induced by acetylcholine and serotonin through GTP-binding proteins in Xenopus oocyte after injection of rat brain messenger RNA. Mol. Brain Res. 2: 113 - 123.

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

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

Orellana, S., Solski, P.A. y Brown, J.H. (1987) Guanosine 5'-O-(thiotriphosphate)-dependent inositol trisphosphate formation in membranes is inhibited by phorbol ester and protein kinase C. J. Biol. Chem. 262: 1638- 1643.

Oron, Y., Dascal, N., Nadler, E. y Lupu, M. (1985) Inositol 1,4,5-trisphosphate mimics muscarinic response in Xenopus oocytes. Nature 313: 141 - 143.

O'Shea, J.J., Harford, J.B. y Klausner, R.D. (1986) Identification and characterization of the phosphatidylinositol kinase in membranes of murine T lymphocytes. J. Immunol. 137: 0971 - 0976.

Otte, A.P., van Run, P., Heideveld, M., van Driel, R. y Durston, A.J. (1989) Neural induction is mediated by cross-talk between the protein kinase C and cyclic AMP pathways. Cell 58: 641- 648.

Pennington, S.R. y Martin B.R. (1985) Insulin-stimulated phosphoinositide metabolism in isolated fat cells. J. Biol. Chem. 260: 11037 - 11045.

Pike, L.J. y Fakes A.T. (1987) Epidermal growth factor stimulates the production of phosphatidylinositol monophosphate and the breakdown of polyphosphoinositides in A431 cells. J. Biol. Chem. 262: 1644-1651.

Porter, F.D., Li, Y-S., y Deuel, T.F. (1988) Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase from bovine uteri. J. Biol. Chem. 263: 8989 - 8995.

Prepié, V., Blackmore, P.F. y Exton, J.H. (1982) Myo-Inositol uptake and metabolism in isolated rat liver cells. J. Biol. Chem. 257: 11315 - 11322.

Putney, J.W., Takemura, H., Hughes, A.R., Horstman, D.A. y Thartrup, O. (1989) How do inositol phosphates regulate calcium signalling? FASEB J. 3: 1899 - 1905.

Quinton, P.M. y Philpott, C.W. (1973) A role for anionic sites in epithelial architecture. Effects of cationic polymers on cell membrane structure. J. Cell Biol. 56: 787 - 796.

Quist, F., Satumtira, N. y Powell, P. (1989) Regulation of polyphosphoinositide synthesis in cardiac membranes. Arch. Biochem. Biophys. 271: 21 - 32.

Rana, R.S., Kowluru, A., Mc Donald, M.J. (1986a). Secretagogue-responsive and unresponsive pools of phosphatidylinositol in pancreatic islets. Arch. Biochem. Biophys. 245: 411 - 416.

Rana, R.S., Sekar, M.Ch., Hokin, L.E. y Mac Donald, M.J. (1986b) A possible role for glucose metabolites in the regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphomonoesterase activity in pancreatic islets. J. Biol. Chem. 261: 5237-5240.

Rebecchi, M.J. y Rosen, O.M. (1987) Purification of a phosphoinositide-specific phospholipase C from bovine brain. J. Biol. Chem. 262: 12526 - 12532.

Rhee, S.G., Suh, P-G., Ryu, S-H., Lee, S.Y. (1989) Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. Science 244: 546-550.

Sagi-Eisenberg, R. (1989) GTP-binding proteins as possible targets for protein kinase C action. Trends Biochem. Sci. 14: 355 - 357.

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

Sagata, M., Oskarsson, M., Copeland, T. Brumbaugh, J. y Vande Woude, G.F. (1988) Function of c-mos proto-oncogene product in meiotic maturation in Xenopus oocytes. Nature 335: 519-525.

Sagata, M., Daar, I. Oskarsson, M., Showalter, S.D. y Vande Waoude, G.F. (1989) The product of the mos proto-oncogen as a candidate "initiator" for oocyte maturation. Science 245: 643 - 645.

Sale, G.J., Fujita-Yamaguchi, Y. y Kahn, C.R. (1986) Characterization of phosphatidylinositol kinase activity associated with the insulin receptor. Eur. J. Biochem. 155: 345 - 351.

Sakai, M., Wells, W.W. (1986) Action of insulin on the subcellular metabolism of polyphosphoinositides in isolated rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 261: 10058 - 10062.

Saltiel, A.R., Sherline, P. y Fox, J.A. (1987) Insulin-stimulated diacylglycerol production results from the hydrolysis of a novel phosphatidylinositol glycan. J. Biol. Chem. 262: 1116-1121.

Schacht, J. (1976) Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex in vitro. J. Neurochem. 27: 1119 - 1124.

Schäfer, M., Behle, G., Varsányi, M. y Heilmeyer, M.G. (1987) Ca^{2+} regulation of 1-(3-sn-phosphatidyl)-1-myo-inositol 4-phosphate formation and hydrolysis on sarcoplasmic-reticular Ca^{2+} -transport ATPase. Biochem. J. 247: 579 - 587.

Shenoy, S., Choi J-K, Bagrodia, S., Copeland T.D., Maller, J.L. y Shalloway, D. (1989) Purified maturation promoting factor phosphorylates pp60^{c-src} at the sites phosphorylated during fibroblast mitosis. Cell 57: 763 - 774.

Sheetz, M.P. Febbrosiello, P. y Koppel, D.E. (1982) Triphosphoinositide increases glycoprotein lateral mobility in erythrocyte membranes. Nature 296: 91-93.

Smith, Ch.D. y Chang, K-J. (1989) Regulation of brain phosphotidylinositol-4-phosphate kinase by GTP analogues. A potential role for guanine nucleotide regulatory proteins. J. Biol. Chem. 264: 3206 - 3210.

Smith, Ch.D., Cox, C.Ch. y Snyderman, R. (1986) Receptor-coupled activation of phosphoinositide-specific phospholipase C by an N protein. Science 232: 97 - 100.

Smith, Ch.D., Uhing, R.J., y Snyderman, R. (1987) Nucleotide regulatory protein-mediated activation of phospholipase C in human polymorphonuclear leukocytes is disrupted by phorbol esters. J. Biol. Chem. 262: 6121 - 6127.

Smith, Ch.D., y Wells, W.W. (1983) Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. II Characterization of in vitro lipid phosphorylation. J. Biol. Chem. 258: 9368 - 9373.

Smith, Ch. D. y Wells, W.W. (1984) Characterization of a phosphatidylinositol 4-phosphate-specific phosphomonoesterase in rat liver nuclear envelopes. Arch. Biochem. Biophys. 235: 529 - 537.

Sommermeier, H., Behl, B., Oberdisse, E. y Resch, K. (1989) Effects of nucleotides on the activity of phospholipase C in rabbit thymus lymphocytes. Differences in assays using endogenous (^3H)inositol-prelabeled membranes or exogenous (^3H) phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as substrate. J. Biol. Chem. 264: 906 - 908.

Snutch, T.P. (1988) The use of Xenopus oocytes to probe synaptic communication. Trends Neuro. Sci. 11: 250 - 256.

Spät, A., Bradford, P.G., Mc Kinney, J.S., Rubin, R.P. y Putney, Jr, J.W. (1986) A saturable receptor for ^3P -inositol- 1,4,5-trisphosphate in hepatocytes and neutrophils. Nature 319: 514 - 516.

Spivack, J.G., Erikson, R.L. y Maller, J.L. (1984) Microinjection of pp60^{v-src} into Xenopus oocytes increases phosphorylation of ribosomal protein S6 and accelerates the rate of progesterone-induced meiotic maturation. Mol. Cell Biol. 4: 1631 - 1637.

Stith, R.J., Maller, J.L. (1987) Induction of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Exp. Cell Res.* 169: 514 - 523.

Stith, R.J. y Maller, J.L. (1985) Evidence polyphosphoinositide turnover is involved in Xenopus oocyte maturation. *J. Cell Biol.* 101: 490a.

Suarez-Quian, C.A., O'Shea, J.J. y Klausner, R.D. (1987) Partially purified phosphatidylinositol kinase does not catalyze the formation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 512 - 316.

Sugiyama, H., Ito, I. Hirono, Ch. (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325: 531 - 533.

Sumikawa, K., Parker, I. y Miledi, R. (1984) Messenger RNA from rat brain induces noradrenaline and dopamine receptors in Xenopus oocytes. *Proc. R. Soc.(Lond.)* 3223: 255 - 260.

Sunkara, P.S., Wright, D.A. y Nishioka, K. (1981) An essential role for putrescine biosynthesis during meiotic maturation of amphibian oocytes. *Dev. Biol.* 87: 351 - 355.

Supattapone, S., Worley, P.F., Baraban, J.M. y Snyder, S.H. (1988) Solubilization, purification, and characterization of an inositol triphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 1530 - 1534.

Tabor, C.W. y Tabor, H. (1984) Polyamines. Ann. Rev. Biochem. 53: 749 - 790.

Takahashi, T., Neher, E. y Sakmann, B. (1987) Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5063 - 5067.

Takenawa, T., Saito, M., Nagai, Y. y Egawa, K. (1977) Solubilization of the enzyme catalyzing CDP-diglyceride-independent incorporation of myo-inositol into phosphatidyl inositol and its comparison to CDP-diglyceride: inositol transferase. Arch. Biochem. Biophys. 182: 244 - 250.

Taylor, D., Uhing, R.J., Blackmore, P.F., Prepié, V. y Exton, J.H. (1985) Insulin and epidermal grow fractor do not affect phosphoinositide metabolism in rat liver plasma membranes and hepatocytes. J. Biol. Chem. 260: 2011 - 2014.

Tooke, N.F., Hales, C.N. y Hutton, J.C. (1984) Ca^{2+} -sensitive phosphatidylinositol 4-phosphate metabolism in rat β -cell. Biochem. J. 219: 471 - 480.

Ulisse, S., Fabbri, A., Dufau, M.L. (1989) Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat Leydig cells. J. Biol. Chem. 264: 2156 - 2163.

Ureta, T., Radojkovic, J. (1979) Frog oocytes: a model system for in vivo studies on the regulation of glucose metabolism. Acta Cient. Venezolana 30: 396 - 400.

Urumow, T. y Wieland, O.H. (1986) Stimulation of phosphatidylinositol 4-phosphate phosphorylation in human placenta membranes by GTP- γ -S. FEBS Lett 207: 253 - 257.

Van Rooijen, L.A., Rossowska, M. y Bozan, N.G. (1985) Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase by its product phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 126: 150 - 155.

Van Dongen, C.J., Zwiers, H., De Graan, P.N. y Gispen, W.H. (1985) Modulation of the activity of purified phosphatidylinositol 4-phosphate kinase by phosphorylated and dephosphorylated B-50 proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 128: 1219 - 1227.

Varela, I., Van Lookeren Campagne, M.M., Alvarez, J.F. y Mato, J.M. (1987) The developmental regulation of phosphatidylinositol kinase in Dictyostelium discoideum. FEBS Lett. 211: 64 - 68.

Vogel, S. y Hoppe, J. (1986) Polyamines stimulate the phosphorylation of phosphatidylinositol in membranes from A431 cells. Eur. J. Biochem. 154: 253 - 257.

Volpe, P., Krause, K-H., Hashimoto, S., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldolesi, J. y Lew, D.P. (1988) "Calciosome", a cytoplasmic organelle: The inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store of nonmuscle cells? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1091 - 1095.

Wahl, M. y Carpenter, G. (1988) Regulation of epidermal growth factor-stimulated formation of inositol phosphates in A-431 cells by calcium and protein kinase C. J. Biol. chem. 263: 7581 - 7590.

Walseth, T.F. y Johnson, R.A. (1979) The enzymatic preparation of α - ^{32}P nucleoside triphosphates, cyclic ^{32}P AMP, and cyclic ^{32}P GMP. Bioch. et Biophys. Acta 562: 11 - 31.

Wasserman, W.J. y Masui, U. (1975) Initiation of meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes by the combination of divalent cations and ionophore A23187. J. Exp. Zool. 193: 369 - 375.

Wasserman, W.J., Pinto, L.H., O'Connor, C.M. y Smith, L.D. (1980) Progesterone induces a rapid increase in $(Ca^{2+})_i$ of Xenopus laevis oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 1534 - 1536.

Wasserman, W.J., Richter, J.D. y Smith, L.D. (1982) Protein synthesis during maturation promoting factor- and progesterone-induced maturation in Xenopus oocytes. Dev. Biol. 89: 152 - 158.

Whipps, D.E., Armston, A.E. Pryor, H.J. y Halestrap, A.P. (1987) Effects of glucagon and Ca^{2+} on the metabolism of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in isolated rat hepatocytes and plasma membranes. *Biochem. J.* 241: 835 - 845.

Whitman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T. y Cantley, L. (1988) Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 332: 644 - 646.

Whitman, M., Kaplan, D., Cantley, L., Roberts, T.M. y Schiffhausen, B. (1986) Phosphoinositide kinase activity and transformation. *Fed. Proc.* 45: 2647 - 2652.

Williams, S.F. y Schacht, J. (1986) Binding of neomycin and calcium to phospholipids and other anionic compounds. *J. Antibiotics.* XXXIX: 457 - 462.

Wolfman, A. y Macara, I.G. (1987) Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in ras-transformed fibroblasts. *Nature* 325: 359 - 361.

Yamaguchi, K., Hirata, M. y Kuriyama, H. (1988) Purification and characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase from pig aortic smooth muscle. *Biochem. J.* 251: 129 - 134.

Yeagle, P.L. (1989) Lipid regulation of cell membrane structure and function. FASEB J. 3: 1833 - 1842.

Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Rouvier, M., Lefkowitz, R.J., y Caron, M.G. (1987) Cross-talk between cellular signalling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation. Nature 327: 67 - 70.

Zick, Y., Spiegel, A.M. y Sagi-Eisenberg, R. (1987) Insulin-like growth factor I receptors in retinal rod outer segments. J. Biol. Chem. 262: 10259 - 10264.

Zick, Y., Sagi-Eisenberg, R., Pines, M., Giershick, P. y Spiegel A.M. (1986) Multisite phosphorylation of the α subunit of transducin by insulin receptor kinase and protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci USA 83: 9294 - 9297.