

UCH-FC

DOC-B

3 15

C 1

**METABOLISMO DEL FOSFATIDILINOSITOL-4-MONOFOSFATO EN
MEMBRANAS AISLADAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis***

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

GERMAINE JACOB AHUMADA

Diciembre 1992

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

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada por la candidata:

GERMAINE JACOB AHUMADA

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

Director de Tesis:

Dr. Jorge E. Allende R.

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Nibaldo Inestroza

Dr. Enrique Jaimovich

Dr. Mario Sapag-Hagar

Dr. Tito Ureta

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

AGRADECIMIENTOS

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

Deseo agradecer también, en forma muy especial, a mis compañeros de laboratorio, por el estímulo y apoyo que siempre recibí de ellos.

Hago extensivos mis agradecimientos:

A Mónica Jiménez y a Rodrigo Young, por su valiosa asistencia en parte del trabajo experimental de esta tesis.

A Erica Johannsen y a Monique Forton, por su permanente disposición de colaboración y estímulo.

A Santiago Leyton, por su excelente trabajo en la transcripción de esta tesis, así como también a José Mondaca, por su diligencia en la confección de los esquemas y figuras.

INDICE DE MATERIAS

	página
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xviii
SUMMARY	xxii
INTRODUCCION	1
A.- ESQUEMA GENERAL E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LOS FOSFOLIPIDOS DE INOSITOL	1
B.- METABOLISMO DE FOSFOINOSITIDOS	8
B.1. Síntesis de fosfatidilinositol 4-monofos- fato y su utilización para la generación de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato	8
B.2. Síntesis de fosfoinosítidos fosforilados en la posición 3 del inositol	12
B.3. Hidrólisis de fosfoinosítidos catalizada por la fosfolipasa C	14
B.3.1. Las isoformas de la enzima	14
B.3.2. Especificidad de sustrato	15
B.3.3. Regulación de la fosfolipasa C- β	19
B.3.4. Regulación de la fosfolipasa C- γ	21
B.3.5. Regulación de la fosfolipasa C- δ	23
B.4. Hidrólisis de fosfoinosítidos catalizada por fosfomonoesterasas	23
C.- METABOLISMO DE INOSITOL FOSFATOS. ACCION DE FOSFOMONOESTERASAS	26
C.1. La inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa	26
C.2. La inositol polifosfato 1-fosfomonoesterasa	28
C.3. La inositol monofosfato fosfomonoesterasa	28

D.-	EL OOCITO DE <i>Xenopus laevis</i> Y EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES EXTRACELULARES	29
D.1.	La maduración meiótica del oocito	29
D.2.	Papel de los fosfoinosítidos en la trans- ducción de señales en el oocito	33
D.3.	Metabolismo de fosfoinosítidos e inositol fosfatos en el oocito de <i>Xenopus laevis</i>	35
	OBJETIVOS DE LA TESIS	38
	MATERIALES Y METODOS	40
A.-	REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION	40
B.-	OBTENCION DE [γ - ³² P] ATP	42
B.1.	Síntesis enzimática	42
B.2.	Análisis de la pureza y cuantificación del [γ - ³² P] ATP	44
C.-	OBTENCION DE [4- ³² P] FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO	45
C.1.	Síntesis enzimática	47
C.2.	Extracción de los fosfoinosítidos	47
C.3.	Purificación del [4- ³² P] fosfatidilinositol 4-monofosfato sintetizado	48
C.4.	Extracción del [4- ³² P] fosfatidilinositol 4-monofosfato desde la placa cromatográfica preparativa	49
C.5.	Análisis de la pureza del [4- ³² P] fosfatidilino- sitol 4-monofosfato sintetizado	50
D.-	PREPARACION DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	51
D.1.	Obtención de ovarios de <i>Xenopus laevis</i>	51
D.2.	Obtención de oocitos	51
D.3.	Fraccionamiento celular	52
E.-	EXTRACCION DE FOSFOINOSITIDOS, INOSITOL FOS- FATOS, INOSITOL Y FOSFATO INORGANICO. METODO UTILIZADO EN LOS ENSAYOS ENZIMATICOS	53
F.-	SEPARACION DE LOS FOSFOINOSITIDOS POR CROMATO- GRAFIA EN CAPA FINA. METODO UTILIZADO EN LOS ENSAYOS ENZIMATICOS	55

G.-	SEPARACION DE INOSITOL FOSFATOS, INOSITOL Y FOSFATO INORGANICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION. METODO UTILIZADO EN LOS ENSAYOS ENZIMATICOS	56
H.-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-QUINASA. INCORPORACION DE [³² P] FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO	58
H.1.	Incubación de membranas	58
H.2.	Extracción de los fosfoinosítidos	58
H.3.	Separación de los fosfoinosítidos	58
I.-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO 5-QUINASA. INCORPORACION DE [³² P] FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO	60
I.1.	Incubación de membranas	60
I.2.	Extracción de los fosfoinosítidos	61
I.3.	Separación de los fosfoinosítidos	61
J.-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA	61
J.1.	Ensayo utilizando sustrato endógeno	61
J.1.1.	Incubación de membranas	63
J.1.2.	Extracción de los fosfoinosítidos	63
J.1.3.	Separación de los fosfoinosítidos	63
J.2.	Ensayo utilizando sustrato exógeno	63
J.2.1.	Incubación de membranas	64
J.2.2.	Extracción de fosfoinosítidos y fosfato inorgánico	65
J.2.3.	Separación de los fosfoinosítidos	65
J.2.4.	Separación del fosfato inorgánico	65
K.-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS FOSFOMONOESTERASAS DE LOS INOSITOL FOSFATOS	65
K.1.	Determinación de la actividad de la inositol 1,4-bisfosfato fosfomonoesterasa	65
K.1.1.	Incubación de membranas	66
K.1.2.	Extracción de inositol fosfatos e inositol	66
K.1.3.	Separación de inositol fosfatos e inositol	66
K.2.	Determinación de la presencia de otras fosfomonoesterasas que hidrolizan inositol fosfatos	69
K.2.1.	Incubación de membranas	69
K.2.2.	Extracción de inositol fosfatos e inositol	70
K.2.3.	Separación de inositol fosfatos e inositol	70

L.-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C	70
L.1.	Ensayo utilizando fosfatidilinositol como sustrato	70
L.1.1.	Incubación de membranas	71
L.1.2.	Extracción de fosfoinosítidos, inositol 1-monofosfato e inositol	73
L.1.3.	Separación de los fosfoinosítidos	73
L.1.4.	Separación de inositol 1-monofosfato e inositol	74
L.2.	Ensayo utilizando fosfatidilinositol 4-monofosfato como sustrato	74
L.2.1.	Incubación de membranas	74
L.2.2.	Extracción de fosfoinosítidos e inositol fosfatos	76
L.2.3.	Separación de los fosfoinosítidos	76
L.2.4.	Separación de los inositol fosfatos	76
L.3.	Ensayo utilizando fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato como sustrato	77
L.3.1.	Incubación de membranas	77
L.3.2.	Extracción de fosfoinosítidos e inositol fosfatos	78
L.3.3.	Separación de los fosfoinosítidos	79
L.3.4.	Separación de los inositol fosfatos	79
M.-	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILILCICLASA	79
N.-	DETERMINACION DEL CALCIO TOTAL	80
O.-	DETERMINACION DE PROTEINAS	80
P.-	CUANTIFICACION DE LOS COMPUESTOS RADIATIVOS	80
Q.-	AUTORRADIOGRAFIAS	80
R.-	TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS	81
	RESULTADOS	82
A.-	ESTUDIOS SOBRE LAS RUTAS METABOLICAS EN QUE PARTICIPA EL FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	82
A.1.	Identificación de fosfatidilinositol 4-monofosfato como el producto generado en membranas de oocitos por la fosfatidilinositol quinasa	84

A.2.	Presencia de una actividad que degrada al fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos	86
A.3.	Cinética de degradación del fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos	86
A.4.	Degradación del [4- ³² P] fosfatidilinositol 4-monofosfato exógeno	89
A.5.	Degradación del fosfatidil [2- ³ H] inositol 4-monofosfato exógeno	91
A.6.	Hidrólisis del fosfatidil [2- ³ H] inositol exógeno	96
A.7.	Presencia en las membranas de oocitos de fosfomonoesterasas que hidrolizan a los inositol fosfatos	98
A.7.1.	Hidrólisis del inositol mono, bis y tris fosfato	98
A.7.2.	Hidrólisis del inositol 1,4-bisfosfato	100
A.8.	Transformación del fosfatidilinositol 4-monofosfato en fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato	102
B.-	CARACTERISTICAS DE LA FOSFOMONOESTERASA QUE HIDROLIZA AL FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO	108
B.1.	Análisis del efecto de cationes	108
B.2.	Determinación del pH óptimo	109
B.3.	Efecto de neomicina y de poliaminas	113
B.4.	Efecto de inhibidores de fosfomonoesterasas	113
B.5.	Efecto de diferentes metabolitos fosforilados	118
B.6.	Efecto de fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol	120
B.7.	Actividad de la fosfomonoesterasa de en presencia progesterona, insulina y acetilcolina	123
C.-	EFEECTO DE METABOLITOS FOSFORILADOS Y DE FLUORURO, TARTRATO Y FOSFATO SOBRE OTRAS REACCIONES DEL METABOLISMO DE FOSFOINOSITIDOS E INOSITOL FOSFATOS EN MEMBRANAS DE OOCITOS	126
C.1.	Efecto de fluoruro, tartrato y fosfato sobre la incorporación de [³² P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato	126
C.2.	Efecto de metabolitos fosforilados sobre la incorporación de [³² P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato	126
C.3.	Efecto de fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol sobre la incorporación de [³² P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato	130
C.4.	Efecto de fructosa 1,6-bisfosfato sobre las fosfomonoesterasas que hidrolizan a los inositol fosfatos	132

D.-	CARACTERISTICAS DE LA ACTIVIDAD FOSFO- LIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS	135
D.1.	Actividad de la fosfolipasa C utilizando como sustratos fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4-monofosfato y fosfatidilinositol 4,5-bisfos- fato	135
D.2.	Cinética de la reacción catalizada por la fosfolipasa C	139
D.3.	Efecto del Ca ⁺²	141
D.4.	Efecto del pH	143
D.5.	Efecto de poliaminas y neomicina	143
D.6.	Efecto de fosfolípidos	146
D.7.	Actividad de la fosfolipasa C en presencia de hormonas y acetilcolina	154
	DISCUSION	160
A.-	ESTUDIOS SOBRE LAS RUTAS METABOLICAS EN QUE PARTICIPA EL FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	160
A.1.	Las quinasas que catalizan la síntesis y la fosforilación del fosfatidilinositol 4-monofosfato	160
A.2.	La hidrólisis del fosfatidilinositol 4-monofosfato	167
B.-	PROPIEDADES DE LA FOSFOMONOESTERASA QUE CATALIZA LA HIDROLISIS DEL FOSFATIDIL- INOSITOL 4-MONOFOSFATO	172
C.-	EFFECTO DE INTERMEDIARIOS FOSFORILADOS SOBRE LA INCORPORACION DE [³² P] FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO	182
D.-	LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS	187
	CONCLUSIONES	205
	BIBLIOGRAFIA	209

LISTA DE TABLAS

		página
TABLA I	Hidrólisis del fosfatidil [2- ³ H] inositol 4-monofosfato: productos de naturaleza lipídica	93
TABLA II	Actividades de la fosfatidilinositol 4-quinasa y la fosfatidilinositol 4-monofosfato 5-quinasa en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> y sobrenadante de 100000 x g	103
TABLA III	Actividad de la fosfatidilinositol 4-monofosfato 5-quinasa de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> bajo distintas condiciones experimentales y comparación con la actividad de la fosfatidilinositol 4-quinasa . .	105
TABLA IV	Efecto de cationes sobre la actividad de la fosfatidilinositol 4-monofosfato fosfo monoesterasa de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	110
TABLA V	Efecto de fluoruro, tartrato y fosfato sobre la incorporación de [³² P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> . .	127
TABLA VI	Efecto de fosfolípidos sobre la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> (sustrato: Ptd [2- ³ H] Ins)	151
TABLA VII	Efecto de ácido fosfatídico sobre la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> (sustrato: Ptd [2- ³ H] Ins 4,5-P ₂)	153
TABLA VIII	Actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> en presencia de posibles reguladores y controles referentes a adenililciclasa (sustrato: Ptd [2- ³ H] Ins)	155
TABLA IX	Actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> en presencia de posibles reguladores y controles referentes a adenililciclasa (sustrato: Ptd [2- ³ H] Ins 4,5-P ₂)	158

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

		página
ESQUEMA I	Activación de la fosfolipasa C, generación de los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol y respuesta celular	2
ESQUEMA II	Metabolismo de los fosfoinosítidos e inositol fosfatos	5
ESQUEMA III	Diferentes vías propuestas para la síntesis de los fosfoinosítidos fosforilados en la posición 3 del inositol	13
ESQUEMA IV	Síntesis de [γ - ³² P] ATP	43
ESQUEMA V	Síntesis de [4- ³² P] fosfatidilinositol 4-monofosfato	46
ESQUEMA VI	Ensayo de la actividad de la fosfatidilinositol 4-quinasa	59
ESQUEMA VII	Ensayo de la actividad de la fosfatidilinositol 4-monofosfato fosfomonoesterasa	62
ESQUEMA VIII	Ensayo de la actividad de las fosfomonoesterasas de los inositol fosfatos	67
ESQUEMA IX	Ensayo de la actividad de la fosfolipasa C	72
ESQUEMA X	Rutas metabólicas del fosfatidilinositol 4-monofosfato	83
ESQUEMA XI	Interconexión propuesta entre las vías de transducción de señales que involucran a la fosfolipasa C y a la fosfolipasa D	195
FIGURA 1	Efecto de adenosina y ADP sobre la actividad de la fosfatidilinositol quinasa de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	85
FIGURA 2	Degradación del fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	87

FIGURA 3	Cinética de degradación del [4- ³² P] fosfatidilinositol 4-monofosfato endógeno en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	88
FIGURA 4	Análisis por HPLC de los productos radiactivos solubles en la fase acuosa luego de la hidrólisis del [4- ³² P] fosfatidilinositol 4-monofosfato exógeno por membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	90
FIGURA 5	Análisis por HPLC de los productos radiactivos solubles en la fase acuosa luego de la hidrólisis del fosfatidil [2- ³ H] inositol 4-monofosfato exógeno por membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	95
FIGURA 6	Análisis por HPLC de los productos radiactivos solubles en la fase acuosa luego de la hidrólisis del fosfatidil [2- ³ H] inositol exógeno por membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	97
FIGURA 7	Hidrólisis de inositol fosfatos por fosfomonoesterasas presentes en las membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	99
FIGURA 8	Hidrólisis del [2- ³ H] inositol 1,4-bisfosfato por fosfomonoesterasas presentes en las membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	101
FIGURA 9	Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatidilinositol 4-monofosfato fosfomonoesterasa de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	112
FIGURA 10	Efecto de neomicina y poliaminas sobre la actividad de la fosfatidilinositol 4-monofosfato fosfomonoesterasa de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	114
FIGURA 11	Efecto de fluoruro, tartrato y fosfato sobre la actividad de la fosfatidilinositol 4-monofosfato fosfomonoesterasa de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	116

FIGURA 12	Efecto de hexosas bisfosfato sobre la actividad de la fosfatidilinositol 4-monofosfato fosfomonoesterasa de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	119
FIGURA 13	Efecto de α -glicerolfosfato y β -glicerolfosfato sobre la actividad de la fosfatidilinositol 4-monofosfato fosfomonoesterasa de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	121
FIGURA 14	Efecto de fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol sobre la cinética de degradación del [4- 32 P] fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	122
FIGURA 15	Efecto de progesterona, insulina y acetilcolina + GTP- γ -S sobre la cinética de degradación del [4- 32 P] fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	124
FIGURA 16	Efecto de hexosas bis y monofosfato sobre la incorporación de [32 P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	129
FIGURA 17	Efecto de α -glicerolfosfato y β -glicerolfosfato sobre la incorporación de [32 P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	131
FIGURA 18	Efecto de fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol sobre la incorporación de [32 P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	133
FIGURA 19	Efecto de fructosa 1,6-bisfosfato sobre la hidrólisis de inositol fosfatos por fosfomonoesterasas presentes en las membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	134
FIGURA 20	Actividad de la fosfolipasa C en membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	136

FIGURA 21	Acción de la fosfolipasa C sobre fosfatidilinositol y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en función del tiempo de incubación	140
FIGURA 22	Efecto de Ca^{+2} sobre la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i>	142
FIGURA 23	Efecto del pH sobre la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> (sustrato: PtdIns [2- 3 H] Ins)	144
FIGURA 24	Efecto de poliaminas sobre la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> (sustrato: PtdIns [2- 3 H] Ins)	145
FIGURA 25	Efecto de polilisina sobre la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> (sustrato: PtdIns [2- 3 H] Ins)	147
FIGURA 26	Efecto de neomicina sobre la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> (sustrato: PtdIns [2- 3 H] Ins)	148
FIGURA 27	Efecto de ácido fosfatídico sobre la actividad fosfolipasa C de membranas de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> (sustrato: PtdIns [2- 3 H] Ins)	149

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
AMP	adenosina 5'-monofosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CDP-DAG	citidina difosfato-diacilglicerol
Ci	Curie
cpm	cuentas por minuto
Chaps	3-[(3-colamido propil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DAG	diacilglicerol
dpm	desintegraciones por minuto
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicol bis-(β -amino etil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
GDP	guanosina 5'-difosfato
GDP- β -S	guanosina 5'-[β -tio] difosfato
GTP	guanosina 5'-trifosfato
GTP- γ -S	guanosina 5'-[γ -tio] trifosfato

Hepes	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'- 2-etanosulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
IGF-1	factor de crecimiento semejante a insulina-1
Ins 1-P	inositol 1-monofosfato
Ins 2-P	inositol 2-monofosfato
Ins 4-P	inositol 4-monofosfato
Ins 1,3-P ₂	inositol 1,3-bisfosfato
Ins 1,4-P ₂	inositol 1,4-bisfosfato
Ins 1,3,4-P ₃	inositol 1,3,4-trisfosfato
Ins 1,4,5-P ₃	inositol 1,4,5-trisfosfato
Ins 1,3,4,5-P ₄	inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato
Ins 1:2,4,5-P ₃	inositol 1:2,4,5-trisfosfato cíclico
kDa	kiloDalton
K _m	constante de Michaelis
liso PtdIns	lisofosfatidilinositol
liso PtdIns 4-P	lisofosfatidilinositol 4-monofosfato
MPF	factor promotor de la maduración
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido
NGF	factor de crecimiento neural
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
P _i	fósforo inorgánico

PM	peso molecular
POPOP	1,4-bis (5-fenil-2-oxazolil) benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
pp60 ^{v-src}	proteína producto del oncogen src viral
PtdOH	ácido fosfatídico
PtdIns	fosfatidilinositol
PtdIns 3-P	fosfatidilinositol 3-monofosfato
PtdIns 4-P	fosfatidilinositol 4-monofosfato
PtdIns 3,4-P ₂	fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato
PtdIns 4,5-P ₂	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PtdIns 3,4,5-P ₃	fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
U.V.	ultravioleta
Vmax	velocidad máxima

RESUMEN

El oocito de *Xenopus laevis* es una célula ampliamente utilizada para el estudio de la transducción de señales extracelulares puesto que posee receptores para acetilcolina, progesterona e insulina y, además, la microinyección de una serie de mRNA exógenos correspondientes a diversos receptores de membrana conduce a la expresión funcional de ellos. El receptor endógeno para acetilcolina y varios receptores expresados en esta célula están acoplados a la fosfolipasa C, de forma tal que la estimulación del sistema conduce a la producción de inositol 1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol, dos moléculas que actúan como segundos mensajeros intracelulares. Así, el oocito presenta una serie de ventajas y aspectos de interés para el estudio del papel de los fosfoinosítidos e inositol fosfatos en la transducción de señales. Sin embargo, estos estudios requieren un conocimiento previo sobre las transformaciones metabólicas que sufren estos compuestos en el oocito y hasta la fecha existía escasa información al respecto.

Trabajos previos de este laboratorio habían demostrado que al incubar membranas aisladas de oocitos de *Xenopus laevis* con [γ - ^{32}P] ATP se sintetiza [^{32}P] fosfatidilinositol monofosfato a partir del fosfatidilinositol endógeno de la membrana. Esta reacción es inicialmente rápi-

da, pero a partir de los 5 minutos la formación del producto pierde su linealidad debido a que el [^{32}P] fosfatidilinositol monofosfato comienza a ser degradado por la misma preparación de membranas. De aquí surgió el objetivo central de esta tesis, el cual fue estudiar la degradación de dicho compuesto (que mayoritariamente resultó ser fosfatidilinositol 4-monofosfato) en membranas aisladas de oocitos, con el propósito de definir las vías que dan cuenta de su metabolización en este sistema. También se propuso estudiar algunas de las enzimas involucradas, con el de caracterizarlas y analizar posibles factores hormonales o metabolitos que pudieran estar regulando su actividad.

A través de este estudio se pudo establecer que el fosfatidilinositol 4-monofosfato, sintetizado como se señaló a partir del fosfatidilinositol endógeno de la membrana y ATP, o bien agregado exógenamente, es mayoritariamente degradado en las membranas aisladas de oocitos a través de una reacción hidrolítica catalizada por una fosfomonoesterasa, siendo los productos fosfatidilinositol y fosfato inorgánico. Esto ocurre en las mismas condiciones en que se observa la síntesis del compuesto, es decir, en presencia de Mg^{+2} y en ausencia de Ca^{+2} agregado (el calcio total endógeno es $15 \mu\text{M}$).

Además, en las condiciones ya señaladas de Ca^{+2} y Mg^{+2} , existe una pequeña pero significativa hidrólisis del fosfatidilinositol 4-monofosfato, catalizada por una actividad fosfolipasa C, con la generación de inositol 1,4-bisfosfato.

Por otra parte, se demostró que el fosfatidilinositol que resulta de la degradación del fosfatidilinositol 4-monofosfato, es a su vez hidrolizado a través de la acción de una actividad fosfolipasa C para formar inositol 1-monofosfato, el cual es degradado hasta inositol libre por una fosfomonoesterasa presente en las membranas de oocito. En este sistema también se encontraron fosfomonoesterasas capaces de hidrolizar inositol 1,4,5-trisfosfato e inositol 1,4-bisfosfato hasta inositol.

Una vez establecidas las reacciones que dan cuenta de la degradación del fosfatidilinositol 4-monofosfato, se procedió a estudiar dos enzimas involucradas en el proceso, la fosfatidilinositol 4-monofosfato fosfomonoesterasa y la fosfolipasa C.

La actividad fosfomonoesterásica de las membranas de oocitos no requiere Ca^{+2} ni Mg^{+2} , presenta un pH óptimo entre 7 y 8, es inhibida por fosfato inorgánico y estimulada por tartrato, mientras el fluoruro presenta un efecto estimulador o inhibidor según su concentración. La actividad enzimática es fuertemente inhibida por fructosa 1,6-bisfosfato y por α -glicerolfosfato, efecto que no se observa con otras hexosas mono o bisfosfato, β -glicerolfosfato, fosfatidilglicerol ni cardiolipina.

La neomicina resultó ser un inhibidor de la actividad fosfomonoesterásica, pero a bajas concentraciones ejerce un efecto activador. A su vez, la espermina y la espermidina

también disminuyen la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-monofosfato.

La acetilcolina en presencia de GTP- γ -S, la progesterona y la insulina no alteran la actividad de la enzima.

En cuanto a la actividad de la fosfolipasa C presente en las membranas del oocito, también fue caracterizada parcialmente, en especial con respecto a su acción sobre fosfatidilinositol. Con este sustrato, la enzima presenta una actividad significativa en ausencia de Ca^{+2} , aumentando al doble con Ca^{+2} 100 μM . Con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato como sustrato, la enzima es totalmente dependiente de Ca^{+2} , presentando la máxima actividad a 50 μM .

La actividad enzimática es afectada por polilisina, poliaminas y neomicina, de las cuales la polilisina, la espermina y la neomicina presentan efecto activador o inhibidor, en diferentes grados, según las concentraciones utilizadas, mientras que la espermidina sólo ejerce una acción estimuladora.

La hidrólisis del fosfatidilinositol y del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en este sistema de membrana aislada no es afectada por GTP- γ -S, acetilcolina o carbamilcolina, progesterona ni insulina.

La actividad de la fosfolipasa C es estimulada en forma importante por el ácido fosfatídico, aumentando al doble con una concentración de 700 μM , usando fosfatidilinositol como sustrato. Este efecto parece ser específico, puesto que no se obtiene con ningún otro fosfolípido ensayado.

SUMMARY

Oocytes obtained from the amphibian *Xenopus laevis* are widely used for the study of transduction of external signals, since they possess acetylcholine, progesterone and insulin receptors and, in addition, have the capacity for expressing functional receptors from their microinjected mRNAs. The endogenous receptor for acetylcholine and several receptors expressed in these cells are coupled to phospholipase C and the stimulation of the system results in the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol, two molecules which function as intracellular second messengers. Thus, the oocyte system presents several advantageous and interesting features for the study of the role of phosphoinositides and inositol phosphates in signal transduction. These studies require a previous knowledge of the metabolic transformations of these compounds in the oocyte, however, only limited information has been available in this area.

Previous studies from this laboratory have demonstrated that the incubation of isolated membranes from *Xenopus laevis* oocytes with [γ - 32 P] ATP yields radiolabeled phosphatidylinositol monophosphate from endogenous phosphatidylinositol. This reaction is initially rapid, but after 5 minutes of

incubation the formation of the product phosphatidylinositol 4-monophosphate loses linearity due to its degradation by the same membrane fractions. The central objective of this thesis emerged from these results, that is, the study of the degradation of phosphatidylinositol monophosphate (which proved to be mainly phosphatidylinositol 4-monophosphate) in isolated oocyte membranes in order to define the pathways that are responsible for its metabolism in this system. In addition, the characterization of some enzymes involved in that process and the effect of additional factors which may act to regulate their activity was also proposed.

During these studies it was shown that phosphatidylinositol 4-monophosphate, synthesized from endogenous phosphatidylinositol and ATP, or added exogenously, is preferentially degraded in isolated oocyte membranes through a hydrolytic reaction catalyzed by a phosphomonoesterase to form phosphatidylinositol and inorganic phosphate. This occurs under the same conditions in which the synthesis of the compound is observed, that is with Mg^{2+} and without added Ca^{2+} (endogenous Ca^{2+} 15 μM total).

In addition, in the conditions previously indicated of Mg^{2+} and Ca^{2+} , there is a small but significant hydrolysis of phosphatidylinositol 4-monophosphate, through a phospholipase C activity, to give inositol 1,4-bisphosphate.

The present work has also demonstrated that the phosphatidylinositol produced from phosphatidylinositol 4-mo-

nophosphate is subsequently hydrolyzed to form inositol 1-monophosphate, which is in turn degraded to free inositol by a phosphomonoesterase of the oocyte membrane. Also confirmed in the system was the presence of phosphomonoesterases that can hydrolyze inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,4-bisphosphate to produce free inositol.

Once the reactions responsible for the degradation of phosphatidylinositol 4-monophosphate in the isolated oocyte membranes were established, the next approach was to study two enzymes involved in the degradation of that phosphoinositide, the phosphomonoesterase that hydrolyzes the phosphatidylinositol 4-monophosphate and the oocyte phospholipase C.

The phosphomonoesterase that hydrolyzes the phosphatidylinositol 4-monophosphate does not require Ca^{2+} or Mg^{2+} , exhibits a pH optimum between 7 and 8, is inhibited by inorganic phosphate and stimulated by tartrate, while fluoride increases or decreases its activity depending on the concentration of this ion.

Fructose 1,6-bisphosphate and α -glycerolphosphate are potent inhibitors of the enzyme and this effect is not observed with other hexoses mono- or bisphosphate, β -glycerolphosphate, phosphatidylglycerol or diphosphatidylglycerol.

Neomicyn was shown to be an inhibitor of the phosphomonoesterase but it is an activator at low concentrations. Spermine and spermidine also decrease the hydrolysis of phosphatidylinositol 4-monophosphate.

On the other hand, the presence of GTP- γ -S, acetylcholine, progesterone or insulin does not modify the phosphomonoesterase activity.

The phospholipase C activity of the oocyte membranes was also partially characterized, principally using phosphatidylinositol as a substrate. The enzyme has a significant activity for phosphatidylinositol degradation in the absence of Ca^{2+} , increasing 2-fold at 100 μM . On the other hand, the phospholipase C activity against exogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate presents a total dependence on Ca^{2+} , with an optimum concentration of 50 μM .

Polylysine, polyamines and neomicyn modify the phospholipase C activity. Polylysine, spermine and neomicyn act as activators or inhibitors to different degrees depending upon their concentrations, while the enzyme is stimulated by spermidine.

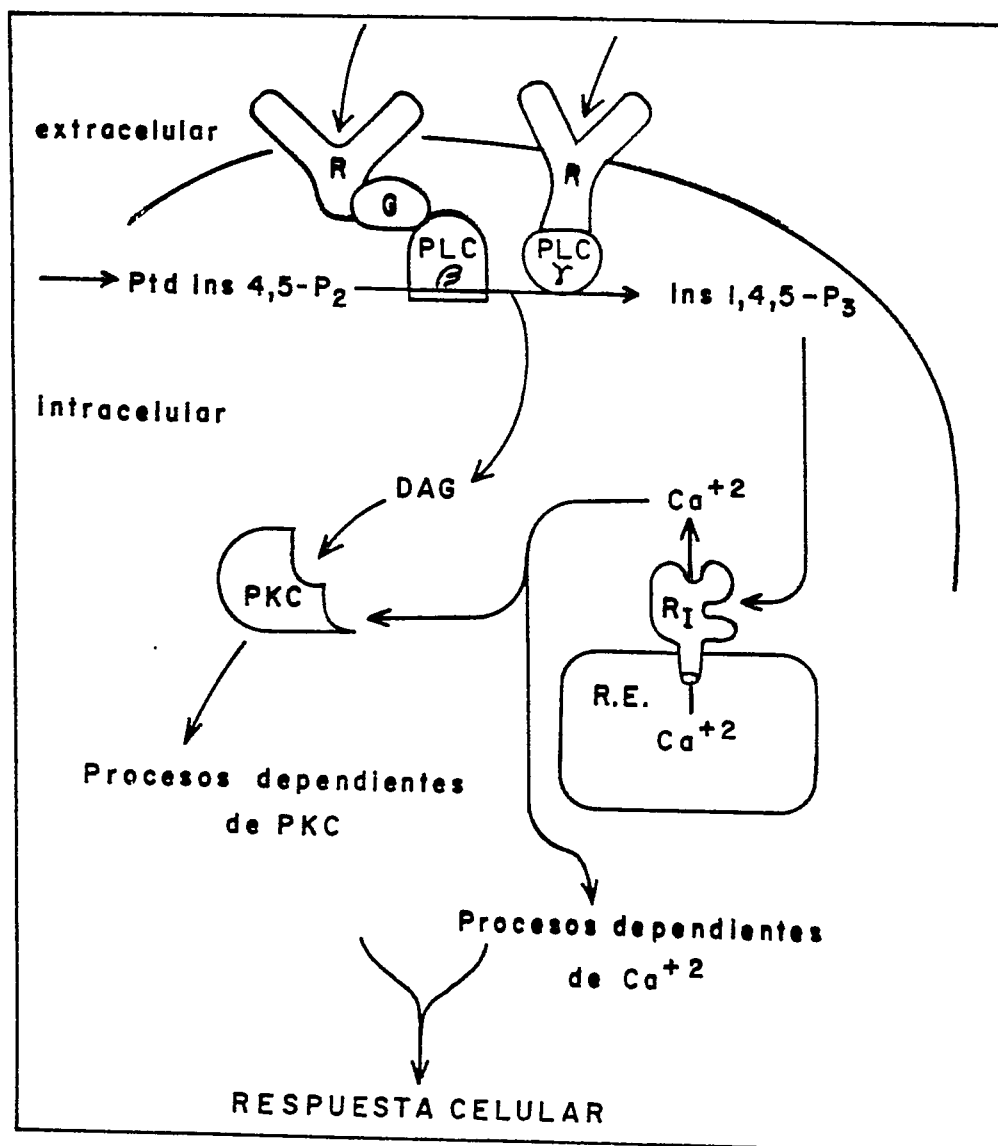
The hydrolysis of phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with the membrane fraction used in this work are not affected by GTP- γ -S, acetylcholine and/or carbamylcholine, progesterone or insulin.

Interestingly, phosphatidic acid is an effective activator of the phospholipase C, increasing its activity 2-fold at 700 μM and with phosphatidylinositol as substrate. This effect seems to be specific and it is not observed with other phospholipids tested.

INTRODUCCION

A.- ESQUEMA GENERAL E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LOS FOSFOLIPIDOS DE INOSITOL

El mecanismo de transducción de la señal extracelular de una serie de moléculas reguladoras, entre ellas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, involucra la hidrólisis y resíntesis de fosfolípidos de inositol presentes en la membrana celular. La activación de una variedad de receptores de la membrana conduce a la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns 4,5-P₂) por acción de una fosfodiesterasa específica (fosfolipasa C), con la generación de inositol 1,4,5-trisfosfato (Ins 1,4,5-P₃) y diacilglicerol (DAG), ambas moléculas con características de segundos mensajeros (Majerus, 1992). Como se muestra en el Esquema I, Ins 1,4,5-P₃ se une a receptores específicos que actúan como canales de Ca⁺² (Supattapone y col, 1988; Ferris y col, 1989; Barnard, 1992) provocando la liberación de Ca⁺² desde depósitos intracelulares, localizados probablemente en el retículo endoplásmico (Berridge e Irvine, 1989; Berridge, 1990). A su vez, DAG y Ca⁺² activan a la proteína quinasa C (Nishizuka, 1988; Rando, 1988). De esta manera se regula una



ESQUEMA I: ACTIVACION DE LA FOSFOLIPASA C, GENERACION DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS INOSITOL 1,4,5-TRISFOSFATO Y DIACILGLICEROL Y RESPUESTA CELULAR.

R = receptor; G = proteína G; PLC-β = fosfolipasa C-β; R' = receptor con actividad tirosina quinasa; PLC-γ = fosfolipasa C-γ; DAG = diacilglicerol; PKC = proteína quinasa C; R.E. = retículo endoplásmico; R_I = receptor para Ins 1,4,5-P₃.

serie de procesos celulares que incluye, entre otros, varias vías metabólicas, secreción de hormonas y neurotransmisores, contracción y proliferación celular (Rhee y Choi, 1992).

Los fosfolípidos de inositol son una fracción minoritaria de los fosfolípidos de la célula, constituyendo alrededor del 8% del total. Tres son los fosfoinosítidos cuantitativamente más importantes, fosfatidilinositol (PtdIns), fosfatidilinositol 4-monofosfato (PtdIns 4-P) y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, los cuales corresponden aproximadamente al 5-7%, 1% y 0,4% del total de los fosfolípidos, respectivamente (Majerus y col., 1984).

Se debe considerar, sin embargo, que hay datos experimentales que indican la existencia en la célula de diferentes compartimentos de fosfoinosítidos. En el caso del PtdIns los estudios realizados en células WRK-1 estimuladas con vasopresina indican que el compartimento sensible a hormonas correspondería a alrededor del 17% del total del PtdIns (Monaco, 1982; Monaco y Woods, 1983).

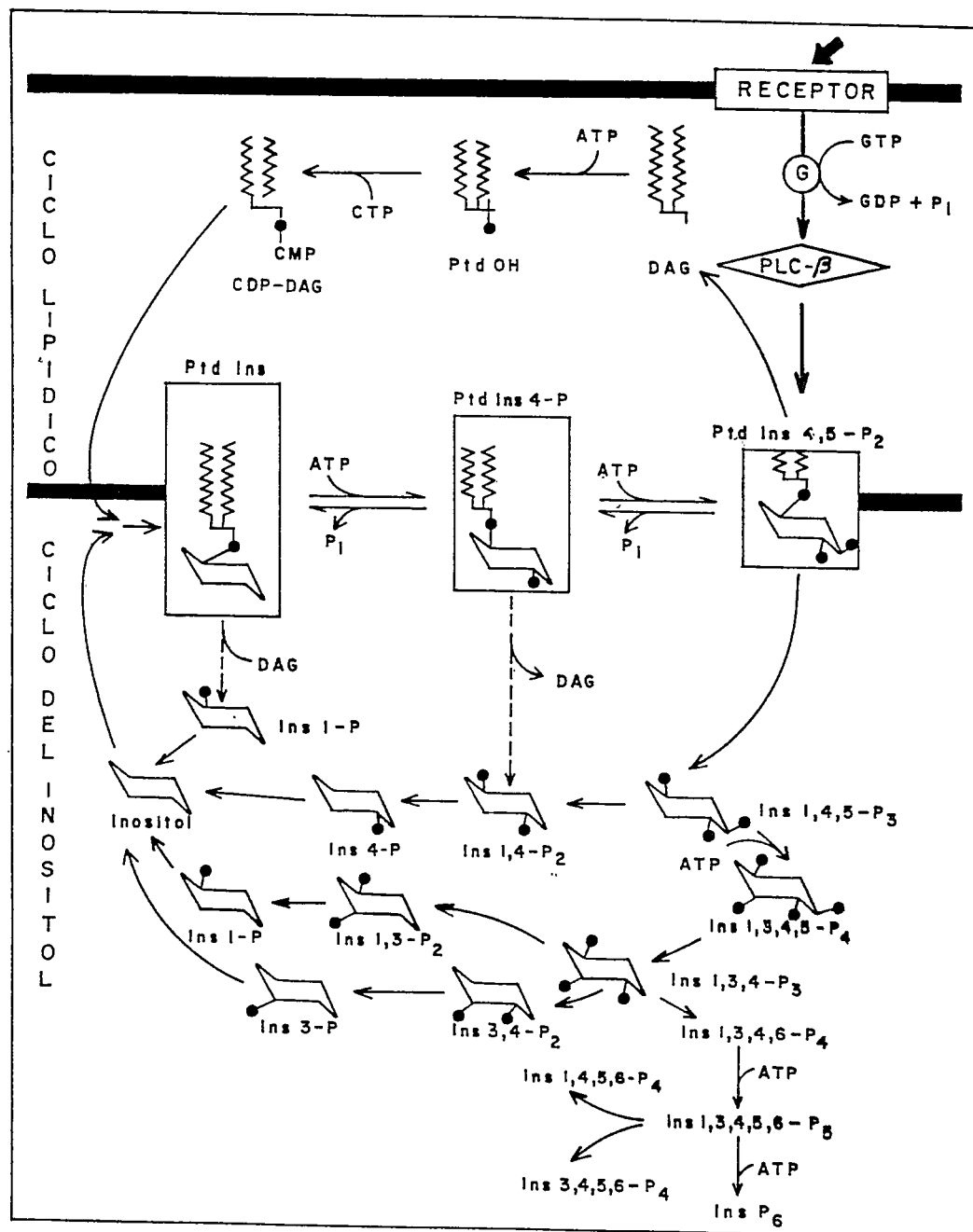
En el mismo tipo de células se ha demostrado que alrededor del 60% del PtdIns 4,5-P₂ intracelular proviene del conjunto de PtdIns sensible a hormonas, siendo este conjunto de PtdIns 4,5-P₂ también sensible a hormonas. Por su parte, el 40% restante del PtdIns 4,5-P₂ provendría del conjunto del PtdIns no sensible a hormonas y constituiría un compartimento estable en el tiempo y no afectado por vasopresina (Koreh y Monaco, 1986; Monaco, 1987).

Con respecto al PtdIns 4-P, el precursor del PtdIns 4,5-P₂, se han obtenido resultados experimentales que indican que en algunos tipos celulares sólo una pequeña fracción del monofosfato serviría como precursor del bisfosfato en células estimuladas. Tal es el caso de los linfocitos (Inokuchi e Imboden, 1990).

En cuanto a la localización subcelular, por muchos años se consideró que los fosfoinosítidos que participan en la respuesta frente a estímulos extracelulares se encontraban exclusivamente en la membrana plasmática (Sekar y Hokin, 1986). Esta visión está cambiando desde que el grupo de Irvine describió en 1991 la presencia de fosfolípidos de inositol en núcleos de células 3T3, los cuales participarían en la respuesta celular ante la unión del factor de crecimiento semejante a insulina-1 (IGF-1) a su receptor en la membrana plasmática (Divechea y col., 1991).

El PtdIns 4,5-P₂ y el Ins 1,4,5-P₃, así como también el DAG, los compuestos claves en la transducción de las señales a través de la membrana celular, son intermediarios de complejas rutas metabólicas en que participan los fosfoinosítidos y un elevado número de inositol fosfatos, entre mono y hexakisfosfatos. Una visión global del metabolismo de los compuestos derivados del inositol se presenta en el Esquema II.

En este esquema se puede apreciar que el PtdIns 4,5-P₂, precursor directo de los segundos mensajeros, se sintetiza a partir de PtdIns por medio de dos fosforilacio-



ESQUEMA II: METABOLISMO DE FOSFOINOSITIDOS E INOSITOL FOSFATOS.

G = proteína G; PLC-β = fosfolipasa C-β.

nes sucesivas, catalizadas por diferentes quinasas. Luego de ocurrida la hidrólisis del PtdIns 4,5-P₂, los dos segundos mensajeros generados pueden ser a su vez utilizados para la resíntesis de los fosfoinosítidos. En efecto, el Ins 1,4,5-P₃ es hidrolizado en forma secuencial para generar inositol libre, mientras el DAG se transforma en ácido fosfatídico (PtdOH) y luego en citidina difosfato-diacilglicerol (CDP-DAG). Finalmente, CDP-DAG e inositol constituyen los precursores directos del PtdIns, cerrándose así los denominados "ciclo de los inositol fosfatos" y "ciclo lipídico" (Berridge, 1987; Berridge e Irvine, 1989)

Además, como se observa en el Esquema II, las rutas metabólicas de los inositol fosfatos involucran también a los inositol tetra, penta y hexakisfosfatos. A éstos se deben agregar los inositol fosfatos cíclicos, los cuales no aparecen en dicho esquema.

Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado que se sintetizan también en la célula otros fosfoinosítidos, además de los mencionados anteriormente. Ellos son fosfatidilinositol 3-monofosfato (PtdIns 3-P), fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PtdIns 3,4-P₂) y fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PtdIns 3,4,5-P₃). El primero de ellos está siempre presente en las células (Cunningham y col., 1990), mientras que PtdIns 3,4-P₂ y PtdIns 3,4,5-P₃ se producen en forma transitoria en respuesta a agonistas y factores de crecimiento. Se ha postulado que estos fosfolípidos de inositol

participarían en la inducción de la mitogénesis, formando parte de un sistema de segundos mensajeros intracelulares (Ullrich y Schlessinger, 1990; Cantley y col., 1991), puesto que en células estimuladas por factores de crecimiento o en células transformadas con ciertos oncogenes existe un nivel elevado de ellos (Auger y col., 1989; Varticovski y col., 1989; Serunian y col., 1990). Sin embargo, su función en la célula no está aún totalmente dilucidada (Majerus, 1992). Estos fosfoinosítidos esterificados con fosfato en la posición 3 del anillo inositol están presentes en la célula en muy pequeña cantidad, representando sólo el 1 al 2% del nivel en que se encuentran los fosfoinosítidos anteriormente conocidos (Varticovski y col., 1989; Auger y col., 1989; Lips y col., 1989). Estos polifosfoinosítidos no son hidrolizados por las fosfolipasas C conocidas (Lips y col., 1989; Serunian y col., 1989) y por lo tanto no es evidente cómo podrían servir como precursores de algún inositol fosfato que constituya un segundo mensajero. Los inositol fosfatos que se derivarían de estos fosfoinosítidos por hidrólisis catalizada por una hipotética fosfolipasa C serían inositol 1,3-bisfosfato (Ins 1,3-P₂), inositol 1,3,4-trisfosfato (Ins 1,3,4-P₃) e inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (Ins 1,3,4,5-P₄), los cuales están presentes en la célula puesto que se forman en las reacciones del metabolismo de inositol fosfatos (Esquema II). En células estimuladas, el nivel de estos inositol fosfatos es 10-50 veces mayor que el de los fosfoinosítidos que los origi-

narían. (Majerus, 1992)

B.- METABOLISMO DE FOSFOINOSITIDOS

Hay una amplia literatura sobre el metabolismo de los fosfoinosítidos que sería difícil cubrir en detalle en la Introducción de esta tesis. Por esta razón la discusión de los antecedentes bibliográficos se centrará en el conocimiento actual sobre las rutas de utilización o síntesis del PtdIns 4-P, ya que el trabajo realizado se ha concentrado principalmente en el metabolismo de este fosfoinosítido en las membranas de oocitos de *Xenopus laevis*.

B.1. Síntesis de fosfatidilinositol 4-monofosfato y su utilización para la generación de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

El PtdIns 4-P se sintetiza a partir del PtdIns a través de una fosforilación con ATP catalizada por la PtdIns 4-quinasa.

Endemann y col., (Endemann y col., 1987) separaron dos tipos de PtdIns 4-quinasas de cerebro de bovino por centrifugación en gradiente de sacarosa. Estas dos enzimas poseen pesos moleculares aparentes de 55000 y 230000. La enzima de 55 kDa es similar en todas las propiedades estudiadas a la de fibroblastos descrita por Whitman y col., (Whitman y col., 1987). Características semejantes se han descrito también para la enzima de membrana plasmática de eritrocitos humanos (Endemann y col., 1987; Graziani y col., 1992), de útero de

bovino (Porter y col., 1988) y células A431 (Walker y col., 1988). En los dos últimos casos mencionados la enzima ha sido purificada a homogeneidad. A esta PtdIns 4-quinasa se le denomina "tipo II". Está fuertemente unida a la membrana plasmática, requiere detergente para su extracción y no está presente en forma significativa en la fracción soluble (Carpenter y Cantley, 1990). Esta PtdIns 4-quinasa presenta la característica de ser inhibida por adenosina y ADP y activada por detergentes (Whitman y col., 1987).

La enzima de 230 kDa, llamada "tipo III", también está asociada a la membrana y, además de cerebro de bovino, ha sido descrita en útero de bovino (Li y col., 1989), cerebro de rata (Yamakawa y Takenawa, 1988) y *Saccharomyces cerevisiae* (Belunis y col., 1988). Posee mayor Km para ATP y es resistente a la inhibición por adenosina (Carpenter y Cantley, 1990).

Cabe señalar que la PtdIns quinasa "tipo I" corresponde a la PtdIns 3-quinasa, la cual cataliza la fosforilación del PtdIns en la posición 3 del anillo inositol. Esta quinasa es resistente a la inhibición por adenosina y por ADP, mientras sí es inhibida por detergentes no iónicos (Whitman y col. 1987).

Un cDNA que codifica para la PtdIns 4-quinasa "tipo II" ha sido aislado a partir de una genoteca de cDNA de cerebro de rata. La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos da una proteína de 697 aminoácidos, con dos posibles dominios transmembrana y varias secuencias

hacia el extremo N-terminal que representan sitios potenciales de fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cAMP y la dependiente de calmodulina (Yamakawa y col., 1991).

En cuanto a mecanismos de regulación que estén modulando la actividad de esta enzima, no se tiene aún un conocimiento claro al respecto. En la literatura hay antecedentes que indican que la actividad de la enzima estaría afectada por cAMP (Holland y col., 1988; Kato y col., 1989) ésteres de forbol (de Chaffoy de Courcelles y col., 1984; Halenda y Feinstein, 1984; Boon y col., 1985) y GTP- γ -S (Chahwala y col., 1987). Todos estos resultados sugieren que la enzima podría estar regulada por proteínas quinasas, por proteínas G o por ambas. Sin embargo, no hay ninguna evidencia directa que indique que la enzima se fosforile o que esté siendo afectada por alguna proteína quinasa o proteína G.

Las poliaminas, espermina y espermidina, para las cuales se ha postulado un importante papel regulador en diversos aspectos del metabolismo y proliferación celular (Tabor y Tabor, 1984), activan en forma notoria a la enzima de membranas de células A431. Un efecto similar ejercen la polilisina y las histonas (Vogel y Hoppe, 1986). También la enzima de membranas de oocitos de *Xenopus laevis* es activada por polilisina (Gatica y col., 1987; Carrasco y col., 1988).

Como ya se indicó, la enzima "tipo II" es inhibida por adenosina (Whitman y col., 1987). Esta inhibición podría ser fisiológicamente relevante bajo condiciones en que se

depleta la célula de ATP (Doctrow y Lowenstein, 1985). Por su parte, S-adenosil homocisteína inhibe la síntesis de PtdIns 4-P en neutrófilos *in vivo* y es un inhibidor competitivo de la enzima de membranas del mismo sistema *in vitro* (Pike y De Meester, 1988).

El PtdIns 4-P es transformado en PtdIns 4,5-P₂ a través de una segunda fosforilación, catalizada por la PtdIns 4-P 5-quinasa que utiliza ATP como dador del grupo fosforilo. Esta enzima ha sido encontrada en membranas plasmáticas y en citoplasma en diversos sistemas (Van Dongen y col., 1984; Van Rooijen y col., 1985; Imai y col., 1986; Cochet y Chambaz, 1986; Lundberg y col., 1985; Ling y col., 1989; Smith y Chang, 1989; Bazenet y col., 1990).

De la membrana del eritrocito se han separado dos formas de la PtdIns 4-P 5-quinasa, "tipo I" y "tipo II". La enzima "tipo II" es idéntica a la PtdIns 4-P 5-quinasa soluble encontrada en el citosol del eritrocito (Bazenet y col., 1990). Funcionalmente, sin embargo, hay similitudes y diferencias entre la enzima citosólica y la unida a membrana, dependiendo del tipo celular. En la mayoría de los casos, ambas son estimuladas por poliaminas, disminuyendo el requerimiento de Mg⁺² para su actividad óptima (Lundberg y col., 1986).

Al igual que en el caso de la PtdIns 4-quinasa, poco se sabe de la regulación de la PtdIns 4-P 5-quinasa. La enzima citosólica de cerebro de rata (Cochet y Chambaz, 1986) y la de membranas de eritrocito (Ling y col., 1989) es esti-

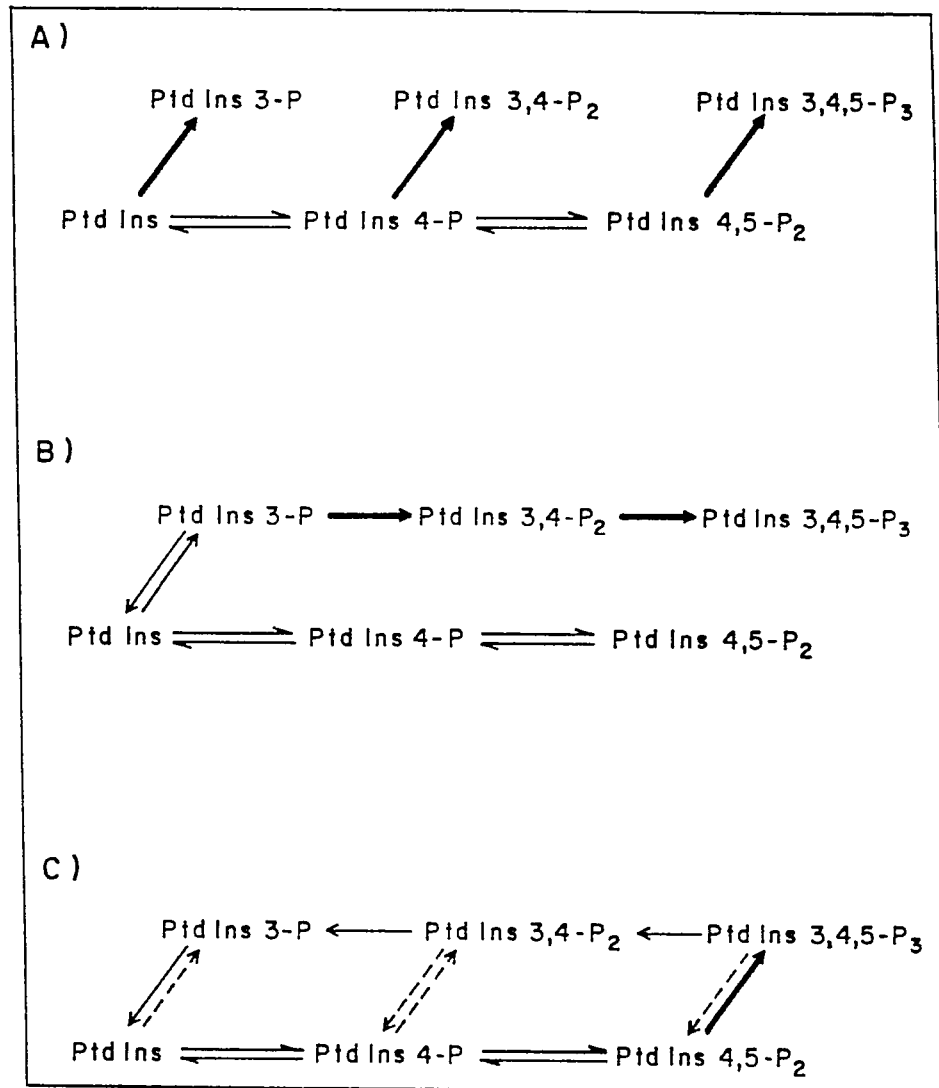
mulada por fosfatidilserina. A su vez, la PtdIns 4-P 5-quinasa de membranas de cerebro de rata es estimulada por GTP- γ -S (Smith y Chang, 1989). Por su parte, la enzima de membranas de cerebro de bovino es fuertemente estimulada por PtdOH en una acción específica que no se obtiene con ningún otro fosfolípido ensayado (Moritz y col., 1992).

B.2. Síntesis de fosfoinosítidos fosforilados en la posición 3 del inositol

Como se planteó anteriormente, se sintetiza también en la célula un conjunto de fosfoinosítidos que poseen un grupo fosforilo en la posición 3 del inositol. Estos son PtdIns 3-P, PtdIns 3,4-P₂ y PtdIns 3,4,5-P₃ (Majerus, 1992).

Las vías metabólicas que conducen a la síntesis de estos compuestos no están aún dilucidadas, existiendo tres hipótesis al respecto, las cuales se resumen en el Esquema III. En la primera de ellas (Esquema III-A) se involucra al PtdIns 4-P, así como también al PtdIns y PtdIns 4,5-P₂, como precursores directos de los fosfoinosítidos fosforilados en la posición 3, a través de reacciones catalizadas por una o más quinasas específicas para fosforilar en dicha posición (Whitman y Cantley, 1988).

Por su parte, las evidencias experimentales obtenidas trabajando con plaquetas humanas estimuladas con trombina, han llevado al grupo de Majerus a postular un modelo en el cual el PtdIns 3-P se sintetiza a partir de PtdIns, para luego



ESQUEMA III: DIFERENTES VIAS PROPUESTAS PARA LA SINTESIS DE LOS FOSFOINOSITIDOS FOSFORILADOS EN LA POSICION 3 DEL INOSITOL.

generarse los otros fosfoinosítidos por fosforilaciones sucesivas en 4 y 5 (Esquema III-B) (Cunningham y col., 1990; Cunningham y Majerus., 1991; Yamamoto y col., 1990; Majerus, 1992).

Por último, el grupo de Irvine, basado en los resultados obtenidos trabajando con neutrófilos activados con formilmethionil-leucil-fenilalanina, proponen las vías que se muestran en el Esquema III-C, en que la enzima clave sería una PtdIns 4,5-P₂ 3-quinasa (Stephens y col., 1991). Este modelo no descarta la participación del PtdIns 4-P como precursor del PtdIns 3,4-P₂.

B.3. Hidrólisis de fosfoinosítidos catalizada por la fosfolipasa C

B.3.1. Las isoformas de la enzima

La fosfolipasa C específica para fosfolípidos de inositol es la enzima clave involucrada en la hidrólisis de fosfoinosítidos acoplada a receptores de membrana, con la generación de segundos mensajeros (Majerus, 1992).

Mediante técnicas de purificación de proteínas, así como también de clonamiento a partir de cDNA, se ha podido conocer la existencia de tres isoenzimas de la fosfolipasa C en tejidos de mamíferos. Se denominan β , γ y δ , y cada una de ellas comprende a su vez más de un subtipo (Rhee y Choi, 1992).

B.3.2. Especificidad de sustrato

Cada una de las tres isoformas de la fosfolipasa C cataliza *in vitro* la hidrólisis de los tres fosfoinosítidos más comunes, PtdIns, PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂, para generar inositol 1-monofosfato (Ins 1-P), inositol 1,4-bisfosfato (Ins 1,4-P₂) e Ins 1,4,5-P₃, respectivamente, y DAG. Todas ellas son dependientes de Ca⁺² (Wilson y col., 1984; Ryu y col., 1987; Homma y col., 1988; Rhee y Choi, 1992).

Las fosfolipasas C estudiadas presentan una mayor afinidad por PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂, pero a baja concentración de Ca⁺² el sustrato preferido es el segundo de los mencionados (Wilson y col., 1984; Bennett y Crooke, 1987; Homma y col., 1988).

Por otra parte, la afinidad por PtdIns 4,5-P₂ es mayor en el caso de la fosfolipasa C-β, comparado con las isoformas γ y δ. (Ryu y col., 1987).

Un aspecto que resulta controvertible en la literatura es el que tiene relación con la especificidad de sustrato de la fosfolipasa C *in vivo*, si bien, como se planteó anteriormente, todas las fosfolipasas C conocidas hidrolizan *in vitro* a los tres fosfoinosítidos.

En los años 50 y comienzos de los 60 se obtuvieron las primeras evidencias experimentales que indicaban que en diferentes sistemas existe un recambio aumentado de PtdIns

frente a una serie de estímulos extracelulares. La atención se centró en este fosfoinosítido y llevó a la postulación de la hipótesis del "ciclo del PtdIns - PtdOH", que proponía la hidrólisis del PtdIns a inositol monofosfato y DAG y la posterior fosforilación de éste para formar PtdOH, el cual se transformaría a su vez en CDP-DAG. Este último reaccionaría con inositol para generar nuevamente el PtdIns (Sekar y Hokin, 1986).

Cuando se encontró que el PtdIns 4-P y el PtdIns 4,5-P₂ también experimentan un rápido recambio en células estimuladas por diversos agonistas, se planteó la cuestión de cuál o cuáles de los fosfolípidos de inositol de la membrana constituye el sustrato fisiológico de la fosfolipasa C activada por la unión de una señal al receptor.

Los primeros experimentos diseñados para dilucidar este punto, midiendo el contenido de los distintos fosfoinosítidos en células sometidas a diversos estímulos, determinaron que la velocidad inicial de desaparición del PtdIns 4,5-P₂ es similar a la velocidad total de desaparición del PtdIns y de aquí se postuló que el sustrato fisiológico sería el bisfosfato, mientras el PtdIns se iría consumiendo para la resíntesis del PtdIns 4,5-P₂ (Weiss y col., 1982; Billah y Lapetina, 1982). Sin embargo, los resultados de estos trabajos no descartan la posibilidad de que el PtdIns también sea un blanco de acción de la fosfolipasa C y que la disminución del PtdIns 4,5-P₂ sea sólo consecuencia del nivel disminuido de su

además de la hidrólisis del PtdIns 4,5-P₂, fundamentalmente en condiciones de estimulación prolongada (Imai y Gershengorn, 1986; Ackermann y col., 1987; Inhorn y col., 1987; Balla y col., 1988).

Un estudio cinético realizado en células acinares de parótidas, determinando las velocidades de flujo a través de una serie de inositol fosfatos intermediarios, indica que tanto la aparición de Ins 1,4-P₂ como de inositol 4-monofosfato (Ins 4-P) (producto de la desfosforilación del Ins 1,4-P₂) e Ins 1-P (producto de la hidrólisis del PtdIns vía fosfolipasa C o bien de la desfosforilación de otros inositol fosfatos) pueden explicarse a través de la metabolización del Ins 1,4,5-P₃, sin necesidad de introducir al modelo la hidrólisis directa de PtdIns o PtdIns 4-P (Hughes y Putney, 1989). Nuevamente, este estudio no descarta del todo la posibilidad de la acción de la fosfolipasa C sobre PtdIns o PtdIns 4-P.

Cabe señalar que el sistema es tremendamente complejo y presenta muchas dificultades para los estudios cinéticos que se requieren para precisar los aspectos en discusión. Por ejemplo, la existencia de compartimentos de fosfoinosítidos metabólicamente activos e inactivos, sensibles o no sensibles a hormonas (Monaco, 1982; Monaco y Woods, 1983; Koréh y Monaco, 1986; Monaco, 1987; King y col., 1987) introduce serios inconvenientes en la interpretación de los análisis cinéticos y de velocidades de recambio.

La hipótesis de la participación de PtdIns, de PtdIns 4-P o de ambos como sustratos de una fosfolipasa C en la respuesta de algún tipo de células frente a todas o algunas de las señales externas se ha mirado con interés puesto que significaría la producción de un único segundo mensajero, el DAG, sin la generación de Ins 1,4,5-P₃ y por lo tanto, sin movilización de Ca⁺² desde depósitos intracelulares, lo cual configuraría una respuesta celular diferente a la esperada con la generación de los dos segundos mensajeros actuando en forma simultánea (Hughes y Putney, 1989).

B.3.3. Regulación de la fosfolipasa C-β

Durante la década pasada se acumuló una gran cantidad de evidencias indirectas acerca de la participación de proteínas G en la activación de la fosfolipasa C por hormonas y neurotransmisores (Fain y col., 1988).

La estimulación por GTP o sus análogos no hidrolizables de la hidrólisis de PtdIns 4,5-P₂ ha sido demostrada en una variada gama de membranas premarcadas con ³²P_i o [³H] inositol (González y Crews, 1985; Cockcroft y Gomperts, 1985; Litosh y col., 1985; Wallace y Fain, 1985; Straub y Gershengorn, 1986; Bojanic y Fain, 1986; Litosh, 1987; Taylor y Exton, 1987; Sommermeyer y col., 1989; Claro y col., 1990). Sin embargo, sólo en 1991 parece dilucidarse la naturaleza de la proteína G que se acopla a la fosfolipasa C. En efecto, el grupo de Sternweis (Smrcka y col., 1991) demostró que una

mezcla de las subunidades α de proteínas G_q y G_{11} , purificada de cerebro de bovino, es capaz de activar una preparación de fosfolipasa C del mismo origen, parcialmente purificada, en presencia de AlF_4^- . A su vez, el grupo de Exton (Taylor y col., 1990; Taylor y col., 1991; Taylor y Exton, 1991), purificó una mezcla de las subunidades α_q y α_{11} de hígado de bovino y con ella se logró la activación selectiva de la fosfolipasa C- β_1 de cerebro de bovino, en presencia de GTP- γ -S, mientras las fosfolipasas C- γ_1 y C- δ_1 no son estimuladas. Este mismo grupo ha purificado la forma trimérica ($\alpha\beta\gamma$) de dos proteínas de la familia G_q , las cuales activan a la fosfolipasa C- β_1 en la presencia de GTP- γ -S o de AlF_4^- (Blank y col., 1991). También se ha logrado reconstituir un sistema de eritrocitos de pavo en que una proteína G inmunológicamente similar a G_q activa a la fosfolipasa C- β_1 (Waldo y col., 1991).

En experimentos en que se transfectaron células Cos-7 con cDNA correspondiente a diferentes subunidades α se observó que sólo el cDNA de α_q o α_{11} produjo un marcado aumento en la producción de inositol fosfatos al estimular con AlF_4^- . La cotrasfección de cDNA de α_q o α_{11} con cDNA de fosfolipasa C- β_1 produjo un aumento aún mayor. Por su parte, los cDNA de α_z , α_{OA} , α_{OB} y α_T no tuvieron ningún efecto (Wu y col., 1992). Utilizando este mismo diseño experimental, Lee y col. (Lee y col., 1992) demostraron que α_q , α_{11} , α_{14} y α_{16} , todos miembros de la familia α_q , estimulan a la fosfolipasa C β -1, siendo los más eficientes α_q y α_{11} (Lee y col., 1992).

Con respecto a la fosfolipasa C β -2, la cual ha sido recientemente clonada a partir de una genoteca de cDNA de células HL-60, se ha visto que no es estimulada por α_q (Park y col., 1992), siendo α_{16} la que más eficientemente la activa (Lee y col., 1992). De estos resultados se ha sugerido que existiría especificidad en la interacción de los diferentes miembros de la familia G_q con las distintas fosfolipasas C- β (Lee y col., 1992; Park y col., 1992).

Entre los receptores que activan a la fosfolipasa C- β a través de una proteína G_q o G_{11} se encuentran el de tromboxano A_2 , bradiquinina, angiotensina, histamina, vasopresina y acetilcolina de tipo muscarínico (Rhee y Choi, 1992).

Usando el receptor muscarínico m_1 , una mezcla de G_q y G_{11} y la fosfolipasa C- β_1 , se logró la primera reconstitución de la vía completa que conduce a la hidrólisis del PtdIns 4,5- P_2 a partir de sus componentes purificados. En efecto, al coreconstituir estas proteínas en vesículas lipídicas, la actividad de la fosfolipasa C- β_1 aumenta en más de diez veces por la adición de carbamilcolina, en presencia de GTP- γ -S (Berstein y col., 1992).

B.3.4. Regulación de la fosfolipasa C- γ

La unión de los factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), epidérmico (EGF) y neural (NGF) a sus respectivos receptores produce la activación de la fosfolipasa C- γ_1 . El tratamiento de una serie de tipos celulares con estos

factores de crecimiento promueve la asociación de la fosfolipasa C- γ_1 con el receptor, la cual está mediada por una interacción de gran afinidad entre ciertos dominios de la enzima y sitios específicos del receptor autofosforilados en tirosina (Koch y col., 1991).

La fosfolipasa C- γ_1 es fosforilada en tirosinas por la actividad tirosina quinasa de los receptores de PDGF, EGF y NGF, y los sitios de fosforilación parecen ser los mismos en los tres casos (Kim y col., 1991). También es fosforilada en serinas por una actividad enzimática aún no definida (Rhee y Choi, 1992).

El efecto de la fosforilación sobre la actividad de la enzima no es aún bien comprendido. Por ejemplo, estudios *in vitro* han demostrado que la enzima fosforilada y la no fosforilada muestran la misma actividad (Kim y col., 1991).

Sin embargo, en células 3T3 transfectadas con fosfolipasa C- γ_1 mutada en las tirosinas 771, 783 o 1254 (las 3 tirosinas fosforiladas por el receptor) y estimuladas con PDGF, se demostró que la fosforilación en tirosina 783 y en menor grado en la 1254 es fundamental para la estimulación de la producción de inositol fosfatos en la célula intacta. La enzima mutante en tirosina 783 se asocia al receptor y es fosforilada en serina en respuesta a PDGF, lo cual sugiere que ni la asociación al receptor ni la fosforilación en serinas son eventos suficientes para la activación de la fosfolipasa C- γ_1 (Kim y col., 1991).

A su vez, los experimentos realizados en células que expresan mutantes del receptor de EGF que no posee la tirosina 992 (en el dominio de unión del receptor a la fosfolipasa C- γ_1) han demostrado que tanto la interacción con el receptor como la fosforilación de la fosfolipasa C- γ_1 en tirosinas son pasos necesarios para la activación de la enzima *in vivo* (Vega y col, 1992).

B.3.5. Regulación de la fosfolipasa C- δ

Con respecto a la fosfolipasa C- δ no se conoce hasta ahora mecanismo alguno que esté regulando su actividad. No se ha descrito ningún receptor ni ningún transductor de señales que esté acoplado a ella (Rhee y Choi, 1992).

B.4. Hidrólisis de fosfoinosítidos catalizada por fosfomonoesterasas

Como se ha señalado, existe un rápido recambio de los fosfoinosítidos de la membrana celular al unirse un agonista a un receptor acoplado al sistema de la fosfolipasa C. La PtdIns 4-quinasa, la PtdIns 4-P 5-quinasa y la fosfolipasa C cumplen una función fundamental en dicho recambio.

Sin embargo, en varios sistemas en que se ha estudiado la síntesis y degradación de fosfoinosítidos ante un estímulo externo se han encontrado también otras enzimas capaces de hidrolizar al PtdIns 4-P y al PtdIns 4,5-P₂. Estas enzimas son fosfomonoesterasas que hidrolizan los fosfatos 5

y 4 del PtdIns 4,5-P₂ y se ignora si ellas tienen o no una participación importante en la regulación de los niveles de los fosfoinosítidos en la membrana celular y, por consiguiente, si están desempeñando o no algún papel fundamental en el mecanismo de transducción de señales que involucra a los compuestos derivados del inositol.

En la literatura existe poca información sobre estas enzimas; se han descrito en diversos sistemas, pero existen escasos estudios sistemáticos tendientes a caracterizarlas.

PtdIns 4-P fosfomonoesterasa, PtdIns 4,5-P₂ 5-fosfomonoesterasa o ambas se han encontrado en sinaptosomas de cerebro de cobayo (Harwood y Hawthorne, 1969), en fracciones subcelulares de corteza cerebral de cobayo (Schacht, 1976) en una fracción compuesta por mitocondrias y sinaptosomas de cerebro de rata (Jolles y col., 1981), en membranas plasmáticas de eritrocito de rata (Marche y col., 1983) en envoltura nuclear de hepatocitos de rata (Smith y Wells, 1984), en membranas plasmáticas de células tumorales de rata (Tooke y col., 1984), en membranas plasmáticas de astrocitoma T-24 humano (Knowles y Lawrence, 1985) y en membranas plasmáticas de cerebro de rata (Claro y col., 1989; Claro y col., 1990).

La única de ellas sometida a una caracterización sistemática es la PtdIns 4-P de envoltura nuclear de hígado de rata (Smith y Wells, 1984), donde los mismos autores habían encontrado síntesis de PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂ (Smith y

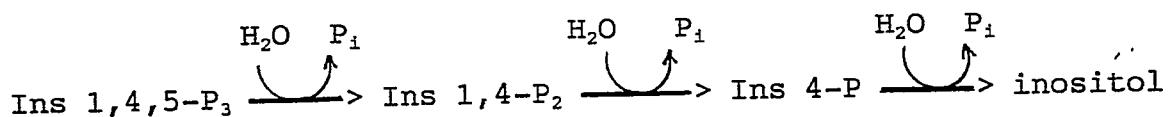
Wells, 1983), proponiendo con estos antecedentes que la interconversión de PtdIns en PtdIns 4-P en este sistema ocurriría a través de una vía simple de fosforilación-desfosforilación, permitiendo una rápida y precisa regulación de los niveles de PtdIns 4-P. En este modelo, los autores descartan la participación de una fosfolipasa C. Sin embargo, este estudio sobre envoltura nuclear cobra ahora mayor interés puesto que el grupo de Irvine ha descrito recientemente la existencia del ciclo de los fosfoinosítidos en los núcleos de células 3T3, bajo el control del receptor de IGF-1 de la membrana plasmática, con la generación de DAG y una aparente translocación de la proteína quinasa C al núcleo (Divechea y col., 1991).

Con respecto a los fosfoinosítidos que poseen el grupo fosforilo en la posición 3, se sabe que ellos no son atacados por las fosfolipasas C específicas de fosfoinosítidos conocidas (Lips y col., 1989; Serunian y col., 1989) y se piensa que en su metabolización y por consiguiente en la regulación de su nivel en la célula, participan solamente quinasas y fosfomonoesterasas. Estas enzimas han sido poco estudiadas hasta el momento, existiendo escasos antecedentes en la literatura. En células 3T3 se encontró una fosfomonoesterasa en la fracción soluble que remueve específicamente el fosforilo de la posición 3 del PtdIns 3-P, no utilizando como sustrato PtdIns 4-P ni PtdIns 4,5-P₂. Tampoco presenta actividad con Ins 1,3-P₂ (Lips y Majerus, 1989).

En cerebro de rata se han descrito en la fracción soluble dos isoformas ("tipo I" y "tipo II") de una fosfomonoesterasa que utiliza como sustratos tanto PtdIns 3-P como Ins 1,3-P₂. La enzima "tipo I" contendría sólo la subunidad catalítica de 65 kDa, mientras la "tipo II" sería un heterodímero constituido además por una subunidad reguladora de 78 kDa. La enzima "tipo II" hidroliza al PtdIns 3-P con una velocidad dos veces mayor que la velocidad de hidrólisis con la "tipo I". A su vez, la "tipo I" cataliza la hidrólisis de Ins 1,3-P₂ con una velocidad cinco veces mayor que con la "tipo II". Estas diferencias estarían dadas por la presencia o ausencia de la subunidad reguladora (Caldwell y col., 1991).

C.- METABOLISMO DE INOSITOL FOSFATOS. ACCION DE FOSFOMONOESTERASAS

Puesto que parte de los estudios realizados en esta tesis se centraron en las fosfomonoesterasas que catalizan la defosforilación del Ins 1,4,5-P₃ para generar inositol libre en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, en esta sección se revisarán algunos aspectos de la acción de estas enzimas:



C.1. La inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa

El Ins 1,4,5-P₃ es hidrolizado a Ins 1,4-P₂ por la

inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa, enzima distribuída entre las fracciones soluble y particulada en diversos tejidos. Además, tanto el inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (Ins 1,3,4,5-P₄) como el inositol 1:2,4,5-trisfosfato cíclico (Ins 1:2,4,5-P₃) también son sustratos de la enzima. En plaquetas humanas se han descrito dos formas citosólicas de la enzima, "tipo I" y "tipo II", y ambas hidrolizan a los mismos sustratos, pero la primera requiere Mg⁺² y los parámetros cinéticos y el PM son diferentes (Majerus, 1992). Sólo la enzima "tipo I" es fosforilada por la proteína quinasa C (Connolly y col., 1986) y la fosforilación está asociada a un aumento de su actividad (Connolly y col., 1986; Molina y Vedia y col., 1986; King y Rittenhouse, 1989). La enzima ha sido también caracterizada parcialmente en otros tejidos y estos estudios sugieren que existirían otras isoformas, además de las encontradas en plaquetas humanas (Downes y col., 1982; Storey y col., 1984; Seyfred y col., 1984; Rana y col., 1986; Hansen y col., 1987).

Un cDNA que codifica para la enzima "tipo II" de plaquetas humanas ha sido aislado de una genoteca de cDNA para proteínas de fusión con β -galactosidasa en el vector λ gt₁₁ (Ross y col., 1991). El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida para la enzima muestra varios sitios potenciales de fosforilación por diversas proteínas quinasas, estando ausente la secuencia de consenso para la proteína quinasa C (Kemp y Pearson, 1990), y esto coincide con los resultados

obtenidos con la enzima nativa, la cual, a diferencia de la "tipo I", no es fosforilada por dicha proteína quinasa.

C.2. La inositol polifosfato 1-fosfomonoesterasa

Tanto el Ins 1,4-P₂ como el inositol 1,3,4-trisfosfato (Ins 1,3,4-P₃) son sustratos de esta enzima, siendo la Km para este último cinco veces mayor. Cabe señalar que la enzima no hidroliza a otros inositol polifosfatos que poseen un grupo fosforilo en la posición 1 del inositol (Majerus, 1992). La enzima ha sido encontrada en varios sistemas, entre ellos, cerebro (Inhorn y col., 1987; Inhorn y Majerus, 1988; Gee y col., 1988 a) e hígado (Shears, 1989). Existen evidencias experimentales que indican que esta enzima da cuenta de la mayor parte de la hidrólisis del Ins 1,4-P₂ (Inhorn y Majerus, 1987). Requiere Mg⁺² como cofactor y es inhibida por Ca⁺² en concentraciones fisiológicas (Inhorn y Majerus, 1987; Inhorn y Majerus, 1988) así como también lo es por Li⁺ (Inhorn y Majerus, 1987; Inhorn y Majerus, 1988).

La inositol polifosfato 1-fosfomonoesterasa de cerebro de bovino ha sido clonada y el cDNA se ha expresado en *Escherichia coli*. La enzima recombinante se comporta en forma similar a la enzima nativa (York y Majerus, 1990).

C.3. La inositol monofosfato fosfomonoesterasa

Esta enzima cataliza la hidrólisis del último grupo fosfato de los inositol polifosfatos para generar inositol

libre. Todos los inositol monofosfatos, con excepción del inositol 2-monofosfato (Ins 2-P), son sustratos de la enzima (Inhorn y col., 1987; Ackermann y col., 1987). Requiere Mg^{+2} como cofactor, Ca^{+2} y Mn^{+2} la inhiben competitivamente, mientras Li^{+} lo hace en forma no competitiva (Hallcher y Sherman, 1980). La inositol monofosfato fosfomonoesterasa de cerebro de rata y de bovino ha sido purificada a homogeneidad (Gee y col., 1988 b) y constituye un dímero de subunidades iguales (Hallcher y Sherman, 1980; Gee y col., 1988 b).

Por último, se ha aislado un cDNA y la enzima ha sido expresada en *Escherichia coli*, encontrándose que la proteína recombinante presenta las mismas características que la enzima nativa (Diehl y col., 1990).

D.- EL OOCITO DE *Xenopus laevis* Y EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES EXTRACELULARES

D.1. La maduración meiótica del oocito

La maduración meiótica del oocito constituye un sistema modelo para el estudio de los mecanismos de acción hormonal y para el gatillamiento de la división celular.

El oocito de *Xenopus laevis* en estado VI es una célula detenida en la profase de la primera división meiótica y la exposición a progesterona o insulina reinicia la meiosis para detenerse nuevamente en la metafase de la segunda divi-

sión meiótica. Este proceso transforma al oocito en un huevo con la capacidad de ser fecundado e iniciar la embriogénesis y se conoce como maduración meiótica (Maller, 1985).

Los mecanismos moleculares a través de los cuales progesterona e insulina inducen la maduración meiótica del oocito no están completamente dilucidados. A continuación se resumen algunos de los aspectos más relevantes conocidos hasta la fecha: a diferencia de lo establecido para la acción de las hormonas esteroidales en otros sistemas, en los cuales existen receptores nucleares y una interacción a nivel de DNA (Wahli y Martínez, 1991), en el oocito de *Xenopus laevis* la progesterona actúa a nivel de la membrana celular, en donde existiría un receptor para ella (Sadler y Maller, 1982). Está bien establecido que la maduración inducida por progesterona involucra la inhibición de la adenililciclase del oocito (Jordana y col., 1981 a; Sadler y Maller, 1981; Finidori-Lepicard y col., 1981) y la consecuente disminución en la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP. La maduración inducida por la progesterona es inhibida al microinyectar al oocito la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP y, por el contrario, es inducida si se microinyecta la subunidad reguladora de dicha proteína quinasa, en ausencia de la hormona (Maller y Krebs, 1977).

Cuando se expone el oocito a progesterona se produce un aumento de la síntesis proteica de alrededor de dos veces y ésto ocurre aproximadamente 2 horas después del trata-

miento con la hormona (Bravo y col., 1978). Los inhibidores de la síntesis proteica bloquean la maduración del oocito, agregados antes de las 2 horas luego de haber tratado el oocito con progesterona.

Posterior a la inducción de la síntesis proteica y coincidente con la ruptura de la membrana nuclear, proceso que define la maduración meiótica del oocito, se detecta en el citoplasma la aparición del factor promotor de la maduración (MPF). Al microinyectar el oocito con un extracto citoplasmático obtenido a partir de oocitos maduros, se detecta un aumento significativo en la fosforilación de proteínas (Lohka y col., 1987; Cicirelli y col., 1988), junto con lo cual hay ruptura de la membrana nuclear. Esto ocurre en ausencia de progesterona y sin síntesis de proteínas.

El MPF está constituido por dos proteínas, la cdc-2 quinasa y la ciclina. Esta última es sintetizada *de novo* luego de la inducción hormonal de la maduración del oocito y se sabe que su unión a la cdc-2 quinasa es fundamental para obtener un MPF activo (Lewin, 1990).

La insulina, a su vez, gatilla una vía de transducción de señales diferente, en la cual parece ser importante la actividad tirosina quinasa del receptor para esta hormona. Se ha demostrado que la microinyección de anticuerpos monoclonales que inhiben la actividad tirosina quinasa del receptor, bloquean la maduración meiótica inducida por insulina (Morgan y col., 1986). Sin embargo, la vía por la cual actúa la insu-

lina tiene de común con la de progesterona el requerimiento de síntesis de proteínas y la activación del MPF (Smith, 1989), de forma tal que ambas hormonas estarían actuando a través de vías diferentes pero convergentes.

También la microinyección de la proteína producto del oncogen ras induce la maduración meiótica del oocito (Birchmeir y col., 1985). Este efecto se observa aún en ausencia de síntesis proteica (Allende y col., 1988), y por otra parte, se ha demostrado que la microinyección de anticuerpos monoclonales contra la proteína ras, previa a la adición de insulina, inhibe la maduración meiótica inducida por ésta, pero no bloquea la maduración inducida por progesterona (Korn y col., 1987; Deshpande y Kung, 1987). De estos resultados, se ha postulado que la proteína producto del oncogen ras y la insulina estarían participando en diferentes puntos de una misma vía de transducción de señales en la maduración meiótica del oocito.

Por último, la incubación de oocitos con altas concentraciones de Ca^{+2} o en presencia del ionóforo de Ca^{+2} A23187 induce la maduración meiótica (Wasserman y Masui, 1975; Wasserman y col., 1980). También se ha detectado un aumento transitorio del Ca^{+2} intracelular en oocitos tratados con progesterona (Moreau y col., 1980), pero este hallazgo no ha sido confirmado (Smith, 1989).

D.2. Papel de los fosfoinosítidos en la transducción de señales en el oocito

Esta célula es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos de transducción de señales extracelulares puesto que posee receptores para progesterona, insulina y acetilcolina y además, su gran tamaño ha permitido microinyectar una serie de mRNA exógenos correspondientes a diversos receptores de membrana, siendo estos expresados en el oocito en forma funcional (Gundersen y col., 1983; Sumikawa y col., 1984; Dascal y col., 1986; Sugiyama y col., 1987; Hirono y col., 1987; Nomura y col., 1987; McIntosh y Catt, 1987; Coats y Navarro, 1990). Una serie de estos últimos, así como también el receptor endógeno para acetilcolina están acoplados en el oocito a la fosfolipasa C (Snutch, 1988).

Los oocitos de *Xenopus laevis* poseen receptores de tipo muscarínico, los cuales, en respuesta a acetilcolina, generan una corriente lenta y oscilatoria de Cl^- (Kusano y col., 1982). Se ha demostrado que la estimulación del receptor por unión de la acetilcolina provoca un aumento del Ins 1,4,5- P_3 intracelular (Oron y col., 1985; Nomura y col., 1987; McIntosh y Catt, 1987), así como también que la microinyección de Ins 1,4,5- P_3 imita la respuesta electrofisiológica inducida por el neurotransmisor (Oron y col., 1985). A su vez, tanto el efecto de acetilcolina como el de Ins 1,4,5- P_3 microinyectado son dependientes de un aumento del nivel de Ca^{+2} intracelular (Gillo y col., 1987). Con estos antecedentes, se ha propuesto

la siguiente secuencia de eventos para explicar el efecto de la acetilcolina en el oocito: unión del ligando al receptor, activación de la fosfolipasa C mediada por proteínas G y generación de Ins 1,4,5-P₃, liberación de Ca⁺² desde depósitos intracelulares y apertura en la membrana celular de un canal de Cl⁻ dependiente de Ca⁺² (Takahashi y col., 1987).

Consistentes con este modelo son también los resultados encontrados al estudiar el efecto de acetilcolina sobre el recambio de fosfoinosítidos en el oocito entero. En efecto, al microinyectar [³H] inositol en el oocito e incubarlo con acetilcolina, se encuentra un aumento temprano de la incorporación del precursor marcado en los fosfolípidos de inositol, lo cual se puede apreciar en tiempos cortos luego de iniciada la incubación con el neurotransmisor (Carrasco y col., 1990).

Por otra parte, también hay evidencias experimentales que sugieren que el proceso de maduración meiótica en el oocito está conectado con cambios en el metabolismo de los compuestos derivados del inositol. Se ha demostrado que la inducción de la maduración meiótica por el tratamiento con progesterona o insulina resulta en un aumento significativo de la incorporación de [³H] inositol en los fosfolípidos de la membrana. Este incremento es tardío si se compara con el efecto de la acetilcolina, haciéndose evidente a las 3-6 horas después de iniciada la incubación con la hormona y coincide con el inicio de la ruptura de la envoltura nuclear, uno de los eventos de la maduración meiótica del oocito. En el caso de

progesterona, el efecto se acompaña de un aumento de los niveles intracelulares de inositol tris, bis y monofosfato (Carrasco y col., 1990).

D.3. Metabolismo de fosfoinosítidos e inositol fosfatos en el oocito de *Xenopus laevis*

A pesar de constituir el oocito un sistema frecuentemente utilizado para el estudio de la función de los fosfolípidos de inositol y de los inositol fosfatos en la transducción de señales y en la movilización de Ca^{+2} desde depósitos intracelulares, existen muy pocos estudios detallados en esta célula sobre las vías metabólicas que dan cuenta de la síntesis y utilización de los compuestos derivados del inositol, así como tampoco los hay con respecto a las propiedades y características de las enzimas involucradas.

Con respecto al metabolismo de los inositol fosfatos en el oocito, se ha descrito la generación de inositol tris, bis y monofosfato en el oocito premarcado con [^3H] inositol y estimulado con acetilcolina o serotonina (Nomura y col., 1987). A su vez, Irvine y col., (Irvine y col., 1986) demostraron que alrededor del 80% del [$2\text{-}^3\text{H}$] Ins 1,4,5- P_3 microinyectado en el oocito es desfosforilado a inositol en alrededor de 30 minutos, encontrándose sólo trazas del bis y monofosfato. Pero, una proporción apreciable (10-20%) es convertida rápidamente en un inositol tetrakisfosfato, presumiblemente Ins 1,3,4,5- P_4 , lo cual indicaría la presencia en

el oocito de una Ins 1,4,5- P_3 3-quinasa, enzima ampliamente distribuída en diversos sistemas (Majerus, 1992).

Sin embargo, a pesar del hallazgo del tetrakisfosfato, no se encontró Ins 1,3,4- P_3 (Irvine y col., 1986), compuesto que es generado a partir del anterior por acción de la inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa, otra enzima que se encuentra presente en todos los tejidos estudiados (Majerus, 1992).

Un estudio realizado por el grupo de Catt (Ji y col., 1989) demostró que, luego de 6 horas de incubación, la mayor proporción del [3H] inositol microinyectado y metabolizado en el oocito se encuentra incorporado en inositol tris, bis y monofosfato, así como también en glicerofosfoinositol fosfato y glicerofosfoinositol. Luego de 15 y 30 horas se observa la aparición de inositol pentakis y hexakisfosfato tritiados respectivamente, y ambos continúan acumulándose hasta las 72 horas. Los estudios cinéticos sugieren entre ellos una relación precursor-producto, generándose el hexakisfosfato a partir del pentakisfosfato. También se detecta una pequeña pero significativa proporción de un inositol tetrakisfosfato tritiado que coeluye en HPLC con un patrón de Ins 3,4,5,6- P_4 .

Para estudiar directamente el metabolismo de estos polifosfatos en el oocito, ambos se microinyectaron en forma separada. Así se pudo observar que el pentakisfosfato es progresivamente transformado en el hexakisfosfato, pero no genera

inositol fosfatos de menor grado de fosforilación, aún luego de 72 horas de incubación. A su vez, el hexakisfosfato no sufre ninguna transformación durante las 72 horas posteriores a su microinyección (Ji y col., 1989).

Como puede apreciarse de estos antecedentes, las rutas metabólicas en que participan los inositol fosfatos en el oocito de *Xenopus laevis* no están aún bien establecidas y ninguna de las enzimas involucradas ha sido objeto de estudio para caracterizarla.

Con respecto al metabolismo de los fosfolípidos de inositol, los únicos estudios detallados se han realizado en este laboratorio y se refieren a la reacción de fosforilación del PtdIns para generar fosfatidilinositol monofosfato. Los experimentos realizados incubando membranas aisladas de oocitos de *Xenopus laevis* con [γ - 32 P] ATP y utilizando el PtdIns endógeno de la membrana o bien PtdIns exógeno, demostraron que más del 90% de la radiactividad que se incorpora en productos de naturaleza lipídica lo hace en fosfatidilinositol monofosfato y sólo alrededor del 5% en fosfatidilinositol bisfosfato (Carrasco y col., 1989). En estos trabajos no se definió si el producto mayoritario de la reacción era PtdIns 4-P o PtdIns 3-P.

La enzima responsable de la síntesis del fosfatidilinositol monofosfato a partir de PtdIns es una fosfatidilinositol quinasa de la membrana del oocito y ha sido caracterizada en este laboratorio. La enzima requiere Mg^{+2} o Mn^{+2}

como cofactor, el GTP no reemplaza al ATP como dador de fosforilo, la presencia de fosfatidilserina y PtdIns 4,5-P₂ estimulan su actividad y 2,3-bisfosfoglicerato es un potente inhibidor (Carrasco y col., 1989). También la polilisina y la poliarginina aumentan la actividad enzimática, en una acción que aumenta la V_{max} de la reacción sin modificar la K_m aparente para ATP (Carrasco y col., 1988).

Objetivos de esta tesis

De los antecedentes anteriormente presentados, se puede concluir que el oocito presenta una serie de ventajas y aspectos de interés para el estudio del papel de los fosfoinosítidos en la transducción de señales. Estos estudios, sin embargo, requieren de un conocimiento previo de las transformaciones metabólicas que afectan a estos fosfolípidos en este sistema celular. Hasta la fecha, se habían realizado pocos trabajos detallados sobre las reacciones que involucran a los fosfoinosítidos en el oocito y sobre las enzimas que catalizan dichas reacciones.

En particular, nuestro interés se despertó por una observación consignada en este laboratorio al estudiar la reacción de fosforilación del fosfatidilinositol para formar fosfatidilinositol monofosfato utilizando una preparación de membranas aisladas de oocitos de *Xenopus laevis* (Carrasco y col., 1989). Esta reacción es inicialmente rápida, alcanzando un estado estacionario a los 5 minutos de incubación. A partir

de este tiempo se observa una pérdida del [^{32}P] fosfatidilinositol monofosfato sintetizado (Carrasco y col., 1989). La desaparición de la radiactividad en este compuesto puede ser mejor estudiada si se permite su síntesis a partir de [γ - ^{32}P] ATP y fosfatidilinositol endógeno o exógeno durante 3 minutos, para luego bloquear una posterior incorporación de ^{32}P en fosfatidilinositol monofosfato diluyendo el ATP radiactivo con ATP no radiactivo (Carrasco y col., 1988; Carrasco y col., 1989).

Estos resultados experimentales hicieron surgir nuestro interés por conocer la respuesta a la pregunta de cuales serían las reacciones que están dando cuenta de la desaparición del fosfatidilinositol monofosfato en estas condiciones experimentales, es decir, en membranas aisladas de oocitos y en presencia de Mg^{+2} en concentración cercana a 10 mM y de Ca^{+2} total no mayor de 15 μM .

La búsqueda de la respuesta a esta pregunta se convirtió en el trabajo que se presenta en esta tesis, cuyos objetivos se pueden resumir en los siguientes puntos:

- A) Establecer las rutas metabólicas que dan cuenta de la utilización del fosfatidilinositol monofosfato en membranas aisladas de oocitos de *Xenopus laevis*.
- B) Caracterizar algunas de las enzimas de la membrana que resulten involucradas en dicho proceso
- C) Estudiar factores hormonales o metabolitos que pudieran regular la actividad de algunas de las enzimas involucradas en el metabolismo de los fosfoinosítidos.

MATERIALES Y METODOS

A.- REACTIVOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACION

ATP, ADP, AMP, cAMP, adenosina, GTP- γ -S, PtdIns, PtdIns 4-P, PtdIns 4,5-P₂, liso PtdIns, liso PtdIns 4-P, Ins 1-P, Ins 1,4-P₂, Ins 1,4,5-P₃, mioinositol, L- α -fosfatidilcolina, L- α -fosfatidiletanolamina, L- α -fosfatidilserina, D,L- α -ácido fosfatídico, L- α -fosfatidilglicerol, cardiolipina, D-glucosa 6-fosfato, D-glucosa 1,6-bisfosfato, D-fructosa 6-fosfato, D-fructosa 1,6-bisfosfato, D-fructosa 2,6-bisfosfato, ácido 2,3-bisfosfo-D-glicérico, L- α -glicerol fosfato, β -glicerol fosfato, creatina fosfato, progesterona, acetilcolina, carbamilcolina, espermina, espermidina, neomicina, polilisina (pesos moleculares promedios de 12000 y 24000, determinados por viscosidad), colagenasa (Tipo I_A), DTT, EDTA, EGTA, Tris, Hepes, seroalbúmina de bovino (fracción V); Tritón X-100, PPO, POPOP, γ -(meta-criloxi)-propil trimetoxisilano, piruvato de sodio, formiato de amonio, placas cromatográficas de sílica gel de alta resolución y placas cromatográficas de polietilenimino celulosa fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (de levadura), L- α -glicerol fosfato deshidrogenasa y triosa fosfato iso-

merasa (de músculo de conejo), lactato deshidrogenasa (de corazón de porcino), 3-fosfoglicerato quinasa (de levadura), creatina quinasa (de músculo de conejo) y NAD^+ fueron adquiridos a Boehringer Mannheim GmbH Biochemica.

Insulina (de bovino) y Chaps se adquirieron a Calbiochem Behring Corp.

Sacarosa, oxalato de potasio, tartrato de sodio y potasio y yodo se obtuvieron de E. Merck A.G.

Acetona, cloroformo y metanol, todos grado analítico, fueron obtenidos de E. Merck A.G. o Riedel - de Haën, A.G.

Las sales inorgánicas y los ácidos, tanto inorgánicos como orgánicos, todos grado analítico, se adquirieron a Sigma Chemical Co., E. Merck A.G., Riedel - de Haën A.G. o Fluka, A.G.

La columna de intercambio aniónico "Partisil 10 Sax" para HPLC se obtuvo de Whatman International Ltd.

Las placas para autorradiografía "X - Omat - XAR-5" fueron adquiridos a Eastman Kodak Co.

Ptd $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins fue obtenido de Amersham International (18,3 - 19,3 Ci/mmol); Ptd $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 4-P se adquirió a Amersham International (1 Ci/mmol), así como también a New England Nuclear Research Products (9,9 Ci/mmol). De este último también se obtuvo Ptd $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 4,5- P_2 (8,8 Ci/mmol).

De Amersham International se obtuvieron además $[2\text{-}^3\text{H}]$ mio-inositol (82,5 Ci/mmol), $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4- P_2

(1 Ci/mmol) y la mezcla de inositol fosfatos: [2-³H] Ins 1-P, [2-³H] Ins 1,4-P₂ y [2-³H] Ins 1,4,5-P₃, cada uno con una radiactividad específica de 1 Ci/mmol.

³²P_i se adquirió tanto a Amersham International como a New England Nuclear Research Products.

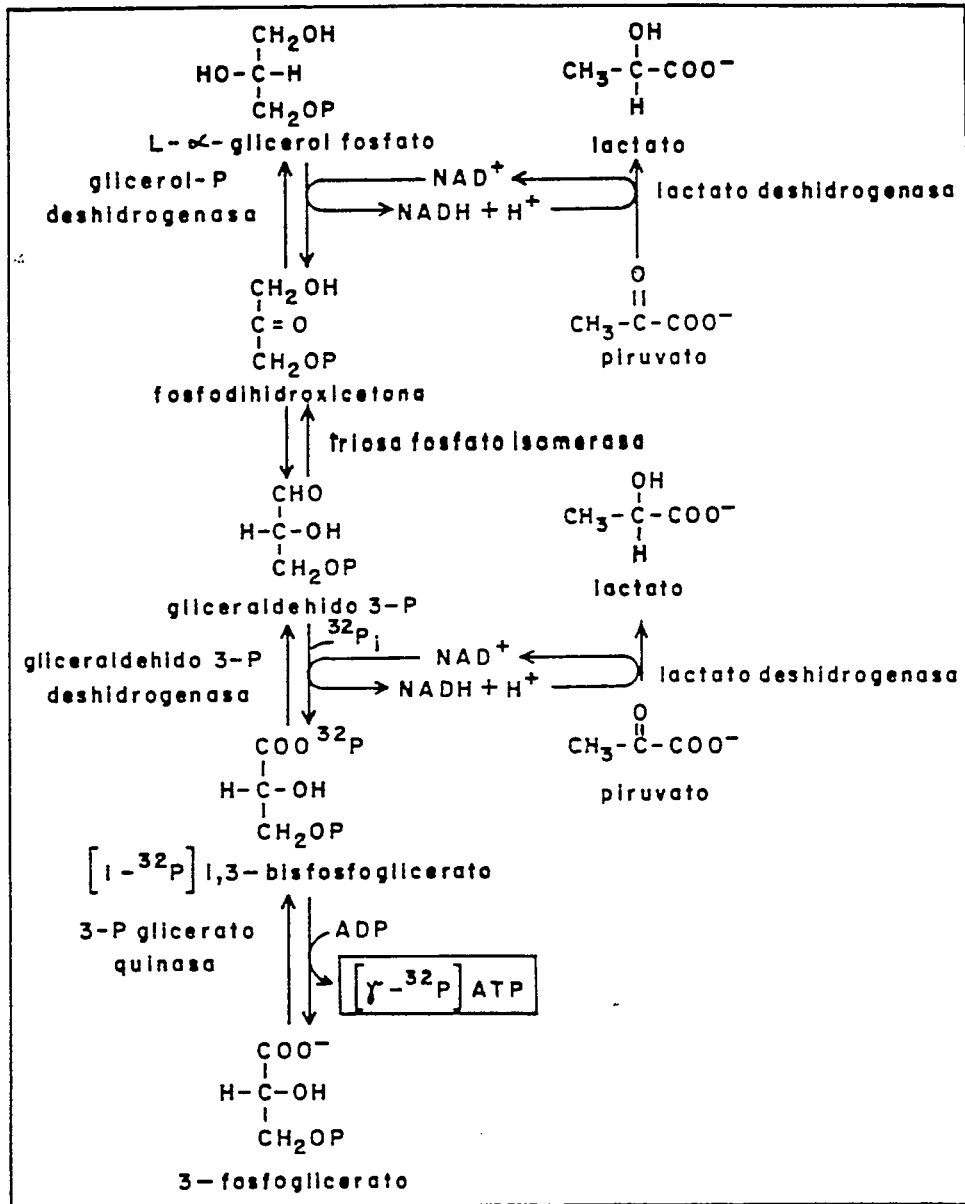
Las hembras adultas de *Xenopus laevis* fueron adquiridas en South African Snake Farm, Cape Province, R.S.A. y mantenidas en tanques a 22°C.

B.- OBTENCION DE [γ-³²P] ATP

Se utilizó el método descrito por Walseth y Johnson (Walseth y Johnson, 1979), que se basa en una serie de reacciones enzimáticas de la vía glicolítica (Esquema IV).

B.1. Síntesis enzimática

Se procede de la siguiente manera: una solución que contiene 50 mCi de ³²P_i en HCl 2 N se lleva a pH 8-8,5 con NaOH 2 N. A continuación, se incuba durante 1 hora a 37°C en un medio que contiene amortiguador Tris-HCl 80 mM, pH 9; MgCl₂ 20 mM; DTT 10 mM; L-α-glicerol fosfato 0,24 mM; piruvato de sodio 2 mM (recién preparado); NAD⁺ 1 mM; ADP 0,1 mM; L-α-glicerol fosfato deshidrogenasa 14 µg/ml (0,8 unidades); triosa fosfato isomerasa 140 µg/ml (0,7 unidades); gliceraldehido 3-P deshidrogenasa 14 µg/ml (1,1 unidades); 3-fosfoglicerato quinasa 1,4 µg/ml (0,6 unidades) y lactato deshidrogenasa 7 µg/ml (3,5 unidades), en un volumen total de 1 ml. Las enzimas se

ESQUEMA IV: SINTESIS DE $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$.

encuentran suspendidas en sulfato de amonio 3,2 M por lo cual, previo a su utilización, una mezcla de ellas en la relación adecuada se centrifuga durante 10 minutos a 7000 x g y el residuo se resuspende en 100 μ l de una solución constituida por amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 9 y DTT 1 mM, para luego adicionarla al medio de incubación. La reacción de fosforilación del ADP se detiene calentando durante 2 minutos a 100°C.

B.2. Análisis de la pureza y cuantificación del [γ -³²P] ATP

La determinación de la pureza del [γ -³²P] ATP sintetizado, así como también del rendimiento de la incorporación de la marca radiactiva en dicho compuesto, se realiza a través de una cromatografía ascendente en placa de polietilenimino celulosa, utilizando como solvente una solución de fosfato de potasio 1 M, pH 3,5. En dicha cromatografía se usan como patrones AMP, ADP y ATP y sus respectivas migraciones se determinan exponiendo la placa cromatográfica a la luz ultravioleta de onda corta.

Una adecuada separación se obtiene en aproximadamente 45 minutos y el ATP migra a una distancia relativa (R_f) entre 0,4 y 0,5.

Para cuantificar la radiactividad incorporada en el [γ -³²P] ATP, se corta la placa cromatográfica en trozos de 0,5 cm y se determina la radiactividad asociada a cada trozo por espectrometría de centelleo líquido.

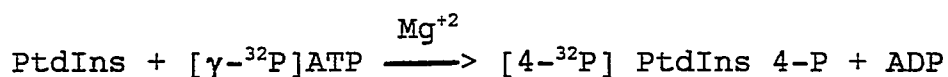
Con el método utilizado para la síntesis se logra

una incorporación entre 80 y 90% del $^{32}\text{P}_i$ en $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$.

C.- OBTENCION DE $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO

Para la preparación de $[4\text{-}^{32}\text{P}] \text{PtdIns 4-P}$ se diseñó un procedimiento basado en el método enzimático descrito por Knowles y Lawrence (Knowles y Lawrence, 1985).

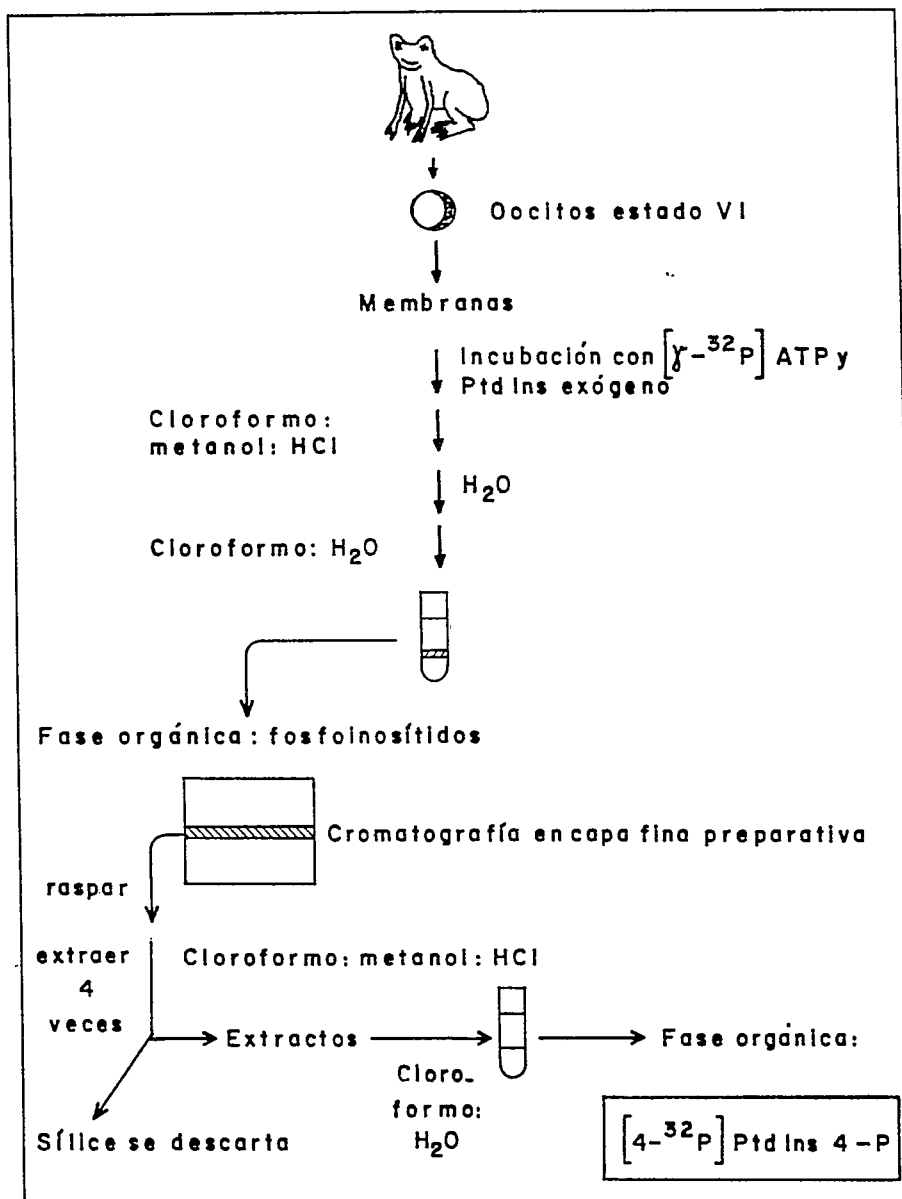
Este último consiste en la fosforilación de PtdIns con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$, utilizando una preparación de membranas plasmáticas de hígado de rata, donde está presente la enzima PtdIns 4-quinasa, de tal forma que se lleva a cabo la reacción:



El $[4\text{-}^{32}\text{P}] \text{PtdIns 4-P}$ así sintetizado se purifica a través de una cromatografía en capa fina preparativa.

En la realización de esta tesis se reemplazó la preparación de membranas usada en el método original por otra obtenida de oocitos de *Xenopus laevis*, donde también se tiene actividad PtdIns 4-quinasa. Con esta preparación de membranas más del 90% de la marca proveniente del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ que se incorpora en compuestos lipídicos lo hace en PtdIns 4-P, mientras que menos del 5% de dicha marca aparece en PtdIns 4,5- P_2 , producto de una segunda fosforilación con ATP, catalizada por la PtdIns 4-P 5-quinasa (Carrasco y col. 1989).

El procedimiento utilizado se muestra en el Esquema V.



ESQUEMA V: SINTESIS DE $[4-^{32}\text{P}]$ FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO.

C.1. Síntesis enzimática

La fosforilación del PtdIns se realiza en 24 tubos en paralelo, cada uno de los cuales contiene 50 μ l del siguiente medio de incubación: amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; Chaps 0,32 mM; DTT 1 mM; PtdIns 56 μ M; $MgCl_2$ 10 mM; [γ - ^{32}P] ATP 50 μ M (1600 dpm/mmol) y 165 μ g de proteínas de membranas de oocitos de *Xenopus laevis*, preparadas según se indica en Materiales y Métodos (sección D).

El PtdIns está disuelto en cloroformo (0,5 μ g/ml) y a cada tubo se agregan 5 μ l de esta solución, para luego evaporar a sequedad bajo N_2 . A continuación, se adicionan 5 μ l de Chaps 3,2 mM y se agita durante 5 minutos. Luego se agrega el resto de los componentes del medio, exceptuando las membranas, y se sonica durante 5 minutos en un sonicador de pozo. Finalmente, se adiciona la preparación de membranas.

Se incuba durante 5 minutos a 30°C y la reacción se detiene agregando a cada tubo 400 μ l de una mezcla de cloroformo : metanol : HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

C.2. Extracción de los fosfoinosítidos

Se procede según la técnica de Kano y col. (Kano y col., 1984). A cada tubo se agregan 50 μ l de H_2O , se agita y luego se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregan 100 μ l de cloroformo y 100 μ l de H_2O , se agita durante 1 minuto y se centrifuga a 3000 x g durante 10 minutos. Con este procedimiento se separa una fase

orgánica (inferior) y una acuosa (superior), quedando la proteína en la interfase. Se separa la fase orgánica y la fase acuosa se vuelve a extraer con 100 μ l de cloroformo, agitando por 1 minuto. Luego de centrifugar a 3000 x g durante 10 minutos, se separa nuevamente la fase orgánica y se junta con la anterior.

La fase orgánica total se lava con 100 μ l de H₂O saturada con cloroformo, agitando durante 1 minuto. A continuación se centrifuga a 3000 x g durante 10 minutos y se descarta la fase acuosa. Para eliminar completamente cualquier fracción residual de fase acuosa en esta etapa, se mantiene la fase orgánica durante 1-12 horas a - 80°C. Inmediatamente luego de descongelada, se centrifuga a 3000 x g durante 10 minutos y se descarta el H₂O residual.

Las fases orgánicas así obtenidas de los 24 tubos se evaporan a sequedad bajo N₂ gaseoso, se resuspenden en una mezcla de cloroformo y metanol (1:1 vol/vol) y se juntan.

Alrededor del 0,5% de la radiactividad del [γ -³²P] ATP utilizado se recupera en la fase orgánica total.

C.3. Purificación del [4-³²P] fosfatidilinositol 4-monofosfato sintetizado

Se realiza a través de una cromatografía preparativa en capa fina y se procede de la siguiente manera: 480 μ l de la fase orgánica total, conteniendo los fosfoinosítidos, se aplican a lo ancho de 6 cm en una placa cromatográfica de sí-

lica gel de alta resolución de 10 cm x 10 cm, la cual ha sido precorrida en una solución de oxalato de potasio al 1% p/v en una solución de metanol : H₂O (2:3 vol/vol) y activada durante 1 hora a 110°C. El cromatograma se desarrolla en un sistema de solventes constituido por cloroformo : acetona : metanol : ácido acético glacial : H₂O (40:15:13:12:8 vol/vol) (Kano y col. 1984). A continuación, la placa se seca y el [4-³²P] PtdIns 4-P se localiza por medio de una autorradiografía con placas Kodak X-Omat-XAR 5.

C.4. Extracción del [4-³²P] fosfatidilinositol 4-monofosfato desde la placa cromatográfica preparativa

La sílica gel correspondiente a la zona donde se localizó al [4-³²P] PtdIns 4-P se raspa y se extrae 4 veces con 400 µl de una mezcla de cloroformo : metanol : HCl concentrado (10:20:0,1 vol/vol) (Knowles y Lawrence, 1985), agitando por 15 minutos cada vez y separando la sílica gel por centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos. A los extractos se le agrega 400 µl de cloroformo y 400 µl de H₂O, se agita y se centrifuga por 10 minutos a 3000 x g, lográndose una separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa se reextrae con 400 µl de cloroformo. Se juntan los extractos clorofórmicos y se lava 1 vez con 400 µl de H₂O saturada con cloroformo, centrifugando luego durante 10 minutos a 3000 x g. Se separa la fase orgánica y se elimina la fase acuosa. El H₂O residual se descarta congelando la fase orgánica durante 1-12

horas a -80°C y luego, inmediatamente de ser descongelada, se centrifuga a $3000 \times g$ durante 10 minutos. Finalmente, la fase orgánica se evapora a sequedad bajo N_2 y se redisuelve el producto en $100 \mu\text{l}$ de cloroformo.

La radiactividad en la fase orgánica se determina por espectrometría de centelleo líquido. Alrededor del 0,2% del ^{32}P del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ utilizado se recupera en el $[4\text{-}^{32}\text{P}]\text{PtdIns 4-P}$ extraído de la placa de sílica gel.

C.5. Análisis de la pureza del $[4\text{-}^{32}\text{P}]\text{fosfatidilinositol 4-monofosfato sintetizado}$

La pureza del producto sintetizado se analiza por cromatografía en capa fina en dos sistemas diferentes de solventes: el producto radiactivo obtenido comigra con un patrón de PtdIns 4-P en el sistema de solventes ya descrito en C.3, constituido por cloroformo : acetona : metanol : ácido acético glacial : H_2O (40:15:13:12:8 vol/vol) (Kano y col, 1984), así como también en un segundo sistema consistente en una mezcla de cloroformo : metanol : hidróxido de amonio concentrado : H_2O (17:13,2:2,8:1 vol/vol) (Pike y Eakes, 1987).

Las placas cromatográficas se revelan con vapores de yodo para localizar los compuestos patrones.

D.- PREPARACION DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*

D.1. Obtención de ovarios de *Xenopus laevis*

Hembras adultas se anestesian por hipotermia en un baño de hielo y agua, el ovario se extrae quirúrgicamente y se corta en trozos pequeños. Estos se lavan con solución salina de Barth para anfibios y se mantienen en esta solución a 4°C. La composición de la solución de Barth es la siguiente: amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; MgSO₄ 0,82 M; CaCl₂ 0,74 mM; KCl 1,0 mM; Ca(NO₃)₂ 0,33 mM; NaCl 88 mM; NaHCO₃ 2,4 mM.

D.2. Obtención de oocitos

Los oocitos desfoliculados se obtienen por un procedimiento enzimático: trozos pequeños de ovarios provenientes de 8 ranas se separan en 2 porciones y cada una se incuba con agitación suave durante 2 horas a 25°C en 50 ml de una solución que contiene: amortiguador Hepes 10 mM, pH 8; CaCl₂ 1 mM; NaCl 110 mM y colagenasa 3 mg/ml. Este tratamiento disocia al tejido del ovario, dejando oocitos libres y una suspensión de capas de células foliculares. Estas últimas se eliminan aprovechando el hecho de que sedimentan más lento que los oocitos. Los oocitos disociados se lavan exhaustivamente con solución de Barth para eliminar la colagenasa y se agita nuevamente con la misma solución para desprender el resto de las células foliculares.

Los oocitos de mayor tamaño, correspondientes a los

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

D.3. Fraccionamiento celular

Las membranas se preparan según el método descrito por Jordana y col. (Jordana y col., 1984).

Todas las manipulaciones se efectúan a 4°C. Los oocitos se homogeneizan en 1 volumen de una solución que contiene: amortiguador Hepes 50 mM, pH 8; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; y sacarosa 0,88 M (solución A). La homogeneización se realiza con un homogeneizador Dounce, con 10 pasadas de vástago A y 10 pasadas del vástago B. El homogeneizado resultante se centrifuga durante 15 minutos a 1000 x g. El sobrenadante obtenido se filtra a través de lana de vidrio y el filtrado se centrifuga durante 20 min a 20000 x g. Nuevamente, el sobrenadante se filtra a través de lana de vidrio y el filtrado se centrifuga durante 2 horas a 100000 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 guarda el sobrenadante. Se aísla la fracción "algodonosa" y se diluye con una solución que contiene amortiguador Hepes 50 mM, pH 8; EDTA 1 mM y DTT 1 mM (solución B), de forma tal que la concentración de sacarosa quede 0,22 M, y se centrifuga nueva-

mente durante 2 horas a 100000 x g. Así se obtiene un sedimento adherido al fondo del tubo y un sobrenadante. Finalmente, el sedimento se resuspende en una solución que contiene amortiguador Hepes 50 mM, pH 8; EDTA 1 mM; DTT 1 mM y sacarosa 0,22 M (solución C), de modo de obtener una concentración de proteínas entre 10 y 20 mg/ml, y se guarda en alícuotas de 100 μ l a - 80°C hasta su uso.

E.- EXTRACCION DE FOSFOINOSITIDOS, INOSITOL FOSFATOS, INOSITOL Y FOSFATO INORGANICO. METODO UTILIZADO EN LOS ENSAYOS ENZIMATICOS.

En algunos ensayos enzimáticos que se detallarán más adelante en esta tesis, es necesario proceder a la extracción de los fosfoinosítidos (PtdIns, PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂). En otros, se requiere extraer compuestos hidrosolubles como inositol fosfatos e inositol. Por último, en ciertos ensayos interesa la extracción tanto de fosfoinosítidos como de inositol fosfatos e inositol o bien de P_i.

En todos los casos se utiliza el mismo método y es el que se describe a continuación: una vez detenida la reacción enzimática correspondiente, por la adición de 400 μ l de una mezcla de cloroformo : metanol : HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol) a los 50 ó 60 μ l del medio de incubación, según el caso, se procede a extraer los fosfoinosítidos según el método descrito por Kano y col. (Kano y col., 1984). En primer término, se adicionan a la mezcla anterior 50 μ l de

H₂O, se agita y se mantiene durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregan luego 100 µl de cloroformo y 100 µl de H₂O, se agita durante 1 minuto y se centrifuga durante 10 minutos a 3000 x g, separándose 2 fases: una superior (acuosa), y una inferior (orgánica), quedando la proteína en la interfase. Se guarda la fase orgánica.

La fase acuosa se reextrae con 100 µl de cloroformo, agitando durante 1 minuto, para luego centrifugar durante 10 minutos a 3000 x g. Se guarda o se descarta la fase acuosa, según el ensayo de que se trate.

Cuando interesan los fosfoinosítidos, la fase orgánica resultante de la segunda extracción se junta con la primera y la fase orgánica total se lava con 100 µl de H₂O saturada con cloroformo, agitando durante 1 minuto, para luego centrifugar a 3000 x g durante 10 minutos. Se descarta la fase acuosa y la fase orgánica se guarda por 1-12 horas a - 80°C, procedimiento que se utiliza para separar completamente el H₂O remanente, para lo cual, inmediatamente después de descongelar la fase orgánica, se centrifuga a 3000 x g por 10 minutos.

La fase orgánica contiene los fosfolípidos de inositol, mientras que en la fase acuosa quedan los inositol fosfatos, inositol y P_i.

F.- SEPARACION DE LOS FOSFOINOSITIDOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA. METODO UTILIZADO EN LOS ENSAYOS ENZIMATICOS.

En la mayor parte de los ensayos enzimáticos realizados en esta tesis y descritos más adelante (Materiales y Métodos, H, I, J, K) se procede a la separación por medio de una cromatografía en capa fina de los fosfoinosítidos extraídos del medio de incubación, y a la posterior determinación de la radiactividad asociada a uno o más de ellos. Para tal efecto se procede de la siguiente manera: la fase orgánica, obtenida como se describió en E, se evapora a sequedad bajo N_2 y se resuspende en 50 μ l de cloroformo. A cada tubo del experimento se le agrega PtdIns, PtdIns 4-P y PtdIns 4,5- P_2 (2 μ g de cada uno) como patrones de cromatografía y la solución clorofórmica se aplica en una placa cromatográfica de sílica gel de alta resolución, de 10 cm x 10 cm, precorrida en oxalato de potasio al 1% en metanol : H_2O (2:3 vol/vol) y activada durante 1 hora a 110°C. El cromatograma se desarrolla en un sistema de solventes constituido por cloroformo : acetona : metanol : ácido acético glacial : H_2O (40:15:13:12:8 vol/vol), según el procedimiento descrito por Kano y col. (Kano y col., 1984).

En aquellos experimentos en que interesa conocer además la radiactividad asociada a lisofosfatidilinositol (liso PtdIns) o lisofosfatidilinositol 4-monofosfato (liso PtdIns 4-P) se adicionan también dichos compuestos como patrones para la cromatografía.

A continuación, las placas se secan y los compuestos patrones se localizan revelando con vapores de yodo. En las ocasiones que se indican se somete la placa cromatográfica a una autorradiografía con placas radiográficas Kodak-X-Omat-XAR 5.

Para determinar la radiactividad en el compuesto que interesa, se raspa la sílica en la mancha correspondiente y se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido.

G.- SEPARACION DE INOSITOL FOSFATOS, INOSITOL Y FOSFATO INORGANICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION. METODO UTILIZADO EN LOS ENSAYOS ENZIMATICOS.

En varios ensayos enzimáticos que se describirán mas adelante (Materiales y Métodos, J.2., K, L) es necesario separar los inositol mono, bis y trisfosfato y el inositol, y determinar la radiactividad asociada a uno o más de estos compuestos. A su vez, en el ensayo de la actividad fosfomonoesterásica sobre PtdIns 4-P usando [4-³²P] PtdIns 4-P como sustrato (descrito en Materiales y Métodos, J.2.), es necesario separar P_i y cuantificar la radiactividad en él.

Esta separación se lleva a cabo a través de una cromatografía líquida de alta presión (cromatógrafo líquido de alta presión Shimadzu, modelo LC-6A) usando una columna de intercambio aniónico Partisil 10-Sax de 0,46 cm x 25 cm.

Las fases acuosas de cada tubo se evaporan a sequedad bajo N₂ y se redisuelven en 300 µl de H₂O desionizada.

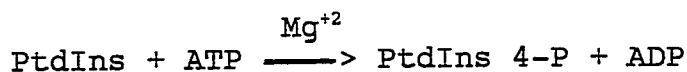
Luego se inyectan en la columna y se eluyen con un flujo de 1,2 ml/min según el siguiente programa (Irvine y col, 1985): se pasa H₂O durante 6 minutos; a continuación se pasa H₂O desionizada y formiato de amonio 1 M (ajustado a pH 3,7 con H₃PO₄ concentrado), de forma tal de lograr una gradiente lineal de formiato entre 0 y 1 M, la cual se desarrolla durante 24 minutos. El formiato 1 M continúa pasando durante 10 minutos, para luego reducir linealmente su concentración con H₂O, hasta llegar a 0 en 2 minutos. Finalmente, se pasa H₂O durante 21 minutos. El tiempo total de una corrida es de 63 minutos.

El eluido se colecta en fracciones de tiempo de 0,25 minutos, lo cual corresponde a volúmenes de 300 μ l. La elución se controla a través de los patrones AMP, ADP y ATP, adicionados a cada muestra en concentración de 100 μ M cada uno, los cuales se detectan espectrofotométricamente a 260 nm, con el detector U.V. del instrumento.

La calibración de los volúmenes de elución de los inositol fosfatos e inositol se realiza inyectando una mezcla de mio-inositol (0,04 pmoles, 7000 dpm) e Ins 1-P, Ins 1,4-P₂ e Ins 1,4,5-P₃, todos marcados en la posición 2 del anillo inositol con ³H (3,3 pmoles y 7300 dpm de cada uno). El volumen de elución de P₁ se determina inyectando ³²P₁ (10 pmoles, 7500 dpm).

A las fracciones obtenidas se les determina la radiactividad por espectrometría de centelleo líquido.

H.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-QUINASA. INCORPORACION DE [³²P] FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO



El método se basa en cuantificar el [4-³²P] PtdIns 4-P formado a partir de PtdIns endógeno de la membrana y [γ -³²P]ATP.

Los ensayos se realizan según el procedimiento descrito por Carrasco y col. (Carrasco y col., 1989) (Esquema VI).

H.1. Incubación de membranas

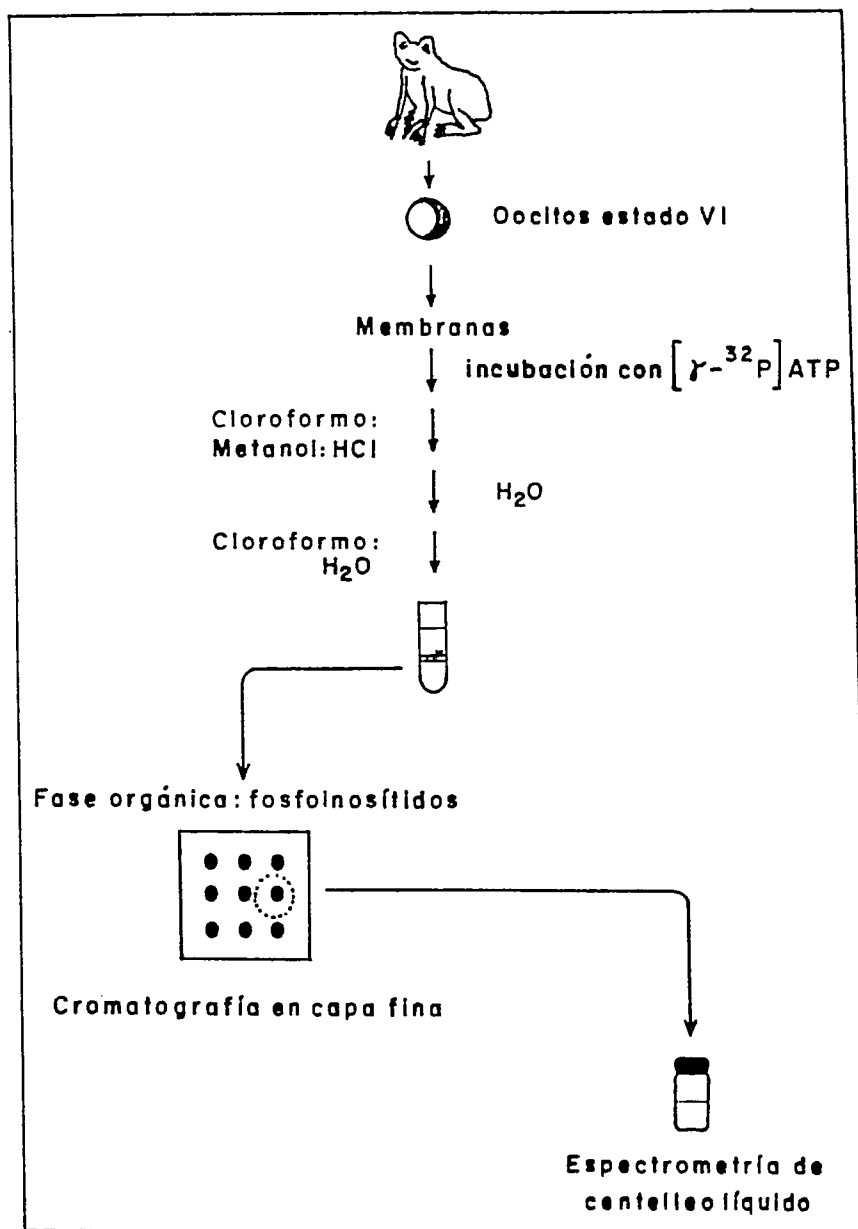
25-98 μ g de proteínas de membranas se incuban en un medio que contiene: amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM y [γ -³²P] ATP 50 μ M (1600 dpm/pmol), en un volumen total de 50 μ l. Se incuba durante 3 minutos a 30°C y la reacción se detiene adicionando 400 μ l de una mezcla de cloroformo: metanol: HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

H.2. Extracción de los fosfoinosítidos

Se procede como se describió en E.

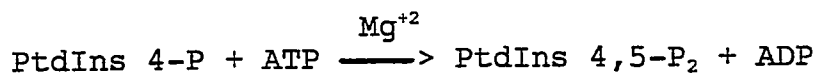
H.3. Separación de los fosfoinosítidos

Se efectúa como se señaló en F, cuantificando la radiactividad incorporada en PtdIns 4-P.



ESQUEMA VI: ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-QUINASA.

I.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO 5-QUINASA. INCORPORACION DE [^{32}P] FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSEFATO



El método empleado es básicamente el mismo que se utiliza para determinar la actividad de la fosfatidilinositol 4-quinasa (ver Materiales y Métodos, H): se procede a cuantificar el PtdIns 4,5-P₂ radiactivo sintetizado a partir de PtdIns 4-P exógeno y endógeno de la membrana y [γ - ^{32}P] ATP.

Los ensayos se realizan según el procedimiento descrito por Carrasco y col. (Carrasco y col., 1989), adicionando PtdIns 4-P exógeno en concentración de 100 μM .

I.1. Incubación de membranas

36-60 μg de proteínas de membranas se incuban en un medio que contiene: amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; PtdIns 4-P 100 μM ; MgCl_2 10 mM; DTT 1 mM y [γ - ^{32}P] ATP 50 μM (1600 dpm/pmol), en un volumen de 50 μl . Se usan tubos silanizados.

Se incuba durante 5 minutos a 30°C y la reacción se detiene adicionando una mezcla de cloroformo: metanol: HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

El PtdIns 4-P está disuelto en cloroformo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y a cada tubo se agrega 5 μl de esta solución, para luego evaporar a sequedad bajo N_2 . A continuación se adicionan todos los componentes del medio de incubación, exceptuando las mem-

branas, se agita durante 5 minutos y se sonica por 5 minutos en un sonicador de pozo.

I.2. Extracción de los fosfoinosítidos

Se realiza según el método señalado en E, con el cual los fosfoinosítidos permanecen solubles en la fase orgánica.

I.3. Separación de los fosfoinosítidos

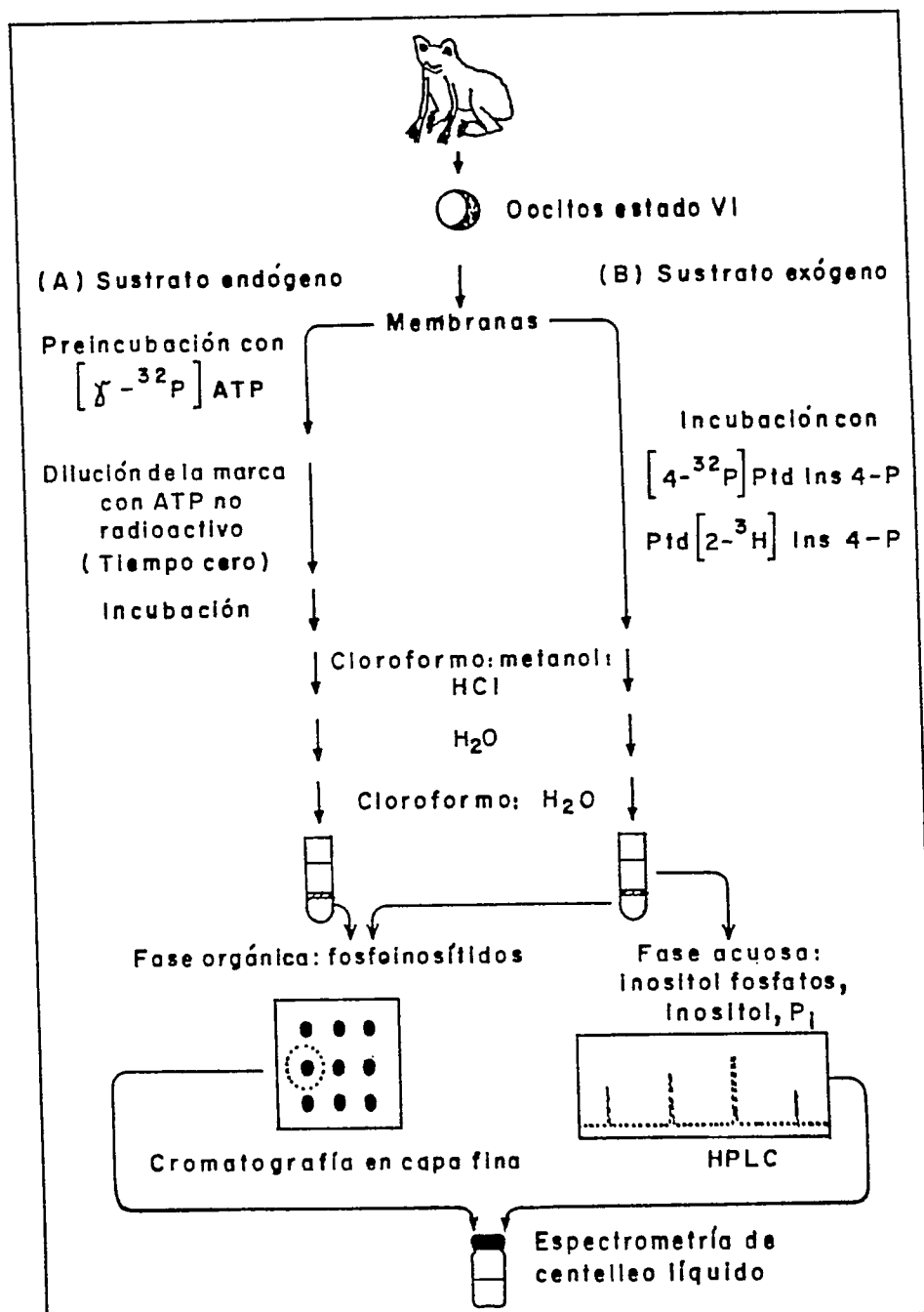
Se procede como se describió en F, cuantificando la radiactividad que se incorpora en PtdIns 4,5-P₂.

J.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA



J.1. Ensayo utilizando sustrato endógeno

El método se basa en sintetizar [4-³²P] PtdIns 4-P a partir de [γ-³²P] ATP y PtdIns endógeno de la membrana, detener la incorporación de la marca diluyendo con un exceso de ATP no radiactivo y por último determinar el [4-³²P] PtdIns 4-P remanente luego de incubar durante un tiempo determinado (Carrasco y col., 1988) (Esquema VII-A).



ESQUEMA VII: ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA.

(A) con sustrato endógeno (B) con sustrato exógeno

J.1.1. Incubación de membranas

En una primera etapa y con el objeto de lograr la síntesis de [4-³²P] PtdIns 4-P a partir del PtdIns endógeno presente en las membranas, se procede a incubar 35-98 µg de proteínas de membranas con [γ-³²P] ATP (1600 dpm/pmol) en un medio que contiene amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM. Luego de una incubación por 3 minutos a 30°C, se agregan 10 µl de ATP 60 mM, de modo que su concentración final en el medio de incubación sea de 10 mM (dilución de la marca 1:200), con lo cual se impide una posterior incorporación de ³²P en PtdIns 4-P. Esto constituye el tiempo cero de la reacción de desfosforilación. Se continúa la incubación a 30°C durante 30 minutos.

La reacción se detiene con la adición de 400 µl de cloroformo: metanol: HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

J.1.2. Extracción de los fosfoinosítidos

Se lleva a cabo como se describió en E. Los fosfoinosítidos son extraídos en la fase orgánica.

J.1.3. Separación de los fosfoinosítidos

Se realiza como se indicó en F, cuantificando la radiactividad remanente en PtdIns 4-P.

J.2. Ensayo utilizando sustrato exógeno

Se usa como sustrato [4-³²P] PtdIns 4-P (sintetiza-

do como se describió en Materiales y Métodos, sección C) o Ptd [2-³H] Ins 4-P.

El método consiste básicamente en medir el ³²P_i formado a partir de [4-³²P] PtdIns 4-P, o bien, el Ptd [2-³H] Ins generado a partir de Ptd [2-³H] Ins 4-P (Esquema VII-B).

En ambos casos se controla también la desaparición del sustrato radiactivo respectivo.

J.2.1. Incubación de membranas

El [4-³²P] PtdIns 4-P está disuelto en cloroformo, mientras el sustrato tritiado está en una mezcla de diclorometano: etanol: H₂O (20:10:1 vol/vol). Una alícuota conteniendo 20 pmoles de [4-³²P] PtdIns 4-P (15600 dpm) o bien 150 pmoles de Ptd [2-³H] Ins 4-P (330000 dpm) se evaporan a sequedad bajo N₂ en el mismo tubo en que se realizará el ensayo. Se disuelve luego en 5 µl de Chaps 3,2 mM, agitando durante 5 minutos. A continuación se agregan los demás componentes del medio, exceptuando las membranas, y se sonica durante 5 minutos en un sonicador de pozo. Finalmente se agrega la preparación de membranas. El medio de incubación contiene amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; Chaps 0,32 mM y 70 µg de proteínas de membranas, en un volumen total de 50 µl. La reacción se detiene con 400 µl de una mezcla de cloroformo: metanol: HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

J.2.2. Extracción de fosfoinosítidos y fosfato inorgánico

Se procede como se describió en E, de forma tal que los fosfoinosítidos quedan en la fase orgánica, mientras el P_i queda en la fase acuosa.

J.2.3. Separación de los fosfoinosítidos

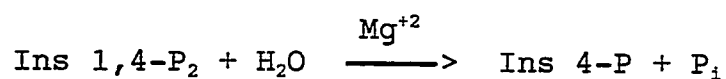
Se realiza como se indicó en F. Cuando se usa $[4-^{32}P]$ PtdIns 4-P como sustrato, se cuantifica la radiactividad remanente en dicho compuesto. Cuando se utiliza el sustrato tritiado, se procede a determinar tanto la radiactividad que aparece en PtdIns, así como también la marca remanente en PtdIns 4-P.

J.2.4. Separación del fosfato inorgánico

Cuando se usa como sustrato $[4-^{32}P]$ PtdIns 4-P, se analiza la aparición de $^{32}P_i$ en la fase acuosa y esto se efectúa según el procedimiento descrito en G.

K.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS FOSFOMONOESTERASAS DE LOS INOSITOL FOSFATOS

K.1. Determinación de la actividad de la inositol 1,4-bisfosfato fosfomonoesterasa



Se usa $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4-P₂ como sustrato y se deter-

mina la aparición de marca en inositol monofosfato, así como también en inositol. Se procede de esta manera porque el inositol monofosfato es a su vez hidrolizado por la preparación de membranas para generar inositol (Esquema VIII).

Se controla también la marca remanente en Ins 1,4-P₂.

K.1.1. Incubación de membranas

50 pmoles de [2-³H] Ins 1,4-P₂ (110000 dpm) se incuban con 98 µg de proteínas de membranas, en un medio que contiene amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; DTT 1 mM y MgCl₂ 10 mM, durante 60 minutos a 30°C. La reacción se detiene con 400 µl de una mezcla de cloroformo: metanol: HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

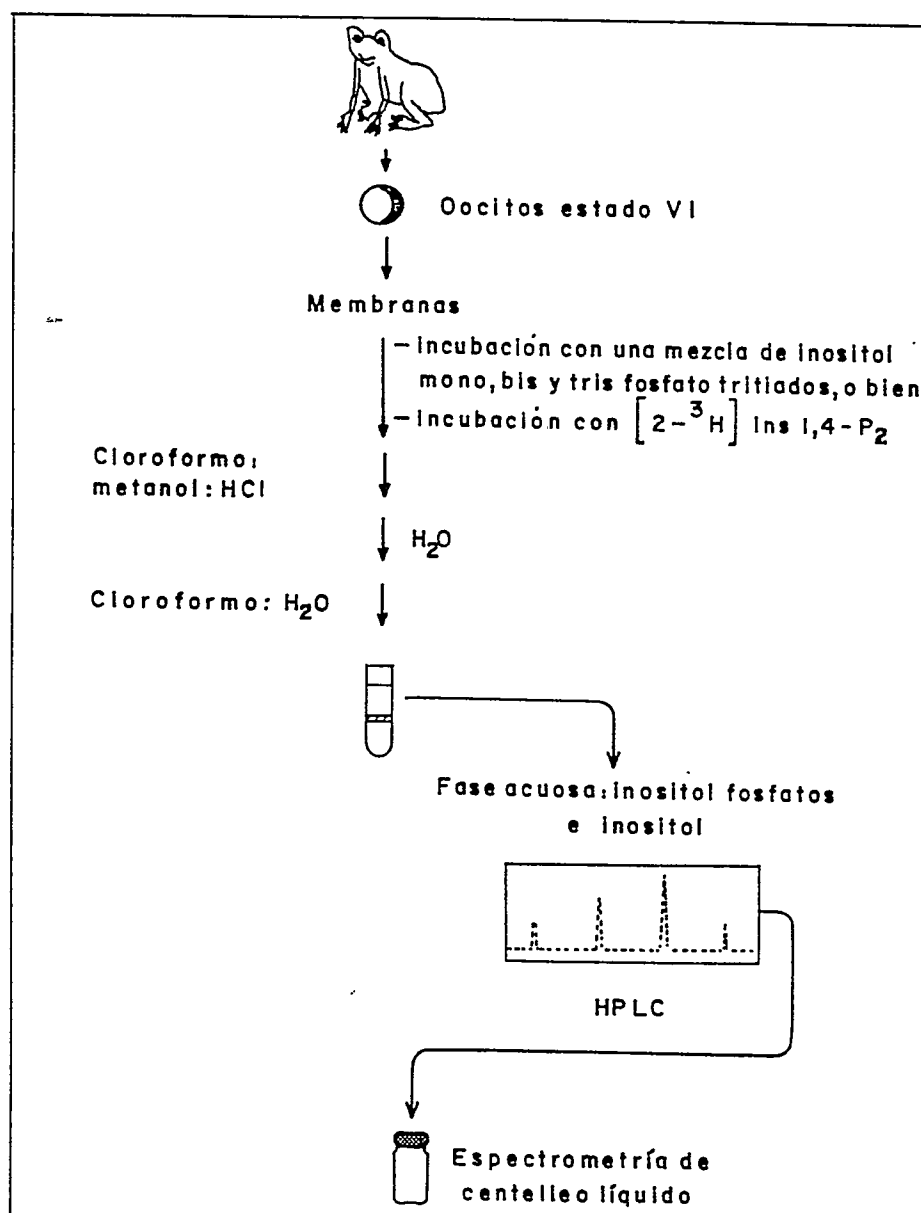
K.1.2. Extracción de inositol fosfatos e inositol

Se realiza según la técnica descrita en E. Los inositol fosfatos y el inositol son extraídos en la fase acuosa.

K.1.3. Separación de inositol fosfatos e inositol

Se cuantifica la radiactividad en inositol mono y bis fosfato y en inositol, siguiendo el método señalado en G. El volumen de elución del inositol monofosfato se determina utilizando [2-³H] Ins 1-P. Con el programa empleado no se distingue entre Ins 1-P e Ins 4-P (Irvine y col., 1985).

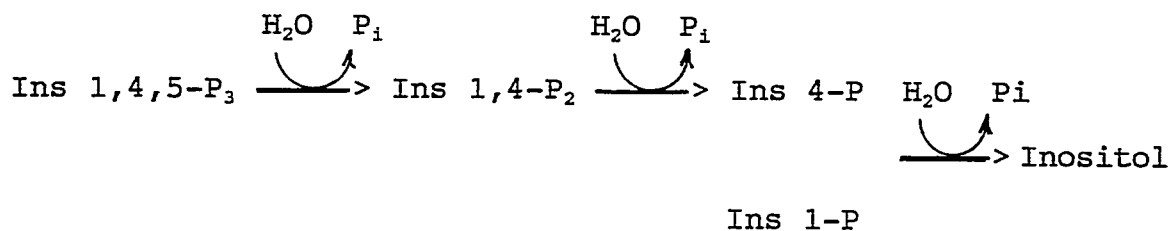
En los experimentos diseñados para comprobar que el



ESQUEMA VIII: ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LAS FOSFOMONOESTERASAS DE LOS INOSITOL FOSFATOS.

inositol monofosfato generado por hidrólisis del Ins 1,4-P₂ corresponde mayoritariamente al Ins 4-P y no al Ins 1-P (Inhorn y Majerus, 1988; Dean y Moyer, 1988) se usó un programa de HPLC que permite distinguir entre ambos isómeros: a una velocidad de flujo de 1 ml/min, se pasa H₂O desionizada y fosfato de amonio 1 M, pH 3,8, de forma tal de lograr un gradiente lineal de fosfato entre 0,01 y 0,06 M, la cual se desarrolla durante 30 minutos. A continuación, se aplica un gradiente entre 0,06 M y 1 M durante 10 minutos. El fosfato continúa pasando durante 10 minutos, para luego reducir linealmente su concentración con H₂O, hasta llegar a 0 en 2 minutos. Finalmente, se pasa H₂O durante 11 minutos. El tiempo total de la corrida es de 63 minutos. Se colectan fracciones de 500 µl (Dean y Moyer, 1988). La calibración de los volúmenes de elución se realiza inyectando una mezcla de Ins 1-P, Ins 1,4-P₂ e Ins 1,4,5-P₃, todos tritiados en la posición 2 del inositol (3,3 pmoles y 7300 dpm de cada uno). No se dispuso de Ins 4-P radiactivo para ser usado como patrón. A las fracciones obtenidas se les determina la radiactividad por espectrometría de centelleo líquido.

K.2. Determinación de la presencia de otras fosfomonoesterasas que hidrolizan inositol fosfatos



Para determinar la presencia en la membrana del oocito de otras fosfomonoesterasas que actúen sobre inositol fosfatos, se dispone de una mezcla de Ins 1,4,5-P₃, Ins 1,4-P₂ e Ins 1-P tritiados y en una proporción conocida y se analiza las variaciones que sufre esta mezcla luego de incubarla con la preparación de membranas de oocitos.

Cabe señalar que el inositol monofosfato proveniente de la hidrólisis de Ins 1,4-P₂ es fundamentalmente Ins 4-P (Inhorn y Majerus, 1988; Dean y Moyer, 1988), pero la mezcla sustrato contiene el isómero con el grupo fosforilo en 1. Sin embargo, el programa de HPLC utilizado en estos ensayos no distingue entre ambos isómeros (Irvine y col., 1985).

K.2.1. Incubación de membranas

Una mezcla formada por 8 pmoles de [2-³H] Ins 1,4,5-P₃, 12 pmoles de [2-³H] Ins 1,4-P₂, 20 pmoles de [2-³H] Ins 1-P y 10 pmoles de [2-³H] inositol (110000 dpm totales), se incubó durante 60 minutos a 30°C con 36 ó 98 µg de proteínas de membranas, en un medio que contiene amortiguador Hepes

25 mM, pH 7,5; DTT 1 mM y Mg^{+2} 10 mM. Se detiene la reacción con 400 μ l de una mezcla de cloroformo : metanol : HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

K.2.2. Extracción de inositol fosfatos e inositol

Se realiza como se describió en E. Los inositol fosfatos y el inositol quedan en la fase acuosa.

K.2.3. Separación de inositol fosfatos e inositol

Se cuantifica la radiactividad en inositol tris, bis y monofosfato, así como también en inositol, utilizando para tal efecto el método que se señaló en G.

L.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C

L.1. Ensayo utilizando fosfatidilinositol como sustrato



Se usa el sustrato tritiado, Ptd [2-³H] Ins y se mide la aparición de Ins 1-P e inositol marcados. Se procede así porque el Ins 1-P producto de la reacción va generando a su vez inositol, debido a la presencia de inositol monofosfato fosfomonoesterasa en la preparación de membranas.

También se controla la desaparición del Ptd [2-³H] Ins.

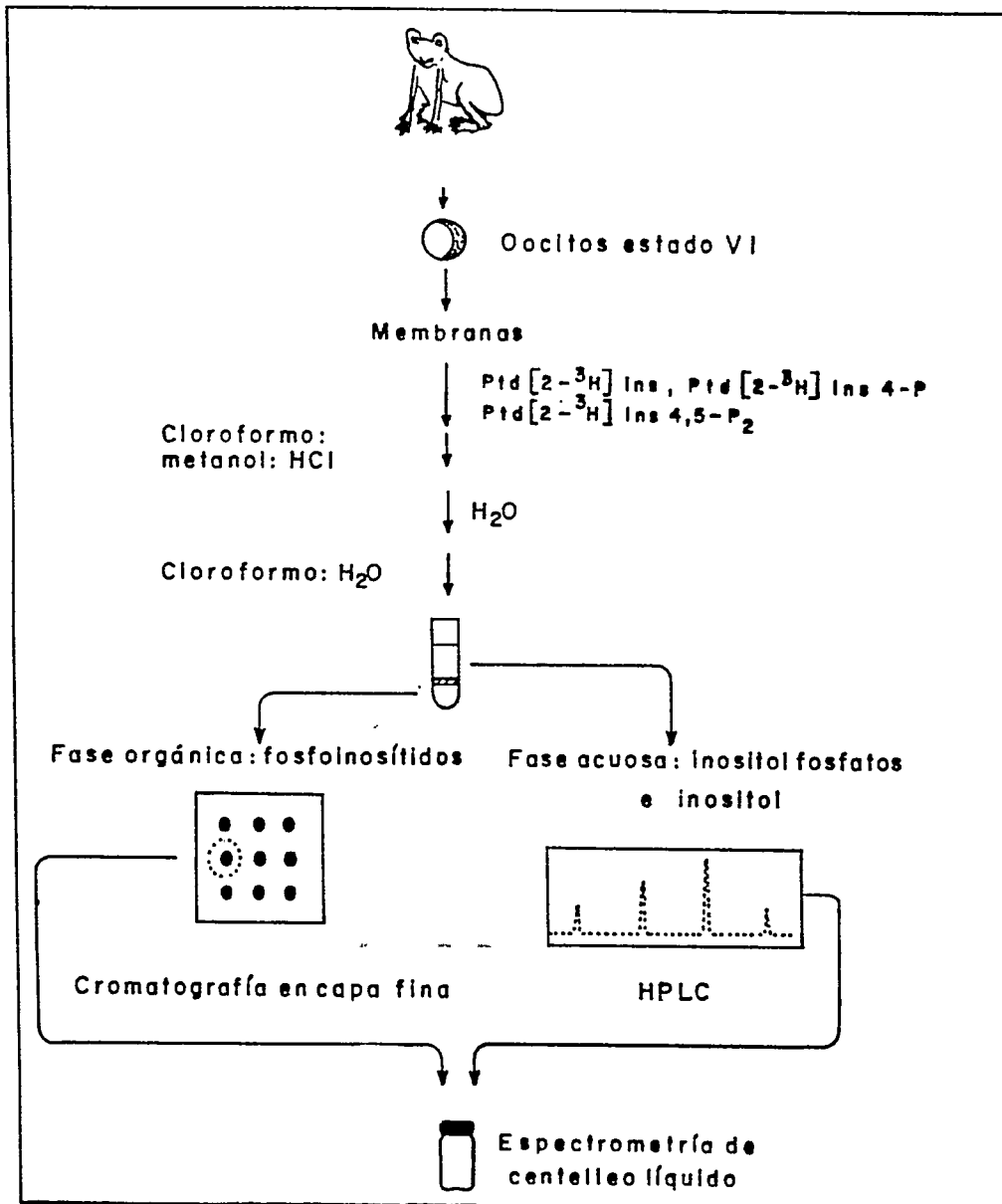
El método se muestra en el Esquema IX.

L.1.1. Incubación de membranas

El Ptd[2-³H]Ins está disuelto en una mezcla de tolueno : etanol (1:1 vol/vol) y 2,7 pmoles (110000 dpm) se colocan en el tubo donde se realizará el ensayo y se evapora a sequedad bajo N₂. Se redisuelve en 5 µl de metanol, con lo cual se obtiene una adecuada distribución del fosfolípido (Roy y col., 1991). Se agregan 5 µl de Chaps 3,2 mM y se agita por 5 minutos. Se agregan a continuación los demás componentes del medio, de modo que en un volumen total de 50 µl se tiene: amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; DTT 1 mM; Chaps 0,32 mM; metanol 5% vol/vol; EGTA 1 mM; CaCl₂ en cantidad tal de tener una concentración de Ca⁺² libre de 100 µM, y 119-196 µg de proteínas de membranas. Se incuba durante 10 minutos a 30°C y se detiene la reacción con 400 µl de una mezcla de cloroformo : metanol : HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

En todos los ensayos de fosfolipasa C, la concentración a usar de CaCl₂ para obtener la concentración deseada de Ca⁺² libre, en presencia de EGTA 1 mM, se calculó usando un programa de computación desarrollado por Goldstein (Goldstein, D.A., 1979), utilizando las constantes descritas por Martell y Smith (Martell, A.E. y Smith, R.M., 1974).

En aquellos experimentos en que interesa determinar cuanto del PtdIns generado por acción de la fosfomonoesterasa sobre PtdIns 4-P es a su vez hidrolizado por la actividad fos-



ESQUEMA IX: ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C.

folipasa C de la membrana del oocito, se utilizan las condiciones de ensayo ya descritas para la fosfomonoesterasa usando sustrato exógeno (J.2.1.), de forma tal que se procede de la siguiente manera: 4 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (176000 dpm), disuelto en tolueno : etanol (1:1 vol/vol) se evaporan a sequedad bajo N₂ y se redisuelve en 5 µl de Chaps 3,2 mM, agitando durante 5 minutos. Luego se adicionan los demás componentes del medio, exceptuando las membranas, y se sonica durante 5 minutos en un sonicador de pozo. Finalmente se agrega la preparación de membranas. En 50 µl totales se tiene: amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; DTT 1 mM; Chaps 0,32 mM; MgCl₂ 10 mM y 70 µg de proteínas de membranas. Se incuba durante 60 minutos a 30°C y la reacción se detiene con 400 µl de una mezcla de cloroformo : metanol : HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

L.1.2. Extracción de fosfoinosítidos, inositol 1-monofosfato e inositol

Se utiliza el método que se describió en E. Los fosfoinosítidos quedan en la fase orgánica, mientras el inositol 1-P y el inositol permanecen en la fase acuosa.

L.1.3. Separación de los fosfoinosítidos

Se procede a determinar la marca remanente en PtdIns, según el método que se describió en F.

L.1.4. Separación de inositol 1-monofosfato e inositol

La radiactividad que aparece en estos compuestos se cuantifica según el método descrito en G.

L.2. Ensayo utilizando fosfatidilinositol 4-monofosfato como sustrato



Se usa el sustrato radiactivo, Ptd [2-³H] Ins 4-P, y se determina la radiactividad en Ins 1,4-P₂ (Esquema IX).

También se controla la radiactividad remanente en PtdIns 4-P.

L.2.1. Incubación de membranas

En primer lugar, se procede a preparar la solución que contiene al sustrato radiactivo: una mezcla de 300 µg de fosfatidilserina, 300 µg de fosfatidiletanolamina, 128 µg de PtdIns 4-P, todos en solución clorofórmica y 1500 pmoles de Ptd[2-³H]Ins 4-P (3,3 x 10⁶ dpm), este último en una mezcla de diclorometano : etanol : H₂O (20:10:1 vol/vol), se evapora a sequedad bajo N₂. Luego se resuspende en 150 µl una solución que contiene amortiguador Hepes-Tris 500 mM, pH 7,5 y KCl 1 M y se agrega 300 µl de agua. Se sonica en un sonicador de pozo hasta obtenerse una solución transparente (10-15 minutos) (Taylor y Exton, 1987).

De esta solución se utilizan 30 µl para cada ensa-

yo, en un volumen total de 50 μ l, de manera que las concentraciones finales de cada componente del medio son: fosfatidilserina 270 μ M; fosfatidiletanolamina 289 μ M; Ptd Ins 4-P 88 μ M; amortiguador Hepes-Tris 50 mM, pH 7,5 y KCl 100 mM. Están presentes además EGTA 1 mM y CaCl_2 de modo de obtener una concentración de Ca^{+2} libre de 100 μ M. También se agrega Ins 1,4- P_2 no radiactivo en exceso, 4 mM. Se procede así para poder atrapar al [2- ^3H] Ins 1,4- P_2 , el cual es el producto de la reacción, puesto que en las membranas de oocitos existen fosfomonoesterasas que catalizan la hidrólisis del Ins 1,4- P_2 .

En cada ensayo hay 50 pmoles de Ptd [2- ^3H] Ins 4-P (110000 dpm) y 119 μ g de proteínas de membranas.

Se incuba durante 10 minutos a 30°C y se detiene la reacción mediante la adición de 400 μ l de una mezcla de cloroformo : metanol : HCl concentrado (20:10:0,01 vol/vol).

En algunos experimentos interesa conocer la cuantía de la hidrólisis de Ptd Ins 4-P, catalizada por la fosfolipasa C presente en las membranas, en las condiciones en que se determina la actividad fosfomonoesterásica sobre este mismo sustrato. En estos casos, se ensaya la fosfolipasa C en el mismo medio de ensayo utilizado para la fosfomonoesterasa (J.2.1.). En consecuencia, se procede de la manera siguiente: 150 pmoles de Ptd [2- ^3H] Ins 4-P (330000 dpm) se incuban con 70 μ g de proteínas de membranas durante 60 minutos a 30°C, en un medio que contiene amortiguador Hepes 25 mM, pH 7,5; DTT 1 mM; MgCl_2 10 mM e Ins 1,4- P_2 4 mM. La reacción se detiene adicionando

400 μ l de una mezcla de cloroformo: metanol: HCl concentrado (20:10:0,01 vol/vol).

El sustrato tritiado está en una mezcla de diclorometano: etanol: H₂O (20:10:1 vol/vol). El volumen requerido se coloca en el tubo en que se realiza el ensayo y se evapora a sequedad bajo N₂. Se redisuelve en 5 μ l de Chaps 3,2 mM, agitando por 5 minutos. A continuación, se agregan los demás componentes del medio, excepto las membranas, y se sonica por 5 minutos en un sonicador de pozo. Por último se adiciona la preparación de membranas.

L.2.2. Extracción de fosfoinosítidos e inositol fosfatos

Se efectúa por el método descrito en E. Los fosfolípidos permanecen en la fase orgánica y los inositol fosfatos en la fase acuosa.

L.2.3. Separación de los fosfoinosítidos

Se realiza según el procedimiento indicado en F. Se cuantifica la radiactividad remanente en PtdIns 4-P.

L.2.4. Separación de los inositol fosfatos

Se lleva a cabo según la técnica señalada en G. Se cuantifica la radiactividad en inositol bisfosfato, controlándose también la aparición de marca en inositol monofosfato e inositol.

L.3. Ensayo utilizando fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato como sustrato



El método empleado consiste en determinar la aparición de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{Ins } 1,4,5\text{-P}_3$ a partir de $\text{Ptd } [2\text{-}^3\text{H}]\text{Ins } 4,5\text{-P}_2$ (Esquema IX).

L.3.1. Incubación de membranas

En primer lugar, es necesario preparar la solución del sustrato radiactivo, para lo cual se procede de la siguiente manera: 200 μg de fosfatidilserina, 200 μg de fosfatidiletanolamina, 100 μg de $\text{PtdIns } 4,5\text{-P}_2$, todos disueltos en cloroformo, y 170 pmoles de $\text{Ptd } [2\text{-}^3\text{H}]\text{Ins } 4,5\text{-P}_2$ ($3,3 \times 10^6$ dpm), disuelto en una mezcla de diclorometano: etanol: H_2O (20:10:1 vol/vol), se evaporan a sequedad bajo N_2 en un tubo previamente silanizado. Luego se agregan 150 μl de una solución constituida por amortiguador Hepes-Tris 500 mM, pH 7,5 y KCl 1 M y posteriormente se adicionan 300 μl de H_2O . Se sonica durante 10-15 minutos hasta que se obtiene una solución transparente, utilizando un sonicador de pozo (Taylor y Exton, 1987).

De esta solución se utilizan 30 μl en cada ensayo, en un volumen total de 50 μl . En consecuencia, las concentraciones finales de cada componente en el medio de incubación

son: fosfatidilserina 180 μM ; fosfatidiletanolamina 192 μM ; PtdIns 4,5- P_2 64 μM ; amortiguador Hepes-Tris 50 mM, pH 7,5 y KCl 100 mM. Al medio se agrega además EGTA 1 mM y CaCl_2 en cantidad tal que la concentración de Ca^{+2} libre sea 50 μM . En cada ensayo hay 5,7 pmoles de Ptd [2- ^3H]Ins 1,4- P_2 (110000 dpm), y 119 μg de proteínas de membranas.

También se adiciona un exceso de Ins 1,4,5- P_3 , no radiactivo, 2 mM, de manera de poder atrapar al [2- ^3H] Ins 1,4,5- P_3 , el producto de la reacción, puesto que en la preparación de membranas están presentes fosfomonoesterasas que hidrolizan a este compuesto.

En algunos experimentos, el Ins 1,4,5- P_3 no radiactivo es reemplazado por fructosa 1,6-bisfosfato 10 mM, compuesto que inhibe a la inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa (Rana y col., 1986).

Se incuba durante 2 minutos a 30°C y la reacción se detiene con 400 μl de una mezcla de cloroformo: metanol: HCl concentrado (10:20:0,01 vol/vol).

L.3.2. Extracción de fosfoinosítidos e inositol fosfatos

Se realiza según el procedimiento que se describió en E. Los fosfoinosítidos quedan disueltos en la fase orgánica, mientras los inositol fosfatos permanecen en la fase acuosa.

L.3.3. Separación de los fosfoinosítidos

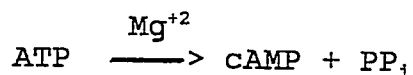
Se cuantifica la radiactividad remanente en PtdIns 4,5-P₂, para lo cual se sigue el método descrito en F.

L.3.4. Separación de los inositol fosfatos

Se cuantifica la radiactividad que aparece en Ins 1,4,5-P₃, lo cual se lleva a cabo según la técnica que se describió en G.

Se controla además la aparición de marca en inositol bis y monofosfato e inositol.

M.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILILICLASA



El método se basa en cuantificar el [³²P] cAMP producido a partir de [α -³²P] ATP (Antonelli y col., 1991). En un volumen de 100 μ l se tiene: amortiguador Hepes 50 mM, pH 8; cAMP 1 mM; DTT 1 mM; EDTA 0,5 mM; glicerol 5% (v/v), MgCl₂ 5 mM; creatina fosfato 4 mM; creatina quinasa 40 μ g, [α -³²P] ATP 0,1 mM (600 dpm/pmol) y 200 μ g de proteínas de membranas. Se incuba durante 30 minutos a 32°C. La reacción se detiene agregando 100 μ l de una mezcla de ATP 40 mM y [³H] cAMP 12 mM (4000 dpm/pmol) y calentando 3 minutos a 100°C. El [³²P] cAMP producido se aísla y se cuantifica a través de una doble cromatografía en DOWEX-50 y alúmina, de acuerdo al método de Solomon y col., (Solomon y col., 1974). El [α -³²P] ATP se

sintetiza en el laboratorio a partir de $^{32}\text{P}_i$ según el método descrito por Walseth y Johnson (Walseth y Johnson, 1979).

N.- DETERMINACION DEL CALCIO TOTAL

El calcio total presente en el medio de incubación se determinó por espectroscopía de absorción atómica.

O.- DETERMINACION DE PROTEINAS

Se realizó por el método descrito por Bradford (Bradford, 1976).

P.- CUANTIFICACION DE LOS COMPUESTOS RADIATIVOS

La radiactividad en fracciones orgánicas o en las muestras resultantes al raspar la sílica gel de las placas cromatográficas, se cuantifica con 5 ml de una mezcla de centelleo que contiene 3,92 g y 0,08 g de PPO y POPOP, respectivamente, por litro de tolueno.

A las fracciones acuosas eluidas de la columna de HPLC se le adiciona 1 ml de H_2O desionizada y se cuantifica su radiactividad con 10 ml de una mezcla de centelleo que contiene 2,7 g y 0,053 g de PPO y POPOP, respectivamente, por litro de una mezcla de tolueno : Tritón X-100 (2:1 vol/vol).

Q.- AUTORADIOGRAFIAS

Se utilizan películas KODAK X-Omat-XAR-5. Las placas cromatográficas que contienen fosfolípidos de inositol

marcados con ^{32}P se exponen por tiempos variables a -80°C .

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

R.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

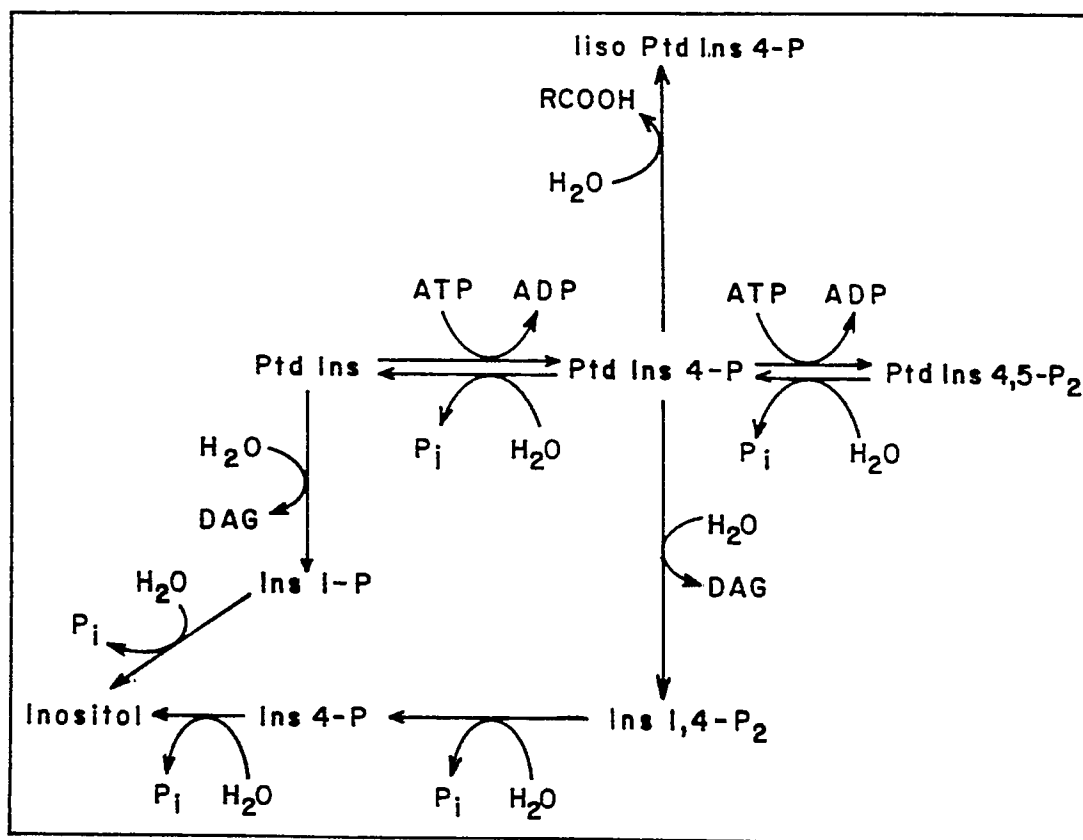
Cada experimento de esta tesis fué repetido entre 1 y 7 veces, en idénticas condiciones. En cada caso se muestran los resultados de uno sólo de los experimentos, representativo del conjunto, y los valores con que se construyeron los gráficos corresponden al promedio entre los duplicados o triplicados de un mismo experimento. En ningún caso la desviación standard entre los valores es superior al 10% del promedio. En el caso de las tablas, los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de los duplicados o triplicados de un mismo experimento, representativo de 2 o más experimentos iguales.

RESULTADOS

A.- ESTUDIOS SOBRE LAS RUTAS METABOLICAS EN QUE PARTICIPA EL FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

Los estudios realizados en la primera parte de esta tesis tienen como objetivo central establecer las rutas metabólicas que dan cuenta de la degradación del fosfatidilinositol 4-monofosfato observada en membranas aisladas de oocitos de *Xenopus laevis* e identificar las enzimas involucradas en este proceso (Esquema X).

Estudios previos de nuestro laboratorio (Carrasco y col., 1989) definieron que las membranas de oocitos contenían una fosfatidilinositol quinasa capaz de generar fosfatidilinositol monofosfato a partir de PtdIns, ya sea endógeno o exógeno, y ATP. Sin embargo, ese trabajo no definió si el producto de esta reacción era el PtdIns 4-P o el PtdIns 3-P. Este último producto podría generarse por medio de una fosfatidilinositol 3-quinasa que ha sido descrita en células estimuladas a proliferar (Whitman y col., 1987).



ESQUEMA X: RUTAS METABOLICAS DEL FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO.

A.1. Identificación de fosfatidilinositol 4-monofosfato como el producto generado en membranas de oocitos por la fosfatidilinositol quinasa.

La sensibilidad a adenosina y ADP es una característica de las PtdIns 4-quinasas y no así de las PtdIns 3-quinazas (Whitman y col., 1987; Carpenter y Cantley, 1990), por lo tanto, la actividad de la PtdIns quinasa de la membrana del oocito se ensayó primero en presencia de concentraciones variables de adenosina. Los resultados que se presentan en la Figura 1-A indican que la reacción de fosforilación del PtdIns endógeno de la membrana con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP es inhibida en un 80% por la adición de adenosina en concentración de 200 μM al medio de incubación.

Luego se realizaron los ensayos de la PtdIns quinasa en presencia de ADP. La Figura 1-B muestra los resultados obtenidos al incubar las membranas de oocitos con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP en presencia de concentraciones crecientes de ADP. Se observa que el ADP en concentración de 1 mM disminuye en un 80% la fosforilación del PtdIns endógeno de la membrana.

Con estos resultados podríamos concluir que en la membrana del oocito está presente mayoritariamente la quinasa que cataliza la fosforilación del PtdIns en la posición 4 del anillo inositol y, en consecuencia, el producto principal de la fosforilación del PtdIns endógeno de la membrana con ATP es PtdIns 4-P. Esto, si la o las fosfatidilinositol quinazas de la membrana del oocito se comportan frente a adenosina y ADP

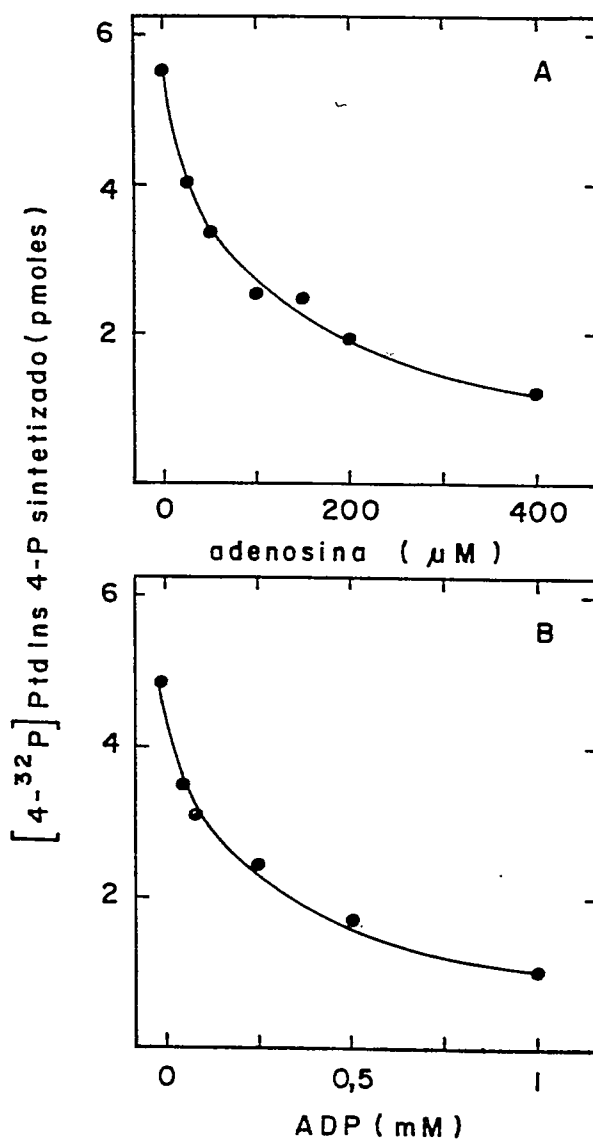


FIGURA 1: EFECTO DE ADENOSINA Y ADP SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL QUINASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

98 μg de proteínas de membranas se incuban con [γ-³²P] ATP 50 μM (1600 dpm/pmmol) durante 3 minutos como se indica en Materiales y Métodos, pero adicionando en (A) diferentes cantidades de adenosina y en (B) diferentes cantidades de ADP. Una vez detenida la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresa como los pmoles de PtdIns 4-P sintetizados en 3 minutos.

en forma similar a como lo hacen estas enzimas en los diversos sistemas estudiados hasta hoy.

A.2. Presencia de una actividad que degrada al fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos

Cuando se incuban membranas de oocitos con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, de modo de sintetizar $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P y luego se bloquea una posterior incorporación de ^{32}P en el PtdIns 4-P mediante la adición de un exceso de ATP no radiactivo, se observa una pérdida de la radiactividad en el $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P.

Esto se puede observar en la autorradiografía de la Figura 2. Luego de 60 minutos de incubación, sólo alrededor de un 40% de la radiactividad originalmente presente en el PtdIns 4-P permanece asociada a él.

A.3. Cinética de degradación del fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas de oocitos

La Figura 3 muestra la cinética de la pérdida de la radiactividad incorporada en el PtdIns 4-P a partir del PtdIns endógeno de la membrana y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. La reacción progresa con el tiempo hasta que, a los 60 minutos, ha desaparecido aproximadamente el 60% de la marca originalmente presente en el PtdIns 4-P. A ninguno de los tiempos ensayados se encontró radiactividad en PtdIns 4,5- P_2 , ni en ningún otro compuesto fosforilado de naturaleza lipídica que pueda ser detectado en una cromatografía en capa fina (ver Figura 2).

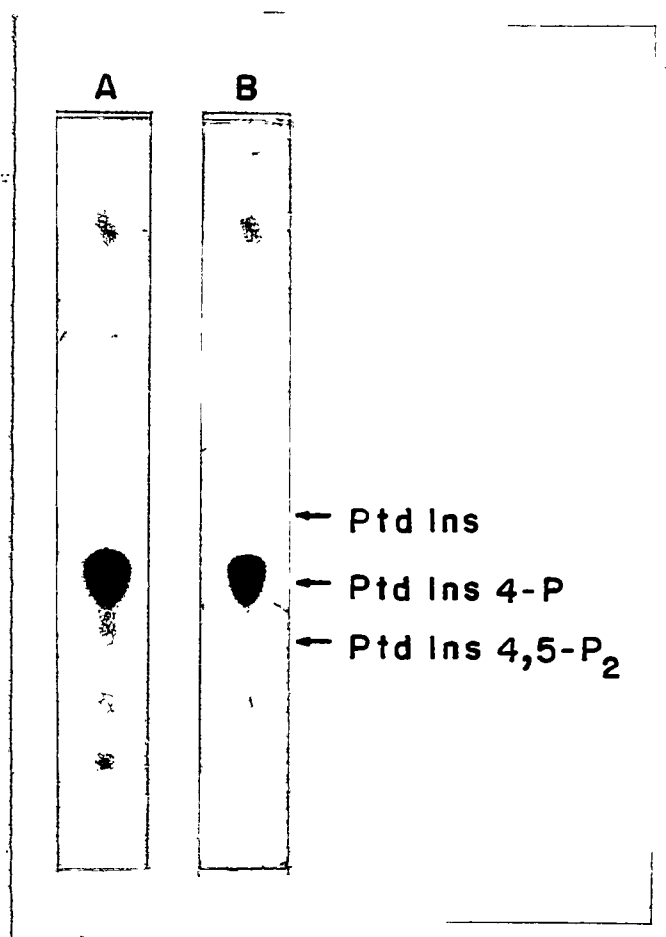


FIGURA 2: DEGRADACION DEL [4-³²P] FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*

El [4-³²P] PtdIns 4-P se sintetiza incubando 36 µg de proteínas de membranas con [γ-³²P] ATP 50 µM (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final 10 mM, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de degradación. La incubación continúa durante 60 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción y los fosfoinosítidos se extraen y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. Finalmente la placa fina se somete a autorradiografía por 8 horas. Las flechas indican la migración de PtdIns, PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂.

(A) tiempo cero (B) incubación 30 minutos

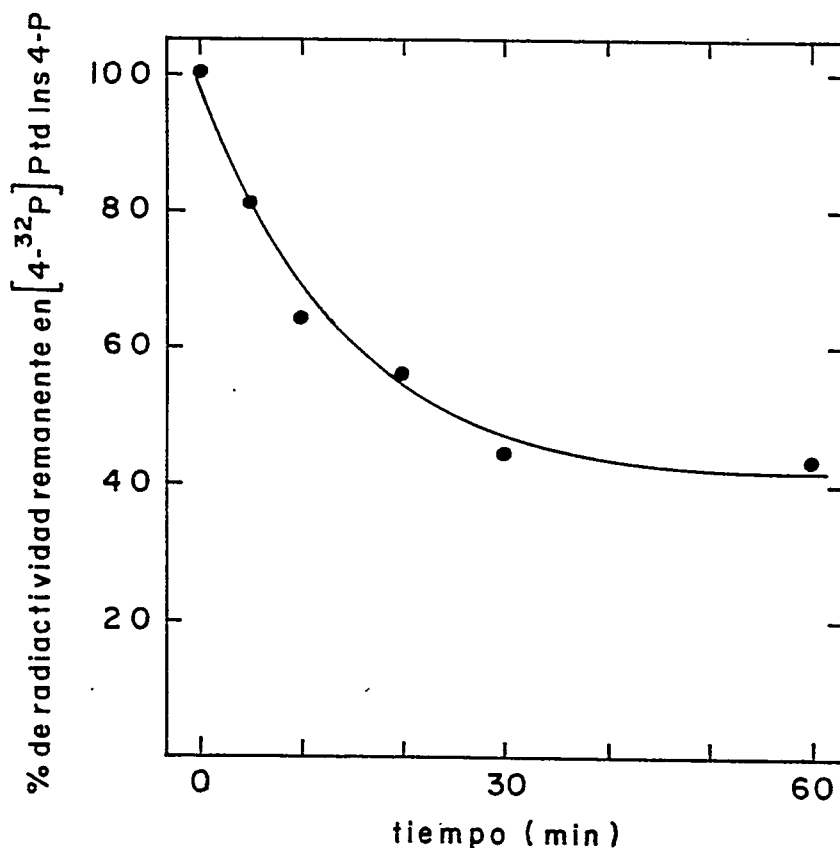


FIGURA 3: CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL [4-³²P] FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO ENDOGENO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El [4-³²P] PtdIns 4-P se sintetiza incubando 36 μ g de proteínas de membranas con [γ -³²P] ATP 50 μ M (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final 10 mM, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de degradación. La incubación continúa durante los tiempos que se indican, luego de lo cual se detiene la reacción y los fosfoinosítidos se extraen y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. El 100% de radiactividad corresponde a los pmoles de [4-³²P] PtdIns 4-P presentes a tiempo cero de la reacción de degradación (5,9 pmoles).

A.4. Degradación del [4-³²P] fosfatidilinositol 4-monofosfato exógeno

Para determinar la naturaleza de la reacción que conduce a la pérdida de la marca del PtdIns 4-P, se procedió a analizar el producto de la reacción, utilizando como sustrato [4-³²P] PtdIns 4-P exógeno, sintetizado como se describió en Materiales y Métodos (sección C).

La incubación de [4-³²P] PtdIns 4-P exógeno con las membranas de oocitos en presencia de Mg⁺² 10 mM produce, al igual que con el compuesto endógeno, una pérdida de la marca desde dicho compuesto. La Figura 4 muestra el análisis por HPLC de los compuestos que se liberan a la fase acuosa luego de incubar las membranas con [4-³²P] PtdIns 4-P y se puede apreciar que toda la radiactividad que aparece en esta fracción está asociada a P_i, no apareciendo marca en inositol bisfosfato ni inositol monofosfato. El experimento control con membranas hervidas demostró que no hay generación de ³²P_i en estas condiciones.

Estos resultados sugieren la presencia en la membrana de una fosfomonoesterasa que hidroliza al PtdIns 4-P con la producción de P_i y PtdIns.

Cabe señalar que no fué posible este análisis a través del ensayo con sustrato endógeno puesto que en este caso el [γ-³²P] ATP presente en el medio es hidrolizado por nucleotidasas de la preparación de membranas, de manera tal

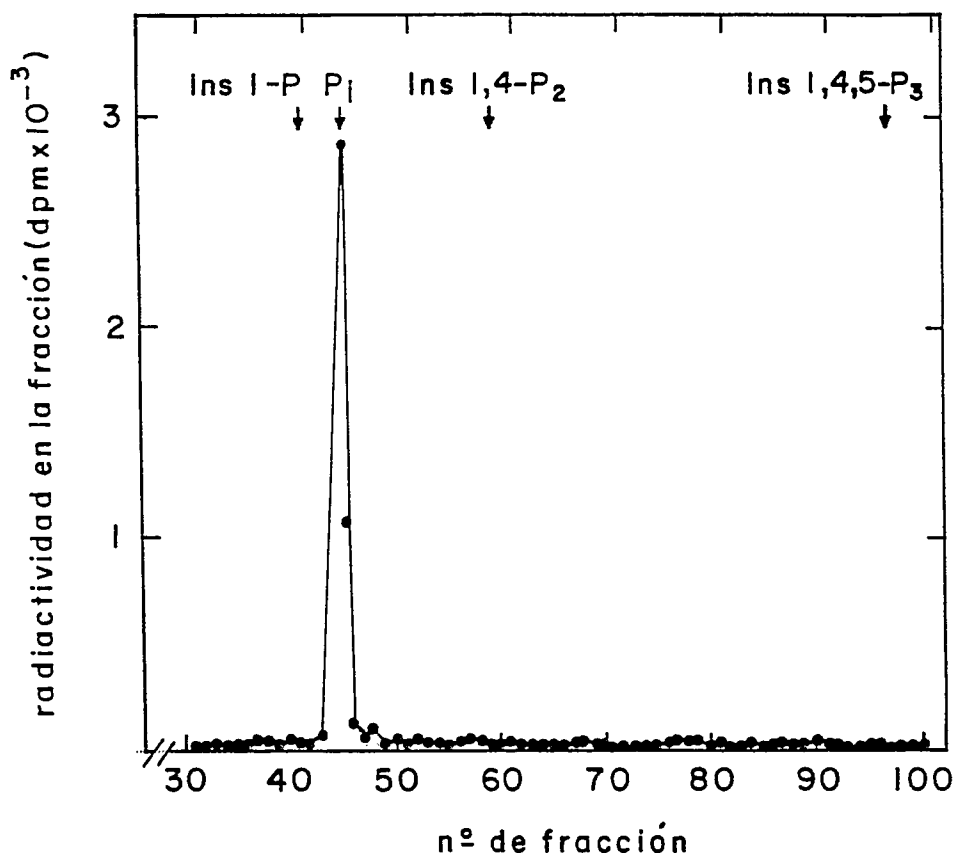


FIGURA 4: ANALISIS POR HPLC DE LOS PRODUCTOS RADIATIVOS SOLUBLES EN LA FASE ACUOSA LUEGO DE LA HIDROLISIS DEL $[4-^{32}\text{P}]$ FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EXOGENO POR MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El $[4-^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P se sintetiza y se purifica como se indica en Materiales y Métodos y 20 pmoles (15600 dpm) del sustrato así sintetizado se incuban con 70 μg de proteínas de membranas durante 60 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en cada fracción colectada se determina por espectrometría de centelleo líquido. Las flechas indican la fracción en que eluyen los patrones de $^{32}\text{P}_i$, $[2-^3\text{H}]$ Ins 1-P, $[2-^3\text{H}]$ Ins 1,4-P₂ y $[2-^3\text{H}]$ Ins 1,4,5-P₃.

que el $^{32}\text{P}_i$ generado de esta forma enmascararía al $^{32}\text{P}_i$ que pudiera provenir del $[4\text{-}^{32}\text{P}] \text{PtdIns 4-P}$.

Por otra parte, el análisis de los fosfoinosítidos de la fase orgánica del experimento demostró que no hay formación de liso PtdIns 4-P a partir del PtdIns 4-P exógeno, así como tampoco de PtdIns 4,5-P_2 . Cabe señalar que el ensayo se realiza en ausencia de ATP exógeno.

A.5. Degradación del fosfatidil $[2\text{-}^3\text{H}]$ inositol 4-monofosfato exógeno

Para confirmar la presencia en la membrana del oocito de una fosfomonoesterasa que cataliza la hidrólisis del PtdIns 4-P , se realizaron experimentos utilizando $\text{Ptd } [2\text{-}^3\text{H}] \text{ Ins 4-P}$ como sustrato exógeno. Estos experimentos se llevan a cabo en ausencia y presencia de un exceso de Ins 1,4-P_2 no radiactivo, en concentración 4 mM. La razón de emplear esta estrategia es la siguiente: si existiera en la preparación de membranas una fosfolipasa C que actuara sobre el $\text{Ptd } [2\text{-}^3\text{H}] \text{ Ins 4-P}$, se generaría $[2\text{-}^3\text{H}] \text{ Ins 1,4-P}_2$ y DAG. Sin embargo, el bisfosfato no es estable en las condiciones del ensayo, debido a la existencia en la membrana de fosfomonoesterasas capaces de hidrolizar el putativo $[2\text{-}^3\text{H}] \text{ Ins 1,4-P}_2$ hasta inositol y P_i (ver Resultados, A.7). Así, el Ins 1,4-P_2 no radiactivo agregado en exceso tiene como objeto poder atrapar al Ins 1,4-P_2 radiactivo en caso de ser éste generado en la incubación.

Un experimento control, semejante al que se describe más adelante en la Figura 7, utilizando como sustrato $[2-^3\text{H}]$ Ins 1,4- P_2 (50 pmoles; 110000 dpm), e incubando tanto en ausencia como en presencia de Ins 1,4- P_2 no radiactivo 4 mM, demostró que, en ausencia del compuesto no radiactivo, prácticamente todo el $[2-^3\text{H}]$ Ins 1,4- P_2 es hidrolizado. Sin embargo, al diluir el sustrato radiactivo con inositol bisfosfato 4 mM no marcado, la reacción hidrolítica se satura y se recupera el 89,5% de la radiactividad inicial en el pico correspondiente al Ins 1,4- P_2 luego del fraccionamiento por HPLC.

Una vez establecidas las condiciones que permitirían atrapar al $[2-^3\text{H}]$ Ins 1,4- P_2 en caso de generarse en el experimento, se procedió a incubar el sustrato exógeno Ptd $[2-^3\text{H}]$ Ins 4-P con la preparación de membranas, en ausencia y presencia de Ins 1,4- P_2 4 mM. Los resultados obtenidos al analizar las fases orgánicas por cromatografía en capa fina se muestran en la Tabla I. Como se puede apreciar, en las condiciones del ensayo se genera Ptd $[2-^3\text{H}]$ Ins y en él aparece más del 80% de la radiactividad que se pierde del Ptd $[2-^3\text{H}]$ Ins 4-P. No hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos sin o con Ins 1,4- P_2 no radiactivo en el medio de incubación. Si se utilizan membranas calentadas a 100°C, el Ptd $[2-^3\text{H}]$ Ins 4-P se mantiene sin variaciones significativas. A su vez, no hay generación de PtdIns 4,5- P_2 (el ensayo se realiza en ausencia de ATP exógeno).

TABLA I

HIDROLISIS DEL FOSFATIDIL [2-³H] INOSITOL 4-MONOFOSFATO:

PRODUCTOS DE NATURALEZ LIPIDICA

Condiciones Experimentales	Ptd [2- ³ H]Ins 4-P remanente a 60' (dpm)	Ptd [2- ³ H]Ins 4-P hidrolizado * (dpm)	Ptd [2- ³ H]Ins formado (dpm)
Membranas hervidas	308.400 ± 5200	21.600	9.460 ± 1020
Membranas	213.900 ± 5500	116.100	94.150 ± 5600
Membranas + Ins 1,4-P ₂	210.800 ± 5010	119.200	99.200 ± 4020

* Determinado por diferencia entre la radiactividad inicial y la recuperada después de la incubación

70 µg de proteínas de membranas se incuban con 150 pmoles (330000 dpm) de Ptd [2-³H] Ins 4-P durante 60 minutos, en presencia o en ausencia de Ins 1,4-P₂ 4 mM, luego de lo cual se detiene la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en las manchas correspondientes a PtdIns y PtdIns 4-P se cuantifican por espectrometría de centelleo líquido. De manera similar se procede en el control con membranas hervidas. Los resultados se expresan como el Ptd [2-³H] Ins formado (dpm) o el Ptd [2-³H] Ins 4-P remanente (dpm) en 60 minutos, así como también se muestra el Ptd [2-³H] Ins 4-P hidrolizado, determinado por diferencia entre la radiactividad inicial y la recuperada después de la incubación. Cada valor corresponde al promedio ± desviación estándar de los duplicados de un mismo experimento.

Estos resultados confirman la presencia en la membrana de una fosfomonoesterasa que hidroliza al PtdIns 4-P, generando PtdIns y P_i .

Por su parte la Figura 5 muestra el análisis por HPLC de las fases acuosas del mismo experimento. Cuando el Ins 1,4- P_2 no radiactivo está ausente de la incubación, los productos de la reacción son inositol monofosfato e inositol. Cuando está presente el Ins 1,4- P_2 4 mM, el mayor producto radiactivo en la fase acuosa es el inositol monofosfato, generándose solo trazas de inositol. Sin embargo, también se obtiene una cantidad pequeña pero significativa de [$2\text{-}^3\text{H}$] Ins 1,4- P_2 , que corresponde a alrededor del 0,2% de la marca inicial en el sustrato. Esto último es indicativo de la presencia de una fosfolipasa C capaz de actuar sobre PtdIns 4-P. Cabe señalar que estos experimentos se realizan en presencia de Mg^{+2} 10 mM y en ausencia de Ca^{+2} agregado (el calcio total endógeno es 15 μM).

De estos experimentos también se desprende que el Ins 1,4- P_2 inhibe a la inositol monofosfato fosfomonoesterasa, explicando la gran reducción en la generación del inositol radiactivo obtenido cuando se agrega este compuesto no radiactivo.

Un análisis de las fases orgánicas por cromatografía en capa fina de un ensayo similar al descrito reveló que no aparece radiactividad asociada al liso PtdIns 4-P.

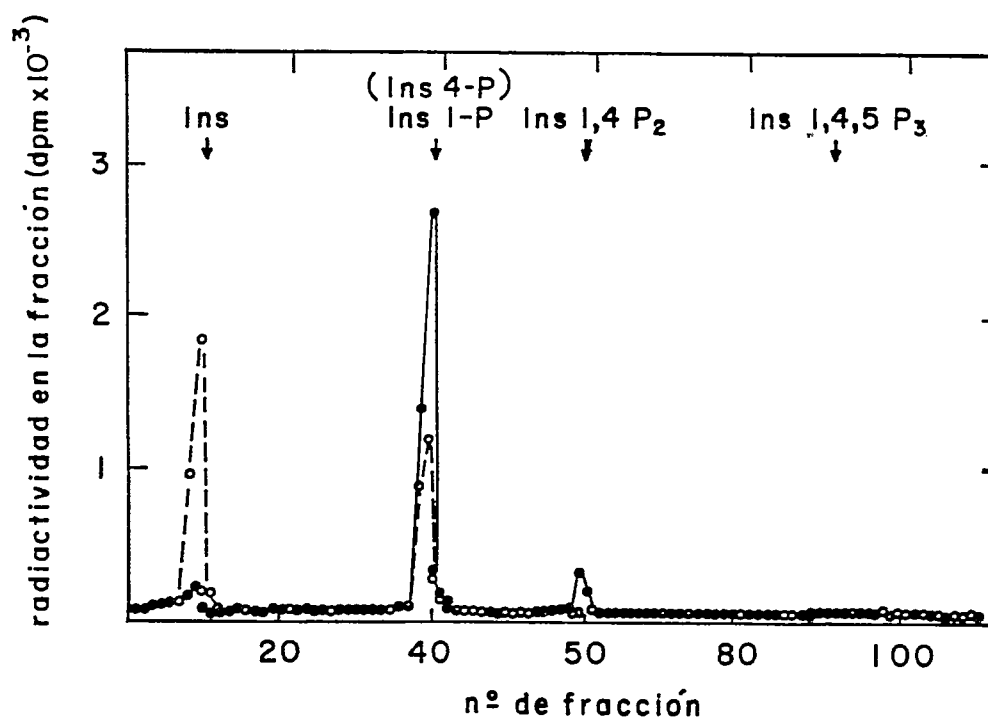


FIGURA 5: ANALISIS POR HPLC DE LOS PRODUCTOS RADIATIVOS SOLUBLES EN LA FASE ACUOSA LUEGO DE LA HIDROLISIS DEL FOSFATIDIL [2-³H] INOSITOL 4-MONOFOSFATO EXOGENO POR MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

150 pmoles (330000 dpm) de Ptd [2-³H] Ins 4-P se incuban con 70 μ g de proteínas de membranas durante 60 minutos, en presencia (●) o ausencia (○) de Ins 1,4-P₂ 4 mM, luego de lo cual se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en cada fracción colectada se determina por espectrometría de centelleo líquido. Las flechas indican la fracción en que eluyen los patrones de [2-³H] inositol, [2-³H] Ins 1-P, [2-³H] Ins 1,4-P₂ y [2-³H] Ins 1,4,5-P₃.

A.6. Hidrólisis del fosfatidil [2-³H] inositol exógeno

Como se describió en A.5., al incubar Ptd [2-³H] Ins 4-P con membranas de oocitos se genera principalmente Ptd [2-³H] Ins, mientras el análisis de las fases acuosas de los mismos experimentos revela que también se forma inositol monofosfato tritiado, aún en presencia de Ins 1,4-P₂ 4 mM, condición en la cual sabemos que el monofosfato marcado no se genera significativamente a partir del bisfosfato marcado. Así, el inositol monofosfato podría provenir de la hidrólisis de PtdIns.

Para analizar si las membranas de oocitos contienen una fosfolipasa C capaz de hidrolizar al PtdIns con la generación de Ins 1-P y DAG, se incubó Ptd [2-³H] Ins con las membranas en condiciones de ensayo semejantes a las usadas para PtdIns [2-³H] Ins 4-P. Los resultados se presentan en la Figura 6, la cual muestra el análisis por HPLC de los productos de la reacción solubles en la fase acuosa. Prácticamente toda la radiactividad que se pierde en el sustrato radiactivo se recupera en las fracciones que corresponden a Ins 1-P y a inositol. Sin embargo, en estas condiciones (en presencia de Mg⁺² 10 mM y en ausencia de Ca⁺² agregado) sólo se hidroliza un 5% del Ptd [2-³H] Ins.

Si se utiliza una preparación de membranas hervidas, no se produce una hidrólisis detectable del Ptd [2-³H]Ins.

Estos resultados demuestran que la membrana del oocito posee una actividad tipo fosfolipasa C capaz de utili-

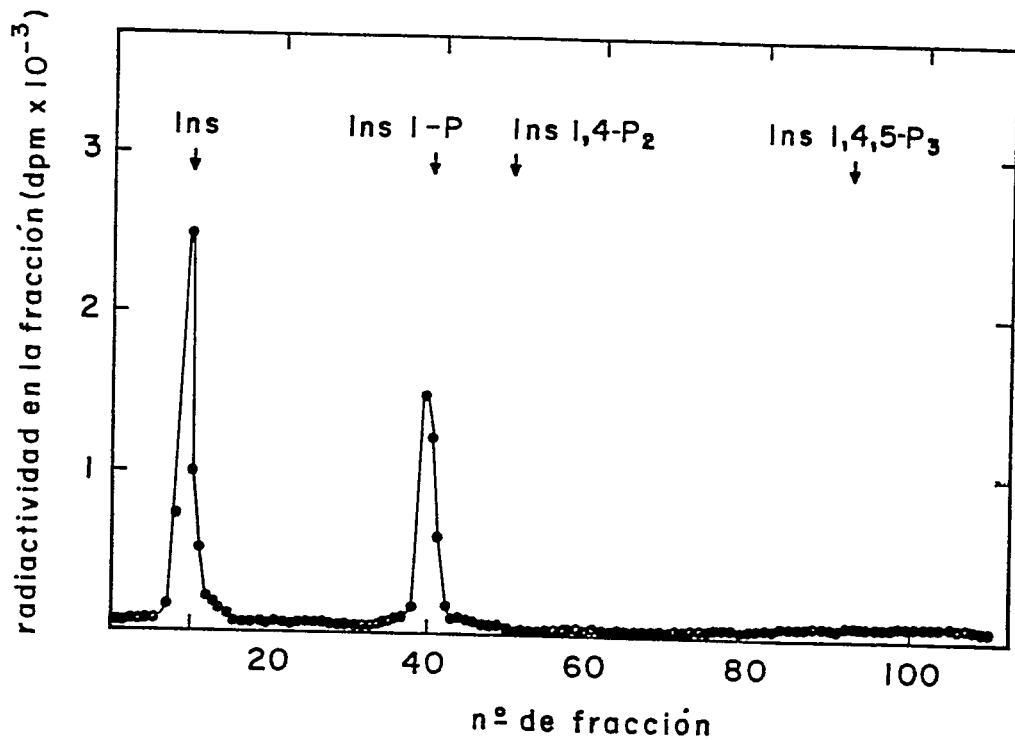


FIGURA 6: ANALISIS POR HPLC DE LOS PRODUCTOS RADIATIVOS SOLUBLES EN LA FASE ACUOSA LUEGO DE LA HIDROLISIS DEL FOSFATIDIL [2-³H] INOSITOL EXOGENO POR MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*. 4 pmoles (175000 dpm) de Ptd [2-³H] Ins se incuban con 70 µg de proteínas de membranas durante 60 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en cada fracción colectada se determina por espectrometría de centelleo líquido. Las flechas indican la fracción en que eluyen los patrones de [2-³H] inositol, [2-³H] Ins 1-P, [2-³H] Ins 1,4-P₂ y [2-³H] Ins 1,4,5-P₃.

zar PtdIns como sustrato para producir Ins 1-P y DAG.

Por su parte, el análisis de las fases orgánicas del experimento indicó que no hay formación de liso PtdIns en las condiciones ensayadas.

A.7. Presencia en las membranas de oocitos de fosfomonoesterasas que hidrolizan a los inositol fosfatos

A.7.1. Hidrólisis inositol mono, bis y tris fosfato

La presencia en las membranas de fosfomonoesterasas que catalizan la hidrólisis de inositol tris, bis y monofosfato queda de manifiesto al analizar por HPLC las fases acuosas de los experimentos en los cuales se incuban las membranas de oocitos con una mezcla que contiene Ins 1,4,5-P₃, Ins 1,4-P₂, Ins 1-P, e inositol, marcados todos con ³H en la posición 2 del anillo inositol. Como se observa en la Figura 7, todo el trisfosfato y el bisfosfato son hidrolizados por la preparación de membranas. La inositol monofosfato fosfomonoesterasa parece menos activa puesto que una cantidad significativa del monofosfato se encuentra aún presente luego de 60 minutos de incubación. Cabe señalar que en estos experimentos se tendría una mezcla de los inositol monofosfatos [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] Ins 4-P. El primero está presente en la mezcla usada como sustrato y el segundo se originaría de la hidrólisis del [2-³H] Ins 1,4-P₂ (Inhorn y Majerus, 1988; Dean y Moyer, 1988). El programa de HPLC utilizado en este caso no discrimina entre

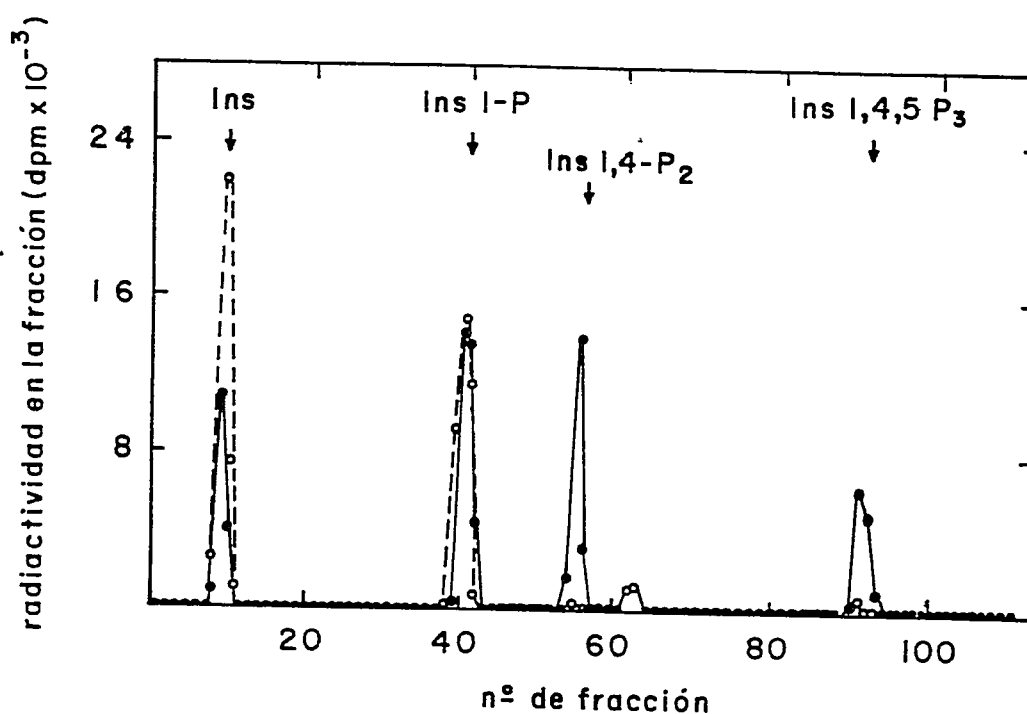


FIGURA 7: HIDROLISIS DE INOSITOL FOSFATOS POR FOSFOMONOESTERASAS PRESENTES EN LAS MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

Una mezcla que contiene 8 pmoles de $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4,5- P_3 , 12 pmoles de $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4- P_2 , 20 pmoles de $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1-P y 10 pmoles de $[2\text{-}^3\text{H}]$ inositol, con un total de 110000 dpm, se incuban durante 60 minutos con (o) 36 μg de proteínas de membranas o (●) la misma cantidad de membranas calentadas a 100°C , luego de lo cual se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en cada fracción colectada se determina por espectrometría de centelleo líquido. Las flechas indican la fracción en que eluyen los patrones de $[2\text{-}^3\text{H}]$ inositol, $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1-P, $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4- P_2 y $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4,5- P_3 .

ambos isómeros (Irvine y col., 1985).

Como es de esperar, la radiactividad en el inositol aumenta considerablemente ya que constituye el producto final de la acción de estas fosfomonoesterasas.

La misma mezcla de inositol fosfatos, incubada con membranas calentadas a 100°C, no sufre ninguna hidrólisis.

A.7.2. Hidrólisis del inositol 1,4-bisfosfato

La presencia en la membrana de una Ins 1,4-P₂ fosfomonoesterasa fué confirmada utilizando [2-³H] Ins 1,4-P₂. La Figura 8-A muestra que todo el inositol bisfosfato utilizado en el ensayo es hidrolizado por la preparación de membranas, apareciendo la marca en inositol monofosfato e inositol. Nuevamente, la fosfomonoesterasa que hidroliza al inositol monofosfato, presumiblemente Ins 4-P (ver más adelante), aparece como menos activa, dado que se acumula una cantidad importante del monofosfato.

Por otra parte, el [2-³H] Ins 1,4-P₂ incubado con membranas calentadas a 100°C no sufre hidrólisis.

Los resultados obtenidos utilizando un programa de HPLC que permite separar el Ins 1-P del Ins 4-P (Dean y Moyer, 1988) sugieren que el inositol monofosfato proveniente de la hidrólisis de Ins 1,4-P₂ con la preparación de membranas de oocitos sería mayoritariamente Ins 4-P. En efecto, al incubar las membranas con [2-³H] Ins 1,4-P₂ durante 10 minutos y analizar las fases acuosas por HPLC se observa que parte del sus-

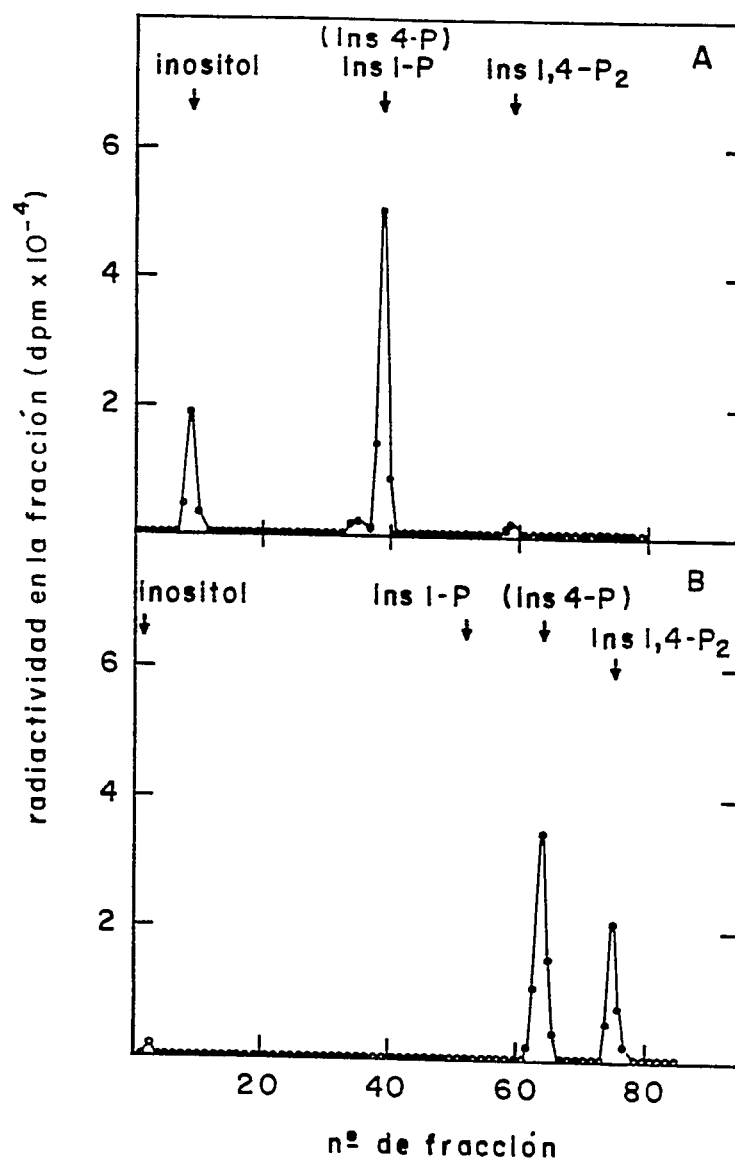


FIGURA 8: HIDROLISIS DEL $[2\text{-}^3\text{H}]$ INOSITOL 1,4-BISFOSFATO POR FOSFOMONOESTERASAS PRESENTES EN LAS MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

50 pmoles (110000 dpm) de $[2\text{-}^3\text{H}]$ $\text{Ins } 1,4\text{-P}_2$ se incuban con 98 μg de proteínas de membranas durante (A) 60 minutos o (B) 10 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. En (A) se utiliza un programa que no separa $\text{Ins } 1\text{-P}$ de $\text{Ins } 4\text{-P}$, mientras que en (B) se usa uno que permite la separación de estos dos isómeros del inositol monofosfato, y ambos programas están descritos en Materiales y Métodos. La radiactividad en cada fracción colectada se determina por espectrometría de centelleo líquido. Las flechas indican la fracción en que eluyen los patrones de $[2\text{-}^3\text{H}]$ inositol, $[2\text{-}^3\text{H}]$ $\text{Ins } 1\text{-P}$ y $[2\text{-}^3\text{H}]$ $\text{Ins } 1,4\text{-P}_2$.

trato ha sido hidrolizado. La marca que se pierde del sustrato aparece repartida entre inositol y un compuesto que posee un tiempo de retención mayor que el determinado para el [2-³H] Ins 1-P patrón, y que coincide con el tiempo de retención descrito para Ins 4-P en las mismas condiciones experimentales (Dean y Moyer, 1988). Por su parte, no se observa formación de Ins 1-P radiactivo. Aunque indicativos, estos resultados no son concluyentes por carecer del patrón de Ins 4-P.

Estos resultados se muestran en la Figura 8-B.

A.8. Transformación del fosfatidilinositol 4-monofosfato en fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

Se sabe que al incubar membranas aisladas de oocitos de *Xenopus laevis* con [γ -³²P] ATP da como producto mayoritario fosfatidilinositol monofosfato, existiendo una incorporación muy baja en el bisfosfato (Carrasco y col., 1989).

En las condiciones experimentales ensayadas en que se tiene pérdida de radiactividad del [4-³²P] PtdIns 4-P sintetizado endógenamente y en que el ATP está presente, no se observa transformación en PtdIns 4,5-P₂ (Resultados, A.2. y A.3.). Por esta razón, se estudió la actividad PtdIns 4-P 5-quinasa en membranas de oocitos y en el sobrenadante de 100000 x g de la preparación de membranas y los resultados se muestran en la Tabla II.

Se puede apreciar que la actividad se encuentra mayoritariamente en la membrana. La actividad de la PtdIns 4-P

T A B L A I I

ACTIVIDADES DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-QUINASA Y
LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO 5-QUINASA
EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis* Y
SOBRENADANTE DE 100000 x g

FRACCION SUBCELULAR	pmoles de ³² P incorporados/mg min	
	PtdIns 4,5-P ₂	PtdIns 4-P
Membranas	3,53 ± 0,060	43,0 ± 3,13
Sobrenadante 100000 x g	0,63 ± 0,040	6,1 ± 0,04
Membranas + sobrenadante 100000 x g	2,05 ± 0,015	28,1 ± 2,20

60 µg de proteínas de membranas o 146 µg de proteínas del sobrenadante de 100000 x g se incuban con [γ -³²P] ATP 50 µM (1600 dpm/ pmol) durante 5 minutos como se indica Materiales y Métodos para la actividad PtdIns 4-P 5-quinasa. La actividad PtdIns 4-quinasa se determina en paralelo en los mismos tubos, de forma tal que se realiza en presencia de PtdIns 4-P 100 µM y durante 5 minutos, a diferencia de lo establecido en Materiales y Métodos. En el ensayo con ambas fracciones se utiliza 60 µg de proteínas de membranas y 73 µg de proteínas del sobrenadante de 100000 x g. Una vez detenida la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en las manchas correspondientes a PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂ se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Cada valor corresponde al promedio ± desviación estándar de los triplicados de un mismo experimento.

5-quinasa resulta ser bastante baja si se compara con la actividad de la PtdIns 4-quinasa en estos organelos, siendo la incorporación de marca desde el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP en $[\text{}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4,5-P₂ aproximadamente el 8% de la marca que se incorpora en PtdIns 4-P.

También se observa que, al ensayar las membranas en presencia de sobrenadante de 100000 x g, las actividades específicas de ambas quinasa son menores a las esperadas de acuerdo a sus actividades en cada fracción. En efecto, cuando se adiciona sobrenadante a la preparación de membranas, la actividad específica de la PtdIns 4-P 5-quinasa disminuye en un 42% y la de la PtdIns 4-quinasa lo hace en un 35%, con respecto a la actividad específica que se obtiene con las membranas solas.

Se procedió luego a estudiar la actividad de la PtdIns 4-P 5-quinasa en las membranas bajo diferentes condiciones experimentales y los resultados se muestran en la Tabla III, donde también se indica la actividad de la PtdIns 4-quinasa determinada en paralelo en los mismos ensayos.

Se puede observar que algunos de los compuestos ensayados aumentan significativamente la actividad de la PtdIns 4-P 5-quinasa : EGTA adicionado en una concentración de 3 mM la aumenta en alrededor de un 52%, mientras la polilisina (PM 24000), que ejerce un importante efecto sobre la PtdIns 4-quinasa, incrementa la actividad de la PtdIns 4-P 5-quinasa en un 100% a concentración de 20 μM , mientras ambos

TABLA III

ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO 5-QUINASA
DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis* BAJO
DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES Y
COMPARACION CON LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-QUINASA.

PREP.	ADICION	CONCENTRACION	pmoles de ³² P incorporados / mg min			
			en		en	
			PtdIns 4,5-P ₂ (%)	PtdIns 4-P (%)		
A	ninguna	---	4,51 ± 0,15	100	48,1 ± 3,15	100
	EGTA	3 mM	6,86 ± 0,19	152	64,3 ± 3,90	134
	Polilisina	20 μM	9,07 ± 0,31	201	108,8 ± 6,20	226
	EGTA +	3 mM				
	Polilisina	20 μM	9,31 ± 0,36	200	122,3 ± 7,50	254
	EGTA +	3 mM				
	Polilisina	50 μM	10,01 ± 0,40	222	133,5 ± 9,15	277
A	ninguna	---	3,91 ± 0,09	100	47,6 ± 2,85	100
	CaCl ₂	100 μM	2,93 ± 0,09	75	39,2 ± 2,73	82
	CaCl ₂	500 μM	2,85 ± 0,11	73	35,7 ± 2,25	75
A	ninguna	---	3,52 ± 0,12	100	45,2 ± 3,28	100
	fosfatidilserina	500 μM	4,40 ± 0,09	125	81,4 ± 5,14	180
	fosfatidiletanol amina	500 μM	4,05 ± 0,22	115	56,5 ± 1,82	125
	fosfatidilserina + fosfatidiletanol amina	500 μM	4,51 ± 0,20	129	85,9 ± 3,35	190
B	ninguna	---	2,00 ± 0,05	100	80,6 ± 2,28	100
	α-glicerol fosfato	4 mM	4,14 ± 0,20	207	156,9 ± 7,43	195
		10 mM	2,38 ± 0,06	119	173,6 ± 8,31	215
B	ninguna	---	2,55 ± 0,07	100	80,2 ± 4,14	100
	β-glicerol fosfato	4 mM	5,94 ± 0,16	233	119,4 ± 6,05	149
		10 mM	1,82 ± 0,05	71	113,5 ± 5,37	142

TABLA III: ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO 5-QUINASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis* BAJO DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES Y COMPARACION CON LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-QUINASA.

(A) 27 μg o (B) 24 μg de proteínas de membranas se incuban con [γ - ^{32}P] ATP 50 μM (1200 dpm/pmol) durante 5 minutos como se indica en Materiales y Métodos para la actividad PtdIns 4-P 5-quinasa, en ausencia y presencia de los compuestos indicados. La actividad PtdIns 4-quinasa se determina en paralelo en los mismos tubos, de forma tal que se realiza en presencia de PtdIns 4-P 100 μM y durante 5 minutos, a diferencia de lo establecido en Materiales y Métodos. Una vez detenida la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en las manchas que corresponden a PtdIns 4-P y PtdIns 4,5- P_2 se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Se le asigna 100% de actividad enzimática a los pmoles de ^{32}P incorporados/mg min en los experimentos controles sin adición. Cada valor corresponde al promedio \pm desviación estándar de los triplicados de un mismo experimento. (A) y (B) representan diferentes preparaciones de membranas.

compuestos agregados juntos tienen un efecto levemente superior al que se logra con polilisina sola.

La adición de Ca^{+2} , junto al Mg^{+2} que contiene el medio de incubación habitual, inhibe parcialmente la actividad, mientras la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina ejercen un leve efecto activador.

El α -glicerolfosfato, compuesto que estimula en forma importante la síntesis del PtdIns 4-P, aumenta al doble la actividad de la PtdIns 4-P 5-quinasa, en concentración de 4 mM, mientras el β -glicerolfosfato 4 mM incrementa la actividad de la enzima en más de un 100%.

En todos los casos, sin embargo, la radiactividad incorporada en PtdIns 4,5- P_2 resulta mucho más baja que la radiactividad incorporada en PtdIns 4-P.

La omisión del sustrato exógeno disminuye a un tercio la incorporación de ^{32}P en PtdIns 4,5- P_2 .

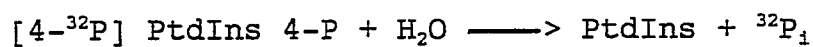
A su vez, la adición de PtdIns 4-P en estos ensayos, compuesto que corresponde al producto de la reacción catalizada por la PtdIns 4-quinasa, no interfiere con la determinación de la actividad de dicha enzima, encontrándose ésta levemente aumentada (en alrededor de un 20%) con respecto a los ensayos habituales, los cuales se realizan en ausencia de este fosfoinosítido.

En todos los casos, los resultados se expresan en términos de los pmoles de ^{32}P incorporados en PtdIns 4,5- P_2 y no como pmoles de PtdIns 4,5- P_2 sintetizados, puesto que pue-

den existir poblaciones de moléculas de PtdIns 4,5-P₂ marcados con ³²P en uno o los dos fosforilos. Esto porque el bisfosfato puede provenir de la fosforilación del monofosfato endógeno o exógeno así como también de dos fosforilaciones sucesivas del PtdIns endógeno.

B.- CARACTERISTICAS DE LA FOSFOMONOESTERASA QUE HIDROLIZA AL FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO

En esta parte de la tesis se caracteriza la actividad fosfomonoesterásica que cataliza la hidrólisis del PtdIns 4-P para formar PtdIns y P_i:



Los estudios se realizan utilizando en el ensayo el sustrato generado al preincubar las membranas con [γ -³²P] ATP, de modo de sintetizar [4-³²P] PtdIns 4-P a partir del PtdIns endógeno de la membrana (Materiales y Métodos, J.1.). La incubación posterior continúa en presencia de un gran exceso de ATP no radiactivo que detiene la incorporación de radiactividad al sustrato. La reacción se sigue midiendo la pérdida de radiactividad en el [4-³²P] PtdIns 4-P.

B.1. Análisis del efecto de cationes

El medio de incubación para sintetizar [4-³²P]PtdIns 4-P contiene MgCl₂ 10 mM, y al diluir la marca del [γ -³²P] ATP

con ATP no radiactivo, el MgCl_2 queda 8,8 mM. Si se retira todo el Mg^{+2} libre adicionando EDTA junto con el ATP no radiactivo (tiempo cero de la reacción de hidrólisis) no se observa ninguna variación en la degradación del $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P. Estos resultados se muestran en la Tabla IV. De la misma manera, cuando se agregó EDTA en varias concentraciones de modo de ir disminuyendo la concentración de Mg^{+2} desde 8,8 mM hasta 1 mM, no se vió ninguna diferencia en la actividad hidrolítica.

La adición de Ca^{+2} o la eliminación del Ca^{+2} residual presente en el medio de incubación, (el calcio total es 15 μM), por medio de la adición de EGTA, tampoco tienen efecto. También se ensayó el efecto de Li^+ , catión que inhibe a otras fosfomonoesterasas que participan en el metabolismo de los compuestos de inositol. En efecto, el Li^+ inhibe en forma no competitiva tanto a la inositol monofosfato fosfomonoesterasa como a la inositol polifosfato 4-fosfomonoesterasa (Berridge y col., 1989; Majerus, 1992). Como se ve en la Tabla IV, el Li^+ no ejerce ningún efecto sobre la degradación del PtdIns 4-P.

B.2. Determinación del pH óptimo

Como se muestra en la Figura 9, la reacción de desfosforilación del $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P presenta un pH óptimo entre 7 y 8.

TABLA IV

EFFECTO DE CATIONES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL
4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS

DE *Xenopus laevis*

EXP.	ADICION	CONCENTRACION (mM)	[4- ³² P] PtdIns 4-P hidrolizado (pmoles)	% ACTIVIDAD
I	ninguna	---	1,15 ± 0,03	100
	EDTA	10	1,10 ± 0,03	96
	CaCl ₂	0.5	1,12 ± 0,05	97
		5	1,10 ± 0,03	96
		10	1,17 ± 0,05	102
II	ninguna	---	1,38 ± 0,06	100
	EGTA	5	1,48 ± 0,04	107
	LiCl	0.5	1,40 ± 0,04	101
		5	1,35 ± 0,05	98
		10	1,42 ± 0,07	103

**TABLA IV: EFECTO DE CATIONES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDIL-
INOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA DE MEMBRANAS
DE OOCITOS DE *Xenopus laevis***

El [4-³²P] PtdIns 4-P se sintetiza incubando 98 µg de proteínas de membranas con [γ-³²P] ATP 50 µM (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final 10 mM, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de hidrólisis. Junto con el ATP no radiactivo se agregan los compuestos que se indican y la incubación continúa durante 30 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción, y los fosfoinosítidos se extraen y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde a PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los resultados se expresan como los pmoles de [4-³²P] PtdIns 4-P hidrolizados en 30 minutos y se asigna en cada caso el 100% de actividad al control sin adición. Cada valor corresponde al promedio ± desviación estándar de los duplicados de un mismo experimento. (I) y (II) representan 2 experimentos diferentes.

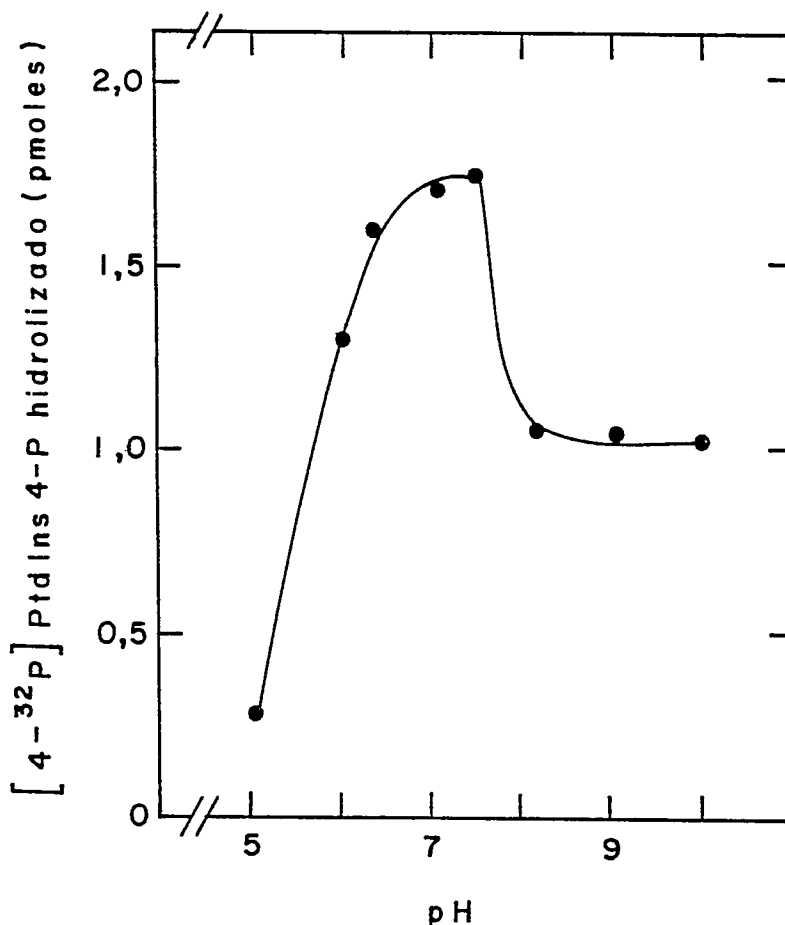


FIGURA 9: EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El [4-³²P] PtdIns 4-P se sintetiza incubando 36 µg de proteínas de membranas con [γ-³²P] ATP 50 µM (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos, como se indica en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final 10 mM, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de hidrólisis. Junto con este último se agregan diferentes amortiguadores para variar el pH desde 7,5 (al cual se sintetiza el [4-³²P] PtdIns 4-P) hasta el pH deseado. La incubación continúa durante 30 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción y los fosfoinosítidos se extraen y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresa como los pmoles de [4-³²P] PtdIns 4-P degradados en 30 minutos.

B.3. Efecto de neomicina y de poliaminas

La Figura 10-A muestra que la neomicina ejerce un efecto bifásico sobre la actividad de la PtdIns 4-P fosfomonoesterasa. A concentraciones menores de 0,6 mM presenta un leve efecto estimulador, con un aumento máximo del 15% a la concentración de 0,2 mM. A concentraciones mayores de 0,6 mM presenta una acción inhibitoria, cayendo la actividad al 45% del control a la concentración de 1 mM.

En la Figura 10-B se observa que la espermina ejerce un efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de PtdIns 4-P, disminuyendo ésta a un 50% con una concentración de 10 mM. Por su parte, la espermidina presenta un muy leve efecto inhibitorio, disminuyendo la actividad hidrolítica en sólo un 10% a la misma concentración.

B.4. Efecto de inhibidores de fosfomonoesterasas

El fluoruro, un inhibidor de fosfomonoesterasas ácidas (Igarashi y Hollander, 1968) no inhibe la reacción de hidrólisis del PtdIns 4-P. Por el contrario, el NaF en concentración de 5 mM produce una activación del 53%. La Figura 11-A muestra los resultados obtenidos al estudiar la actividad enzimática en presencia de NaF entre 0,5 y 10 mM. El tartrato constituye, al igual que el fluoruro, un inhibidor de fosfomonoesterasas ácidas (Igarashi y Hollander, 1968). En la Figura 11-A también se puede observar que el tartrato estimula a la actividad enzimática que hidroliza al PtdIns 4-P. En

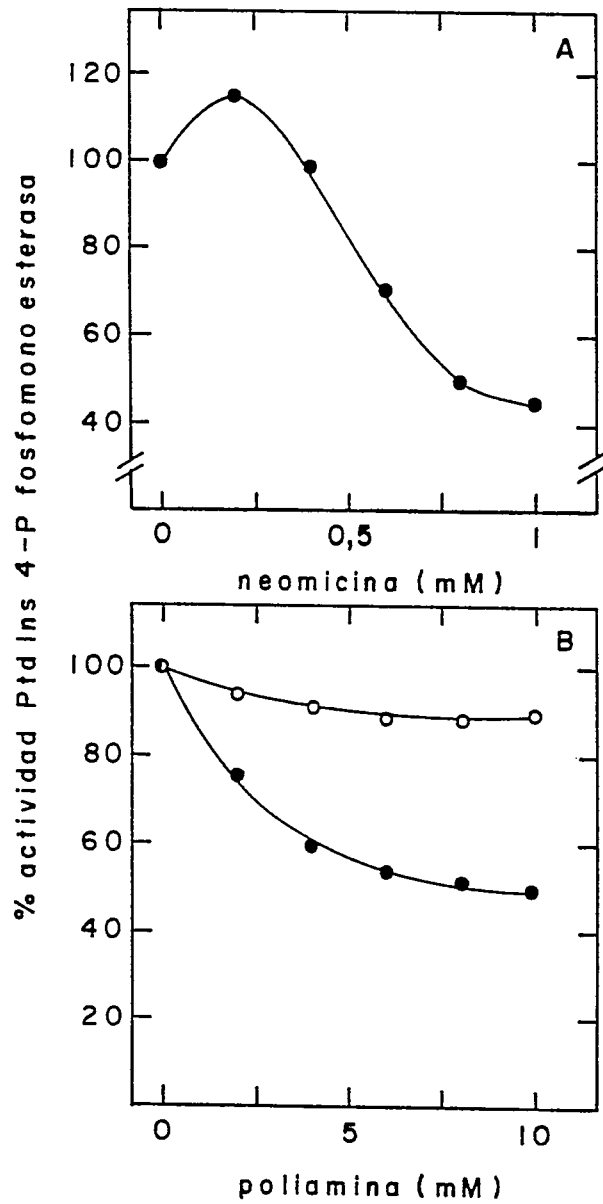


FIGURA 10: EFECTO DE NEOMICINA Y POLIAMINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

FIGURA 10: EFECTO DE NEOMICINA Y POLIAMINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El [4-³²P] PtdIns 4-P se sintetiza incubando 98 µg de proteínas de membranas con [γ-³²P] ATP 50 µM (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final 10 mM, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de hidrólisis. Junto con el ATP no radiactivo se agregan en (A) diferentes cantidades de neomicina y en (B) diferentes cantidades de (●) espermina o (○) espermidina y la incubación continúa durante 30 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción y los fosfoinosítidos se extraen y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los pmoles de [4-³²P] PtdIns 4-P degradados en 30 minutos y en ausencia de neomicina o de poliaminas corresponden al 100% de actividad enzimática: (A) 3,8 pmoles (B) (●) 4,1 pmoles y (○) 4,3 pmoles.

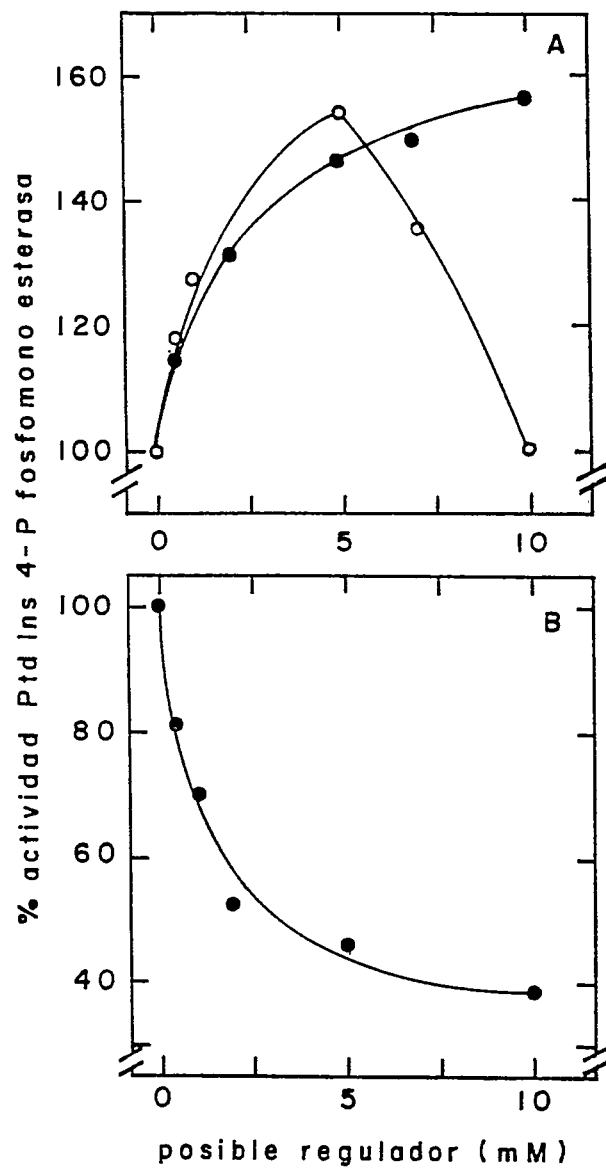


FIGURA 11: EFECTO DE FLUORURO, TARTRATO Y FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

FIGURA 11: EFECTO DE FLUORURO, TARTRATO Y FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El [4-³²P] PtdIns 4-P se sintetiza incubando 98 µg de proteínas de membranas con [γ-³²P] ATP 50 µM (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final 10 mM, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de hidrólisis. Junto con este último se agrega en (A) diferentes cantidades de (o) fluoruro o de (●) tartrato y en (B) diferentes cantidades de fosfato y la incubación continúa durante 30 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción y los fosfoinosítidos se extraen y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los pmoles de [4-³²P] PtdIns 4-P degradados en 30 minutos y en ausencia del posible regulador corresponden al 100% de actividad enzimática: (A) (o) 0,85 pmoles y (●) 1,1 pmoles; (B) 0,96 pmoles.

efecto, una concentración de 10 mM aumenta la actividad en un 57%.

El fosfato es un inhibidor de fosfomonoesterasas alcalinas (Cox y col., 1967). Al estudiar su acción sobre la actividad de la fosfomonoesterasa que hidroliza al PtdIns 4-P, se observó que ejerce un efecto inhibitor. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 11-B y en ella se puede apreciar que el fosfato en concentración 10 mM disminuye la actividad enzimática en alrededor de un 62%.

B.5. Efecto de diferentes metabolitos fosforilados

Existen antecedentes en la literatura sobre el efecto inhibitor de varios análogos fosforilados sobre otra fosfomonoesterasa relacionada con el metabolismo de los compuestos derivados de inositol, la inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa (Downes y col., 1982; Seyfred y col., 1984; Rana y col., 1986). En esta parte de la tesis el interés se centró en la búsqueda de intermediarios metabólicos capaces de inhibir la actividad que hidroliza al PtdIns 4-P generando P_i .

La Figura 12 muestra los resultados obtenidos al ensayar el efecto de hexosas bisfosfato sobre la actividad de la fosfomonoesterasa que hidroliza al PtdIns 4-P. Se puede observar que la fructosa 1,6-bisfosfato es un potente inhibidor de la actividad enzimática, inhibiéndola completamente a una concentración de 5 mM. Por su parte, también la fructosa 2,6-bisfosfato ejerce una acción inhibitora, aún cuando lo

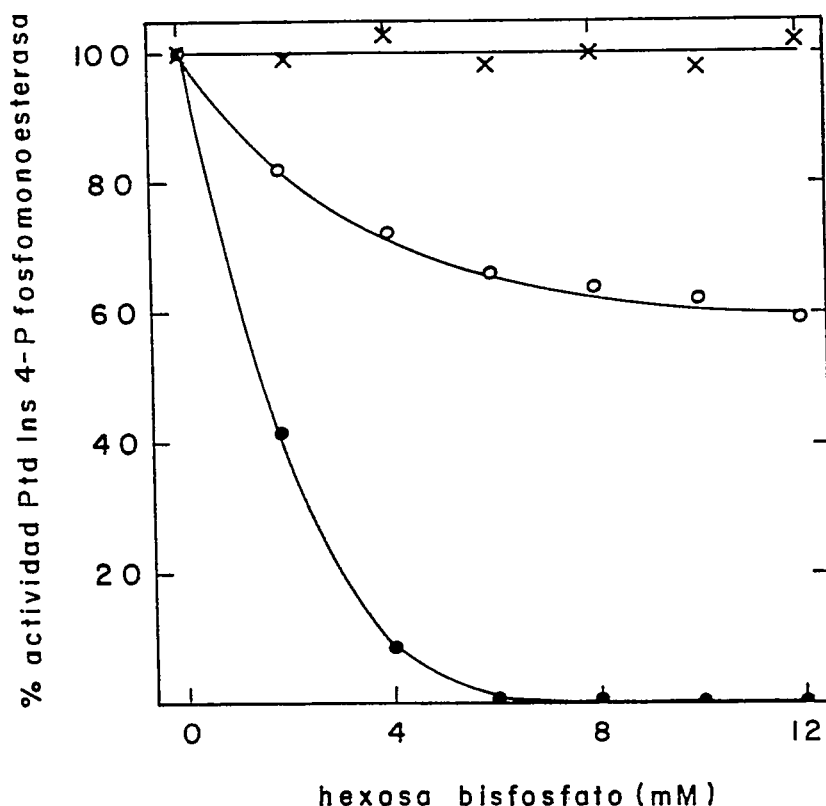


FIGURA 12: EFECTO DE HEXOSAS BISFOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONOESTERASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P se sintetiza incubando $36\ \mu\text{g}$ de proteínas de membranas con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP $50\ \mu\text{M}$ ($1600\ \text{dpm/pmol}$) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final $10\ \text{mM}$, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de hidrólisis. Junto con el ATP no radiactivo se agregan diferentes cantidades de (●) fructosa 1,6-bisfosfato (○) fructosa 2,6-bisfosfato o (x) glucosa 1,6-bisfosfato y la incubación continúa por 30 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los pmoles de $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P degradados en 30 minutos y en ausencia de hexosas bisfosfato corresponden al 100% de actividad enzimática: (●) 3,5 pmoles (○) 4,1 pmoles y (x) 4,1 pmoles.

hace en menor grado. En efecto, con una concentración de 12 mM se logra una disminución de la actividad de aproximadamente un 40%. Por último, la glucosa 1,6-bisfosfato prácticamente no tiene un efecto significativo en todo el rango de concentración estudiado.

En experimentos en que se adicionó fructosa 6-fosfato o glucosa 6-fosfato al medio de incubación en que se ensaya la actividad fosfomonoesterásica, en concentraciones entre 2 y 12 mM, se pudo observar que ninguna de las dos hexosas monofosfato tiene efecto sobre la actividad enzimática.

El α -glicerolfosfato resultó ser un potente inhibidor de la hidrólisis del PtdIns 4-P, lográndose un 100% de inhibición con una concentración de 10 mM. Estos resultados se muestran en la Figura 13.

Por el contrario, el β -glicerolfosfato ejerce un leve efecto estimulador sobre la actividad de la fosfomonoesterasa, aumentándola en un 25% con una concentración de 5 mM, para volver al nivel basal a 10 mM. Esto se muestra también en la Figura 13.

B.6. Efecto de fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol

En la Figura 14 se muestra la cinética de degradación del [4-³²P] PtdIns 4-P realizada en ausencia y en presencia de fosfatidilglicerol. Este compuesto, agregado en concentración de 1 μ g/ μ l al medio de ensayo, inhibe parcialmente la actividad enzimática.

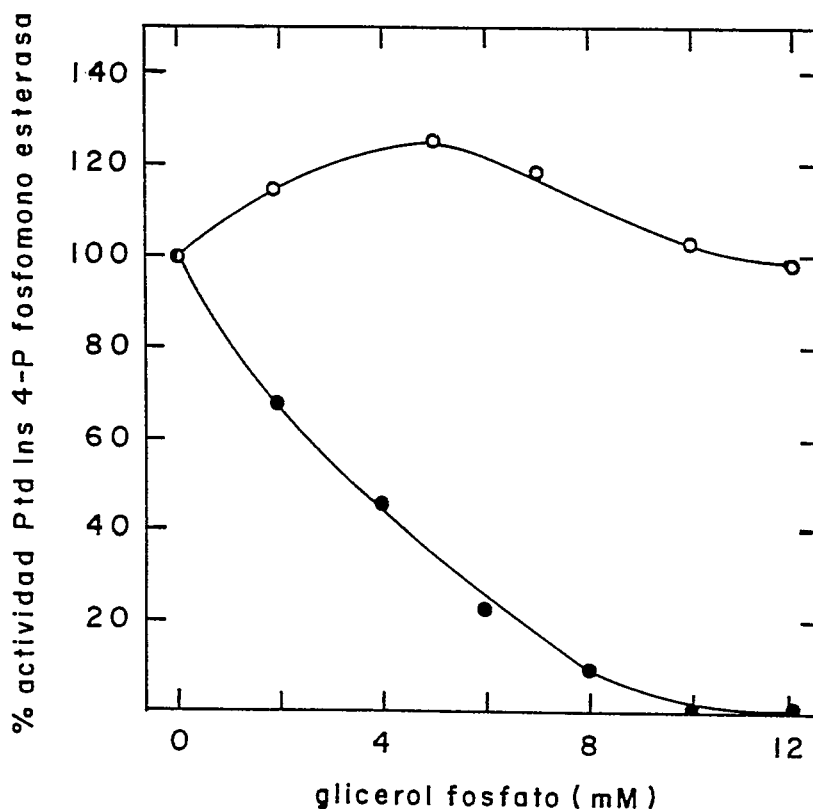


FIGURA 13: EFECTO DE α -GLICEROLFOSFATO Y β -GLICEROLFOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO FOSFOMONO-ESTERASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P se sintetiza incubando $36\ \mu\text{g}$ de proteínas de membranas con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP $50\ \mu\text{M}$ ($1600\ \text{dpm/pmol}$) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final $10\ \text{mM}$, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de hidrólisis. Junto con el ATP no radiactivo se agregan (●) diferentes cantidades de α -glicerolfosfato o (○) diferentes cantidades de β -glicerolfosfato y la incubación continúa durante 30 minutos, luego de lo cual se detiene la reacción y los fosfoinosítidos se extraen y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los pmoles de $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P degradados en 30 minutos y en ausencia de α o β -glicerolfosfato corresponden al 100% de actividad enzimática: (●) 2,2 pmoles y (○) 2,7 pmoles.

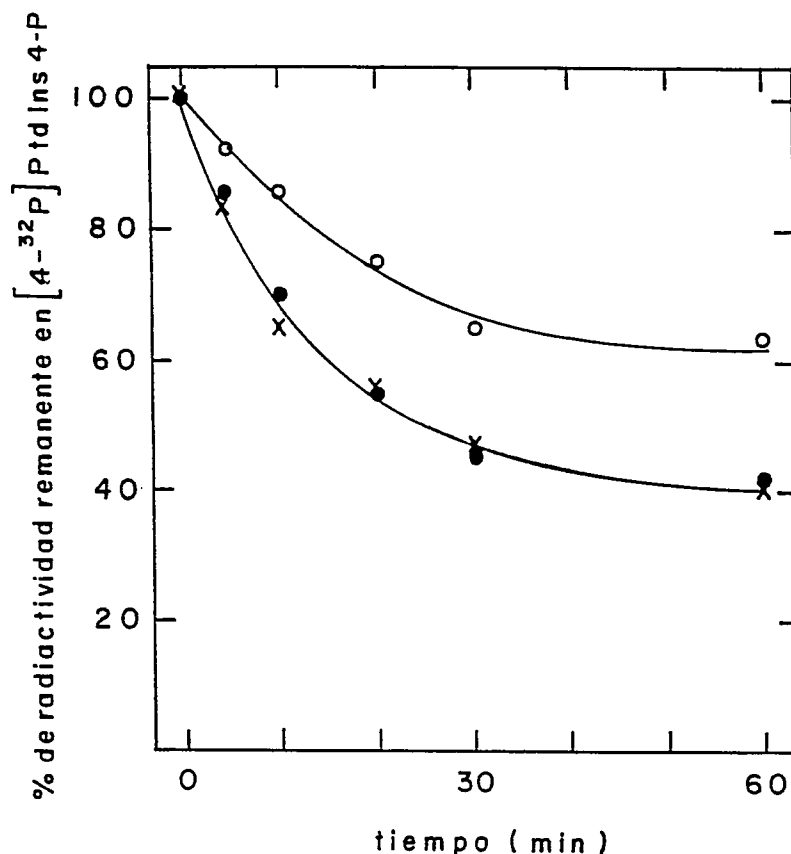


FIGURA 14: EFECTO DE FOSFATIDILGLICEROL Y DIFOSFATIDILGLICEROL SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL [4-³²P] FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El [4-³²P] PtdIns 4-P se sintetiza incubando 98 μ g de proteínas de membranas con [γ -³²P] ATP 50 μ M (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final 10 mM, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de hidrólisis. Junto con este último se adiciona (o) fosfatidilglicerol 1 μ g/ μ l o (x) difosfatidilglicerol 1 μ g/ μ l, luego de lo cual continúa la incubación por los tiempos indicados. El control sin adición está representado por (●). Se detiene la reacción y los fosfoinosítidos se extraen y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. El 100% de radiactividad corresponde a los pmoles de [4-³²P] PtdIns 4-P presentes al tiempo cero de la reacción de hidrólisis: (●) 4,2 pmoles (o) 4,4 pmoles y (x) 4,1 pmoles.

Por su parte, el difosfatidilglicerol (cardiolipina), no ejerce ningún efecto sobre la degradación del sustrato al ser adicionado al medio de incubación en concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Esto puede observarse también en la Figura 14.

B.7. Actividad de la fosfomonoesterasa en presencia de progesterona, insulina y acetilcolina

Se sabe que la progesterona promueve un aumento del recambio de fosfoinosítidos en el oocito entero, mientras que la insulina aumenta la incorporación de [^3H] mio-inositol en los fosfolípidos de inositol (Carrasco y col., 1990).

La Figura 15-A muestra que ninguna de estas dos hormonas ensayadas en concentración de 10 μM afecta la pérdida de marca del [4- ^{32}P] PtdIns-4-P en el tiempo .

Por su parte, la acetilcolina, que también promueve el recambio de fosfoinosítidos en el oocito entero (Carrasco y col., 1990), no influye tampoco sobre la cinética de hidrólisis del [4- ^{32}P] PtdIns 4-P, ensayada en concentraciones de 10 y 20 μM en presencia de GTP- γ -S 100 μM . Estos resultados se presentan en la Figura 15-B.

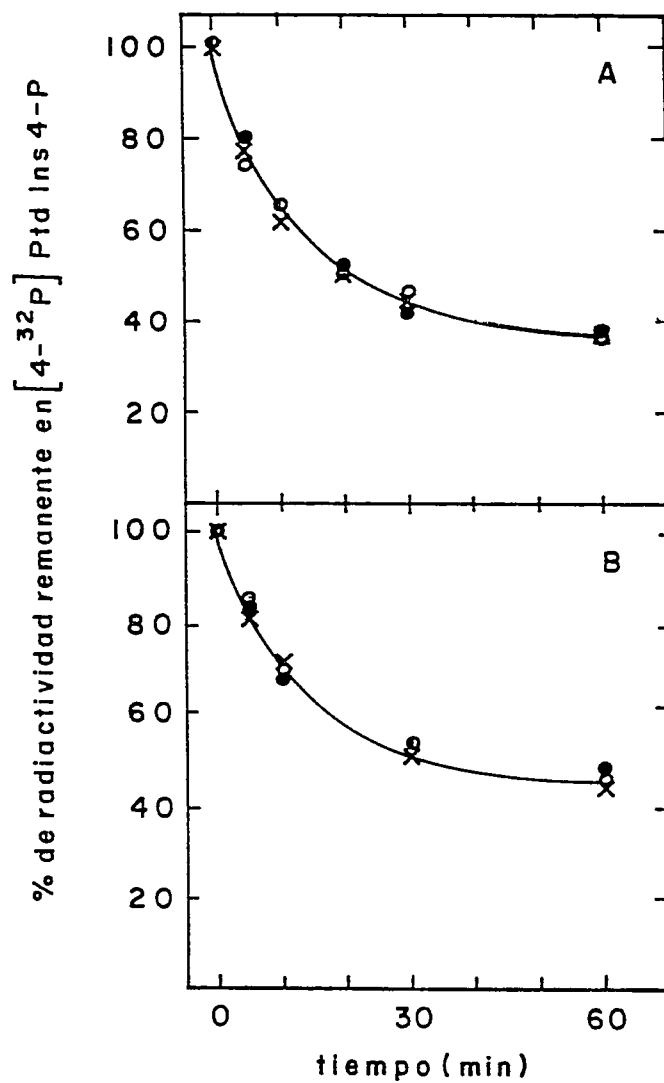


FIGURA 15: EFECTO DE PROGESTERONA, INSULINA Y ACETILCOLINA + GTP- γ -S SOBRE LA CINETICA DE DEGRADACION DEL $[4-^{32}\text{P}]$ FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

FIGURA 15: EFECTO DE PROGESTERONA, INSULINA Y ACETILCOLINA + GTP- γ -S SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACION DEL [4- 32 P] FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

El [4- 32 P] PtdIns 4-P se sintetiza incubando 80 μ g de proteínas de membranas con [γ - 32 P] ATP 50 μ M (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos, como se describe en Materiales y Métodos. En este momento se agrega ATP no radiactivo (concentración final 10 mM, dilución de la marca 1:200) y esto corresponde al tiempo cero de la reacción de hidrólisis. Junto con este último se adiciona en (A) (o) progesterona 10 μ M o (x) insulina 10 μ M y en (B) (o) acetilcolina 10 μ M + GTP- γ -S 100 μ M o (x) acetilcolina 20 μ M + GTP- γ -S 100 μ M, luego de lo cual continúa la incubación por los tiempos indicados. Tanto en (A) como en (B) los controles sin adición están representados por (●). Se detiene la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. El 100% de radiactividad corresponde a los pmoles de [4- 32 P] PtdIns 4-P presentes al tiempo cero de la reacción de hidrólisis: (A) (●) 5,5 pmoles (o) 5,1 pmoles y (x) 4,8 pmoles; (B) (●) 4,9 pmoles (o) 5,2 pmoles y (x) 5,5 pmoles.

C.- EFECTO DE METABOLITOS FOSFORILADOS Y DE FLUORURO, TARTRATO Y FOSFATO SOBRE OTRAS REACCIONES DEL METABOLISMO DE FOSFOINOSITIDOS E INOSITOL FOSFATOS EN MEMBRANAS DE OOCITOS.

Los mismos compuestos que se probaron como posibles modificadores de la actividad de la PtdIns 4-P fosfomonoesterásica se ensayaron también sobre la incorporación de [^{32}P] fosfato en PtdIns 4-P.

C.1. Efecto de fluoruro, tartrato y fosfato sobre la incorporación de [^{32}P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato.

Cuando se probó el efecto de fluoruro, tartrato y fosfato sobre la síntesis de PtdIns 4-P a partir de PtdIns endógeno y [γ - ^{32}P] ATP, se encontraron los resultados que se muestran en la Tabla V. Se puede observar que el fluoruro tiene un leve efecto activador a concentración de 10 mM, mientras el fosfato incrementa la incorporación de [^{32}P] fosfato al aumentar su concentración hasta 6 mM, para luego perder este efecto al llegar a 10 mM. Por su parte, la presencia de tartrato no afecta significativamente la formación de [4 - ^{32}P] PtdIns 4-P.

C.2. Efecto de metabolitos fosforilados sobre la incorporación de [^{32}P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato

Los resultados que se presentan en la Figura 16 muestran que la adición de fructosa 1,6-bisfosfato aumenta al triple la incorporación de [^{32}P] fosfato desde [γ - ^{32}P] ATP en

TABLA V

EFEECTO DE FLUORURO, TARTRATO y FOSFATO SOBRE LA INCORPORACION
 DE [³²P] FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS
 DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*

EXP.	ADICION	CONCENTRACION (mM)	[³² P] FOSFATO INCORPORADO (pmoles)	% INCORPORACION
I	fluoruro de sodio	0	6,58 ± 0,17	100
	" "	2	6,01 ± 0,33	91
	"	6	6,91 ± 0,10	105
	"	10	7,96 ± 0,41	121
II	tartrato de sodio y potasio	0	4,92 ± 0,42	100
	"	2	5,29 ± 0,18	108
	"	6	4,45 ± 0,14	90
	"	10	4,28 ± 0,23	87
III	fosfato de sodio	0	3,75 ± 0,09	100
	"	2	4,30 ± 0,10	115
	"	6	5,33 ± 0,03	142
	"	10	3,62 ± 0,01	97

TABLA V: EFECTO DE FLUORURO, TARTRATO Y FOSFATO SOBRE LA INCORPORACION DE [³²P] FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

98 µg de proteínas membranas se incuban durante 3 minutos con [γ -³²P] ATP, de acuerdo a las condiciones indicadas en Materiales y Métodos, pero adicionando diferentes cantidades de los compuestos que se señalan en la tabla. El [4-³²P] PtdIns 4-P formado se determina luego de la extracción y separación de los fosfoinosítidos por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como los pmoles de [³²P] fosfato incorporados en 3 minutos y se asigna el 100% a la incorporación en ausencia del compuesto agregado. Cada valor corresponde al promedio \pm desviación estándar de los duplicados de un mismo experimento. I, II y III representan 3 experimentos diferentes.

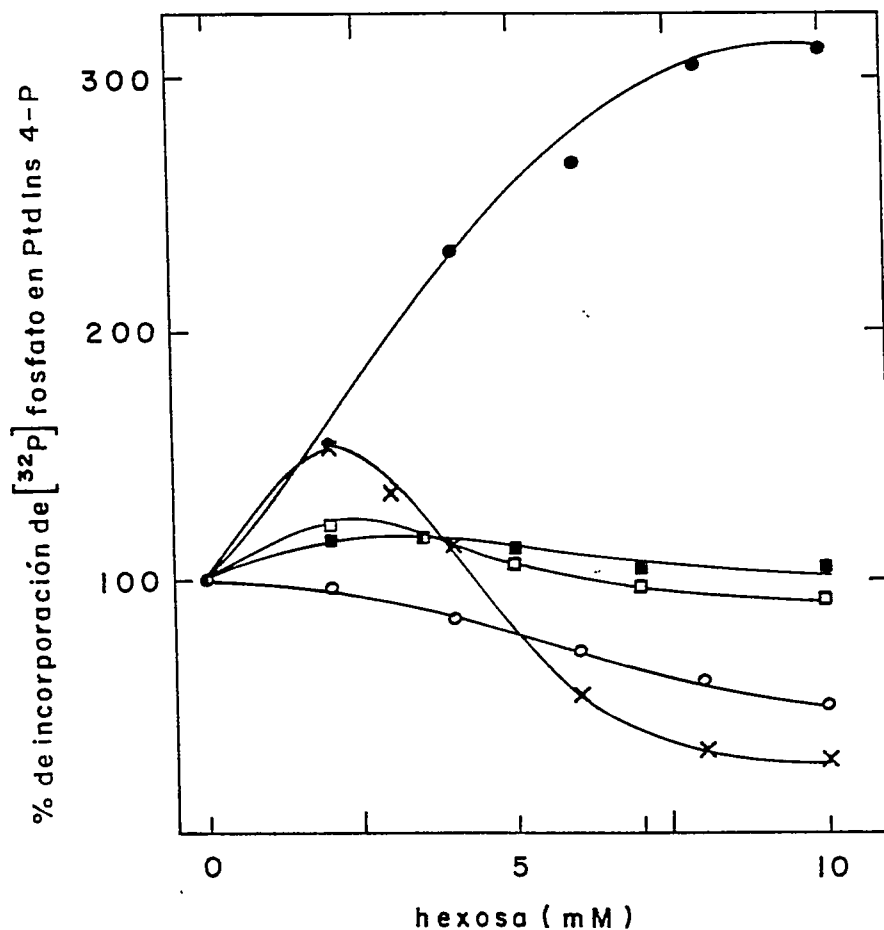


FIGURA 16: EFECTO DE HEXOSAS BIS Y MONOFOSFATO SOBRE LA INCORPORACION DE $[^{32}\text{P}]$ FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

36 μg de proteínas de membranas se incuban con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 50 μM (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos como se indica en Materiales y Métodos, pero adicionando diferentes cantidades de (●) fructosa 1,6-bisfosfato, (x) fructosa 2,6-bisfosfato, (o) glucosa 1,6-bisfosfato, (□) fructosa 6-fosfato o (■) glucosa 6-fosfato. Una vez detenida la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha que corresponde al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los pmoles de ^{32}P incorporados en 3 minutos y en ausencia de hexosa bis o monofosfato corresponden al 100% de incorporación: (●) 5,2 pmoles, (x) 4,2 pmoles, (o) 4,7 pmoles, (□) 4,1 pmoles y (■) 4,0 pmoles.

PtdIns 4-P, con una concentración de la hexosa bisfosfato de 10 mM.

Por su parte, la fructosa 2,6-bisfosfato posee un efecto bifásico, aumentando la formación de [4-³²P] PtdIns 4-P en alrededor de un 55% a 2 mM, para luego revertirse el efecto, disminuyendo la incorporación en un 70% a 10 mM.

En presencia de glucosa 1,6-bisfosfato 10 mM se obtiene sólo un 50% de incorporación de fosfato radiactivo en PtdIns 4-P, con respecto al experimento control, mientras que a esta misma concentración, tanto la fructosa 6-fosfato como la glucosa 6-fosfato ejercen un leve efecto estimulador.

A su vez, tanto el α como el β -glicerolfosfato estimulan la formación de [4-³²P] PtdIns 4-P a partir de [γ -³²P] ATP y PtdIns endógeno, según queda de manifiesto en la Figura 17: el α -glicerolfosfato, en concentración de 10 mM, aumenta la incorporación de [³²P] fosfato en un 100%, mientras el efecto estimulador del β -glicerolfosfato es algo menor, incrementando la formación de [4-³²P] PtdIns 4-P en alrededor de un 60% a 2 mM, para luego disminuir su efecto a mayores concentraciones.

C.3. Efecto de fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol sobre la incorporación de [³²P] fosfato en fosfatidilinositol 4-monofosfato

El fosfatidilglicerol inhibe la incorporación de [³²P] fósforo en PtdIns 4-P, como puede apreciarse en la

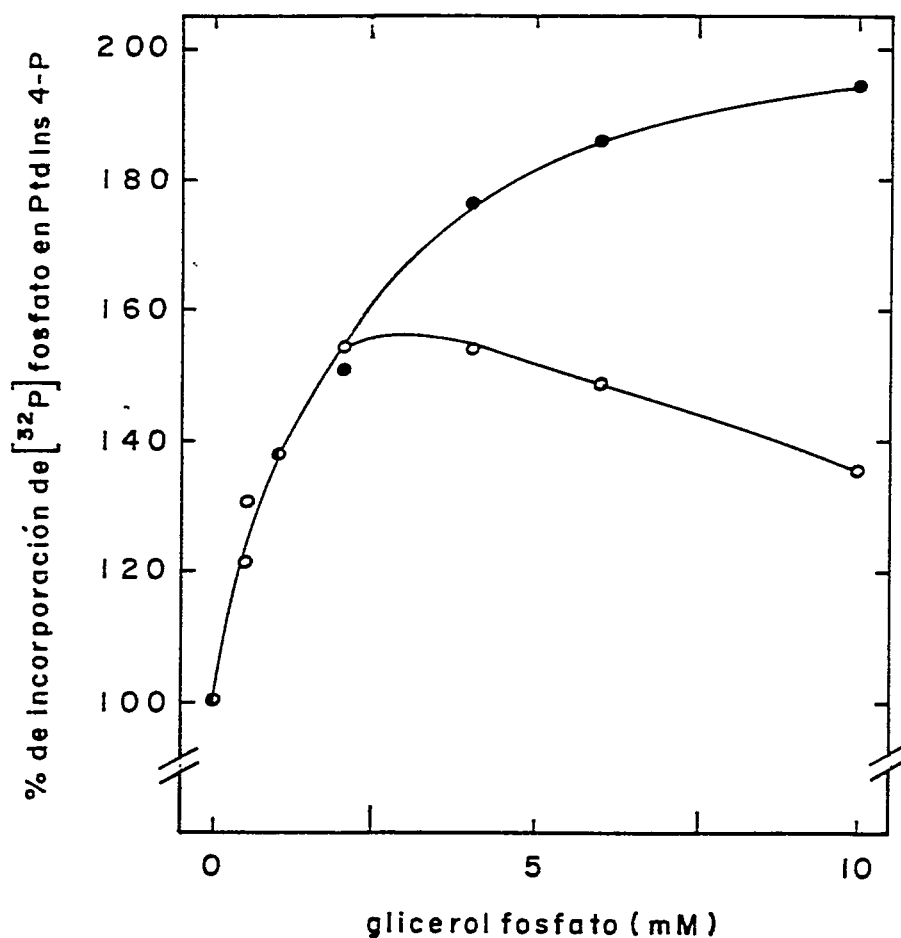


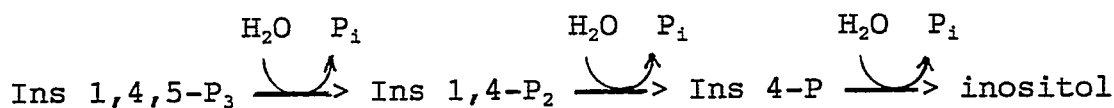
FIGURA 17: EFECTO DE α -GLICEROLFOSFATO Y β -GLICEROLFOSFATO SOBRE LA INCORPORACION DE $[^{32}\text{P}]$ FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

25 μg de proteínas de membranas se incuban con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 50 μM (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos como se indica en Materiales y Métodos, pero adicionando diferentes cantidades de (●) α -glicerolfosfato o (○) β -glicerolfosfato. Una vez detenida la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha correspondiente al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los pmoles de ^{32}P incorporados en 3 minutos y en ausencia de α o β -glicerolfosfato corresponden al 100% de incorporación: (●) 7,5 pmoles y (○) 6,6 pmoles.

Figura 18. En efecto, este compuesto ensayado en concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disminuye la formación de $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P en un 65%. Por su parte, el difosfatidilglicerol (cardiolipina) no presenta ningún efecto en el rango de concentraciones ensayadas.

C.4. Efecto de la fructosa 1,6-bisfosfato sobre las fosfomonoesterasas que hidrolizan a los inositol fosfatos

Dado que la fructosa 1,6-bisfosfato resultó ser un potente inhibidor de la actividad fosfomonoesterásica que hidroliza al PtdIns 4-P y con el antecedente de que esta hexosa bisfosfato inhibe también a la inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa de páncreas (Rana y col., 1986), se analizó su efecto sobre otras fosfomonoesterasas presentes en la membrana del oocito y relacionadas con el metabolismo de compuestos derivados del inositol:



Como se puede ver en la Figura 19, la fructosa 1,6-bisfosfato, ensayada en concentración de 10 mM, inhibe casi completamente a las fosfomonoesterasas que hidrolizan Ins 1,4,5-P₃, Ins 1,4-P₂ e Ins 1-P, respectivamente.

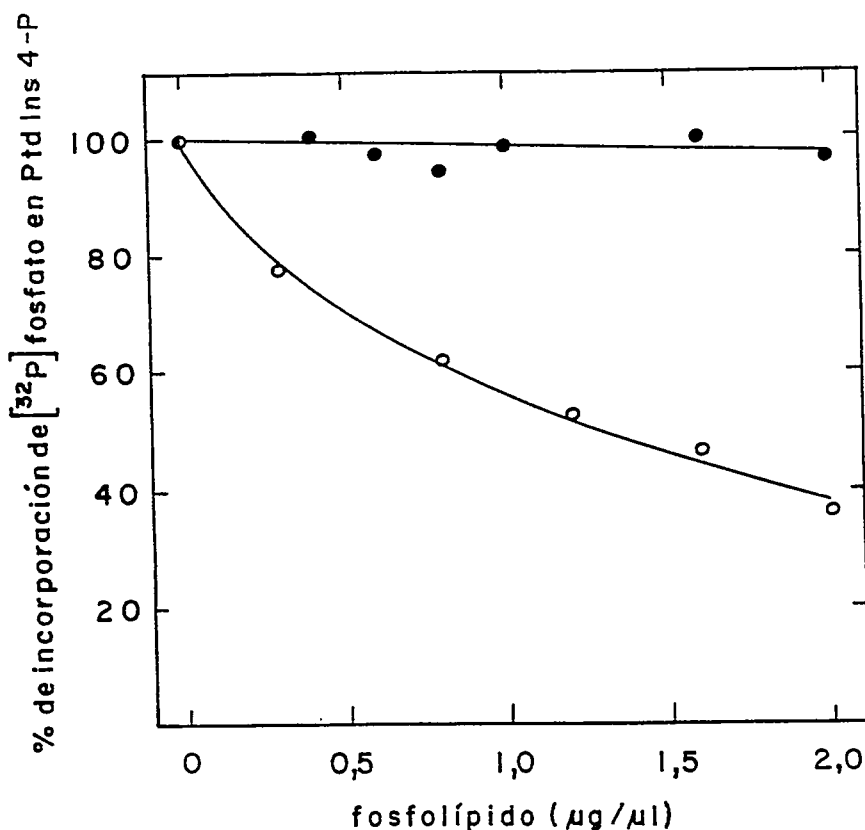


FIGURA 18: EFECTO DE FOSFATIDILGLICEROL Y DIFOSFATIDILGLICEROL SOBRE LA INCORPORACION DE $[^{32}\text{P}]$ FOSFATO EN FOSFATIDIL INOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*

36 µg de proteínas de membranas se incuban con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 50 µM (1600 dpm/pmol) durante 3 minutos como se indica en Materiales y Métodos, pero adicionando diferentes cantidades de (o) fosfatidilglicerol o (●) difosfatidilglicerol. Una vez detenida la reacción, se extraen los fosfoinosítidos y se separan por cromatografía en capa fina, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en la mancha correspondiente al PtdIns 4-P se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los pmoles de ^{32}P incorporados en 3 minutos y en ausencia de fosfolípido corresponden al 100% de incorporación: (o) 4,2 pmoles y (●) 4,5 pmoles.

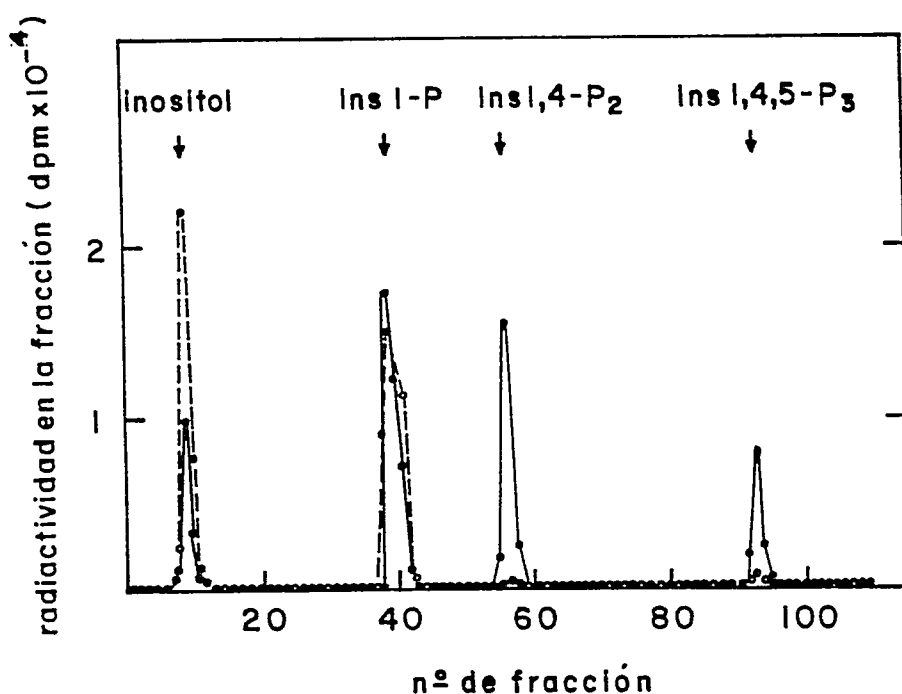
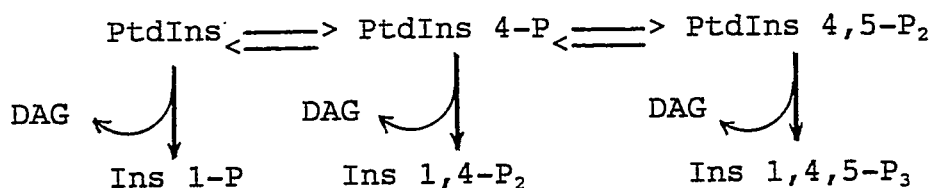


FIGURA 19: EFECTO DE FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATO SOBRE LA HIDROLISIS DE INOSITOL FOSFATOS POR FOSFOMONOESTERASAS PRESENTES EN LAS MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

Una mezcla que contiene 8 pmoles de $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4,5- P_3 , 12 pmoles de $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4- P_2 , 20 pmoles de $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1-P y 10 pmoles de $[2\text{-}^3\text{H}]$ inositol, con un total de 110000 dpm, se incuban durante 60 minutos con 36 μg de proteínas de membranas, en presencia (●) o ausencia (○) de fructosa 1,6-bisfosfato 10 mM, luego de lo cual se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en cada fracción colectada se determina por espectrometría de centelleo líquido. Las flechas indican la fracción en que eluyen los patrones de $[2\text{-}^3\text{H}]$ inositol, $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1-P, $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4- P_2 y $[2\text{-}^3\text{H}]$ Ins 1,4,5- P_3 .

D.- CARACTERISTICAS DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS

En esta parte de la tesis se estudian las características de la fosfolipasa C encontrada en la preparación de membranas de oocitos, como se describió en Resultados A.5 y A.6.



D.1. Actividad de la fosfolipasa C utilizando como sustratos fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4-monofosfato y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

La Figura 20 muestra el análisis por HPLC de las fases acuosas de experimentos en los cuales se incubó 110000 dpm de Ptd [2-³H] Ins (2,7 pmoles), Ptd [2-³H] Ins 4-P (50 pmoles) o Ptd [2-³H] Ins 4,5-P₂ (5,7 pmoles) con membranas de oocitos, en presencia de Ca⁺² 100 μM. Cabe señalar que los experimentos anteriormente descritos (A.5. y A.6.) con los dos sustratos nombrados en primer término se realizaron en presencia de Mg⁺² 10 mM y en ausencia de Ca⁺² agregado.

Se puede apreciar que al incubar Ptd [2-³H] Ins con membranas de oocitos se obtiene Ins 1-P e inositol marcados (Figura 20-A). El porcentaje de marca en inositol es menor que

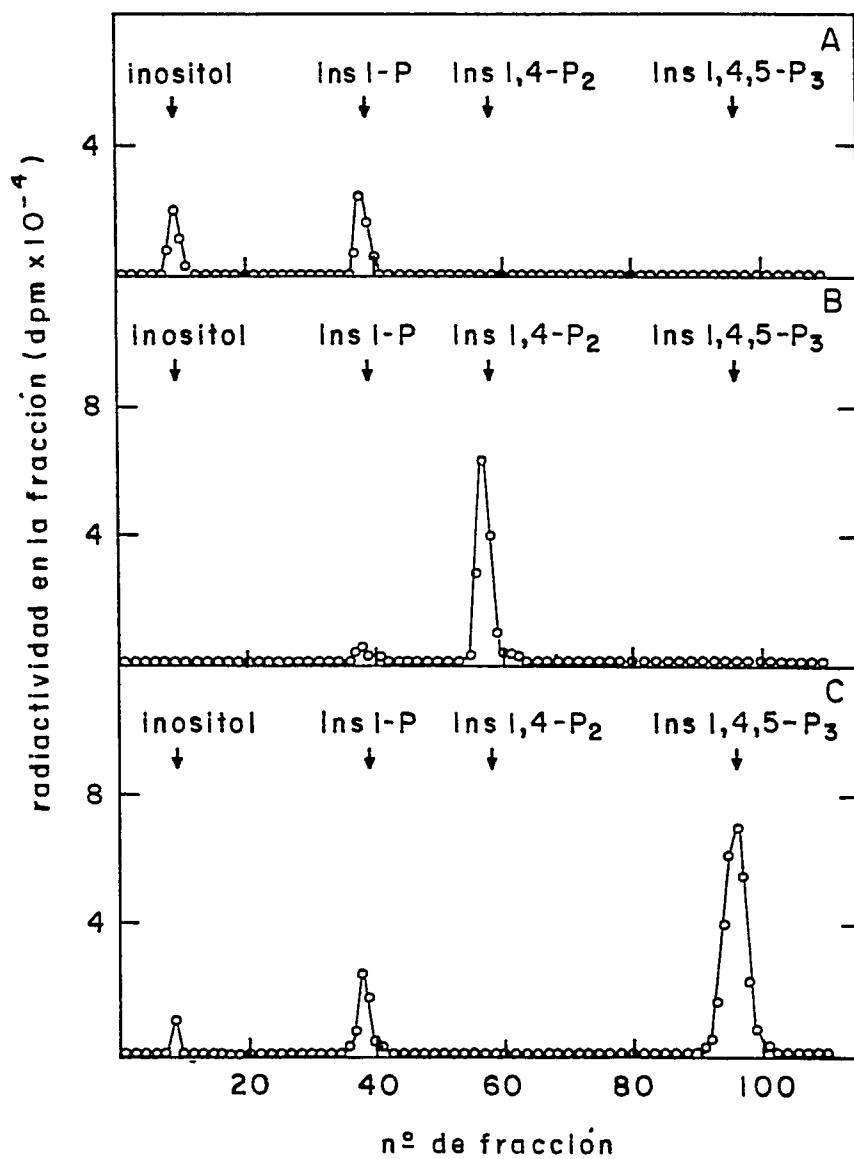


FIGURA 20: ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

FIGURA 20: ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

Durante 60 minutos se incuban en (A) 196 μg de proteínas de membranas con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm), en (B) 119 μg de proteínas de membranas con 50 pmoles de Ptd [2-³H] Ins 4-P (110000 dpm) en presencia de PtdIns 4-P 88 μM e Ins 1,4-P₂ 4 mM y en (C) 119 μg de proteínas de membranas con 5,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins 4,5-P₂ (110000 dpm) en presencia de PtdIns 4,5-P₂ 64 μM e Ins 1,4,5-P₃ 2 mM, como se indica en Materiales y Métodos. La concentración de Ca⁺² es 100 μM en los 3 ensayos. Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indicó en Materiales y Métodos. La radiactividad en cada fracción se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Las flechas indican la fracción en que eluyen los patrones de [2-³H] inositol, [2-³H] Ins 1-P, [2-³H] Ins 1,4-P₂ y [2-³H] Ins 1,4,5-P₃.

en los experimentos con Mg^{+2} 10 mM (ver Resultados, A.6.). En experimentos controles se comprobó que la Ins 1-P fosfomonoesterasa es más activa en presencia de Mg^{+2} .

Los resultados utilizando Ptd [2- 3H] Ins 4-P como sustrato, en presencia de un exceso de Ins 1,4- P_2 no radiactivo (Figura 20-B), muestran que la radiactividad que se recupera en la fase acuosa aparece casi en su totalidad asociada al Ins 1,4- P_2 . La aparición de una pequeña cantidad de inositol monofosfato tritiado se explicaría por la hidrólisis vía fosfolipasa C del Ptd [2- 3H] Ins generado a partir del Ptd [2- 3H] Ins 4-P por acción de la fosfomonoesterasa.

Por último, la Figura 20-C muestra los resultados obtenidos al utilizar Ptd [2- 3H] Ins 4,5- P_2 como sustrato, en presencia de un exceso de Ins 1,4,5- P_3 no radiactivo. Como se puede apreciar, la radiactividad en la fase acuosa corresponde mayoritariamente a [2- 3H] Ins 1,4,5- P_3 . Puede observarse también la producción de inositol monofosfato tritiado. Cabe señalar que en las condiciones del experimento hay hidrólisis del PtdIns 4,5- P_2 con la generación de PtdIns 4-P y subsecuentemente de PtdIns, por lo tanto el inositol monofosfato puede provenir de la hidrólisis del PtdIns, así como también del Ins 1,4- P_2 generado a partir de PtdIns 4-P (el experimento se realiza en ausencia de Ins 1,4- P_2 no radiactivo).

Ninguno de los tres sustratos utilizados sufre modificación alguna si es incubado con una preparación de membranas calentada a 100°C.

Si se estima la radiactividad específica de cada uno de los tres sustratos utilizados, para lo cual se conoce tanto la radiactividad específica de los tres sustratos radiactivos agregados, así como también la cantidad de PtdIns 4-P y de PtdIns 4,5-P₂ no radiactivos adicionados exógenamente en los ensayos correspondientes (en el ensayo con Ptd [2-³H] Ins éste no se diluye con PtdIns exógeno no radiactivo), y considerando el contenido endógeno de cada fosfoinosítido en la membrana del oocito como semejante a los descritos para las membranas plasmáticas de hepatocito (Schachter, 1988) se obtienen valores de $2,1 \times 10^7$, $2,2 \times 10^7$ y $3,3 \times 10^7$ dpm/ μ mol para Ptd [2-³H] Ins, Ptd [2-³H] Ins 4-P y Ptd [2-³H] Ins 4,5-P₂, respectivamente. Este cálculo supone también que en el caso de cada uno de los fosfoinosítidos, tanto el compuesto agregado exógenamente como el endógeno de la membrana pasan a constituir un conjunto único.

Así, se puede estimar que se generan 2214, 4202 y 7000 pmoles de producto en 60 minutos y por mg de proteínas a partir de PtdIns, PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂, respectivamente.

D.2. Cinética de la reacción catalizada por la fosfolipasa C

En la Figura 21 se presentan los resultados que se obtienen al estudiar la hidrólisis de Ptd [2-³H] Ins y de Ptd [2-³] Ins 4,5-P₂ en función del tiempo de incubación, en presencia de Ca⁺² 100 μ M. La hidrólisis del Ptd [2-³H] Ins tiene una fase lineal corta de alrededor de 5 minutos, mien-

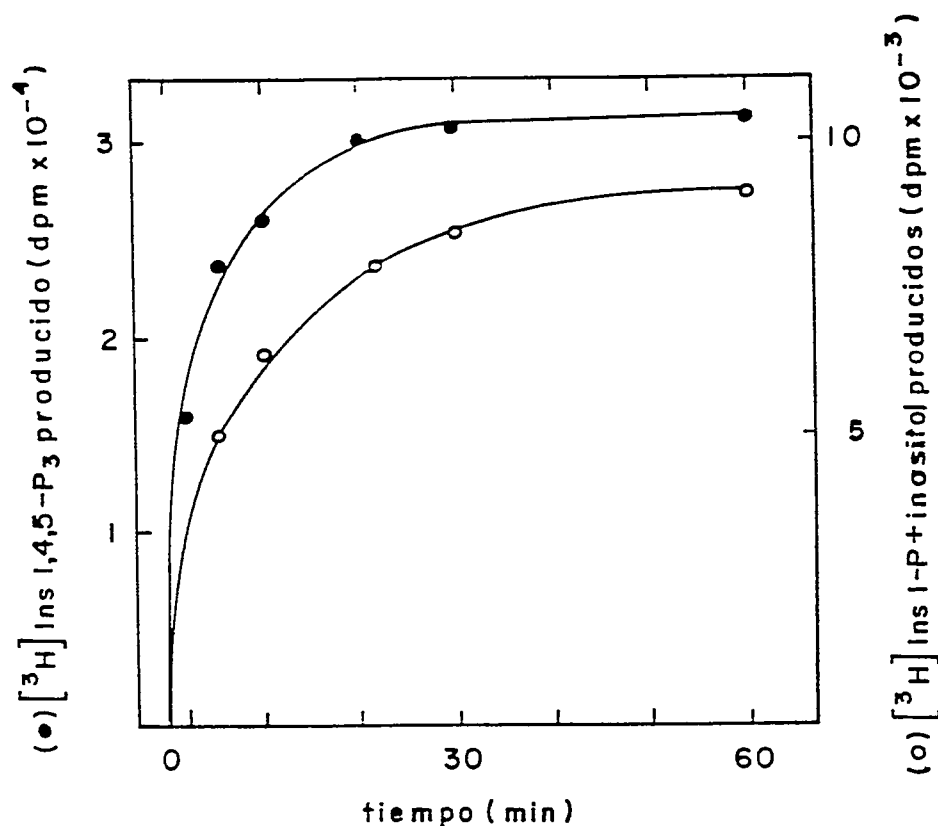


FIGURA 21: ACCION DE LA FOSFOLIPASA C SOBRE FOSFATIDILINOSITOL Y FOSFATIDILINOSITOL 4,5-BISFOSFATO EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION

(○) 196 μg de proteínas de membranas se incuban con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm) o (●) 119 μg de proteínas de membranas se incuban con 5,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins 4,5-P₂ (110000 dpm) en presencia de PtdIns 4,5-P₂ 64 μM e Ins 1,4,5-P₃ 2 mM, durante los tiempos señalados y como se indica en Materiales y Métodos. La concentración de Ca⁺² es 100 μM en ambos ensayos. Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indicó en Materiales y Métodos. Se colectan las fracciones en que eluyen (○) [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] inositol o (●) [2-³H] Ins 1,4,5-P₃ y la radiactividad en ellas se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. Los resultados se expresan como (○) [2-³H] Ins 1-P + [2-³H] inositol formados (dpm) o (●) [2-³H] Ins 1,4,5-P₃ formado (dpm) en los tiempos indicados.

tras que la hidrólisis del Ptd [2-³H] Ins 4,5-P₂ presenta una fase lineal más corta, de aproximadamente 2 minutos.

Considerando las radiactividades específicas de los sustratos estimadas en la sección anterior (D.1.), las actividades específicas de la fosfolipasa C con PtdIns y con PtdIns 4,5-P₂ como sustratos son 243 y 2037 pmoles de producto/min mg respectivamente.

D.3. Efecto del Ca⁺²

Como se puede ver en la Figura 22-A; la hidrólisis del PtdIns catalizada por la fosfolipasa C es estimulada en un 100% por Ca⁺² 100 μM, existiendo sí una actividad basal en ausencia del catión. A concentraciones mayores de 100 μM el grado de estimulación es algo menor. También se comprobó que el Mg⁺² no reemplaza al Ca⁺² en todo el rango de concentración ensayada desde 50 μM a 2 mM.

Por su parte, la Figura 22-B nos indica que la hidrólisis del PtdIns 4,5-P₂ es totalmente dependiente de Ca⁺², no existiendo actividad enzimática en su ausencia y obteniéndose un máximo de actividad con una concentración de Ca⁺² de 50 μM, y esta actividad se mantiene con concentraciones mayores de Ca⁺², hasta 2 mM. A su vez, también se determinó que el Mg⁺² no reemplaza al Ca⁺² a las concentraciones ensayadas, desde 50 μM a 2 mM.

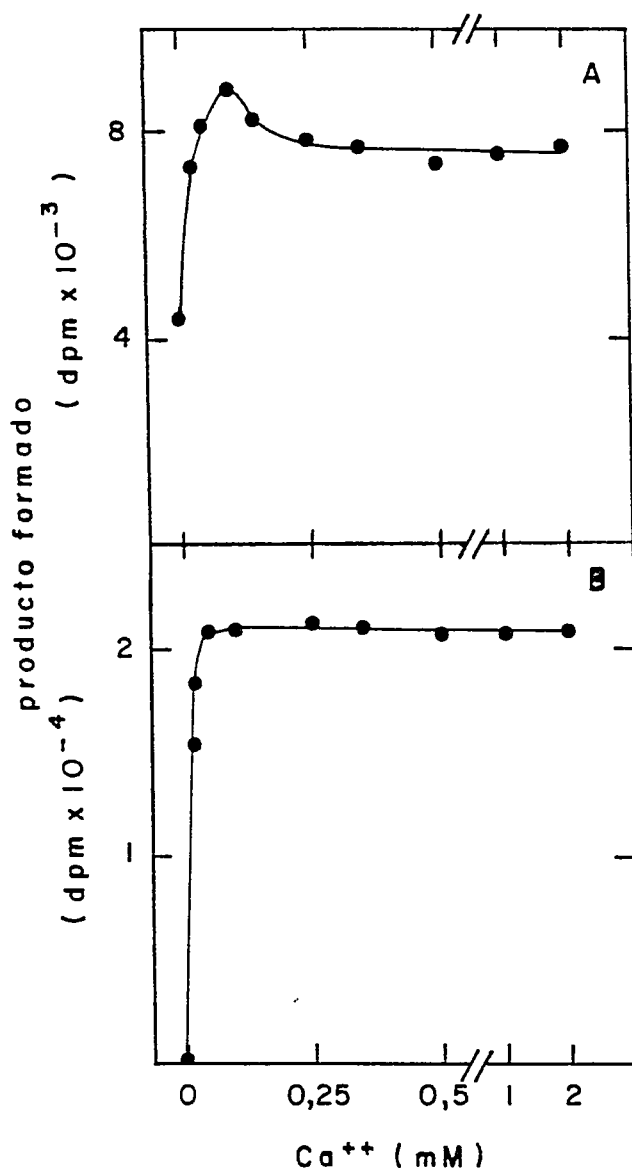


FIGURA 22: EFECTO DE Ca^{+2} SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

En (A), 196 μg de proteínas de membranas se incuban con 2,7 pmoles de Ptd [$2\text{-}^3\text{H}$] Ins (110000 dpm) durante 10 minutos. En (B), 119 μg de proteínas de membranas se incuban con 5,7 pmoles de Ptd [$2\text{-}^3\text{H}$] Ins 4,5- P_2 en presencia de PtdIns 4,5- P_2 64 μM e Ins 1,4,5- P_3 2 mM durante 2 minutos, con diferentes concentraciones de Ca^{+2} y como se indica en Materiales y Métodos. Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. Se colectan las fracciones en que eluyen (A) [$2\text{-}^3\text{H}$] Ins 1-P y [$2\text{-}^3\text{H}$] inositol o (B) [$2\text{-}^3\text{H}$] Ins 1,4,5- P_3 y la radiactividad se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresa como (A) [$2\text{-}^3\text{H}$] Ins 1-P + [$2\text{-}^3\text{H}$] inositol formados (dpm) en 10 minutos o (B) [$2\text{-}^3\text{H}$] Ins 1,4,5- P_3 formado (dpm) en 2 minutos.

D.4. Efecto del pH

Las fosfolipasas C estudiadas de diferentes orígenes presentan pH óptimo entre 4,5 y 8 (Manne y Kung, 1987; Ryu y col., 1987; Rebecchi y Rosen, 1987; Carter y Smith, 1987; Nakanishi y col., 1988; Roy y col., 1991; Griendling y col., 1991), lo cual ha sido interpretado como consecuencia de la existencia de diferentes tipos y subtipos (Rhee y col., 1989).

La Figura 23 muestra los resultados del análisis del efecto de las variaciones de pH sobre la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos, utilizando como sustrato PtdIns y realizado en presencia de Ca^{+2} 100 μM . Se puede observar que la máxima actividad enzimática se obtiene a pH 7,5. No hay variación en cuanto al pH óptimo si se determina en presencia de Ca^{+2} 500 μM .

Experimentos controles demostraron que no hay hidrólisis no enzimática en el rango de pH estudiado.

D.5. Efecto de poliaminas y neomicina

Los resultados que se muestran en la Figura 24 indican que la espermidina aumenta la actividad de la fosfolipasa C, usando PtdIns como sustrato, lográndose un incremento máximo de alrededor de un 50% a una concentración de 2 mM. Sin embargo, a concentraciones mayores el efecto estimulador disminuye, llegándose nuevamente a la actividad basal con 10 mM.

Por su parte, la espermina, en concentración

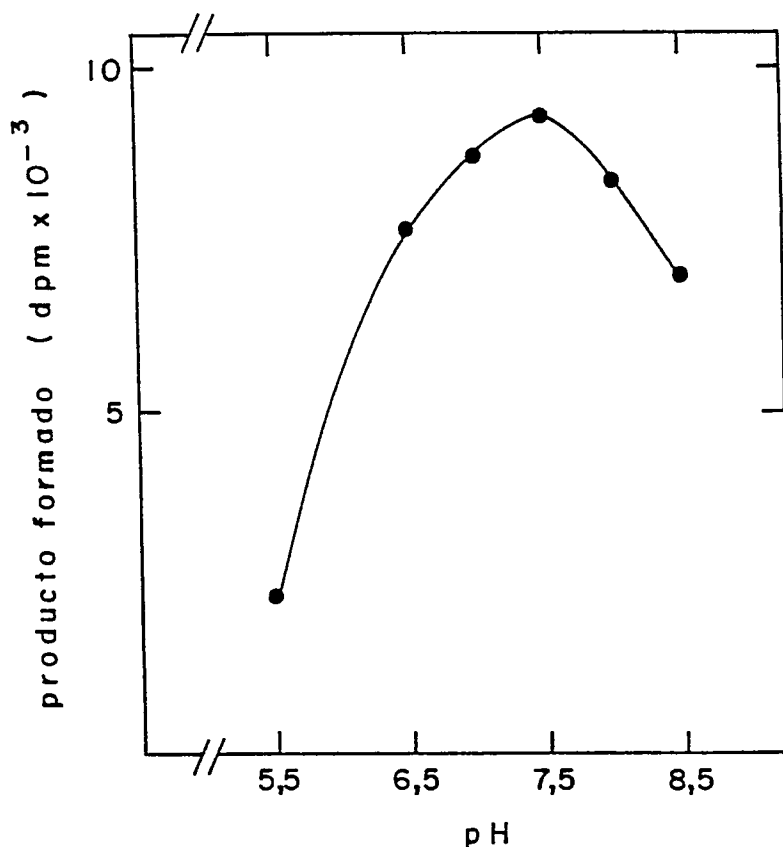


FIGURA 23: EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

(SUSTRATO: Ptd [2-³H] Ins)

196 μ g de proteínas de membranas se incuban con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm) durante 10 minutos, como se indica en Materiales y Métodos, pero en presencia de diferentes amortiguadores, de modo de obtener los pH indicados. La concentración de Ca^{+2} es 100 μ M. Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. Se colectan las fracciones en que eluyen [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] inositol y la radiactividad se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresa como [2-³H] Ins 1-P + [2-³H] inositol (dpm) formados en 10 minutos.

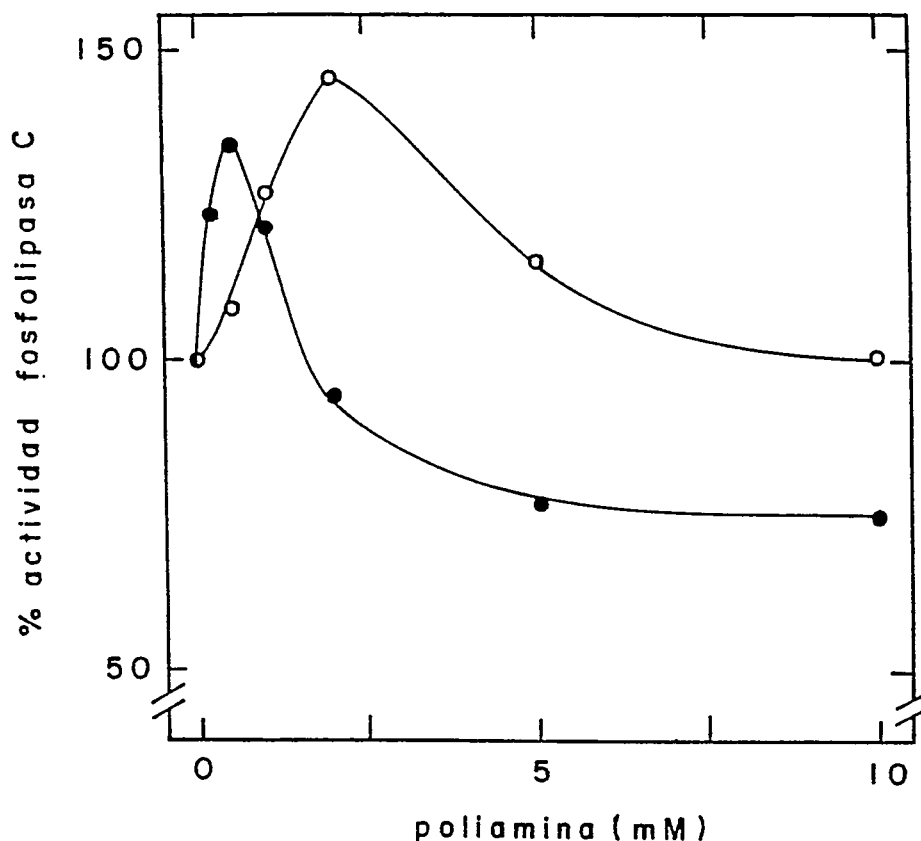


FIGURA 24: EFECTO DE POLIAMINAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.
(SUSTRATO: Ptd [2-³H] Ins)

119 μ g de proteínas de membranas se incuban con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm) durante 10 minutos, como se indica en Materiales y Métodos, pero en presencia de diferentes concentraciones de (●) espermina o (○) espermidina. La concentración de Ca^{+2} es 100 μ M. Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. Se colectan las fracciones en que eluyen [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] inositol y la radiactividad se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresa como [2-³H] Ins 1-P + [2-³H] inositol (dpm) formados en 10 minutos. El 100% se asigna al control sin adición: (●) 4274 dpm (○) 4542 dpm.

0,5 mM, también aumenta la actividad enzimática, aún cuando lo hace en menor grado, lográndose un incremento máximo de sólo un 35%. Este compuesto a concentraciones mayores de 2 mM ejerce un efecto levemente inhibitor, disminuyendo la hidrólisis de PtdIns a valores de alrededor de un 75% del control en concentraciones mayores de 5 mM.

La polilisina (PM 12000) ejerce un efecto bifásico sobre la hidrólisis del PtdIns catalizada por la fosfolipasa C. En efecto, como puede verse en la Figura 25, esta polica-tión en concentraciones menores de 200 μ M ejerce un leve efecto inhibitor, disminuyendo la actividad hasta un 80% del control a 200 μ M. A concentraciones mayores, el efecto se revierte, aumentando la hidrólisis del PtdIns hasta lograrse un incremento de alrededor del 65% sobre el control, a 700 μ M.

Utilizando PtdIns como sustrato, la neomicina ejerce un efecto bifásico sobre la actividad enzimática, presentando un leve efecto activador con un máximo a 1 mM y que representa un 30% de incremento sobre el control, para luego disminuir su efecto activador lográndose la actividad basal a 5 mM y un 10% de inhibición a 10 mM. Estos resultados se muestran en la Figura 26.

D.6. Efecto de fosfolípidos

En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos al estudiar el efecto de ácido fosfatídico sobre la actividad fosfolipasa C, utilizando PtdIns como sustrato, y en

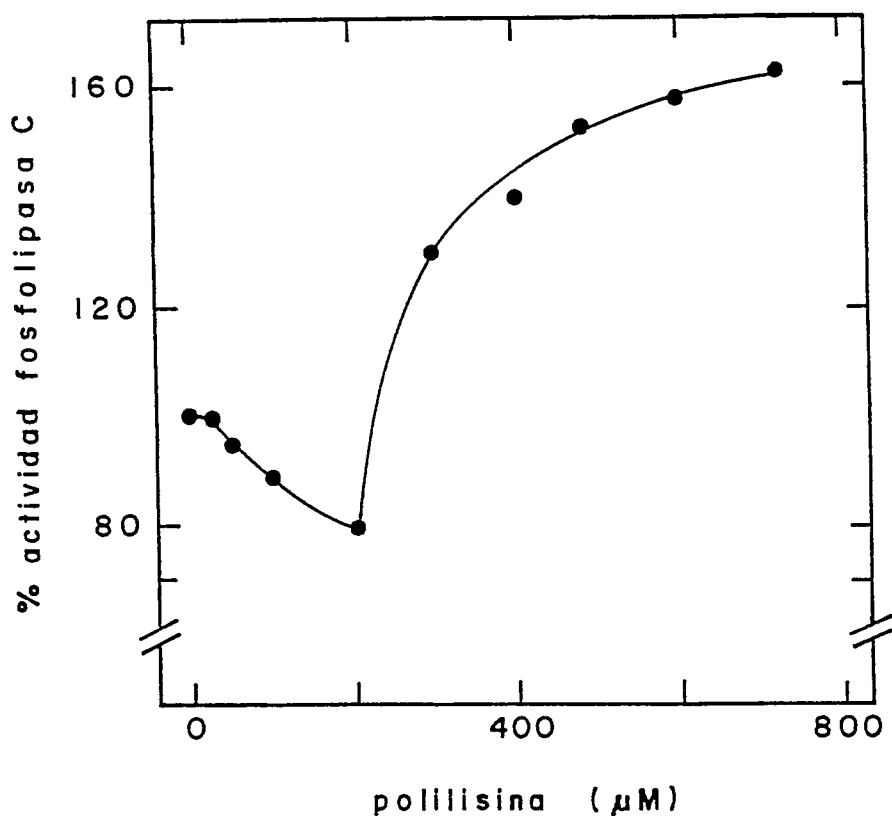


FIGURA 25: EFECTO DE POLILISINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

(SUSTRATO: Ptd [2-³H] Ins)

119 μg de proteínas de membranas se incuban con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm) durante 10 minutos, como se indica en Materiales y Métodos, pero en presencia de diferentes concentraciones de polilisina (PM 12000). La concentración de Ca⁺² es 100 μM. Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. Se colectan las fracciones en que eluyen [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] inositol y la radiactividad se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresa como el [2-³H] Ins 1-P + [2-³H] inositol (dpm) formados en 10 minutos. El 100% se asigna al control sin adición: 4263 dpm.

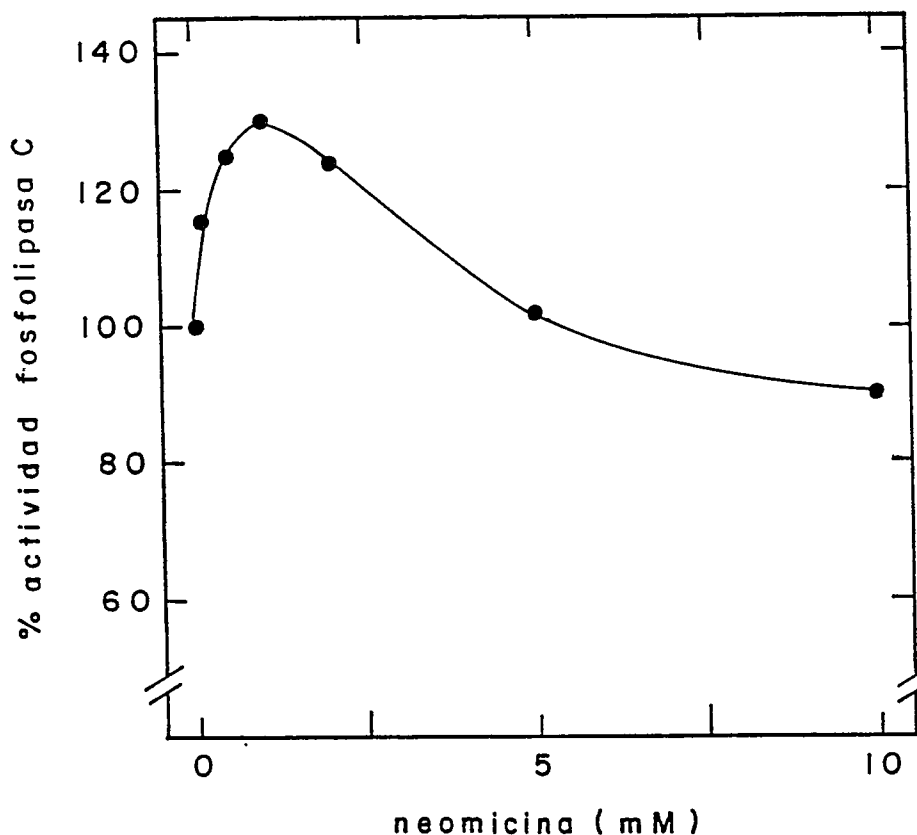


FIGURA 26: EFECTO DE NEOMICINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.
(SUSTRATO: Ptd [2-³H] Ins)

119 μg de proteínas de membranas se incuban con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm) durante 10 minutos, como se indica en Materiales y Métodos, pero en presencia de diferentes concentraciones de neomicina. La concentración de Ca^{+2} es 100 μM . Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. Se colectan las fracciones en que eluyen [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] inositol y la radiactividad se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresa como [2-³H] Ins 1-P + [2-³H] inositol (dpm) formados en 10 minutos. El 100% se asigna al control sin adición: 4558 dpm.

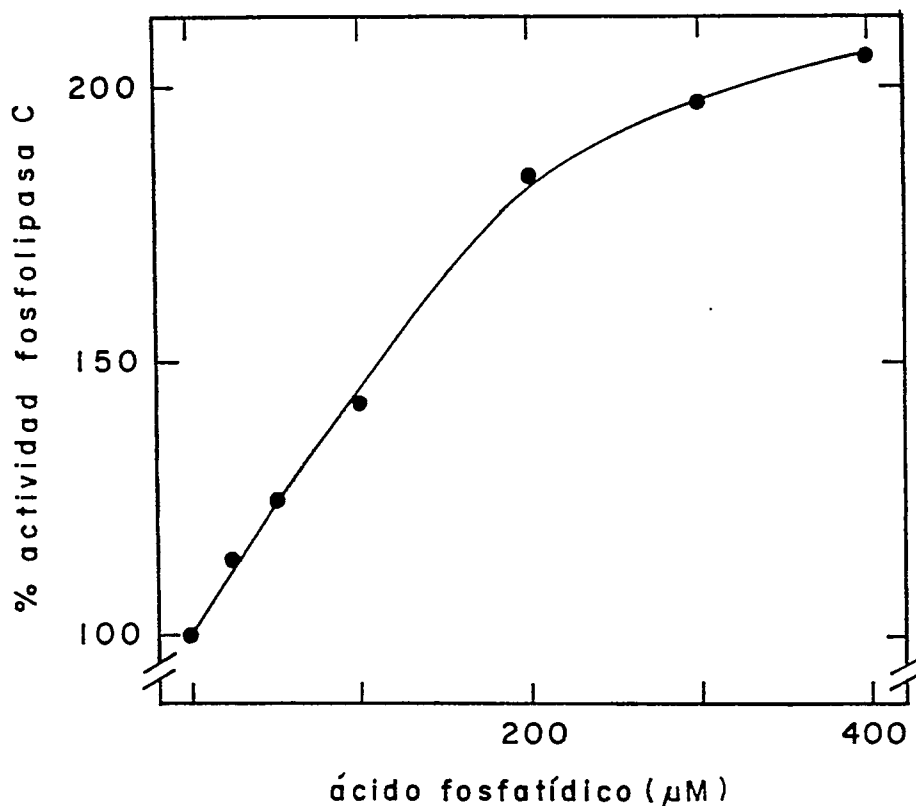


FIGURA 27: EFECTO DE ACIDO FOSFATIDICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.
(SUSTRATO: Ptd [2-³H] Ins)

119 μg de proteínas de membranas se incuban con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm) durante 10 minutos, como se indica en Materiales y Métodos, pero en presencia de diferentes concentraciones de ácido fosfatídico. La concentración de Ca²⁺ es 100 μM. Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. Se colectan las fracciones en que eluyen [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] inositol y la radiactividad se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad enzimática se expresa como [2-³H] Ins 1-P + [2-³H] inositol (dpm) formados en 10 minutos. El 100% se asigna al control sin adición: 4105 dpm.

ella se demuestra que este compuesto estimula en forma importante la actividad enzimática, lográndose un 100% de activación con una concentración de 400 μM . Como se puede ver en la Tabla VI, este efecto no se logra con ningún otro de los fosfolípidos ensayados, de los cuales sólo el fosfatidilglicerol (200 μM) presenta una acción estimuladora (33% sobre el control). La fosfatidilserina ejerce un leve efecto estimulador a 200 μM , pero a 400 μM inhibe en un 15% la actividad enzimática. La fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina, ambas en concentración de 200 μM , presentan un leve efecto inhibidor.

Cuando se adiciona ácido fosfatídico en concentración de 100 μM al medio de incubación que contiene como sustrato Ptd [2- ^3H] Ins 4,5- P_2 en presencia de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (en concentraciones de 180 y 192 μM , respectivamente) se obtiene un aumento de la actividad enzimática de un 80% sobre el control. Estos resultados se muestran en la Tabla VII.

Estos estudios se realizaron reemplazando el Ins 1,4,5- P_3 no radiactivo por fructosa 1,6-bisfosfato 10 mM para inhibir a las fosfomonoesterasas que degradan al producto. En experimentos controles se comprobó que no hay diferencias significativas entre el uso de uno o del otro en cuanto al rendimiento en [2- ^3H] Ins 1,4,5- P_3 .

Cabe señalar que al efectuarse los ensayos de fosfolipasa C utilizando Ptd [2- ^3H] Ins 4,5- P_2 como sustrato, si en el medio de incubación sólo están presentes el sustrato

TABLA VI

EFFECTO DE FOSFOLIPIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C
 DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*

(SUSTRATO : Ptd [2-³H] Ins)

ADICION	CONCENTRACION (μ M)	PRODUCTO FORMADO [2- ³ H]Ins 1-P + [2- ³ H]inositol (dpm)	% ACTIVIDAD
ninguna		7.500 \pm 80	100
(D,L)-ácido fosfatídico	200	13.800 \pm 154	184
	400	15.375 \pm 98	205
(L) - fosfatidil serina	200	8.302 \pm 122	114
	400	6.503 \pm 189	85
(L) - fosfatidil colina	200	6.750 \pm 49	92
(L) - fosfatidiletanol amina	200	6.467 \pm 125	89
(L) - fosfatidil glicerol	200	9.922 \pm 33	133

TABLA VI: EFECTO DE FOSFOLIPIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*.

(SUSTRATO: Ptd [2-³H] Ins)

119 µg de proteínas de membranas se incuban con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm) durante 10 minutos, como se indica en Materiales y Métodos, pero en presencia de diferentes fosfolípidos en las concentraciones que se indican. La concentración de Ca⁺² es 100 µM. Se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. Se colectan las fracciones en que eluyen [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] inositol y la radiactividad se cuantifica por espectrometría de centelleo líquido. La actividad se expresa como [2-³H] Ins 1-P + [2-³H] inositol (dpm) formados en 10 minutos y se asigna el 100% al control sin adición. Cada valor corresponde al promedio ± desviación estándar de los triplicados de un mismo experimento.

T A B L A VII

EFECTO DE ACIDO FOSFATIDICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C

DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*(SUSTRATO : Ptd [2-³H] Ins 4,5 - P₂)

ADICION	CONCENTRACION (μM)	PRODUCTO FORMADO [2- ³ H]Ins 1,4,5-P ₃ (dpm)	% ACTIVIDAD
ninguna	---	6.100 ± 202	100
ácido fosfatídico	50	7.930 ± 173	130
ácido fosfatídico	100	10.980 ± 326	180

119 μg de proteínas de membranas se incuban durante 2 minutos con 4,5 pmoles de Ptd [2-³H] Ins 4,5-P₂ (88000 dpm), en presencia de PtdIns 4,5-P₂ 64 μM. El medio contiene también fosfatidilserina 180 μM y fosfatidiletanolamina 192 μM, como se indica en Materiales y Métodos, y el ácido fosfatídico se adiciona previo a la sonicación. Además el medio contiene fructosa 1,6-bisfosfato 10 mM. La concentración de Ca⁺² es 50 μM. Luego se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en las fracciones que corresponden a [2-³H] Ins 1,4,5-P₃ se determina por espectrometría de centelleo líquido y la actividad enzimática se expresa como [2-³H] Ins 1,4,5-P₃ (dpm) formado en 2 minutos. El 100% se asigna a la actividad en ausencia de ácido fosfatídico. Cada valor corresponde al promedio ± desviación estándar de los triplicados de un mismo experimento.

radiactivo y el no radiactivo y se omite la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, la actividad enzimática disminuye al 15% de la que se obtiene en presencia de estos dos últimos fosfolípidos.

D.7. Actividad de la fosfolipasa C en presencia de hormonas y acetilcolina

La Tabla VIII muestra que la actividad de la fosfolipasa C que se encuentra en las membranas aisladas de oocitos, utilizando Ptd [2-³H] Ins como sustrato, no varía en forma significativa al ser ensayada en presencia de acetilcolina, carbamilcolina (agonista estable puesto que no es hidrolizada por la acetilcolinesterasa como lo es la acetilcolina), progesterona e insulina, GTP- γ -S y GDP- β -S. De los compuestos analizados, sólo el fluoruro presenta un efecto significativo, que corresponde a una disminución de la actividad enzimática en un 35% cuando se emplea una concentración de 10 mM.

Otras concentraciones de acetilcolina, carbamilcolina, insulina y progesterona, aparte de las que se muestran en la Tabla VIII, fueron también ensayadas: no se obtuvo ningún efecto a 10 ni 40 μ M, en ausencia o presencia de GTP- γ -S 10 o 100 μ M.

En experimentos controles, utilizando la misma preparación de membranas, se puede apreciar que la adenililciclase presenta un comportamiento normal, siendo estimulada fuertemente por GTP- γ -S y fluoruro, en tanto que la actividad es-

T A B L A VIII

ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis* EN PRESENCIA DE POSIBLES REGULADORES Y
 CONTROLES REFERENTES A ADENILILCICLASA.
 (SUSTRATO: Ptd [2-³H]Ins)

EXP.	ADICION	CONCENTRACION		PRODUCTO FORMADO	% ACTIVIDAD
		(μ M)	(mM)	[2- ³ H]Ins 1-P + [2- ³ H]inositol (dpm)	
I	ninguna	---		4.210 \pm 125	100
	GTP- γ -S	10		4.084 \pm 182	97
		100		4.125 \pm 96	98
	GDP- β -S	10		3.999 \pm 105	95
		100		4.144 \pm 122	98
	Na F		5	3.578 \pm 137	85
			10	2.736 \pm 88	65
	Acetilcolina + GTP- γ -S	20		3.494 \pm 109	83
		100		3.620 \pm 155	86
	Carbamilcolina + GTP- γ -S	20		3.557 \pm 194	88
100			4.505 \pm 141	107	
II	ninguna	---		5.097 \pm 172	100
	GTP- γ -S	100		5.250 \pm 161	103
	Progesterona + GTP- γ -S	10		4.128 \pm 282	81
		100		4.828 \pm 177	95
	Insulina + GTP- γ -S	10		5.110 \pm 237	114
100			4.893 \pm 212	96	
III	ACTIVIDAD ADENILILCICLASA			[³² P] cAMP (pmoles/mg 30 min)	
	ninguna	---		9,3 \pm 0,35	100
	GTP- γ -S	100		111,9 \pm 0,30	1.203
	GTP- γ -S + Progesterona	100		76,5 \pm 0,5	823
		5			
	NaF		10	149,3 \pm 15	1.605

TABLA VIII: ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis* EN PRESENCIA DE POSIBLES REGULADORES Y CONTROLES REFERENTES A ADENILILCICLASA.
(SUSTRATO: Ptd [2-³H] Ins)

119 µg de proteínas de membranas se incuban durante 10 minutos con 2,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins (110000 dpm), de acuerdo a las condiciones indicadas en Materiales y Métodos, pero adicionando los compuestos que se señalan en la tabla. La concentración de Ca⁺² es 50 µM. Luego se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en las fracciones que corresponden a [2-³H] Ins 1-P y [2-³H] inositol se determinan por espectrometría de centelleo líquido y la actividad enzimática se expresa como los productos formados (dpm) en 10 minutos. I y II representan 2 experimentos diferentes. III corresponde a la determinación de la actividad adenililciclase, la cual se realiza incubando las membranas en presencia de [α -³²P] ATP 0,1 mM (600 dpm/pmol) durante 30 minutos, luego de lo cual el cAMP sintetizado se aísla por una doble cromatografía en DOWEX-50 y alúmina, se cuantifica su radiactividad por espectrometría de centelleo líquido y la actividad enzimática se expresa como los pmoles de cAMP sintetizados en 30 minutos y por mg de proteínas. El 100% se asigna en cada caso a la actividad en ausencia del posible regulador. Cada valor corresponde al promedio \pm desviación estándar de los duplicados de un mismo experimento.

timulada por GTP- γ -S cae significativamente en presencia de progesterona (Jordana y col., 1981 a; Jordana y col., 1981 b; Jordana y col., 1984). Esto se muestra en la Tabla VIII.

Cabe señalar que está demostrado que la inhibición por progesterona sólo se observa cuando la enzima es activada a través del tratamiento con GTP- γ -S (Jordana y col., 1981 a), por lo cual en estos experimentos no se incluyó un control con progesterona sola.

La Tabla IX muestra a su vez que, usando como sustrato Ptd [2- 3 H] Ins 4,5-P₂, la actividad de la fosfolipasa C de las membranas aisladas no se ve afectada en forma significativa por ninguno de los siguientes compuestos ensayados: GTP- γ -S, GDP- β -S, carbamilcolina, insulina y progesterona. En cambio, el fluoruro 10 mM disminuye la actividad enzimática a la mitad.

La carbamilcolina y las hormonas progesterona e insulina se ensayaron también en concentraciones diferentes a las que se indican en la Tabla IX, no encontrándose ningún efecto a 10 μ M ni 40 μ M, en ausencia o presencia de GTP- γ -S 100 μ M.

Nuevamente, como se puede apreciar en la Tabla IX, los experimentos controles con la misma preparación de membranas muestran que la adenililciclase está activa y responde en la forma esperada a GTP- γ -S, progesterona y fluoruro (Jordana y col., 1981 a; Jordana y col., 1981 b; Jordana y col., 1984).

TABLA IX

ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus**Laevis* EN PRESENCIA DE POSIBLES REGULADORES Y

CONTROLES REFERENTES A ADENILILCICLASA.

(SUSTRATO: Ptd[2-³H]Ins 4,5-P₂)

EXP.	ADICION	CONCENTRACION		PRODUCTO FORMADO	% ACTIVIDAD
		(μ M)	(mM)	[2- ³ H]Ins 1,4,5-P ₃ (dpm)	
I	ninguna			13.431 \pm 113	100
	GTP- γ -S	100		13.362 \pm 203	99
	GDP- β -S	100		12.759 \pm 107	92
	Carbamilcolina	25		12.423 \pm 176	98
	+ GTP- γ -S	100		12.589 \pm 231	103
	Progesterona	10		13.134 \pm 231	98
	+ GTP- γ -S	100		13.028 \pm 262	103
	Insulina	10		14.774 \pm 198	110
	+ GTP- γ -S	100		13.834 \pm 262	97
	fluoruro de sodio		10	7.406 \pm 300	55
ACTIVIDAD ADENILILCICLASA				[³² P] cAMP	
				(pmoles/mg 30 min)	
II	ninguna			15,1 \pm 0,9	100
	GTP- γ -S	100		154,9 \pm 8,9	1.025
	GTP- γ -S	100		113,5 \pm 13,5	752
	+ Progesterona	5			
	fluoruro		10	237,7 \pm 3,3	1.574

TABLA IX: ACTIVIDAD DE LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis* EN PRESENCIA DE POSIBLES REGULADORES Y CONTROLES REFERENTES A ADENILILCICLASA.
(SUSTRATO: Ptd [2-³H] Ins 4,5-P₂)

119 µg de proteínas de membranas se incuban durante 2 minutos con 5,7 pmoles de Ptd [2-³H] Ins 4,5-P₂ (110000 dpm), en presencia de PtdIns 4,5-P₂ 64 µM y de Ins 1,4,5-P₃ 2 mM, de acuerdo a las condiciones indicadas en Materiales y Métodos, pero adicionando además los compuestos que se señalan en la tabla. La concentración de Ca⁺² es 25 µM. Luego se detiene la reacción, se separa la fase acuosa y se analiza por HPLC, como se indica en Materiales y Métodos. La radiactividad en las fracciones que corresponden a [2-³H] Ins 1,4,5-P₃ se determina por espectrometría de centelleo líquido y la actividad enzimática se expresa como el producto formado (dpm) en 2 minutos. I y II representan 2 experimentos diferentes. III corresponde a la determinación de la actividad adenililciclase, la cual se realiza incubando las membranas en presencia de [α-³²P] ATP 0,1 mM (600 dpm/pmol) durante 30 minutos, luego de lo cual el cAMP sintetizado se aísla por una doble cromatografía en DOWEX-50 y alúmina, se cuantifica su radiactividad por espectrometría de centelleo líquido y la actividad enzimática se expresa como los pmoles de cAMP sintetizados en 30 minutos y por mg de proteínas. El 100% de asigna en cada caso a la actividad en ausencia del posible regulador. Cada valor corresponde al promedio ± desviación estándar de lo duplicados de un mismo experimento.

DISCUSION

A.- ESTUDIOS SOBRE LAS RUTAS METABOLICAS EN QUE PARTICIPA EL FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO EN MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*

A.1. Las quinasas que catalizan la síntesis y la fosforilación del fosfatidilinositol 4-monofosfato

En estudios previos realizados en este laboratorio se estableció que la fosforilación del PtdIns de la membrana del oocito tiene como resultado la síntesis de fosfatidilinositol monofosfato, el cual es posteriormente degradado por la misma preparación de membranas que contiene a la enzima fosforilante (Carrasco y col., 1989).

El primer objetivo de esta tesis fué justamente definir las reacciones que dan cuenta de la degradación del fosfatidilinositol monofosfato en las membranas de oocito, bajo las mismas condiciones en que se estudió la síntesis de este compuesto en trabajos anteriores (Carrasco y col., 1989).

Un punto importante que los estudios previos no habían definido es si el fosfatidilinositol monofosfato generado por las membranas aisladas de oocito corresponde al PtdIns 4-P o al PtdIns 3-P. En la síntesis del primero inter-

viene una fosfatidilinositol 4-quinasa y en la del segundo una fosfatidilinositol 3-quinasa (Carpenter y Cantley, 1990). La quinasa que fosforila al PtdIns en la posición 4 del inositol participa en la vía que conduce a la síntesis del PtdIns 4,5-P₂, precursor de Ins 1,4,5-P₃ y DAG, el primero regulador de la liberación de Ca⁺² intracelular y el segundo activador de la proteína quinasa C (Berridge e Irvine, 1989).

Por su parte, la PtdIns 3-quinasa es una de las proteínas citoplasmáticas que se asocian con receptores de factores de crecimiento y el producto de algunos oncogenes, todos los cuales tienen en común el constituir proteínas con actividad tirosina quinasa (Cantley y col., 1991). En efecto, la PtdIns 3-quinasa se ha encontrado asociada a la proteína producto del oncogen src viral (pp 60^{v-src}) (Sugimoto y col., 1984), el complejo formado por el antígeno T medio del virus polioma con pp 60^{v-src} (Whitman y col., 1985; Kaplan y col., 1986), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Kaplan y col., 1987), el receptor del factor estimulador de colonias-1 (Varticovski y col., 1989), el receptor de insulina (Endemann y col., 1990; Ruderman y col., 1990) y el receptor de EGF sobreexpresado (Bjorge y col., 1990). Por esta razón y dado también que la actividad de esta enzima se encuentra aumentada en células estimuladas a proliferar, ella ha sido implicada como formando parte de un mecanismo de transducción de señales para la proliferación celular y transformación (Cantley y col., 1991). Sin embargo,

es importante señalar que el PtdIns 3-P es un constituyente normal pero muy minoritario en células que no están en proliferación y en células no transformadas (Whitman y col., 1988; Auger y col., 1989; Kucera y Rittenhouse, 1990; Cunningham y col., 1990). Cabe también considerar que el oocito de *Xenopus laevis* posee receptores para insulina, los cuales podrían estar en relación con una actividad PtdIns 3-quinasa.

La fosfatidilinositol quinasa presente en las membranas de oocitos resultó ser sensible a la inhibición por adenosina y ADP. En efecto, la reacción de fosforilación del PtdIns es inhibida en un 80% por adenosina 200 μ M y en el mismo porcentaje por ADP 1 mM. La inhibición por adenosina y ADP, de tipo competitivo con respecto al ATP, constituye una propiedad característica de las PtdIns 4-quinasas "tipo II", en tanto que las PtdIns 4-quinasas "tipo III" y las PtdIns 3-quinasas ("tipo I") no son afectadas (Whitman y col., 1987; Carpenter y Cantley, 1990).

Considerando que la o las PtdIns quinasas presentes en la membrana del oocito se comporten frente al ADP y a la adenosina en forma similar a como lo hacen todas las PtdIns quinasas estudiadas hasta la fecha, los resultados obtenidos permitirían concluir que en la membrana del oocito se encuentra mayoritariamente una PtdIns 4-quinasa, es decir, una quinasa que fosforila al PtdIns en la posición 4 del anillo inositol y, por consiguiente, el producto principal que se

obtiene como resultado de la fosforilación del PtdIns en membranas de oocitos es el PtdIns 4-P.

Para dilucidar este punto en forma definitiva se propone como trabajo futuro determinar directamente si el fosfatidilinositol monofosfato sintetizado en este sistema es el PtdIns 4-P o el PtdIns 3-P, o bien, si hay síntesis de ambos. Para realizar este estudio se dispone de las herramientas analíticas necesarias (Whitman y col., 1988). Por otra parte, sería interesante estudiar lo que sucede en oocitos tratados con insulina, comparados con oocitos no tratados, puesto que se ha descrito en otros sistemas que el tratamiento con esta hormona provoca una activación de la PtdIns 3-quinasa, probablemente relacionada con la asociación física que se establece entre la enzima y el receptor de insulina (Endermann y col., 1990; Ruderman y col., 1990).

El PtdIns 4-P generado es posteriormente metabolizado por la misma preparación de membranas y en las mismas condiciones experimentales en que es sintetizado, es decir, en presencia de Mg^{+2} y en ausencia de Ca^{+2} agregado.

Como ha quedado establecido, al utilizar $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP para fosforilar el PtdIns endógeno de la membrana, se sintetiza $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P y, si se bloquea la incorporación de ^{32}P en este compuesto diluyendo el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP con un exceso de ATP no radiactivo, se observa que la radiactividad del $[4\text{-}^{32}\text{P}]$ PtdIns 4-P se va perdiendo en el tiempo. En estas condiciones, la radiactividad que se pierde no se recupera en PtdIns 4,5- P_2

ni en liso PtdIns 4-P. Con respecto a la generación del primero de los nombrados, se sabía por estudios previos de este laboratorio que al incubar membranas de oocitos con [γ - 32 P] ATP la incorporación de marca en el bisfosfato es muy baja si se compara con la que se obtiene en el monofosfato (Carrasco y col., 1989). Ahora bien, si se analizan los antecedentes de la literatura sobre la localización subcelular de la enzima en otras células, se puede apreciar que ella ha sido encontrada tanto en membrana plasmática (Smith y Chang, 1989; Ling y col., 1989) como en citosol (Van Rooijen y col., 1985; Lundberg y col., 1986), así como también en ambos compartimientos subcelulares (Van Dongen y col., 1984; Cochet y Chambaz, 1986; Bazenet y col., 1990). Así, se procedió a estudiar la actividad de la PtdIns 4-P 5-quinasa en membranas y sobrenadante de 100000 x g de oocitos y los resultados indican que la enzima se encuentra mayoritariamente en las membranas.

La adición del sobrenadante de 100000 x g al ensayo realizado con membranas y [γ - 32 P] ATP no varía la relación entre los productos PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂, con respecto a lo que se obtiene con membranas solas, sin embargo, las actividades específicas de ambas quinasas son menores a las esperadas de acuerdo a las obtenidas con cada fracción. Se requiere de un mayor estudio para tener la explicación de este hecho puesto que, dada la complejidad de la fracción sobrenadante, existen varias posibilidades. Entre ellas, que ocurra una rápida remoción de los productos PtdIns 4-P y

PtdIns 4,5-P₂ a medida que se sintetizan en la membrana, por acción de una o más enzimas del sobrenadante, o bien, una mayor hidrólisis del [γ -³²P] ATP. También es posible la existencia en la fracción sobrenadante de uno o más inhibidores que afecten la actividad de la PtdIns 4-quinasa y de la PtdIns 4-P 5-quinasa de la membrana.

La actividad específica de la PtdIns 4-P 5-quinasa en membranas de oocitos resultó ser 10 veces menor a la de la PtdIns 4-quinasa y, si bien es cierto que la PtdIns 4-P 5-quinasa puede ser menos activa o estar en menor cantidad que la PtdIns 4-quinasa en la membrana del oocito, también pueden plantearse otras posibilidades. Una de ellas es que el PtdIns 4,5-P₂ en la membrana aislada esté siendo rápidamente removido a medida que se va formando, a través de una actividad fosfolipasa C o alguna otra reacción aún no definida. Otra es que la enzima sea activada a través de algún mecanismo que esté interrumpido en la membrana aislada debido, por ejemplo, a la pérdida de alguna molécula reguladora durante el proceso de preparación de las membranas. También es posible que la enzima sufra un proceso de proteólisis durante el fraccionamiento celular, y de aquí que sería necesario realizar un estudio comparativo usando membranas preparadas en ausencia y en presencia de inhibidores de proteasas. En contra de estas dos últimas hipótesis están los resultados obtenidos al incubar oocitos enteros con ³²P_i, puesto que en estas condiciones también el PtdIns 4,5-P₂ radiactivo se encontró en concentra-

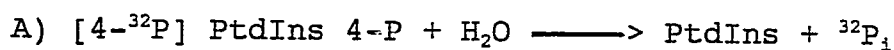
ción muy baja y menor que el PtdIns 4-P (Carrasco, 1990) lo cual parece indicar que efectivamente en el oocito la enzima se encuentra menos activa o en menor cantidad que la otra quinasa. Sin embargo, siendo la PtdIns 4-P 5-quinasa la enzima responsable de reponer el PtdIns 4,5-P₂ hidrolizado por la fosfolipasa C en la célula estimulada, es posible que su actividad sea baja en la célula no estimulada, pero que su actividad aumente, a través de un mecanismo aún no conocido, cuando el sistema de transducción de señales acoplado a la fosfolipasa C es estimulado por la unión de un ligando a un receptor de la membrana celular. Resultados experimentales recientes (Moritz y col., 1992) muestran que el ácido fosfatídico es un potente activador de la PtdIns 4-P 5-quinasa presente en membranas aisladas de cerebro de bovino, aumentando 20 veces la actividad de la enzima a una concentración de 80 μ M. Este efecto es específico puesto que no se obtiene con ningún otro fosfolípido. También se investigó si el ácido fosfatídico tiene efecto al ser generado endógenamente, para lo cual se trataron las membranas con fosfolipasa D, enzima que genera ácido fosfatídico por hidrólisis de fosfolípidos, para luego incubarlas con [γ -³²P] ATP. En estas condiciones hay un aumento de más de dos veces de la marca incorporada en PtdIns 4,5-P₂, mientras la marca que se recupera en PtdIns 4-P permanece sin variar con respecto a las membranas sin tratar.

La posible implicancia fisiológica de estos datos experimentales se discutirán más adelante, puesto que resulta-

dos de esta tesis e información de la literatura indican que el ácido fosfatídico también activa a la fosfolipasa C.

A.2. La hidrólisis del fosfatidilinositol 4-monofosfato

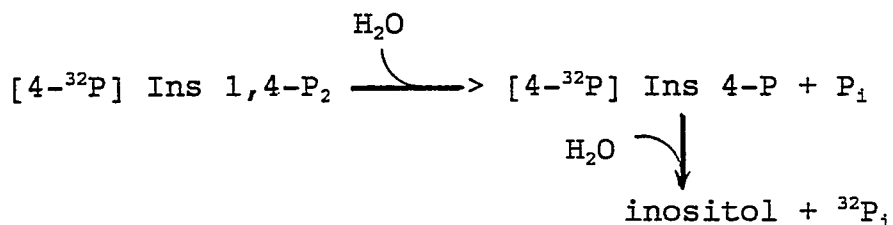
Dado que la radiactividad que se pierde del [4-³²P] PtdIns 4-P no aparece asociada a ningún otro compuesto de naturaleza lipídica detectable por cromatografía en capa fina, se concluyó que dicha pérdida debía ocurrir a través de una reacción de hidrólisis con la generación de productos hidrosolubles. Analizando esta posibilidad se observa que la pérdida del ³²P desde el [4-³²P] PtdIns 4-P puede ser explicada a través de dos reacciones hidrolíticas diferentes, una catalizada por una fosfomonoesterasa (reacción A) y la otra por una fosfolipasa C (reacción B):



Una de ellas o las dos podrían dar cuenta de la degradación del PtdIns 4-P.

Para dilucidar este punto se procedió a analizar los productos de la reacción de hidrólisis. Cuando se utilizó [4-³²P] PtdIns 4-P exógeno se obtuvo como único producto ³²P₁. Esto es indicativo de la presencia en la membrana de una fosfomonoesterasa, sin embargo, no es una evidencia concluyente puesto que se habría obtenido un resultado similar si el

[4-³²P] PtdIns 4-P hubiese sido hidrolizado por una fosfolipasa C y, a su vez, el [4-³²P] Ins 1,4-P₂ resultante se desfosforila para generar inositol libre:



Para que esta proposición fuese válida, debía darse la condición de la presencia en las membranas del oocito de fosfomonoesterasas capaces de hidrolizar al Ins 1,4-P₂ hasta inositol libre (Majerus, 1992). En los experimentos diseñados para analizar este aspecto se comprobó que efectivamente dichas enzimas están presentes en el sistema de oocitos.

La cuestión de la naturaleza de la reacción de hidrólisis que explique la degradación del [4-³²P] PtdIns 4-P fue resuelta utilizando como sustrato el Ptd [2-³H] Ins 4-P. En este caso, las dos reacciones posibles son:

- A) Ptd [2-³H] Ins 4-P + H₂O ----> Ptd [2-³H] Ins + P_i
 B) Ptd [2-³H] Ins 4-P + H₂O ----> [2-³H] Ins 1,4-P₂ + DAG

En el caso de actuar una fosfolipasa C (reacción B) y generarse [2-³H] Ins 1,4-P₂, éste sería hidrolizado por las fosfomonoesterasas de inositol fosfatos de la membrana, pero este problema se obvió agregando un exceso de Ins 1,4-P₂ no

radiactivo, el cual satura la reacción de hidrólisis y atraparía al producto radiactivo.

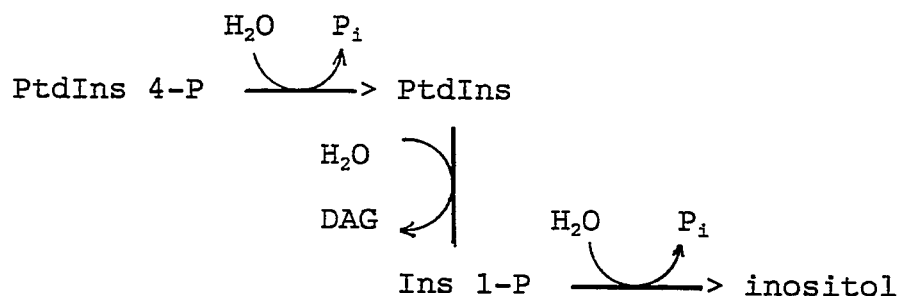
Al utilizar el sustrato tritiado se pudo comprobar que más del 80% de la radiactividad que se pierde del Ptd [2-³H] Ins 4-P se recupera en Ptd [2-³H] Ins, no apareciendo marca en otros compuestos de naturaleza lipídica como PtdIns 4,5-P₂ (el experimento se realiza en ausencia de ATP exógeno) o liso PtdIns 4-P. Estos resultados demostraron que el PtdIns 4-P es degradado preferencialmente por acción de una fosfomonoesterasa para formar PtdIns y P_i.

En estos experimentos también se genera una cantidad pequeña pero significativa de [2-³H] Ins 1,4-P₂, lo cual demostró la presencia en la membrana del oocito de una actividad fosfolipasa C capaz de hidrolizar al PtdIns 4-P. Como se verá más adelante las condiciones usadas en este ensayo, Mg⁺² 10 mM y Ca⁺² total 15 μM (determinado por espectroscopía de absorción atómica) son claramente subóptimas para esta enzima. Sin embargo, nuestro objetivo en este capítulo fue el de definir las vías responsables de la degradación del PtdIns 4-P precisamente bajo estas condiciones.

Al incubar las membranas de oocitos con Ptd [2-³H] Ins 4-P también se observó la formación de inositol monofosfato e inositol tritiados. Puesto que la transformación del [2-³H] Ins 1,4-P₂ en dichos compuestos está bloqueada por la adición de un exceso de Ins 1,4-P₂ no radiactivo, la otra posibilidad es que el inositol monofosfato se esté generando

a partir del Ptd [2-³H] Ins que proviene de la hidrólisis del Ptd [2-³H] Ins 4-P. A su vez el inositol monofosfato generaría inositol por hidrólisis. Mediante el uso de Ptd [2-³H] Ins se pudo comprobar que efectivamente este compuesto es hidrolizado por la preparación de membranas y bajo las condiciones de este ensayo para formar inositol monofosfato, lo cual demuestra la presencia en la membrana del oocito de una fosfolipasa C capaz de utilizar este fosfoinosítido como sustrato. Sin embargo, debido a las condiciones subóptimas para esta enzima, ya mencionadas, se obtiene la hidrólisis de sólo el 5% del sustrato radiactivo. De acuerdo a la estructura del PtdIns, el inositol monofosfato que se forma a partir de él debe ser el Ins 1-P.

Considerando los resultados obtenidos en el estudio de las vías de metabolización del PtdIns 4-P en membranas aisladas de oocito, se propone que este fosfolípido de inositol se degradaría mayoritariamente a través de la siguiente secuencia de reacciones, en presencia de Mg⁺² y en ausencia de Ca⁺² exógeno:



De los experimentos realizados para estudiar las reacciones que dan cuenta de la degradación del PtdIns 4-P

surgieron también datos de interés con respecto a las enzimas responsables del metabolismo de los inositol fosfatos en las membranas de oocito. Así por ejemplo, se encontraron actividades enzimáticas capaces de hidrolizar al Ins 1,4,5-P₃, al Ins 1,4-P₂ y al Ins 1-P. La actividad que hidroliza al Ins 1,4,5-P₃ debe ser, por extrapolación a lo que ocurre en otros sistemas, una inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa. La actividad que degrada al Ins 1,4-P₂ debe corresponder a la inositol polifosfato 1-fosfomonoesterasa, por antecedentes de la literatura y resultados de esta tesis al analizar el producto de la reacción. Por último, es una sola la enzima que degrada a todos los inositol monofosfatos, con excepción del Ins 2-P, y corresponde a la inositol monofosfato fosfomonoesterasa.

De los resultados obtenidos, la inositol monofosfato fosfomonoesterasa aparece como la menos activa de las tres. Sin embargo, en otros sistemas estudiados la enzima se encuentra en la fracción soluble y no asociada a membranas (Ackermann y col., 1987; Ragan y col., 1988). Por ésto sería interesante analizar la distribución subcelular de esta enzima en oocito, de modo tal de comprobar si en esta célula la enzima está exclusivamente en membranas, si está distribuída entre fracción soluble y membranas, o bien si la actividad encontrada en membranas es sólo minoritaria.

Además se demostró que esta enzima es inhibida por el Ins 1,4-P₂.

A su vez, también se obtuvieron evidencias experi-

mentales que indican que el Ins 1,4-P₂ en la membrana del oocito es hidrolizado a Ins 4-P como ocurre en todos los sistemas estudiados hasta ahora (Imai y Gershengorn, 1986; Ragan y col., 1988; Inhorn y Majerus, 1987), pero los resultados no son concluyentes porque no se dispuso de Ins 4-P tritiado que sirviera como patrón para un análisis por HPLC que diera una respuesta definitiva.

B.- PROPIEDADES DE LA FOSFOMONOESTERASA QUE CATALIZA LA HIDROLISIS DEL FOSFATIDIL INOSITOL 4-MONOFOSFATO

Como se señaló en la Introducción de esta tesis, existen escasos antecedentes en la literatura sobre fosfomonoesterasas que degraden PtdIns 4-P o PtdIns 4,5-P₂. Este tipo de enzimas ha sido descrita en varios sistemas estudiados (Harwood y Hawthorne, 1969; Schacht, 1976; Jolles y col., 1981; Marche y col., 1983; Smith y Wells, 1984; Tooke y col., 1984; Knowles y Lawrence, 1985; Schäfer y col., 1987; Claro y col., 1989; Claro y col., 1990), pero sólo la enzima de envoltura nuclear de hígado de rata ha sido objeto de un estudio sistemático (Smith y Wells, 1984).

La hidrólisis del [4-³²P] PtdIns 4-P endógeno, sintetizado a partir de [γ -³²P] ATP y PtdIns endógeno de la membrana, progresa en el tiempo hasta que se ha degradado aproximadamente un 60% del compuesto radiactivo presente originalmente. La cuantía del sustrato hidrolizado no aumenta aun cuando se continúe la incubación en el tiempo. No se tiene una

explicación definitiva para el hecho de que exista una fracción del [4-³²P] PtdIns 4-P que no se degrada. Una posibilidad es que con [γ -³²P] ATP se estén marcando dos conjuntos diferentes de PtdIns 4-P y que sólo uno de ellos esté accesible para la acción de la fosfomonoesterasa. La hipótesis de la existencia de diferentes compartimentos de fosfoinosítidos en la célula está apoyada por una serie de datos experimentales (Monaco, 1982; Monaco y Woods, 1983; Koréh y Monaco, 1986; Monaco, 1987; Inokuchi e Imboden, 1990). Otra posibilidad es que la incubación de las membranas genere inhibidores de la fosfomonoesterasa.

El estudio de las propiedades de la PtdIns 4-P fosfomonoesterasa de membranas de oocitos reveló que la hidrólisis de PtdIns 4-P catalizada por dicha enzima no requiere iones metálicos divalentes, puesto que la adición de EDTA y EGTA, así como la presencia de Mg⁺² o de Mg⁺² y Ca⁺² en forma simultánea no afectan a la reacción. Si se compara con la degradación de PtdIns 4-P catalizada por la enzima de envoltura nuclear, se encuentra que en este caso la hidrólisis es más rápida en presencia de EDTA y la reacción es inhibida por Ca⁺² y Mg⁺² (Smith y Wells, 1984). A su vez, la enzima de membrana plasmática del tumor de células β de rata es activada por Ca⁺² (Tooke y col., 1984).

Es conocido que el Li⁺ ejerce una inhibición de tipo no competitiva sobre otras fosfomonoesterasas del metabolismo de los compuestos derivados del inositol, específicamen-

te sobre la inositol polifosfato 1-fosfomonoesterasa (Inhorn y Majerus, 1987; Inhorn y Majerus, 1988; Ragan y col., 1988; Gee y col., 1988 a) y sobre la inositol monofosfato fosfomonoesterasa (Hallcher y Sherman, 1980; Gee y col., 1988 b). Por esta razón se estudió si presenta o no un efecto similar sobre la PtdIns 4-P fosfomonoesterasa, encontrándose que la adición de Li^+ al medio de incubación no modifica la hidrólisis del PtdIns 4-P.

La actividad PtdIns 4-P fosfomonoesterasa de membranas de oocitos resultó ser inhibida en un 50% por espermina 10 mM y sólo muy levemente por espermidina a la misma concentración, efectos muy parecidos a los que se obtienen con la enzima de envoltura nuclear de hepatocitos de rata, la cual es además estimulada por otra poliamina, la putrescina (Smith y Wells, 1984). Otras enzimas del metabolismo de fosfoinosítidos también son afectadas por poliaminas. Entre ellas, la PtdIns 4-quinasa de membranas plasmáticas de células A431 (Vogel y Hoppe, 1986) y la PtdIns 4-P 5-quinasa de citosol de cerebro de rata (Lundberg y col., 1986), las cuales son activadas por estas poliaminas.

Como se discutirá más adelante, en este trabajo también se encontró que tanto la espermina como la espermidina afectan a la actividad fosfolipasa C de membranas de oocitos.

Por otra parte, en estudios previos de este laboratorio se había observado que otra poliamina, la polilisisina, estimula significativamente la reacción de hidrólisis del

PtdIns 4-P catalizada por la fosfomonoesterasa (Carrasco y col., 1988). A su vez, la polilisina también afecta la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocito, como se mostró en los Resultados.

Tanto el efecto inhibitor de las poliaminas como su efecto activador han sido interpretados en términos de una interacción entre el polication y el fosfolípido cargado negativamente (Smith y Wells, 1984; Lundberg y col., 1986). Sin embargo, en el caso de los experimentos que se realizan con membranas es difícil llegar a conclusiones acerca del mecanismo molecular a través de los cuales las poliaminas y polilisina afectan la actividad de algunas enzimas. La acción del polication puede estar relacionada con un efecto sobre la estructura de la membrana misma o bien, con un efecto a nivel de la estructura de la enzima afectada, o ambos. La capacidad de la polilisina para romper membranas celulares ha sido bien documentada desde los trabajos de Quinton y Philpott (Quinton y Philpott, 1973).

La neomicina, un aminoglicósido cargado positivamente, también afecta la actividad de la fosfomonoesterasa que hidroliza al PtdIns 4-P en membranas de oocitos. Su acción es bifásica, presentando un leve efecto estimulador que es máximo a 0,2 mM (15%), pero a concentraciones mayores de 0,6 mM ejerce una inhibición, disminuyendo la actividad enzimática en un 55% a 1 mM. También en esta tesis se demostró que este antibiótico altera la actividad de la fosfolipasa C de las

membranas de oocito, presentando nuevamente un efecto bifásico.

Se sabe que la neomicina altera el metabolismo de fosfoinosítidos. La PtdIns 4-P fosfomonoesterasa de membranas de oocitos tiene un comportamiento frente a la neomicina similar al de la enzima de envoltura nuclear (Smith y Wells, 1984). En otros sistemas estudiados, la hidrólisis de PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂, catalizada por fosfomonoesterasas, es inhibida por neomicina, pero sin presentar el efecto estimulador que se observa a bajas concentraciones con la enzima de oocitos y la de envoltura nuclear (Orsulakova y col., 1976; Schacht, 1976). También el antibiótico afecta a otras enzimas del metabolismo de fosfoinosítidos, entre ellas, la PtdIns 4-quinasa de membranas de oocito, con la cual también se obtiene un efecto bifásico (Carrasco y col., 1988), la PtdIns quinasa de membranas de eritrocitos de rata (Marche y col., 1983) y tanto la PtdIns quinasa como la fosfolipasa C de fibroblastos (Carney y col., 1985). En estos tres últimos casos sólo se ha descrito un efecto inhibidor.

La neomicina se une fuertemente a PtdIns 4,5-P₂ y PtdIns 4-P, presentando una afinidad algo menor por PtdIns (Williams y Schacht, 1986), y se atribuye su efecto inhibidor a una interacción iónica entre el antibiótico y el fosfolípido. La estimulación que se logra en algunos casos a baja concentración de neomicina podría deberse a efectos del antibiótico a otro nivel, como podría ser un efecto sobre la membra-

na, sobre la enzima misma o sobre ambas.

Es interesante destacar que varios de los efectos de las poliaminas encontrados *in vitro* se logran a concentraciones de éstas que son semejantes a su concentración en las células (0,1-4 mM). Su actividad sobre el metabolismo de los fosfoinosítidos podría relacionarse con la postulación de que estas poliaminas estarían jugando un importante papel regulador en diversos aspectos del metabolismo y proliferación celular (Tabor y Tabor, 1984).

El fluoruro, ion que constituye un inhibidor de fosfomonoesterasas ácidas en general (Igarashi y Hollander, 1968), estimula la actividad fosfomonoesterásica de membranas de oocitos. En efecto, con una concentración de 5 mM se obtiene una estimulación de 50%, la cual no aumenta si se varía la concentración de fluoruro hasta 10 mM. Esta propiedad también ha sido descrita para la enzima equivalente de corteza cerebral de rata (Claro y col., 1990), mientras la PtdIns 4-P fosfomonoesterasa de retículo sarcoplasmático es inhibida por este ion (Schäfer y col., 1987). A su vez, la enzima de envoltura nuclear de hepatocitos no es afectada (Smith y Wells, 1984).

Se sabe que el fluoruro en combinación con Al^{+3} , en forma de AlF_4^- , activa a las proteínas G, involucradas en la activación de la fosfolipasa C acoplada a receptor (Hepler y Gilman, 1992), y la acción de este ion sobre la fosfomonoesterasa abre la posibilidad de que la enzima estuviese de alguna

manera también regulada por proteínas G, aún cuando no existe ningún antecedente en la literatura que apoye esta hipótesis. Sin embargo, en contra de esta idea están los datos experimentales obtenidos en esta tesis al estudiar el efecto de la acetilcolina en presencia de GTP- γ -S sobre la hidrólisis de PtdIns 4-P. Se sabe que la unión de acetilcolina a su receptor estimula a la fosfolipasa C, con la generación de Ins 1,4,5-P₃ y DAG, proceso acoplado a proteínas G y descrito en una serie de tipos celulares, entre ellos el oocito de *Xenopus laevis* (Oron y col., 1985). Sin embargo, la acetilcolina en presencia de GTP- γ -S no afecta la hidrólisis del PtdIns 4-P en las membranas aisladas.

El tartrato, otro compuesto descrito como inhibidor de fosfomonoesterasas ácidas en general (Igarashi y Hollander, 1968), también presenta un efecto activador, mientras que el fosfato, el producto de la reacción e inhibidor de fosfomonoesterasas alcalinas (Cox y col., 1967) inhibe parcialmente la hidrólisis del PtdIns 4-P. La enzima de envoltura nuclear de hepatocitos no es afectada por ninguno de estos dos inhibidores (Smith y Wells, 1984).

Para explicar el estímulo por estos dos inhibidores de fosfomonoesterasas se podría postular que la actividad de la fosfomonoesterasa es estimulada por alguna estructura fosforilada, cuya desfosforilación podría ser inhibida por fluoruro o tartrato. Obviamente que no hay evidencia experimental que avale esta idea.

El estudio del efecto de una serie de metabolitos fosforilados sobre la hidrólisis de PtdIns 4-P por la fosfomonoesterasa entregó algunos interesantes resultados. La fructosa 1,6-bisfosfato y el α -glicerol fosfato resultaron ser potentes inhibidores de la hidrólisis de PtdIns 4-P, lográndose una inhibición de 100% con concentraciones de 5 mM y 10 mM, respectivamente.

Existen antecedentes en la literatura que indican que la inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa de células de islotes pancreáticos es también fuertemente inhibida por fructosa 1,6-bisfosfato, siendo la inhibición de tipo competitivo. Sin embargo, en este caso también hay una fuerte inhibición por fructosa 2,6-bisfosfato y glucosa 1,6-bisfosfato (Rana y col., 1986), mientras que en el caso de la enzima de membranas de oocitos se obtuvo sólo una inhibición parcial con fructosa 2,6-bisfosfato (60% a 12 mM) y ningún efecto con glucosa 1,6-bisfosfato.

También en este trabajo de tesis se demostró que la fructosa 1,6-bisfosfato inhibe a las actividades enzimáticas de la membrana de oocitos que degradan al Ins 1,4,5-P₃, Ins 1,4-P₂ e Ins 1-P.

Las hexosas monofosfato ensayadas, fructosa 6-fosfato y glucosa 6-fosfato, no ejercen ningún efecto en la hidrólisis del PtdIns 4-P con membranas de oocitos. La misma reacción catalizada por la enzima de envoltura nuclear de hepatocitos tampoco es afectada por glucosa 6-fosfato (Smith

y Wells, 1984), como tampoco la actividad inositol polifosfato 5-fosfomonoesterasa de islotes pancreáticos sufre alteraciones con hexosas monofosfato (Rana y col., 1986).

Como ya se indicó, la actividad PtdIns 4-P fosfomonoesterasa de membranas de oocitos es también fuertemente inhibida por α -glicerolfosfato, mientras que el β -glicerolfosfato estimula levemente la actividad enzimática (25% a 5 mM). Ninguno de los dos afecta a la enzima de envoltura nuclear de hepatocitos (Smith y Wells, 1984).

Estudios previos de este laboratorio habían demostrado que otro intermediario fosforilado, el 2,3-bisfosfoglicerato, no afecta la hidrólisis del PtdIns 4-P en membranas de oocito (Carrasco y col., 1989), mientras que este compuesto es un inhibidor importante de la enzima que cataliza la hidrólisis de Ins 1,4,5- P_3 en islotes pancreáticos de rata (Rana y col., 1986), de membranas de eritrocitos humanos (Downes y col., 1982) y de membranas plasmáticas de hígado de rata (Seyfred y col., 1984). En los dos primeros casos se ha comprobado que se trata de una inhibición de tipo competitivo.

Por último, el fosfatidilglicerol, agregado en concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ al medio de incubación, inhibe parcialmente la degradación de PtdIns 4-P en el tiempo, mientras que el difosfatidilglicerol (cardiolipina) no tiene ningún efecto.

Teniendo en cuenta que al trabajar con membranas es difícil precisar si los efectos observados se deben a una acción a nivel de la membrana, de la enzima misma o de ambas,

un análisis de las estructuras de los intermediarios fosforilados utilizados, considerando sus propiedades estereoquímicas, indica que el efecto inhibitor de algunos de ellos podría ser consecuencia de una analogía estructural con el sustrato PtdIns 4-P, como es el caso de la fructosa 1,6-bisfosfato.

Por otra parte, tanto la progesterona como la insulina inducen la maduración meiótica del oocito, a través de vías de transducción de señales separadas pero convergentes (Smith, 1989). Como se demostró en trabajos anteriores de este laboratorio, la inducción de la maduración meiótica del oocito por cada una de estas hormonas provoca, entre otros efectos, un aumento de la incorporación de [³H] inositol en fosfoinosítidos, la cual ocurre luego de 3-6 horas del tratamiento hormonal. En el caso de la progesterona, aumenta también la formación de inositol fosfatos (Carrasco y col., 1990). Sin embargo, los mecanismos moleculares que expliquen estos resultados no se conocen. Por su parte, se sabe que la acetilcolina se une a un receptor de tipo muscarínico en la membrana del oocito acoplado a la fosfolipasa C con la generación de inositol fosfatos, y el tratamiento del oocito entero con el neurotransmisor provoca un aumento temprano de la incorporación de [³H] inositol en los fosfolípidos derivados de él, detectable ya en los primeros 10 minutos luego del tratamiento con acetilcolina.

Así, estando estas moléculas reguladoras involucradas de alguna manera en el recambio de fosfoinosítidos, funda-

mentalmente en el aumento de la incorporación de [^3H] inositol en fosfoinosítidos, se decidió estudiar si tenían o no algún efecto sobre la degradación de PtdIns 4-P por acción de la fosfomonoesterasa, por ejemplo, inhibiendo esta reacción hidrolítica. Al estudiar la hidrólisis del PtdIns 4-P en membranas de oocitos en función del tiempo, se pudo demostrar que ni acetilcolina, ensayada en presencia de GTP- γ -S, ni progesterona e insulina alteran la cinética de degradación de PtdIns 4-P en este sistema *in vitro*.

C.- EFECTO DE INTERMEDIARIOS FOSFORILADOS SOBRE LA INCORPORACION DE [^{32}P] FOSFATO EN FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO

El hallazgo que algunos metabolitos fosforilados sean inhibidores de ciertas enzimas del metabolismo de los compuestos derivados del inositol puede ser muy útil. Análogamente, el 2,3-bisfosfoglicerato ha sido ampliamente utilizado para bloquear la hidrólisis del Ins 1,4,5- P_3 (Downes y col., 1982; Seyfred y col., 1984; Rana y col., 1986) y facilitar así la detección de cambios en los niveles de este compuesto provocados por la estimulación de la fosfolipasa C (Orellana y col., 1987; Balla y col., 1987; Baukal y col., 1988) o bien para el estudio de las vías metabólicas que conducen a la biosíntesis de inositol polifosfatos, como tetrakis y pentakisfosfato (Balla y col., 1988; Balla y col., 1989 a; Balla y col., 1989 b). En forma similar, estudios en relación a la síntesis de PtdIns 4-P podrían ser facilitados por el uso

de fructosa 1,6-bisfosfato o α -glicerolfosfato para impedir su degradación.

Sin embargo, es pertinente hacer notar que estudios previos de este laboratorio demostraron que el 2,3-bisfosfoglicerato es un potente inhibidor de la PtdIns 4-quinasa de membranas de oocitos (Carrasco y col., 1989), de forma tal que durante este trabajo de tesis pareció útil disponer de información sobre posibles efectos sobre otras reacciones del metabolismo de fosfoinosítidos e inositol fosfatos de los mismos compuestos ensayados con la PtdIns 4-P fosfomonoesterasa. Así, se realizó un estudio en paralelo, analizando la incorporación de [^{32}P] fosfato en PtdIns 4-P y además, se probó el efecto de algunos intermediarios fosforilados sobre la incorporación de [^{32}P] fosfato en PtdIns 4,5- P_2 , así como también sobre las fosfomonoesterasas que hidrolizan a los inositol fosfatos.

Los estudios de la síntesis de [4- ^{32}P] PtdIns 4-P revelaron que este proceso aumenta en forma muy notoria en presencia de fructosa 1,6-bisfosfato, la cual, presente en el medio de incubación en concentración de 10 mM, triplica la incorporación de [^{32}P] fosfato en PtdIns 4-P. Este efecto es específico para la fructosa 1,6-bisfosfato puesto que ni la fructosa 2,6-bisfosfato ni la glucosa 1,6-bisfosfato ejercen una acción similar. La fructosa 2,6-bisfosfato presenta un efecto bifásico, estimulando o inhibiendo la incorporación de [^{32}P] fosfato según su concentración, mientras que la glucosa 1,6-bisfosfato disminuye la formación de [4- ^{32}P] PtdIns 4-P.

Las hexosas monofosfato fructosa 6-fosfato y glucosa 6-fosfato sólo presentan un leve efecto estimulador.

Otro intermediario fosforilado cuya presencia en el medio de incubación aumenta en forma importante la producción de [4-³²P] PtdIns 4-P es el α -glicerolfosfato, el cual a 10 mM la incrementa en un 100%. El β -glicerolfosfato también estimula, pero su efecto es menor que el de α -glicerolfosfato a las mismas concentraciones.

El fosfatidilglicerol, a su vez disminuye la fosforilación del PtdIns, mientras que el difosfatidilglicerol (cardiolipina) no afecta dicha reacción.

También la incorporación de [³²P] fosfato en PtdIns 4,5-P₂ es activada en forma importante por α y β -glicerolfosfato.

No existe ningún antecedente en la literatura sobre efectos de metabolitos fosforilados sobre las actividades de la PtdIns 4-quinasa y la PtdIns 4-P 5-quinasa, con excepción del efecto inhibitor del 2,3-bisfosfoglicerato sobre la enzima de membranas de oocitos, descrito por este laboratorio (Carrasco y col., 1989).

De estos resultados, llama la atención que los compuestos que más fuertemente estimulan la síntesis de PtdIns 4-P a partir de PtdIns, la fructosa 1,6-bisfosfato y el α -glicerolfosfato, son justamente los que resultaron ser los inhibidores más potentes de la degradación hidrolítica del PtdIns 4-P.

Es entonces importante definir si la inhibición de la degradación es capaz de dar cuenta del estímulo sobre la incorporación que fue observado. Para esto es necesario hacer algunas aproximaciones para determinar las velocidades de síntesis y degradación en la membrana. La velocidad de síntesis de PtdIns 4-P fue estimada de acuerdo a la V_{max} de la reacción, determinada previamente por Carrasco y col. (Carrasco y col., 1989) en tiempos cortos con velocidad inicial lineal. Para estimar la velocidad de degradación usando el ensayo empleado en el cual se sintetiza $[4-^{32}P]$ PtdIns 4-P y se detiene la incorporación de marca agregando un gran exceso de ATP no radiactivo, es necesario calcular la dilución isotópica que sufre el PtdIns 4-P radiactivo por el compuesto endógeno preexistente en las membranas y por el que se seguiría sintetizando a partir del ATP no radiactivo que fue agregado a tiempo cero. Estos cálculos están basados en varias presunciones; una de las más discutibles es que todo el PtdIns 4-P presente en las membranas conformaría un solo conjunto susceptible de ser degradado por la fosfomonoesterasa. Además, para los cálculos se ha supuesto que el contenido de fosfoinosítidos de las membranas de oocito es semejante al de las membranas plasmáticas de hepatocito (Schachter, D., 1988), lo cual también puede ser discutible. Así y todo, estos cálculos nos arrojan una velocidad de síntesis que sería de 62 pmoles por min y por mg de proteínas de membrana y una degradación que sería casi tres veces mayor, 176 pmoles por min y

por mg. De ser esto así, podríamos concluir que el aumento de incorporación de [^{32}P] fosfato en PtdIns 4-P observado en presencia de la fructosa 1,6-bisfosfato y con α -glicerol-fosfato podría explicarse totalmente por el efecto inhibitorio de estos compuestos sobre la hidrólisis del PtdIns 4-P, ya que estos compuestos eliminan totalmente la reacción de la fosfo-monoesterasa.

Sin embargo, el efecto de otros intermediarios fosforilados sobre la incorporación de [^{32}P] fosfato en PtdIns 4-P parece ser independiente de su efecto sobre la reacción de hidrólisis del PtdIns 4-P. Por ejemplo, el fosfatidilglicerol inhibe ambas reacciones, mientras que la glucosa 1,6-bisfosfato inhibe la reacción de formación del PtdIns 4-P pero no afecta su degradación. En estos casos, podría estar afectada la actividad de la PtdIns 4-quinasa, como consecuencia de un efecto sobre la membrana o sobre la enzima misma.

Volviendo a nuestra estimación de las velocidades de síntesis y degradación del PtdIns 4-P, parece evidente que estas velocidades calculadas para las condiciones de nuestro ensayo *in vitro* con membranas aisladas no pueden reflejar la situación *in vivo*. De otra manera no se explicaría la existencia de cantidades apreciables de PtdIns 4-P en las membranas celulares. En la célula deben existir condiciones que regulen alguna o ambas actividades, ya sea por acción sobre las enzimas pertinentes, compartimentación de sustratos o enzimas o por factores indirectos. La PtdIns 4-quinasa y la PtdIns 4-P

fosfomonoesterasa podrían constituir un ciclo fútil de utilización de ATP que probablemente está regulado *in vivo*.

D.- LA FOSFOLIPASA C DE MEMBRANAS DE OOCITOS

En el desarrollo de esta tesis se pudo comprobar que las membranas de oocitos poseen actividad fosfolipasa C capaz de hidrolizar PtdIns, PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂, con la generación de inositol mono, bis y trisfosfato, respectivamente. No se tiene información que permita decidir si se trata de una enzima o varias enzimas diferentes.

Al hacer una estimación de la actividad específica de la fosfolipasa C utilizando como sustratos PtdIns y PtdIns 4,5-P₂, tal como se indica en Resultados (secciones D.1. y D.2.) en las condiciones óptimas de concentración de Ca⁺², la enzima resulta ser aproximadamente 10 veces más activa con el bisfosfato. Estos resultados están de acuerdo con los datos de la literatura sobre la especificidad de sustrato de la fosfolipasa C de diversos orígenes (Wilson y col., 1984; Bennett y Crooke, 1987; Homma y col., 1987; Rhee y col., 1989; Rhee y Choi, 1992). Como se verá más adelante, sin embargo, la preferencia por los sustratos se revierte en ausencia de la Ca⁺².

La fosfolipasa C ha sido descrita tanto en la fracción soluble de la célula como asociada a membranas (Rebecchi y Rosen, 1987; Bennett y Crooke, 1987; Manne y Kung, 1987; Ryu y col., 1987; Taylor y Exton, 1987; Carter y Smith, 1987; Lee y col., 1987; Banno y col., 1988; Roy y col., 1991). En oocito

se encontró en membranas y en sobrenadante de 100000 x g; ensayada con Ptd [2-³H] Ins como sustrato, la actividad específica en membranas es aproximadamente el doble que en el sobrenadante de 100000 x g (datos no mostrados).

Es importante destacar que existe información en la literatura que indica que las condiciones de ensayo pueden influenciar la actividad de la fosfolipasa C y la especificidad por los sustratos y, en especial, la forma como se prepara el sustrato, en presencia de detergentes o fosfolípidos, parece tener marcada influencia (Hofmann y Majerus, 1982; Wilson y col., 1984; Taylor y Exton, 1987; Ryu y col., 1987).

La fosfolipasa C de membranas de oocitos, utilizando como sustrato PtdIns, presenta actividad enzimática en ausencia de Ca⁺², la cual es estimulada en un 100% por la adición de Ca⁺² en concentración de 100 μM. A su vez, usando PtdIns 4,5-P₂ la enzima es absolutamente dependiente de Ca⁺², alcanzando la actividad máxima a una concentración de este catión de 50 μM. Esta concentración de Ca⁺² óptima para la hidrólisis de PtdIns 4,5-P₂ resulta ser mayor que para la mayoría de las fosfolipasas C descritas hasta el momento. En general, todas las fosfolipasas C específicas para fosfoinosítidos que se han estudiado necesitan Ca⁺² para su óptimo funcionamiento, siendo menor el requerimiento para la hidrólisis de PtdIns 4,5-P₂ que para la de PtdIns. En efecto, en numerosos sistemas se ha descrito máxima hidrólisis de PtdIns 4,5-P₂ a concentraciones de Ca⁺² entre 1 y 10 μM, en tanto que

usando PtdIns como sustrato se necesitan concentraciones de 1 mM o más para lograr la máxima actividad (Bennett y Crooke, 1987; Manne y Kung, 1987; Rebecchi y Rosen, 1987; Ryu y col., 1987; Nakanishi y col., 1988; Banno y col., 1988). De estos antecedentes se desprende que la fosfolipasa C de membranas de oocitos presenta un comportamiento atípico con PtdIns como sustrato, puesto que presenta actividad en ausencia de Ca^{+2} y se logra la máxima hidrólisis a 100 μM del catión.

Sin embargo, también se han descrito fosfolipasas C con las cuales la máxima hidrólisis de PtdIns 4,5- P_2 se logra a mayor concentración de Ca^{+2} , como por ejemplo, una fosfolipasa C de linfocitos de porcino cuya máxima actividad con PtdIns 4,5- P_2 se obtiene a una concentración de Ca^{+2} de 1 mM (Carter y Smith, 1987).

Cabe señalar que las concentraciones de Ca^{+2} a las que se ha hecho referencia constituyen las concentraciones a las cuales se obtiene máxima actividad, pero varias de las fosfolipasas C descritas, actuando sobre PtdIns 4,5- P_2 , presentan una actividad significativa a concentraciones de Ca^{+2} bajo 1 μM (Banno y col., 1988; Bennett y Crooke, 1987; Wilson y col., 1984; Homma y col., 1988; Ryu y col., 1987). La concentración intracelular de Ca^{+2} corresponde a 100-200 nM y en la célula la fosfolipasa C debe actuar al nivel de Ca^{+2} que existe en la célula en reposo, puesto que la hidrólisis del PtdIns 4,5- P_2 , acoplada a la estimulación de un receptor de membrana, debe ocurrir antes del aumento del Ca^{+2} intracelular

desencadenado por el Ins 1,4,5-P₃. Así, es posible que al aumentar el nivel de Ca⁺² en la célula, la fosfolipasa C utilice eficientemente como sustrato al PtdIns.

Los resultados de este trabajo mostraron también que la actividad de la fosfolipasa C de membranas de oocitos es afectada por poliaminas y neomicina, como se mencionó ya en esta Discusión.

Usando PtdIns como sustrato, tanto la espermina como la polilisina ejercen un efecto bifásico. Con la primera se logra una activación máxima del 35% a 0,5 mM y presenta un efecto inhibitor también leve a concentraciones sobre 2 mM. Por su parte, la presencia de concentraciones crecientes de polilisina en el ensayo hace que disminuya la actividad enzimática hasta llegar a un 80% de la basal a 200 µM y a concentraciones mayores el efecto se revierte, lográndose un incremento en la actividad de un 65% a 700 µM. A su vez, la espermidina solo ejerce una acción estimuladora, siendo mayor que la de la espermina, pero se logra a mayor concentración (50% a 2 mM).

Como ya se planteó en esta Discusión, no está claramente establecido el mecanismo a través del cual las poliaminas están influenciando la actividad de una serie de enzimas de membrana (ver sección B).

La neomicina también presenta un efecto bifásico, aumentando o disminuyendo la hidrólisis del PtdIns según la concentración a la cual se agrega al medio de incubación. Sin

embargo, llama la atención que el efecto activador (incremento de un 30%) sea mayor que el inhibidor (disminución de un 10%), en el rango de concentración estudiada, puesto que, como se discutió anteriormente en referencia a los efectos de este antibiótico sobre la fosfomonoesterasa que hidroliza al PtdIns 4-P, el efecto más notorio de la neomicina sobre el metabolismo de fosfoinosítidos es su carácter inhibidor que se debería a una interacción iónica entre el antibiótico, un aminoglicósido cargado positivamente y el sustrato, un fosfolípido con carga negativa.

Sin embargo, también se ha determinado que la afinidad por PtdIns es algo menor que por PtdIns 4-P y PtdIns 4,5-P₂, compuestos más fuertemente cargados negativamente (Williams y Schacht, 1986). En esto podría radicar la explicación al hecho observado de que aquellas enzimas que utilizan como sustratos PtdIns 4,5-P₂ o PtdIns 4-P son, en general, más fuertemente inhibidas por la neomicina (Orsulakova y col., 1976; Schacht, 1976; Carney y col., 1985), mientras que el efecto podría ser menor con aquellas enzimas que usan PtdIns como sustrato. Por otra parte, como ya se discutió anteriormente, el leve efecto estimulador a bajas concentraciones del antibiótico sobre la actividad de algunas enzimas de membrana, como la PtdIns 4-quinasa y la PtdIns 4-P fosfomonoesterasa tanto de membranas de oocitos como de envoltura nuclear de hepatocitos, no ha sido aún explicado, pero podría deberse a una interacción del aminoglicósido cargado con componentes de

la membrana celular o con la enzima misma.

La fosfolipasa C de membranas de oocitos resultó ser activada en forma importante (2 veces) por ácido fosfatídico, usando tanto PtdIns como PtdIns 4,5-P₂ como sustratos. El efecto sobre PtdIns se caracterizó en mayor grado y se demostró que el efecto de ácido fosfatídico es específico, no lográndose con ninguno de los otros fosfolípidos ensayados.

Este resultado es interesante puesto que existen algunos datos en la literatura sobre un efecto similar en otros sistemas : la fosfolipasa C de membranas de sinaptosomas, con PtdIns como sustrato, es fuertemente activada por ácido fosfatídico, aumentando la hidrólisis 4 veces con una concentración de 50 μ M (Qian y Drewes, 1991). A su vez, la enzima que hidroliza PtdIns 4,5-P₂ de membranas de plaquetas aumenta 17 veces su actividad cuando se ensaya en presencia de ácido fosfatídico. Ningún otro fosfolípido presenta este efecto (Jackowski y Rock, 1989).

Con estos datos experimentales, se ha postulado que podría existir un mecanismo de retroalimentación positiva regulando a la fosfolipasa C, puesto que el ácido fosfatídico se genera a partir del diacilglicerol, producto de la hidrólisis del PtdIns 4,5-P₂ (Berridge, 1987). De esta manera, se lograría un aumento en el recambio de los fosfoinosítidos y una mayor generación de los segundos mensajeros Ins 1,4,5-P₃ y DAG. Por otra parte, se ha demostrado que también la síntesis de PtdIns 4,5-P₂, catalizada por la PtdIns 4-P 5-quinasa,

es estimulada fuertemente por ácido fosfatídico (Moritz y col., 1992).

El ácido fosfatídico es también producto de la acción hidrolítica de la fosfolipasa D sobre fosfolípidos de la membrana celular y, por otra parte, existen datos experimentales que indican que la estimulación de un receptor muscarínico por carbamilcolina activa tanto a la fosfolipasa C como a la fosfolipasa D en una preparación de membranas de sinaptosomas, en presencia de GTP- γ -S (Qian y Drewes, 1991). De esta manera, se abre la posibilidad de que el producto de la acción de la fosfolipasa D, el ácido fosfatídico, esté influenciando a la fosfolipasa C, de forma tal que se estaría frente a una interconexión o diálogo entre 2 vías diferentes de transducción de señales extracelulares. Se ha postulado que la activación de la fosfolipasa D podría constituir un evento que preceda y tal vez desencadene la activación de la fosfolipasa C, sin embargo, si bien esto podría estar ocurriendo en algunos tipos celulares, existen datos experimentales que indican que la activación por un mismo estímulo de la fosfolipasa C ocurre antes que la de fosfolipasa D (Liscovitch, 1992).

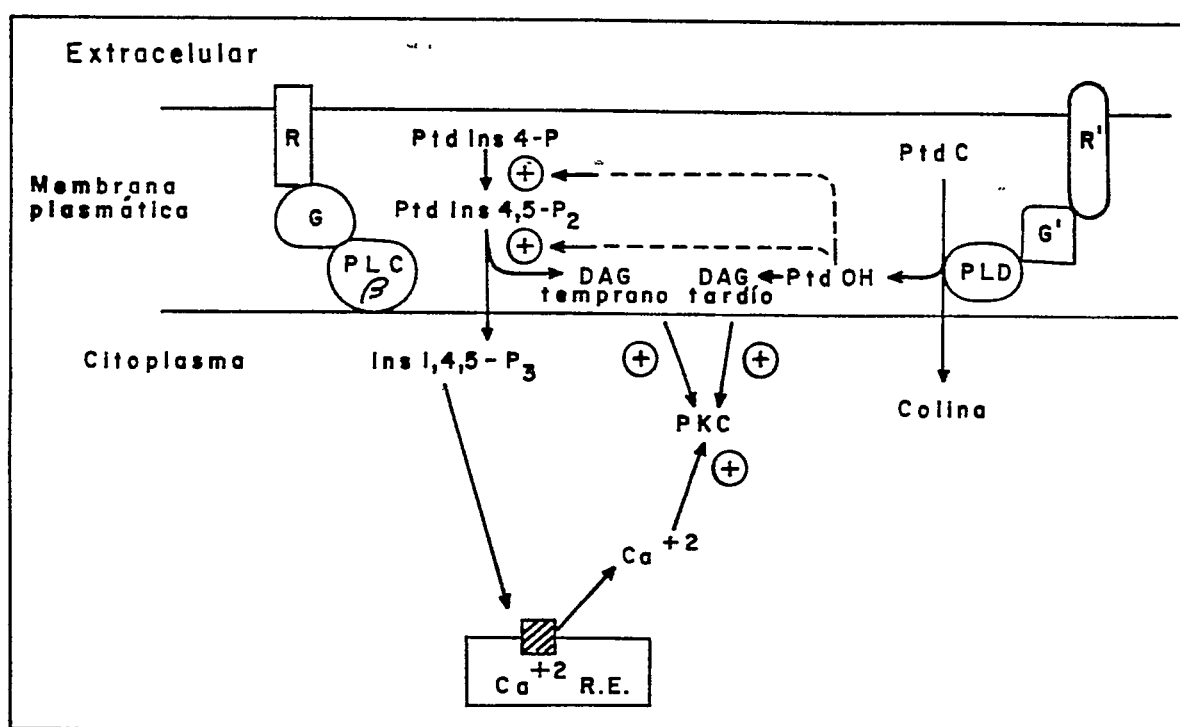
También se ha propuesto que podría existir una convergencia entre las dos vías de transducción de señales, si el producto de una vía puede transformarse en el mensajero de la otra o viceversa. Tal es el caso de DAG y ácido fosfatídico, los cuales se interconvierten por acción de la DAG

quinasa y la fosfatidato fosfohidrolasa. Así, la fosforilación del DAG, que se ha interpretado como un posible mecanismo que ponga término a su señal, podría en realidad estar representando la generación de una nueva señal a través del ácido fosfatídico. Sin embargo, no hay datos hasta el momento que apoyen esta hipótesis.

Algo similar podría estar ocurriendo por medio del proceso contrario, es decir, la desfosforilación del ácido fosfatídico para formar DAG (Liscovitch, 1992). Esto último tiene algún apoyo experimental, puesto que en algunos sistemas se ha demostrado que existe una producción tardía de DAG a partir de ácido fosfatídico, producido éste a su vez por una señal que active a la fosfolipasa D (van Blitterswijk y col., 1991 a; van Blitterswijk y col., 1991 b; Fälmann y col., 1992). También se ha demostrado que la producción de DAG a través de este mecanismo se correlaciona con una activación de la proteína quinasa C (Fälmann y col., 1992).

Como trabajo futuro, sería interesante determinar si el oocito posee una fosfolipasa D activada por señales externas, así como también realizar experimentos agregando fosfolipasa D exógena para generar ácido fosfatídico endógenamente y observar si la fosfolipasa C se activa en estas condiciones.

Un esquema tentativo que muestra posibles relaciones entre los dos sistemas de transducción de señales es el Esquema XI.



ESQUEMA XI: INTERCONEXION PROPUESTA ENTRE LAS VIAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES QUE INVOLUCRAN A LA FOSFOLIPASA C Y A LA FOSFOLIPASA D.

R y R' = receptores; G y G' = proteínas G; PLC-β = fosfolipasa C-β; PLD = fosfolipasa D; Ptd C = fosfatidil colina; DAG = diacilglicerol; PtdOH = ácido fosfatídico; PKC = proteína quinasa C; R.E. = retículo endoplásmico.

Entre los objetivos de esta tesis también estaba el estudiar posibles factores hormonales que pudieran estar regulando la actividad de algunas de las enzimas involucradas en el metabolismo de los fosfoinosítidos. Los resultados del efecto de acetilcolina, progesterona e insulina sobre la actividad de la PtdIns 4-P fosfomonoesterasa ya fueron analizados en esta Discusión (ver sección B).

Cuando las membranas aisladas de oocitos se trataron con GTP- γ -S o bien, con este mismo análogo no hidrolizable de GTP en presencia de acetilcolina o carbamilcolina, no se observó ningún efecto sobre la actividad de la fosfolipasa C, usando tanto PtdIns 4,5-P₂ como PtdIns como sustratos. A su vez, la adición de fluoruro (el cual como AlF₄⁻ activa a las proteínas G) disminuyó la hidrólisis de ambos fosfoinosítidos. Estos resultados fueron inesperados, puesto que se sabe que el oocito de *Xenopus laevis* posee receptores para acetilcolina de tipo muscarínicos (Kusano y col., 1982) y responde *in vivo* a la estimulación de dicho receptor con un aumento del Ins 1,4,5-P₃ intracelular (Oron y col., 1985). Resultados similares se obtienen con varios receptores exógenos expresados en el oocito (Gundersen y col., 1983; Sumikawa y col., 1984; Dascal y col., 1986), lo que indicaría la activación acoplada a receptor de una fosfolipasa C en esta célula.

Como ya se estableció en la Introducción de esta tesis, durante la década pasada se acumuló una gran cantidad

de información indirecta que indicaba que la activación de la fosfolipasa C por una serie de hormonas y neurotransmisores está mediada por una proteína G (González y Crews, 1985; Cockcroft y Gomperts, 1985; Harden y col., 1987; Harden y col., 1988; Litosh y col., 1985; Taylor y Exton, 1987; Orellana y col., 1987; Sommermeyer y col., 1989; Claro y col., 1989; Claro y col., 1990). En todos estos casos se observó una estimulación de la fosfolipasa C por GTP o sus análogos no hidrolizables. Está bien establecido que la unión de GTP a la subunidad α de una proteína G (trimero $\alpha\beta\gamma$) provoca la disociación de dicha subunidad y que el complejo α -GTP constituye un regulador de proteínas efectoras (Taylor, 1990). También el fluoruro, como AlF_4^- , puede interactuar con el complejo α -GDP para imitar el efecto de α -GTP (Hepler y Gilman, 1992).

Estudios realizados en los últimos dos años permiten suponer que las proteínas de la familia de las G_q serían las transductoras de la señal entre el receptor y la fosfolipasa C- β_1 . En efecto, estas proteínas purificadas son capaces de estimular a la fosfolipasa C- β_1 , en presencia de GTP- γ -S o de fluoruro (Taylor y col., 1990; Smrcka y col., 1991; Taylor y Exton, 1991; Waldo y col., 1991). A su vez, la fosfolipasa C- β_2 es activada por G_{z16} (Lee y col., 1992).

Entre los receptores que se acoplarían a fosfolipasa C- β_1 a través de las proteínas G está el receptor muscarínico (m_1) para acetilcolina (Hepler y Gilman, 1992). Los estudios en que el receptor muscarínico m_1 se coreconstituye

en vesículas lipídicas con $G_{q/11}$ y con la fosfolipasa C- β_1 , muestran que la adición de carbamilcolina y GTP- γ -S aumenta la hidrólisis del PtdIns 4,5- P_2 15 veces por sobre la basal (Berstein y col., 1992).

En muchos sistemas de membranas aisladas de diversos orígenes se ha logrado estimulación de la fosfolipasa C con GTP- γ -S u otros análogos no hidrolizables de GTP (González y Crews, 1985; Cockcroft y Gomperts, 1985; Taylor y Exton, 1987; Litosh, 1987; Orellana y col., 1987; Cockcroft y Taylor, 1987; Harden y col., 1988; Claro y col., 1989; Claro y col., 1990). En varios de estos casos también se ha comprobado el efecto activador del fluoruro (Litosh, 1987; Cockcroft y Taylor, 1987; Harden y col., 1987; Claro y col., 1990). Estos resultados contrastan con los resultados negativos encontrados con las membranas aisladas de *Xenopus laevis*.

También se ha estudiado en sistemas de membranas aisladas el efecto de carbamilcolina en presencia de GTP- γ -S, encontrándose un aumento de la actividad de la fosfolipasa C, el cual es significativamente mayor que con GTP- γ -S sólo. Esto se observó tanto con PtdIns 4,5- P_2 como con PtdIns como sustratos (Claro y col., 1989; Claro y col., 1990), y también en membranas premarcadas con [3 H] inositol (Orellana y col., 1987). En el caso de las membranas de oocitos no se obtuvo efecto de acetilcolina ni carbamilcolina, en presencia de GTP- γ -S, con PtdIns como sustrato. Por su parte, tampoco la hidrólisis del PtdIns 4,5- P_2 se vió afectada por carbamilco-

lina en presencia del mismo análogo.

Cabe señalar que en la mayoría de los estudios citados más arriba con respecto a la estimulación de la fosfolipasa C por análogos no hidrolizables de GTP, las concentraciones utilizadas de GTP- γ -S caen entre 10 y 100 μ M, y los experimentos de esta tesis se realizaron en este mismo rango de concentración. En cambio, en los casos citados sobre los estudios del efecto de carbamilcolina se han utilizado concentraciones hasta 1 mM (Claro y col., 1990), muy superiores a las utilizadas en los ensayos con membranas de oocito, en que la máxima concentración ensayada fué 40 μ M. Es posible que para observar el efecto de acetilcolina o de carbamilcolina con las membranas de oocitos sea necesario usar concentraciones mayores a las utilizadas en esta tesis.

Los resultados de Oron y col. (Oron y col., 1985) y los de Carrasco y col. (Carrasco y col., 1990) indican que en el oocito entero la acetilcolina promueve un aumento de la producción de Ins 1,4,5- P_3 . En el primer caso, el efecto se logró con una concentración de 100 μ M y en el segundo con una de 10 μ M.

Con respecto a los estudios realizados con las membranas aisladas de oocito, los ensayos con GTP- γ -S y acetilcolina o carbamilcolina se efectuaron a una concentración de Ca^{+2} correspondiente a la mitad de la óptima, es decir, 50 μ M para PtdIns y 25 μ M para PtdIns 4,5- P_2 . Sería interesante repetir estos experimentos a menores concentraciones de Ca^{+2} .

Por otra parte, es posible que en las vesículas obtenidas al preparar las membranas, los receptores muscarínicos no queden accesibles a la acetilcolina o a la carbamilcolina, lo cual podría suceder si en un porcentaje importante de las vesículas el lado intracelular quedara hacia el interior.

Existen algunos datos experimentales sobre la participación de proteínas G en la transducción de la señal de acetilcolina y otros agonistas en el oocito. Dascal y colaboradores (Dascal y col., 1986) encontraron que la microinyección de GTP- γ -S en el oocito imita la respuesta de acetilcolina y de serotonina, y el tratamiento del oocito con toxina de *Bordetella pertussis*, la cual ADP ribosila a G_i y G_o bloqueando sus efectos (Hepler y Gilman, 1992), disminuye a la mitad la respuesta a dichos agonistas. Estos resultados fueron confirmados por Nomura y colaboradores (Nomura y col., 1987), los cuales demostraron además que la microinyección de GDP- β -S disminuye en forma importante la respuesta ante la estimulación con serotonina o acetilcolina.

Por su parte, la expresión en el oocito de los mRNA de cerebro para G_i y G_o aumenta significativamente la respuesta ante el GTP- γ -S microinyectado, el cual, como ya se mencionó, imita la respuesta a acetilcolina y serotonina (Kaneko y col., 1987).

A su vez, los trabajos del grupo de Iyengar mostraron que la microinyección de las subunidades $\beta\gamma$ de las

proteínas G conducía a una atenuación de la estimulación de la corriente de Cl^- producida por acetilcolina, lo cual fué interpretado como debido al secuestro de una subunidad α activadora de la fosfolipasa C. También en estos estudios el tratamiento del oocito con toxina de *Bordetella pertussis* provocó un desacoplamiento del receptor muscarínico de la estimulación de la corriente de Cl^- (Moriarty y col., 1988).

Los resultados con la toxina de *Bordetella pertussis* sugirieron que una proteína G_o estaría involucrada en la activación de la fosfolipasa C de oocitos. El mismo grupo anterior realizó experimentos en los cuales microinyectaron la subunidad α_o activada con GTP- γ -S, logrando una corriente de Cl^- , con movilización de Ca^{+2} intracelular. A su vez, la microinyección del trímero G_o aumentó la corriente de Cl^- estimulada por la unión del agonista al receptor muscarínico, en tanto que la microinyección de las subunidades α_{11} , α_{12} y α_{13} , así como también la de los trímeros correspondientes no tuvieron ningún efecto (Moriarty y col., 1990). También la microinyección de la subunidad α_{o1} recombinante aumentó la estimulación muscarínica de la corriente de Cl^- mediada por Ins 1,4,5- P_3 (Padrell y col., 1991).

A la luz del conocimiento actual sobre la identidad de las proteínas G que estarían activando a la fosfolipasa C- β , las cuales serían de la familia G_q (ver Introducción), es difícil interpretar los resultados del grupo de Iyengar. Es posible que las proteínas G y las subunidades α utilizadas en

dichos estudios hayan estado contaminadas con G_q o G_{11} o alguna otra proteína de esta familia, posibilidad que los autores han descartado (Padrell y col., 1991). También cabe la posibilidad que efectivamente la fosfolipasa C- β de la membrana del oocito pueda estar interactuando con proteínas G diferentes a las de la familia G_q .

Hasta la fecha se han clonado dos subtipos de α_s , dos subtipos de α_i y un subtipo de α_o , desde una genoteca de cDNA de oocitos de *Xenopus laevis* (Olate y col., 1989; Olate y col., 1990).

También es importante destacar que, como se planteó en la Introducción, no todas las fosfolipasas C conocidas son reguladas por proteínas G. Se sabe que las proteínas $G_{q/11}$, las cuales regulan a la fosfolipasa C- β_1 , no estimulan a las fosfolipasas C- γ ni C- δ (Taylor y col., 1991). Ahora bien, si en las membranas del oocito las fosfolipasas C más abundantes fueran isoenzimas no reguladas por proteínas G o receptores, podrían enmascarar la actividad regulada por el receptor muscarínico. En efecto y como se estableció en la Introducción de esta tesis, la fosfolipasa C- γ_1 estaría participando en un mecanismo de transducción de señales que involucra a los receptores con actividad tirosina quinasa de algunos factores de crecimiento (Rhee y Choi, 1992). A su vez, para la fosfolipasa C- δ no se ha descrito hasta ahora ningún receptor ni proteína transductora de señales, ni algún otro mecanismo que esté regulando su actividad (Rhee y Choi, 1992).

Por otra parte, la actividad fosfolipasa C acoplada al receptor de acetilcolina podría perderse o inactivarse selectivamente durante la preparación de membranas.

Cabe señalar que los controles efectuados determinando la actividad de la adenililciclase en las membranas aisladas de oocitos demostraron que esta enzima se encontraba funcionalmente intacta en la preparación, respondiendo a la estimulación con fluoruro y con GTP- γ -S, y a la inhibición con progesterona de la activación con GTP- γ -S, de una manera similar a la descrita (Jordana y col., 1981 a; Jordana y col., 1981 b; Jordana y col., 1982; Jordana y col., 1984). Esto indica que en la preparación de membranas las proteínas G involucradas en la activación de la adenililciclase están presentes y son funcionales.

En cuanto a las posibles acciones de la progesterona y de la insulina, ninguna de estas dos hormonas tuvo efecto sobre la hidrólisis de PtdIns ni de PtdIns 4,5-P₂ con la preparación de membranas de oocitos.

Se probó progesterona en este sistema porque la incorporación de [³H] inositol en fosfolípidos, así como también la generación de inositol fosfatos, aumenta durante la maduración meiótica del oocito luego de 3-6 horas del tratamiento con la hormona (Carrasco y col., 1990). El mecanismo a través del cual la progesterona produce este efecto no se conoce, pero sería indirecto ya que requiere de la síntesis de proteínas. Los resultados negativos obtenidos, por lo tanto,

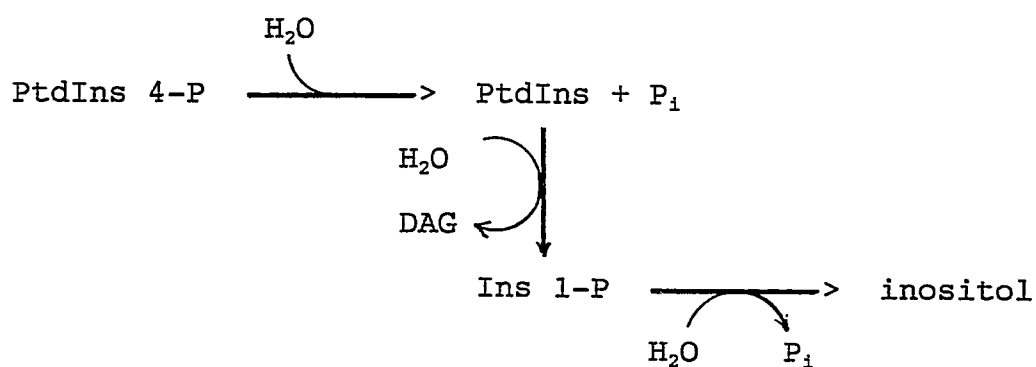
no son sorprendentes pues indicarían que no sería la fosfolipasa C un blanco directo de la acción de la progesterona. De la misma manera, el efecto de insulina sobre el recambio de fosfoinosítidos también debe ser indirecto, puesto que, al igual como sucede con la progesterona, su acción se evidencia varias horas después del tratamiento con la hormona y es bloqueado por inhibidores de la síntesis proteica.

Como trabajo a futuro, se sugiere un estudio más detallado de la fosfolipasa C del oocito. Por una parte, es importante lograr una caracterización más completa de la enzima, para lo cual es necesaria su purificación. Por otra parte, el clonamiento y la expresión de la fosfolipasa C- β , de las proteínas G (de las cuales ya se han clonado especies de α_o , α_s y α_i) y del receptor muscarínico del oocito, permitiría disponer de todos los componentes purificados para realizar con ellos estudios de reconstitución del sistema y avanzar así en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la transducción de señales externas en el oocito.

CONCLUSIONES

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

- 1.- Se ha podido establecer la vía metabólica que es responsable de la degradación mayoritaria del fosfatidilinositol 4-monofosfato en membranas aisladas de oocito de *Xenopus laevis*, en presencia de Mg^{+2} y ausencia de Ca^{+2} agregado, proponiéndose la siguiente ruta:



- 2.- Como consecuencia del estudio anterior, se ha identificado la presencia de las siguientes actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de fosfoinosítidos

e inositol fosfatos en las membranas aisladas de oocito:

- A) Una fosfomonoesterasa que cataliza la hidrólisis del PtdIns 4-P con la formación de PtdIns y P_i . Esta enzima es la responsable en forma mayoritaria de la degradación observada del PtdIns 4-P sintetizado con membranas aisladas de oocito a partir de PtdIns endógeno.

En el estudio realizado para determinar las propiedades de esta enzima y posibles factores hormonales o metabolitos que modifiquen su actividad, se encontró que la fructosa 1,6-bisfosfato y el α -glicerolfosfato son potentes inhibidores de la actividad enzimática, mientras que el P_i , la espermina y la espermidina ejercen también diferentes grados de inhibición.

La enzima es activada o inhibida por neomicina según su concentración y lo mismo ocurre con flurouro. A su vez, acetilcolina, progesterona e insulina no afectan la hidrólisis de PtdIns 4-P.

- B) Una actividad fosfolipasa C que hidroliza a PtdIns, PtdIns 4-P y PtdIns 4,5- P_2 , con la generación de Ins 1-P, Ins 1,4- P_2 e Ins 1,4,5- P_3 , respectivamente. La actividad con PtdIns como sustrato presenta la propiedad atípica de hidrolizar a este fosfolípido en ausencia de Ca^{+2} , presentando su

máxima actividad a Ca^{+2} 100 μM .

Es afectada por espermina, polilisina y neomicina, las cuales la inhiben o estimulan según sus concentraciones, mientras que la espermidina la estimula sin presentar efecto inhibitor.

La actividad que hidroliza al PtdIns no es afectada por acetilcolina, carbamilcolina, progesterona, insulina ni GTP- γ -S en las condiciones ensayadas. A su vez el ácido fosfatídico la estimula en forma importante, lo cual apoya la hipótesis recientemente enunciada, que postula una interconexión o diálogo entre los mecanismos de transducción de señales a través de la fosfolipasa C y de la fosfolipasa D.

Con PtdIns 4,5- P_2 como sustrato, la enzima es absolutamente dependiente de Ca^{+2} . Esta actividad es también estimulada por ácido fosfatídico y no es afectada por carbamilcolina, progesterona, insulina ni GTP- γ -S en las condiciones utilizadas.

- C) Fosfomonoesterasas que hidrolizan Ins 1,4,5- P_3 , Ins 1,4- P_2 e Ins 1-P hasta inositol y fosfato inorgánico.

El trabajo realizado en esta tesis ha dado origen a las siguientes publicaciones:

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

2.- Jacob, G., Allende, C. C. y Allende, J. E. (1991). The hydrolysis of phosphatidylinositol 4-phosphate in membranes of *Xenopus laevis* oocytes: characteristics of a phosphomonoesterase. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 B: 809-816.

3.- Jacob, G., Allende, C. C. y Allende, J. E. (1993). Characteristics of phospholipase C present in membranes of *Xenopus laevis* oocytes. Stimulation by phosphatidic acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, en prensa.

BIBLIOGRAFIA

- Ackermann, K.E., Gish, B.G., Honchar, M.P. y Sherman, W.R. (1987). Evidences that inositol 1-phosphate in brain of lithium-treated rats results mainly from phosphatidylinositol metabolism. *Biochem J.* 242: 517-524.
- 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.
- Antonelli, M., Olate, J., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1991). Polylysine activates membrane-bound adenylyl cyclase from *Xenopus laevis* oocytes through the G_s transducing protein. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B: 827-832.
- 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 cell. *Cell* 57: 167-175.
- Balla, T., Guillemette, G., Baukal, A.J. y Catt, K.J. (1987). Metabolism of inositol 1,3,4-trisphosphate to a new tetrakisphosphate isomer in angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 262: 9952-9955.
- Balla, T., Baukal, A.J., Guillemette, G. y Catt, K.J. (1988). Multiple pathways of inositol polyphosphate metabolism in angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 263: 4083-4091.
- Balla, T., Hunyady, L., Baukal, A.J. y Catt, K.J. (1989 a). Structures and metabolism of inositol tetrakisphosphate and pentakisphosphate in bovine adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 264: 9386-9390.
- Balla, T., Baukal, A.J., Hunyady, L. y Catt, K.J. (1989 b). Agonist-induced regulation of inositol tetrakisphosphate isomers and inositol pentakisphosphate in adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 264: 13605-13611.

- Banno, Y., Yada, Y. y Nozawa, Y. (1988). Purification and characterization of membrane-bound phospholipase C specific for phosphoinositides from human platelets. *J. Biol. Chem.* 23: 11459-11465.
- Barnard, E.A. (1992). Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem. Sci.* 17: 368-374.
- Baukal, A.J., Balla, T., Hunyady, L., Hausdorff, W., Guillemette, G. y Catt, K.J. (1988). Angiotensin II and guanine nucleotides stimulate formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and its metabolites in permeabilized adrenal glomerulosa cells. *J. Biol. Chem.* 263: 6087-6092.
- Bazenet, C.E., Ruiz Ruano, A., Brockman, J.L. y Anderson, R.A. (1990). The human erythrocyte contains two forms of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase which are differentially active toward membranes. *J. Biol. Chem.* 265: 18012-18022.
- Belunis, C.J., Bae-Lee, M., Kelly, M.J. y Carman, G.M. (1988). Purification and characterization of phosphatidylinositol kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 18897-18903.
- Bennett, 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. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360.
- Berridge, M.J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 159-193.
- Berridge, M.J. (1990). Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 265: 9583-9586.
- Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205.
- Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, C.P., Heslop, J.P. e Irvine, R.F. (1983). Changes in the levels 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.

- Bernstein, G., Blank, J.L., Smrcka, A.V., Higashijima, T., Sternweis, P.C., Exton, J.H. y Ross, E.M. (1992). Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis using purified m_1 muscarinic receptor, $G_{q/11}$ and phospholipase C- β_1 . J. Biol. Chem. 267: 8081-8088.
- Billah, M.M. y Lapetina, E.G. (1982). Rapid decrease of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in thrombin-stimulated platelets. J. Biol. Chem. 257: 12705-12708.
- Birchmeier, C., Broek, D. y Wigler, M. (1985). RAS proteins can induce meiosis in *Xenopus* oocytes. Cell 43: 615-621.
- Bjorge, J.D., Chan, T-O., Antczak, M., Kung, H-J. y Fujita, D.J. (1990). Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3816-3820.
- Blank, J.L., Ross, A.H. y Exton, J.H. (1991). Purification and characterization of two G-proteins that activate the β_1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. J. Biol. Chem. 266: 18206-18216.
- Bojanic, D. y Fain, J.N. (1986). Guanine nucleotide regulation of [3 H] vasopressin binding to liver membranes and solubilised receptor: evidence for the involvement of a guanine nucleotide regulatory protein. Biochem. J. 240: 361-365.
- Boon, A., Beresford, B. y Mellors, A. (1985). A tumor promoter enhances the phosphorylation of polyphosphoinositides while decreasing phosphatidylinositol labelling in lymphocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 129: 431-438.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method 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.C., y Allende, J.E. (1978). Amphibian oocyte maturation and protein synthesis: related inhibition by cyclic AMP, theophylline and papaverine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1242-1246.
- Burzio, L.O. y Koide, S.S. (1977). Stimulation of poly (adenosin diphosphate ribose) synthase activity of *Xenopus* germinal vesicle by progesterone. Ann. N.Y. Acad. Sci. 286: 398-407.

- Caldwell, K.K., Lips, D.L., Bansal, V.S. y Majerus, P.W. (1991). Isolation and characterization of two 3-phosphatases that hydrolyze both phosphatidylinositol 3-phosphate and inositol 1,3-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 266: 18378-18386.

- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. y Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64: 281-302.

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

- Carpenter, C.L. y Cantley, L.C. (1990). Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* 29: 11147-11156.

- Carrasco, D. (1990). Estudios sobre fosfatidilinositol quinasas y sobre la incorporación de inositol a fosfatidilinositoides en oocitos de *Xenopus laevis* tratados con hormonas. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- 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, D., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1989). Factors that regulate the activity of the phosphatidylinositol kinase present in oocyte membranes of *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 487-491.

- Carrasco, D., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1990). The incorporation of myo-inositol into phosphatidylinositol derivatives is stimulated during hormone-induced meiotic maturation of amphibian oocytes. *Exp. Cell. Res.* 191: 313-318.

- Carter, H.R. y Smith, A.D. (1987). Resolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C isolated from porcine lymphocytes into multiple species. *Biochem. J.* 244: 639-645.

- Chahwala, S.B., Fleischman, L.F. y Cantley, L.C. (1987). Kinetic analysis of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) effects on phosphatidylinositol turnover in NRK cell homogenates. *Biochemistry* 26: 612-622.

- 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.
- Claro, E., Wallace, M.A., Lee, H-M. y Fain, J.N. (1989). Carbachol in the presence of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) stimulates the breakdown of exogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol by rat brain membranes. *J. Biol. Chem.* 264: 18288-18295.
- Claro, E., Wallace, M.A. y Fain, J.N. (1990). Dual effect of fluoride on phosphoinositide metabolism in rat brain cortex. *Biochem. J.* 268: 733-737.
- Coats, W.D. y Navarro, J. (1990). Functional reconstitution of fmet-leu-phe receptor in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 5964-5966.
- 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. y Gomperts, B.D. (1985). Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* 314: 534-536.
- Cockcroft, S. y Taylor, J.A. (1987). Fluoroaluminates mimic guanosine 5'-[γ -thio] triphosphate in activating the polyphosphoinositide phosphodiesterase of hepatocyte membranes. *Biochem. J.* 241: 409-414.
- Connolly, T.M., Lawing, W.J.Jr. y Majerus, P.W. (1986). Protein kinase C phosphorylates human platelet inositol trisphosphate 5'-phosphomonoesterase, increasing the phosphatase activity. *Cell* 46: 951-958.
- Cox, R.P., Gilbert, P. y Griffin, M.J. (1967). Alkaline inorganic pyrophosphatase activity of mammalian cell alkaline phosphatase. *Biochem. J.* 105: 155-161.
- Cunningham, T.W. y Majerus, P.W. (1991). Pathway for the formation of D-3 phosphate containing inositol phospholipids in PDGF stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 568-576.
- Cunningham, T.W., Lips, D.L., Bansal, V.S., Caldwell, K.K., Mitchell, C.A. y Majerus, P.W. (1990). Pathway for the formation of D-3 phosphate containing inositol phospholipids in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* 265: 21676-21683.

- 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 injected with rat brain messenger RNA. *Mol. Brain Res.* 1: 201-209.
- Dean, N.M. y Moyer, J.D. (1988). Metabolism of inositol bis-tris-, tetrakis- and pentakis-phosphates in GH₃ cells. *Biochem. J.* 250: 493-500.
- 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.
- 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.
- Diehl, R.E., Whiting, P., Potter, J., Gee, N., Ragan, C.I., Linemeyer, D., Schoepfer, R., Bennett, C. y Dixon, R.A.F. (1990). Cloning and expression of bovine brain inositol monophosphatase. *J. Biol. Chem.* 265: 5946-5949.
- Dillon, S.B., Murray, J.J., Verghese, M.W. y Snyderman, R. (1987). Regulation of inositol phosphate metabolism in chemoattractant-stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 262: 11546-11552.
- Divechea, N., Banfić, M. e Irvine, R.F. (1991). The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-1) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J.* 10: 3207-3214.
- Doctrow, S.R. y Lowenstein, J. (1985). Adenosine and 5'-chloro-5'-deoxyadenosine inhibit the phosphorylation of phosphatidylinositol and myosin light chain in calf aorta smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 260: 3469-3476.
- Downes, C.P. (1989). The cellular functions of myo-inositol. *Biochemical Society Transactions* 17: 259-268.
- Downes, C.P. y Wusterman, M.M. (1983). Breakdown of polyphosphoinositides and not phosphatidylinositol accounts for muscarinic agonist-stimulated inositol phospholipid metabolism in rat parotid glands. *Biochem. J.* 216: 633-640.

- 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.
- Endemann, G., Dunn, S.N. y Cantley, L.C. (1987). Bovine brain contains two types of phosphatidylinositol kinase. *Biochemistry* 26: 6845-6852.
- Endemann, G., Yonezawa, K., y Roth, R.A. (1990). Phosphatidylinositol kinase or an associated protein is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 265: 396-400.
- Fain, J.N., Wallace, M.A., Wojcikiewicz, R.J.H. (1988). Evidences for involvement of guanine nucleotide-binding regulatory proteins in the activation of phospholipases by hormones. *FASEB J.* 2: 2569-2571.
- Fällmann, M., Gullberg, M., Hellberg, C. y Anderson, T. (1992). Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 267: 2656-2663.
- Ferris, C.D., Higanir, R.L., Supattapone, S. y Snyder, S.H. (1989). Purified inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mediates calcium flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature* 342: 87-89.
- Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Slatkine, S., Hanoune, J. y Baulieu, E-E. (1981). Progesterone inhibits membrane-bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 292: 255-257.
- 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.
- Gee, N.S., Reid, G.G., Jackson, R.G., Barnaby, R.J. y Ragan, C.I. (1988 a). Purification and properties of inositol-1,4-bisphosphatase from bovine brain. *Biochem. J.* 253: 777-782.

- Gee, N.S., Ragan, C.I., Watling, K.J., Aspley, S., Jackson, R.G., Reid, G.G., Gani, D. y Shute, J.K. (1988 b). The purification and properties of myo-inositol monophosphatase from bovine brain. *Biochem. J.* 249: 883-889.
- Gillo, B., Lass, Y., Nadler, E. 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.* 392: 349-361.
- Goldstein, D. A. (1979). Calculation of the concentrations of free cations and cation-ligand complexes in solutions containing multiple divalent cations and ligands. *Biophys. J.* 26: 235-242.
- González, R.A. y Crews, F.T. (1985). Guanine nucleotides stimulate production of inositol trisphosphate in rat cortical membranes. *Biochem. J.* 232: 799-804.
- Griendling, K.K., Taubman, M.B., Akers, M., Mendlowitz, M. y Alexander, R.W. (1991). Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 266: 15498-15504.
- Graziani, A., Ling, L.E., Endemann, G., Carpenter, C.L. y Cantley, L.C. (1992). Purification and characterization of human erythrocyte phosphatidylinositol 4-kinase. *Biochem. J.* 284: 39-45.
- 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.
- 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.
- Hallcher, L.M. y Sherman, W.R. (1980). The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255: 10896-10901
- Hansen, C.A., Johanson, R.A., Williamson, M.T. y Williamson, J.R. (1987). Purification and characterization of two types of soluble inositol phosphate 5-phosphomonoesterase from rat brain. *J. Biol. Chem.* 262: 17319-17326.
- 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.

- Harden, T.K., Hawkins, P.T., Stephens, L., Boyer, J.L. y Downes, C.P. (1988). Phosphoinositide hydrolysis by guanosine 5' [γ -thio] triphosphate-activated phospholipase C of turkey erythrocyte membranes. *Biochem. J.* 252: 583-593.
- Harwood, J.L. y Hawthorne, J.N. (1969). Metabolism of the phosphoinositides in guinea-pig brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 16: 1377-1387.
- Hepler, J.R. y Gilman, A.G. (1992). G-proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17: 383-387.
- Hirono, C., Ito, I. y Sugiyama, H. (1987). Neurotensin and acetylcholine evoke common responses in frog oocytes injected with rat brain messenger ribonucleic acid. *J. Physiol.* 382: 523-535.
- Hofmann, S.L. y Majerus, P.W. (1982). Identification and properties of two distinct phosphatidylinositol-specific phospholipase C enzymes from sheep seminal vesicular glands. *J. Biol. Chem.* 257: 6461-6469.
- Holland, K.M., Homann, M.J., Belunis, C.J. y Carman, G.M. (1988). Regulation of phosphatidylinositol kinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170: 828-833.
- Homma, Y., Imaki, J., Nakanishi, O. y Takenawa, T. (1988). Isolation and characterization of two different forms of inositol phospholipid-specific phospholipase C from rat brain. *J. Biol. Chem.* 263: 6592-6598.
- Hughes, A.R. y Putney, J.W.Jr. (1989). Source of ^3H -labeled inositol bis- and monophosphates in agonist-activated rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* 264: 9400-9407.
- Igarashi, M. y Hollander, V.P. (1968). Acid phosphatase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 243: 6084-6089.
- Imai, A. y Gershengorn, M.C. (1986). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate turnover is transient while phosphatidylinositol turnover is persistent in thyrotropin releasing hormone-stimulated rat pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8540-8544.
- 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.

- Inhorn, R.C. y Majerus, P.W. (1987). Inositol polyphosphate 1-phosphatase from calf brain. *J. Biol. Chem.* 262: 15946-15952.
- Inhorn, R.C. y Majerus, P.W. (1988). Properties of inositol polyphosphate 1-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 263: 14559-14565.
- Inhorn, R.C., Bansal, V.S. y Majerus, P.W. (1987). Pathway for inositol 1,3,4-trisphosphate and 1,4-bisphosphate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2170-2174.
- Inokuchi, S. e Imboden, J. (1990). Antigen receptor-mediated regulation of sustained polyphosphoinositide turnover in a human T cell line. *J. Biol. Chem.* 265: 5983-5989.
- Irvine, R.F., Änggard, E.E., Letcher, A.J. y Downes, C.P. (1985). Metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate 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 Ins (1,4,5) P₃ 3-kinase activity in animal tissues. *Nature* 320: 631-634.
- Jackowski, S. y Rock, Ch.O. (1989). Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phospholipase C activity by phosphatidic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 268: 516-524.
- Jacob, G., Allende, C. C. y Allende, J. E. (1991). The hydrolysis of phosphatidylinositol 4-phosphate in membranes of *Xenopus laevis* oocytes: characteristics of a phosphomonoesterase. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 B: 809-816.
- Jacob, G., Allende, C. C. y Allende, J. E. (1993). Characteristics of phospholipase C present in membranes of *Xenopus laevis* oocytes. Stimulation by phosphatidic acid. *Comp. Biochem. Physiol.* en prensa.
- Ji, H., Sandberg, K., Baukal, A.J. y Catt, K.J. (1989). Metabolism of inositol pentakisphosphate to inositol hexakisphosphate in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 264: 20185-20188.
- Jolles, J., Zwiers, H., Dekker, A., Wirtz, K.A. y Gispen, W.H. (1981). Corticotropin-(1-24)-tetracosapeptide affects protein phosphorylation and polyphosphoinositide metabolism in rat brain. *Biochem. J.* 194: 283-291.

- Jordana, X., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1981 a). Guanine nucleotides are required for progesterone inhibition of amphibian oocyte adenylate cyclase. *Biochem. Int.* 3: 527-532.
- Jordana, X., Otero, C., Allende, C.C., Allende, J., Flawia, M., Kornblihtt, A.R. y Torres, H.N. (1981 b). Adenylate cyclase activity in *Xenopus laevis* ovarian follicles. *Mol. Cell. Biochem.* 40: 85-91.
- Jordana, X., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1982). Differential inhibition by progesterone of the adenylate cyclase of oocytes and follicle cells of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* 143: 124-128.
- Jordana, X., Olate, J., Allende, C.C. y Allende, J.E. (1984). Studies on the mechanism of inhibition of amphibian oocyte adenylate cyclase by progesterone. *Arch. Biochem. Biophys.* 228: 379-387.
- Kano, K., Higashida, H., Inove, R. y Nozawa, Y. (1984). Bradykinine-induced rapid breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in neuroblastoma x glioma hybrid NG 108-15 cells. *J. Biol. Chem.* 259: 10201-10207.
- Kaplan, D.R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Raptis, L., Garcea, R.L., Pallas, D., Roberts, T.M., y Cantley, L. (1986). Phosphatidylinositol metabolism and polyoma-mediated transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3624-3628.
- 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.
- Kato, H., Uno, I., Ishikawa, T. y Takenawa, T. (1989). Activation of phosphatidylinositol kinase and phosphatidylinositol 4-phosphate kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 264: 3116-3121.
- Kemp, B.E. y Pearson, R.B. (1990). Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* 15: 342-346.
- Kim, H.K., Kim, J.W., Zilberstein, A., Margolis, B., Kim, J.G., Schlessinger, J. y Rhee, S.G. (1991). PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC- γ 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 65: 435-441.

- King, W.G. y Rittenhouse, S.E. (1989). Inhibition of protein kinase C by staurosporine promotes elevated accumulations of inositol trisphosphates and tetrakisphosphate in human platelets exposed to thrombin. *J. Biol. Chem.* 264: 6070-6074.
- King, C.E., Stephens, L.R., Hawkins, P.T., Guy, G.R. y Michell, R.H. (1987). Multiple metabolic pools of phosphoinositides and phosphatidate in human erythrocytes incubated in a medium that permits rapid transmembrane exchange of phosphate. *Biochem. J.* 244: 209-217.
- Knowles, A.F. y Lawrence, C.M. (1985). Enzymatic synthesis and hydrolysis of [³²P] phosphatidylinositol phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 220-225.
- Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C. y Pawson, T. (1991). SH₂ and SH₃ domains: elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins. *Science* 252: 668-674.
- Koréh, K. y Monaco, M.E. (1986). The relationship of hormone-sensitive and hormone-insensitive phosphatidylinositol to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the WRK-1 cell. *J. Biol. Chem.* 261: 88-91.
- Korn, L.J., Siebel, C.W., Mc Cormick, F. y Roth, R.A. (1987). Ras p21 as a potential mediator of insuline action in *Xenopus* oocytes. *Science* 236: 840-843.
- Kucera, G.L. y Rittenhouse, S.E. (1990). Human platelets form 3-phosphorylated phosphoinositides in response to α -thrombin, U46619 or GTP γ S. *J. Biol. Chem.* 265: 5345-5348.
- Kusano, K., Miledi, R. y Stinnakre, J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membranes. *J. Physiol.* 328: 143-170.
- Lee, K-Y., Ryu, S.H., Suh, P-G., Choi, W.C. y Rhee, S.G. (1987). Phospholipase C associated with particulate fractions of bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5540-5544.
- Lee, C.H., Park, D., Wu, D., Rhee, S.G. y Simon, M.I. (1992). Members of the G_s α subunit gene family activate phospholipase C- β isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 267: 16044-16047.
- Lewin, B. (1990). Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell* 61: 743-752.

- Li, Y-S., Porter, F.D., Hoffman, R.M. y Deuel, T.F. (1989). Separation and identification of two phosphatidylinositol 4-kinase activities in bovine uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 202-209.
- Ling, L.E., Schulz, J.T. y Cantley, L.C. (1989). Characterization and purification of membrane-associated phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 264: 5080-5088.
- Lips, D.L. y Majerus, P.W. (1989). The discovery of a 3-phosphomonoesterase that hydrolyzes phosphatidylinositol 3-phosphate in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 264: 19911-19915.
- Lips, D.L., Majerus, P.W., Gorga, F.R., Young, A.T. y Benjamin, T.L. (1989). Phosphatidylinositol 3-phosphate is present in normal and transformed fibroblasts and is resistant to hydrolysis by bovine brain phospholipase C II. *J. Biol. Chem.* 264: 8759-8763.
- Litosh, I. (1987). Guanine nucleotides and NaF stimulation of phospholipase C activity in rat cerebral-cortical membranes. *Biochem. J.* 244: 35-40.
- Litosh, I., Wallis, C. y Fain, J.N. (1985). 5-hydroxytryptamine stimulates inositol phosphate production in cell-free system from blowfly glands: evidence for a role of GTP in coupling receptor activation to phosphoinositide breakdown. *J. Biol. Chem.* 260: 5464-5471.
- Liscovitch, M. (1992). Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *Trends Biochem. Sci.* 17: 393-399.
- Lohka, M.J., Kyes, J.L. y Maller, J.L. (1987). Metaphase protein phosphorylation in *Xenopus laevis* eggs. *Mol. Cell. Biol.* 7: 760-768.
- Lundberg, G.A., Jergil, B. y Sundler, R. (1985). Subcellular localization and enzymatic properties of rat liver phosphatidylinositol-4-phosphate-kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 846: 379-387.
- Lundberg, G.A., Jergil, B. y Sundler, R. (1986). Phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from rat brain. Activation by polyamines and inhibition by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 161: 257-262.
- Majerus, P.W. (1992). Inositol phosphate biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 225-250.

- Majerus, P.W., Neufeld, E.J. y Wilson, D.B. (1984). Production of phosphoinositide-derived messengers. *Cell* 37: 701-703.
- Maller, J.L. (1985). Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Diff.* 16: 211-221.
- Maller, J.L. 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: 1712-1718.
- Manne, V. y Kung, H-F. (1987). Characterization of phosphoinositide-specific phospholipase C from human platelets. *Biochem. J.* 243: 763-771.
- Marche, P., Koutouzov, S. y Girard, A. (1983). Impairment of membrane phosphoinositide metabolism by aminoglycoside antibiotics: streptomycin, amikacin, kanamycin, dibekacin, gentamycin and neomycin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227: 415-420.
- Martell, A. E. y Smith, R. M. (1974). Critical stability constants. Vol 1, Plenum Press, New York.
- McIntosh, R.P. y Catt, K.J. (1987). Coupling of inositol phospholipid hydrolysis to peptide hormone receptors expressed from adrenal and pituitary mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9045-9048.
- Molina y Vedia, L.M. y Lapetina, E.G. (1986). Phorbol 12,13-dibutyrate and 1-oleyl-2-acetyldiacylglycerol stimulate inositol trisphosphate dephosphorylation in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261: 10493-10495.
- Monaco, M.E. (1982). The phosphatidylinositol cycle in WRK-1 cells. Evidence for a separate, hormone-sensitive phosphatidylinositol pool. *J. Biol. Chem.* 257: 2137-2139.
- Monaco, M.E. (1987). Inositol metabolism in WRK-1 cells. Relationship of hormone-sensitive to -insensitive pools of phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 262: 13001-13006.
- Monaco, M.E. y Woods, D. (1983). Characterization of the hormone-sensitive phosphatidylinositol pool in WRK-1 cells. *J. Biol. Chem.* 258: 15125-15129.
- 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.O., 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.
- Moriarty, T.M., Gillo, B., Carty, D.J., Premont, T., Landau, E.M. e Iyengar, R. (1988). β γ subunits of GTP-binding proteins inhibit muscarinic receptor stimulation of phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8865-8869.
- Moriarty, T.M., Padrell, E., Carty, D.J., Omri, G., Landau, E.M. e Iyengar, R. (1990). G_o protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. *Nature* **343**: 79-82.
- Moritz, A., De Graan, P.N.E., Gispen, W.H. y Wirtz, K.W.A. (1992). Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol 4-phosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **267**: 7207-7210.
- Nakanishi, O., Homma, Y., Kawasaki, H., Emori, Y., Suzuki, K. y Takenawa, T. (1988). Purification of two types of phosphoinositide-specific phospholipase C from rat liver. *Biochem. J.* **256**: 453-459.
- Nishizuka, Y. (1988). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312.
- 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* oocytes after injection of rat brain messenger RNA. *Mol. Brain. Res.* **2**: 113-123.
- Olate, J., Jorquera, H., Purcell, P., Codina, J., Birnbaumer, L. y Allende, J.E. (1989). Molecular cloning and sequence determination of cDNA coding for the α -subunit of a G_o -type protein of *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* **244**: 188-192.
- Olate, J., Martínez, S., Purcell, P., Jorquera, H., Codina, J., Birnbaumer, L. y Allende, J.E. (1990). Molecular cloning and sequence determination of four different cDNA species coding for α -subunits of G proteins from *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett.* **268**: 27-31.
- 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.
- Orsulakova, A., Stockhorst, E. y Schacht, J. (1976). Effect of neomycin on phosphoinositide labelling and calcium binding in guinea-pig inner ear tissues *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.* 26: 285-290.
- Padrell, E., Carty, D. J., Moriarty, T. M., Hildebrandt, J. D., Landau, E. M. e Iyengar, R. (1991). Two forms of the bovine brain G_0 that stimulate the inositol trisphosphate-mediated Cl^- currents in *Xenopus* oocytes. Distinct guanine nucleotide binding properties. *J. Biol. Chem.* 266: 9771-9777.
- Park, D., Jhon, D-Y., Kriz, R., Knopf, J. y Rhee, S.G. (1992). Cloning, sequencing, expression, and G_q -independent activation of phospholipase C- β_2 . *J. Biol. Chem.* 267: 16048-16055.
- Pike, L.J. y Eakes, 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.
- Pike, M. y De Meester, C. (1988). Inhibition of phosphoinositide metabolism in human polymorphonuclear leukocytes by S-adenosylhomocysteine. *J. Biol. Chem.* 263: 3592-3599.
- 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.
- Qian, Z. y Drewes, L.R. (1991). Cross-talk between receptor-regulated phospholipase D and phospholipase C in brain. *FASEB J.* 5: 315-319.
- 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.
- Ragan, C.I., Watling, K.J., Gee, N.S., Aspley, S., Jackson, R., Reid, G.G., Baker, R., Billington, D.C., Barnaby, R.J. y Leeson, P.D. (1988). The dephosphorylation of inositol 1,4-bisphosphate to inositol in liver and brain involves two distinct Li^+ -sensitive enzymes and proceeds via inositol 4-phosphate. *Biochem. J.* 249: 143-148.
- Rana, R.S., Sekar, M.Ch., Hokin, L.E. y Mac Donald, M.J. (1986). 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.

- Rando, R.R. (1988). Regulation of protein kinase C activity by lipids. *FASEB J.* 2: 2348-2355.
- 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. y Choi, K.D. (1992). Regulation of inositol phospholipid specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267: 12393-12396.
- Rhee, S.G., Suh, P-G., Ryu, S-H. y Lee, S.Y. (1989). Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244: 546-550.
- Ross, T.S., Jefferson, A.B., Mitchell, C.A. y Majerus, P.W. (1991). Cloning and expression of human 75-kDa inositol polyphosphate-5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* 266: 20283-20289.
- Roy, G., Villar, L.M., Lazaro, I., González, M., Bootello, A. y González-Porte, P. (1991). Purification and properties of membrane and cytosolic phosphatidylinositol-specific phospholipase C from human spleen. *J. Biol. Chem.* 266: 11495-11501
- Ruderman, N.B., Kapeller, R., White, M.F. y Cantley, L.C. (1990). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1411-1415.
- Ryu, S.H., Suh, P-G., Cho, K.S., Lee, K-Y. y Rhee, S.G. (1987). Bovine brain cytosol contains three immunologically distinct forms of inositolphospholipid-specific phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6649-6653.
- Sadler, S.E. y Maller, J.E. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 256: 6368-6373.
- Sadler, S.E. y Maller, J.E. (1982). Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocytes by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257: 355-361.
- Schacht, J. (1976). Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex *in vitro*. *J. Neurochem.* 27: 1119-1124.
- Schachter, D. (1988). The hepatocyte plasma membrane: organization and differentiation. En "The liver, Biology and Pathobiology", (Arias, I. M., Jakoby, W. B., Popper, H., Schachter, D. y Shafritz, D. A., editores), 2^{da} edición, Raven Press, New York, pags. 134-135.

- Schäfer, M., Behle, G., Varsányi, M. y Heilmeyer, L.M.J. Jr. (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.
- Sekar, M.C. y Hokin, L.E. (1986). The role of phosphoinositides in signal transduction. *J. Membrane Biol.* 89: 193-210.
- Serunian, L.A., Haber, M.T., Fukui, T., Kim, J.W., Rhee, S.G., Lowenstein, J.M. y Cantley, L.C. (1989). Phosphoinositides produced by phosphatidylinositol 3-kinase are poor substrates for phospholipases C from rat liver and bovine brain. *J. Biol. Chem.* 264: 17809-17815.
- Serunian, L.A., Auger, K.R., Romertz, T. y Cantley, L.C. (1990). Production of novel polyphosphoinositides *in vivo* is linked to transformation by polyoma virus middle T antigen. *J. Virol.* 64: 4718-4725.
- Seyfred, M.A., Farrell, L.E. y Wells, W.W. (1984). Characterization of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate phosphatase in rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259: 13204-13208
- Shears, S.B. (1989). Metabolism of the inositol phosphates produced upon receptor activation. *Biochem. J.* 260: 313-324.
- Smith, L.D. (1989). The induction of oocyte maturation: transmembrane signalling events and regulation of the cell cycle. *Development* 107: 685-699.
- Smith, C.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, C.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.
- Smith, C.D. y Chang, K-J. (1989). Regulation of brain phosphatidylinositol-4-phosphate kinase by GTP analogues. A potential role for guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 264: 3206-3210.
- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O. y Sternweis, P.C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G_q . *Science* 251: 804-807.
- Snutch, T.P. (1988). The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends Neuro. Sci.* 11: 250-256.

- Solomon, Y., Londos, C. y Rodbell, M. (1974). A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58: 541-548.
- Sommermeyer, H., Behl, B., Oberdisse, E. y Resch, K. (1989). Effects of nucleotides on the activity of phospholipase C in rabbit thymus lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 264: 906-908.
- Stephens, L.R., Hughes, K.T. e Irvine, R.F. (1991). Pathway of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 351: 33-39.
- Storey, D.J., Shears, S.B., Kirk, C.J. y Michell, R.H. (1984). Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate to inositol in liver. *Nature* 312: 374-376.
- Straub, R.E. y Gershengorn, M.C. (1986). Thyrotropin-releasing hormone and GTP activate inositol trisphosphate formation in membranes isolated from rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 261: 2712-2717.
- Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L.C. y Erikson, R.L. (1984). Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2117-2121.
- Sugiyama, H., Ito, I. e Hirono, C. (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.
- Supattapone, S., Worley, P.F. Baraban, J.M. y Snyder, S.H. (1988). Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 1530-1534.
- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annu. 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.
- Taylor, C. (1990). The role of G proteins in transmembrane signalling. *Biochem. J.* 272: 1-13.

- Taylor, S.J. y Exton, J.H. (1987). Guanine-nucleotide and hormone regulation of polyphosphoinositide phospholipase C activity of rat liver plasma membranes. *Biochem. J.* 248: 791-799.
- Taylor, S.J. y Exton, J.H. (1991). Two α subunits of the G_q class of G proteins stimulate phosphoinositide phospholipase C- β_1 activity. *FEBS Lett.* 286: 214-216.
- Taylor, S.J., Smith, J. y Exton, J.H. (1990). Purification from bovine liver membranes of a guanine nucleotide-dependent activator of phosphoinositide-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 265: 17150-17156.
- Taylor, S.J., Chae, H.Z., Rhee, S.G. y Exton, J.H. (1991). Activation of the β_1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the G_q class of G proteins. *Nature* 350: 516-518.
- Thomas, A.P., Alexander, J. y Williamson, J.R. (1984). Relationship between inositol polyphosphate production and the increase of cytosolic free Ca^{++} induced by vasopressin in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 259: 5574-5584.
- Tooke, N.E., Hales, C.N. y Hutton, J.C. (1984). Ca^{2+} -sensitive phosphatidylinositol-4-phosphate metabolism in rat β -cell tumour. *Biochem. J.* 219: 471-480.
- Ullrich, A. y Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212.
- van der Blitterswijk, W.J., Hilkmann, H., de Widt, J. y van der Bend, R.L. (1991 a). Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblast. I. Biphasic formation of diacylglycerol from phosphatidylinositol and phosphatidylcholine, controlled by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266: 10337-10343.
- van der Blitterswijk, W.J., Hilkmann, H., de Widt, J. y van der Bend, R.L. (1991 b). Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblast. II. Phosphatidylcholine breakdown by phospholipases C and D: involvement of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266: 10344-10350.
- Van Dongen, C.J., Zwiers, H., De Graan, P.N. y Gispen, W.H. (1984). Purification and partial characterization of the phosphatidylinositol 4-phosphate kinase from rat brain. *Biochem. J.* 223: 197-203.

- 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.
- Varticovski, L., Druker, B., Morrison, D., Cantley, L. y Roberts, T. (1989). The colony stimulating factor-1 receptor associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *Nature* 342: 699-702.
- Vega, Q.C., Cochet, C., Filhol, O., Chang, C.P., Rhee, S.G. y Gill, G. (1992). A site of tyrosine phosphorylation in the C terminus of the epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C. *Mol. Cell. Biol.* 12: 128-135.
- Vogel, S. y Hoppe, J. (1986). Polyamines stimulate the phosphorylation of phosphatidylinositol in membranes from A431 cells. *Eur. J. Biochem.* 154: 253-257.
- Wahli, W. y Martínez, E. (1991). Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *FASEB J.* 5: 2243-2249.
- Waldo, G., Boyer, J., Morris, A. y Harden, T.K. (1991). Purification of an AlF_4^- and G-protein $\beta\gamma$ -subunit-regulated phospholipase C-activating protein. *J. Biol. Chem.* 266: 14217-14225.
- Walker, D.H., Dougherty, N. y Pike, L.J. (1988). Purification and characterization of a phosphatidylinositol kinase from A431 cells. *Biochemistry* 27: 6504-6511.
- Wallace, M.A. y Fain, J.N. (1985). Guanosine-5'-O-thiotriphosphate (GTP γ S) stimulates phospholipase C activity in plasma membranes of rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260: 9527-9530.
- 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. *Biochim. 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 $(Ca^{2+})_{in}$ of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1534-1536.

- Weiss, S.J., McKinney, J.S. y Putney, J.W. Jr. (1982). Receptor-mediated net breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in parotid acinar cells. *Biochem. J.* **206**: 555-560.
- Whitman, M. y Cantley, L.C. (1988). Phosphoinositide metabolism and the control of cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* **948**: 327-344.
- Whitman, M., Kaplan, D.R., Schaffhausen, B., Cantley, L. y Roberts, T.M. (1985). Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* **315**: 239-242.
- Whitman, M., Kaplan, D., Roberts, T. y Cantley, L.C. (1987). Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts: implications for cellular regulation. *Biochem. J.* **247**: 165-174.
- 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.
- Williams, S.E. y Schacht, J. (1986). Binding of neomycin and calcium to phospholipids and other anionic compounds. *J. Antibiot.* **39**: 457-462.
- Wilson, D.B., Bross, T.E., Hofmann, S.L. y Majerus, P.W. (1984). Hydrolysis of polyphosphoinositides by purified sheep seminal vesicle phospholipase C enzymes. *J. Biol. Chem.* **259**: 11718-11724.
- Wu, D., Lee, C.H., Rhee, S.G. y Simon, M.I. (1992). Activation of phospholipase C by α subunits of the G_q and G_{11} proteins in transfected Cos-7 cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 1811-1817.
- Yamakawa, A. y Takenawa, T. (1988). Purification and characterization of membrane-bound phosphatidylinositol kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **263**: 17555-17560.
- Yamakawa, A., Nishizawa, M., Fujiwara, K.T., Kawai, S., Kawasaki, H., Suzuki, K. y Takenawa, T. (1991). Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding the phosphatidylinositol kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **266**: 17580-17583.

- Yamamoto, K., Graziani, A., Carpenter, C., Cantley, L.C. y Lapetina, E.G. (1990). A novel pathway for the formation of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate: phosphorylation of phosphatidylinositol 3-monophosphate by phosphatidylinositol 3-monophosphate 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 265: 22086-22089.

- York, J.D. y Majerus, P.W. (1990). Isolation and heterologous expression of a cDNA encoding bovine inositol polyphosphate 1-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9548-9552.