

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

PURIFICACION DE UNA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA
TIPO 1 DE LA FRACCION MICROSOMAL DE HIGADO DE RATA

GUILLERMINA ASINS MUÑOZ

Tesis presentada por la Licenciada
Guillermina Asins Muñoz para optar
al grado de Doctor en Farmacia.

Ha sido realizada en el Departamento
de Bioquímica de la Facultad de
Farmacia de la Universidad de
Barcelona, bajo la dirección del
Profesor Dr. Fausto García Hegardt

Barcelona, Marzo 1989.

A mi esposo y a mi hija

Deseo expresar mi reconocimiento a quienes con su colaboración han contribuido a la realización de esta Tesis. En especial:

Al Profesor Dr. Fausto García Hegardt, Jefe del Departamento, por el esfuerzo dedicado en la labor de dirección de este trabajo. Asimismo he de agradecerle muy sinceramente su cordialidad, apoyo y acertados consejos.

A la Dra. Dolors Serra Cucurull, por su amable ayuda y compañerismo. A ella debo agradecerle su inestimable colaboración en la obtención de numerosos enzimas y reactivos que he precisado en mi trabajo.

Y a todos los compañeros del Departamento, no sólo a los actuales sino además a todos aquellos a quienes he conocido en estos años de trabajo. Quiero hacer aquí una especial alusión a los más jóvenes, cuya alegría e ingenio han sido un constante estímulo en mi labor.

PRESENTACION

Desde hace años se han relacionado niveles elevados de colesterol en sangre con aparición de arterioesclerosis. Actualmente está demostrada la correlación entre una elevada concentración en sangre de determinadas lipoproteínas y la afección de la enfermedad. La esclerosis cardiovascular es, en sociedades industrializadas, una de las más frecuentes causas de muerte por enfermedad. De ahí que el metabolismo del colesterol y su regulación hayan devenido uno de los temas de estudio en bioquímica de mayor interés social, al que se han dedicado grandes esfuerzos y recursos, pues su trascendencia sanitaria es innegable.

En nuestro Laboratorio, la investigación sobre el metabolismo del colesterol y su regulación se ha centrado en el estudio del principal enzima que controla la síntesis: la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa).

Al igual que otros muchos enzimas, éste intercambia sus estados inactivo o activo por fosforilación/desfosforilación reversible, dependiendo su nivel de actividad del grado de fosforilación. Ello justifica que nuestra labor se oriente al conocimiento de los mecanismos enzimáticos de fosforilación/desfosforilación de la HMG-CoA reductasa.

El estudio del control de la actividad HMG-CoA reductasa por fosforilación/desfosforilación se inició en nuestro Laboratorio con trabajos "in vitro", fruto de los cuales ha sido la purificación y caracterización, a partir de hígado de rata, de diversos enzimas que intervienen en la fosforilación/desfosforilación de la HMG-CoA reductasa: HMG-CoA reductasa quinasas y HMG-CoA reductasa fosfatasas, ambas tanto de origen microsomal como citosólico. Otra línea de investigación que opera "in vivo", con hepatocitos aislados, complementó el estudio de la fosforilación del enzima con [32 P]PO $_4$ H $_3$ y su respuesta a distintos efectores.

Así pues, al iniciar nuestro trabajo, se habían purificado parcialmente, y caracterizado, cuatro proteínas fosfatasas de origen citosólico y tres proteínas fosfatasas de origen microsomal, con actividad sobre HMG-CoA reductasa, de las cuales se estaban realizando estudios orientados a conocer su especificidad. Nuestro primer objetivo fue profundizar en la caracterización de las proteínas fosfatasas de origen microsomal y su purificación; en especial la actividad fosfatasa, que a lo largo de este trabajo denominaremos HMG-CoA reductasa fosfatasa M, que presenta un comportamiento cromatográfico que la diferencia de otras proteínas fosfatasas descritas.

En el transcurso de nuestro trabajo, algunos autores han llamado la atención acerca de la posibilidad de que las fosfatasas purificadas de la fracción microsomal no sean proteínas del retículo endoplasmático, sino que procedan del glucógeno que, en muchos casos, contamina la fracción microsomal. Pequeñas cantidades de glucógeno serían suficientes para unir con una fuerza

inusual un tipo de proteín fosfatasa relacionada con el glucógeno, la proteín fosfatasa G, y con ello llevar a error respecto a la ubicación citológica de la actividad proteín fosfatasa investigada.

La sugerencia de esta posibilidad era de suficiente importancia para que, una vez ultimada una parte del trabajo de purificación y caracterización de la HMG-CoA reductasa fosfatasa microsomal, fuera de interés profundizar en el estudio de la posible relación entre la HMG-CoA fosfatasa M y la proteín fosfatasa G. En esa dirección se han orientado los trabajos de esta memoria.

Los resultados obtenidos en el subfraccionamiento celular, en el fraccionamiento cromatográfico y la caracterización enzimática de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, evidencian, a nuestro entender, la existencia de dos proteínas independientes: una relacionada con microsomas y otra relacionada con glucógeno.

ABREVIATURAS MAS USUALES

ACAT	acil-CoA-colesterol-O-acetil-transferasa
AMP	adenosín-5'-monofosfato
AMPc	adenosín-3'-5'-monofosfato
ATP	adenosín-5'-trifosfato
Bis-Tris	bis(2-hidroximetil)imino-tris-(hidroximetil) metano
°C	grados centígrados
¹⁴ C	carbono 14
cDNA	copia de ácido desoxirribonucleico
CHO	células de ovario de hamster
Ci, mCi, µCi	curio, milicurio, microcurio
cpm	cuentas por minuto
CoA	coenzima A
DARPP-32	fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc
DEAE	dietilaminoetil
DI	desinhibidor
dpm	desintegraciones por minuto
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilen-diamino-tetraacetato
EGTA	etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter)
g, mg, µg	gramos, miligramos, microgramos
GSQ-3	glucógeno sintasa quinasa 3
³ H	tritio
h	horas
HMG-ácido	ácido 3-hidroxi-3-metilglutaril
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMG-CoA Rd	HMG-CoA reductasa
I-1	inhibidor 1 de la actividad proteín fosfatasa
I-2	inhibidor 2 de la actividad proteín fosfatasa
IDL	lipoproteínas de densidad intermedia
kb	quilobases
kDa	quilodaltons
L, mL, µL	litro, mililitro, microlitro
LDH	láctico deshidrogenasa
LDL	lipoproteínas de baja densidad
m	minutos
mA	miliamperios
M, mM, µM, nM, pM	molar, milimolar, micromolar, nanomolar, picomolar
mS	milistatohm
MVL	mevalonolactona
NAD ⁺	nicotinamidoadenín dinucleótido
NADH	nicotinamidoadenín dinucleótido reducido
NADP ⁺	nicotinamidoadenín dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamidoadenín dinucleótido fosfato reducido

nm	nanómetro
³² P	fósforo 32
PCS	proteín fosfatasa estimulada por policaciones
P _i	fosfato inorgánico
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
pNPP	para-nitrofenilfosfato
PPi	pirofosfato inorgánico
PPO	2,5-difeniloxazol
PrP	proteín fosfatasa
PrQ	proteín quinasa
PrQ-AMPC	proteín quinasa dependiente de AMPC
REL	retículo endoplasmático liso
RER	retículo endoplasmático rugoso
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
RNA _t	ácido ribonucleico de transferencia
RP-I	inhibidor de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa
rpm	revoluciones por minuto
³² S	azufre 32
s	segundos
SDS	dodecil sulfato sódico
SEM	desviación estándar de la media
SPM	sobrenadante postmitocondrial
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilendiamina
TPCK	L-1-tosilamido-2-feniletil-clorometilcetona
Tris	tris (hidroximetil)aminometano
U	unidades internacionales de actividad enzimática
UT-1	células de ovario de hamster resistentes a compactina
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad
xg	gravedades

INDICE

	Página
1.- <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL	2
1.2. REGULACION DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL	4
1.2.1. Enzimas que intervienen en el metabolismo del colesterol	6
1.2.1.1. Localización subcelular	8
1.2.1.2. Regulación coordinada	9
1.2.2. Lipoproteínas	11
1.3. HMG-CoA REDUCTASA	13
1.3.1. Estructura	13
1.3.2. Purificación	16
1.3.3. Regulación	16
1.4. REGULACION DE LA CONCENTRACION DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA	18
1.4.1. Endocitosis de LDL	18
1.4.2. Compactina y mevilonina	18
1.4.3. Mevalonato	19
1.4.4. Esteroles	20
1.4.5. Derivados no esteroides del mevalonato	22
1.4.6. Ritmo circadiano	23
1.4.7. Control hormonal	24
1.5. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA POR FOSFORILACION/DESFOSFORILACION	
1.5.1. HMG-CoA reductasa quinasas	25
1.5.1.1. HMG-CoA reductasa quinasa	27
1.5.1.2. Proteín quinasa C	29
1.5.1.3. Proteín quinasa dependiente de Ca ²⁺ y calmodulina	31
1.5.2. HMG-CoA reductasa fosfatasas	33
1.5.2.1. HMG-CoA reductasa fosfatasas citosólicas	33
1.5.2.2. HMG-CoA reductasa fosfatasas microsomales	34
1.5.2.3. Especificidad	36
1.5.3. Regulación del sistema bicíclico	37
1.5.3.1. Regulación hormonal	38
1.5.3.2. Regulación por mevalonato	42

1.6. OTROS MECANISMOS DE CONTROL DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA	45
1.6.1. Composición y fluidez de la membrana	45
1.6.2. Control hormonal	45
1.6.3. Activadores alostéricos y compuestos con grupos tiol	46
1.6.4. Proteínas reguladoras	46
1.7. FOSFOPROTEIN FOSFATASAS. CLASIFICACION	49
1.7.1. Proteín fosfatasa tipo 1	53
1.7.1.1. Proteín fosfatasa 1 _r	55
1.7.1.2. Proteín fosfatasa 1 _o	59
1.7.1.3. Proteín fosfatasa 1 _m	61
1.7.1.4. Proteín fosfatasa 1 _x	62
1.7.2. Proteín fosfatasa tipo 2A	63
1.7.3. Proteín fosfatasa tipo 2B	66
1.7.4. Proteín fosfatasa tipo 2C	67
1.8. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LAS PROTEIN FOSFATASAS	69
1.8.1. Citosólicas	69
1.8.2. Unidas a la fracción de glucógeno	72
1.8.3. Microsomales	72
1.8.4. Otras localizaciones	73
1.8.4.1. Núcleo	73
1.8.4.2. Membranas plasmáticas	73
1.8.4.3. Mitocondrias	73
1.8.4.4. Ribosomas	74
1.9. ESPECIFICIDAD DE LAS PROTEIN FOSFATASAS	75
1.10. OBTENCION DE ANTICUERPOS FRENTE A LAS PROTEIN FOSFATASAS	78
1.11. REGULACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN FOSFATASA	79
1.11.1. Proteínas termoestables	79
1.11.1.1. Inhibidor 1	80
1.11.1.2. Inhibidor 2	81
1.11.1.3. Desinhibidor	82
1.11.1.4. Inhibidor de la actividad PrP 2A.	82
1.11.1.5. Otras proteínas termoestables	83
1.11.2. Proteínas básicas y poliaminas	83
1.11.3. Otros activadores e inhibidores	85
1.11.3.1. Cationes divalentes	85
1.11.3.2. Fluoruros-Compuestos pirofosforilados y otros.	86

	Página
1.12. CONTROL DE LA ACTIVIDAD PROTEIN FOSFATASA POR HORMONAS Y OTROS EFECTORES EXTRACELULARES . . .	87
1.12.1. Variación de la concentración de nucleótidos cíclicos	87
1.12.2. Variación de la concentración de calcio y diacilglicerol.	92
1.12.3. Receptores con actividad proteín tirosín quinasa	94
1.12.3.1 Actividad proteín tirosín quinasa del receptor de la insulina	95
1.12.3.2 Aumento de mensajeros intracelulares por acción de la insulina	95
1.13. ESTUDIOS DE CLONACION. HOMOLOGIA ENTRE LAS SUBUNIDADES CATALITICAS DE LAS PROTEIN FOSFATASAS	98
1.13.1. Subunidades catalíticas tipo 1	98
1.13.2. Subunidades catalíticas tipo 2A	99
1.13.3. Subunidad catalítica 2B	100
1.13.4. Subunidades catalíticas 2C	100
1.13.5. Subunidad catalítica X	100
1.13.6. Homología entre distintas subunidades	101
1.14. RELACION ENTRE LAS PROTEIN FOSFATASAS DE LOS DISTINTOS COMPARTIMENTOS CELULARES. MODELOS PROPUESTOS	103
2.- <u>MATERIAL Y METODOS.</u>	106
2.1. PRODUCTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS	107
2.1.1. Reactivos generales	107
2.1.2. Productos radioactivos	108
2.1.3. Proteínas y preparaciones enzimáticas	109
2.1.4. Síntesis de productos	109
2.1.4.1. Síntesis de HMG-CoA, [³ H]HMG-CoA, [¹⁴ C]HMG-CoA	109
2.1.4.2. Síntesis de [³² P]ATP	110
2.1.4.3. Preparación de poli-L-lisina-Sepharosa 4B	110
2.2. ANIMALES UTILIZADOS. CONDICIONES	111
2.2.1. Ratas	111
2.2.2. Conejos	111

2.3. OBTENCION DE LOS PREPARADOS ENZIMATICOS	113
2.3.1. Purificación de HMG-CoA reductasa inactiva	113
2.3.1.1. Obtención de microsomas	113
2.3.1.2. Solubilización de la HMG-CoA reductasa	114
2.3.1.3. Precipitación con sulfato amónico	115
2.3.1.4. Inactivación por quinasas endógenas	115
2.3.1.5. Calentamiento a 64°C	116
2.3.1.6. Cromatografía en Affi-Gel Blue-Sepharosa	116
2.3.1.7. Cromatografía en Agarosa Hexano-HMG-CoA	117
2.3.2. Preparación de Ser(³² P) HMG-CoA reductasa	118
2.3.3. Purificación de glucógeno fosforilasa	119
2.3.3.1. Obtención y extracción del músculo	119
2.3.3.2. Precipitación ácida	119
2.3.3.3. Precipitación con sulfato amónico	120
2.3.3.4. Calentamiento a pH alcalino	120
2.3.3.5. Cristalización y liofilización	120
2.3.3.6. Valoración	121
2.3.4. Fosforilación de la glucógeno fosforilasa	121
2.3.4.1. Fosforilación con fosforilasa "b" quinasa	122
2.3.4.2. Precipitación con sulfato amónico	122
2.3.4.3. Condiciones de almacenaje	122
2.3.5. Preparación de Ser(³² P) glucógeno fosforilasa.	123
2.3.6. Purificación de fosforilasa quinasa	124
2.3.6.1. Obtención y extracción del músculo.	124
2.3.6.2. Precipitación ácida	124
2.3.6.3. Precipitación con sulfato amónico	124
2.3.6.4. Cromatografía en Sepharosa 4B	125
2.3.7. Purificación del inhibidor 2	125
2.3.7.1. Preparación del extracto crudo	125
2.3.7.2. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50	125
2.3.7.3. Precipitación con sulfato amónico	126
2.3.7.4. Calentamiento a 95°C	126
2.3.7.5. Cromatografía en Blue-Sepharosa CL-6B	127
2.3.8. Purificación de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1	127
2.3.8.1. Preparación del extracto crudo	128
2.3.8.2. Precipitación con sulfato amónico	128
2.3.8.3. Precipitación con etanol.	128
2.3.8.4. Cromatografía en DEAE-celulosa DE-50.	129
2.3.8.5. Cromatografía en poli-L-lisina-Sepharosa 4B	129
2.3.8.6. Cromatografía en Sephadex G-75	130
2.3.9. Purificación de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A	130
2.3.10. Obtención de la glucógeno sintasa quinasa 3	130

2.4. TECNICAS ANALITICAS	131
2.4.1. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa con sustrato [³ H]-HMG-CoA	131
2.4.2. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa con sustrato [¹⁴ C]-HMG-CoA	132
2.4.3. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa	133
2.4.4. Determinación de la actividad glucógeno fosforilasa	133
2.4.5. Determinación de la actividad glucógeno fosforilasa quinasa	134
2.4.6. Determinación de la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa	135
2.4.7. Determinación de la actividad inhibidora del inhibidor 2	136
2.4.8. Identificación de la actividad proteín fosfatasa tipo 1	136
2.4.9. Identificación de la actividad proteín fosfatasa tipo 2A	137
2.4.10 Identificación de la actividad proteín fosfatasa tipo 2B	138
2.4.10.1. Sustrato para-nitrofenilfosfato	138
2.4.10.2. Sustrato HMG-CoA reductasa	139
2.4.11 Identificación de la actividad proteín fosfatasa tipo 2C	140
2.4.12 Determinación de la actividad glucosa-6-fosfatasa	140
2.4.13 Determinación de la actividad láctico deshidrogenasa	142
2.4.14 Determinación de la concentración de glucógeno	143
2.4.15 Determinación de RNA	144
2.4.16 Determinación de la concentración de proteína.	145
2.5. TECNICAS ELECTROFORETICAS	146
2.5.1. Geles de acrilamida denaturantes	146
2.5.2. Geles de acrilamida no denaturantes. Determinación de la actividad PrP	147
2.6. TECNICAS DE CENTRIFUGACION	149
2.6.1. Subfraccionamiento por ultracentrifugación	149
2.6.2. Subfraccionamiento en gradiente de sacarosa	150
2.7. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	152
2.7.1. Solubilización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa	152
2.7.2. Tratamiento de las muestras con α-amilasa.	152
2.7.3. Precipitación con acetona	152
2.7.4. Tratamiento de las muestras con tripsina	153

	Página
3.- RESULTADOS	154
3.1. EFECTO DE LA DILUCION EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS PROTEIN FOSFATASAS	155
3.1.1. Sustrato HMG-CoA reductasa	156
3.1.2. Sustrato glucógeno fosforilasa	156
3.2. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA EN EL SOBRENADANTE POSTMITOCONDRIAL DE HIGADO DE RATA.	161
3.2.1. Animales alimentados	161
3.2.2. Animales en ayunas y tratados con glucagon . .	162
3.3. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA	165
3.3.1. Subfraccionamiento por ultracentrifugación . .	165
3.3.1.1. Animales alimentados	165
3.3.1.2. Animales en ayunas tratados con glucagon	166
3.3.2. Subfraccionamiento en gradiente de sacarosa continuo	170
3.3.2.1. Animales alimentados	172
3.3.2.2. Animales en ayunas tratados con glucagon	175
3.4. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA	179
3.4.1. Solubilización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa	179
3.4.1.1. Animales alimentados	179
3.4.1.2. Animales en ayunas tratados con glucagon	179
3.4.2. Comprobación de que la actividad solubilizada no es PrP 1 ₀	182
3.4.3. Clasificación de las actividades solubilizadas tras su cromatografía en DEAE-celulosa	187
3.5. PURIFICACION DE UNA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M A PARTIR DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA.	188
3.5.1. "Batch" en DEAE-celulosa de la actividad solubilizada con Triton X-100	188
3.5.2. Cromatografía en Fosfocelulosa P-11	188
3.5.3. Cromatografía en Aminohexil-Sepharosa 4B	190
3.5.4. Cromatografía en poli-L-lisina-Sepharosa 4B	190
3.5.5. Cromatografía en Ultrogel AC4	193
3.5.6. Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones denaturantes de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	193
3.5.7. Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones no denaturantes.	196

	Página
3.5.8. Cromatofoco de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	198
3.6. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M	200
3.6.1. Ensayos con sustrato Ser(³² P) HMG-CoA reductasa	200
3.6.2. Clasificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	202
3.6.2.1. Ensayos frente al inhibidor 2	202
3.6.2.2. Ensayos frente al RP inhibidor	204
3.6.2.3. Ensayos frente a protamina	204
3.6.3. Tripsinización controlada	207
3.6.4. Fosforilación con GSQ-3 y calentamiento a 100°C	209
3.6.5. Rotura por precipitación con acetona	210
3.6.6. Especificidad de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	212
3.6.7. Diferencias entre la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M y la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa unida al precipitado de glucógeno	213
3.6.7.1. Solubilización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa de precipitado de glucógeno	213
3.6.7.2. Cromatografía en DEAE-celulosa	215
3.6.7.3. Cromatografía en Aminohexil-Sepharosa 4B	217
3.7. PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE 37 kDa DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M	220
3.7.1. Obtención de la subunidad catalitica	220
3.7.2. Cromatografía en Bio Gel A 0.5m	220
3.7.3. Cromatografía en Aminohexil-Sepharosa 4B	222
3.7.4. Cromatografía en poli-L-lisina Sepharosa 4B	224
3.7.5. Electroforesis en geles de acrilamida	224
3.8. PROPUESTA DE UN MODELO DE UNION DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M (85 kDa) A LAS MEMBRANAS MICROSOMALES	228
3.8.1. Cromatografía en DEAE-celulosa de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada con KCl	228
3.8.2. Cromatografía en Bio Gel A 0.5m de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada con KCl 0.5 M	231
3.8.3. Disociación de la HMG-CoA reductasa fosfatasa M (85 kDa) con KCl. Cromatografía en Bio Gel A 0.5m	231
3.8.4. Tripsinización de la subunidad asociada	233

	Página
4.- <u>DISCUSION</u>	234
4.1. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA EN EXTRACTOS INICIALES	235
4.2. LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA	238
4.2.1. Contaminación de los microsomas con proteínas citosólicas y proteínas adheridas	238
4.2.2. Contaminación de los microsomas por glucógeno.	239
4.3. LA ACTIVIDAD ASOCIADA A MICROSOMAS ES DISTINTA DE LA ASOCIADA A GLUCOGENO	242
4.3.1. Centrifugación en gradiente lineal de sacarosa	242
4.3.2. Pautas de solubilización	243
4.3.3. Otras evidencias	244
4.4. PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD MICROSOMAL	246
4.4.1. Elección de la actividad excluida del DEAE-celulosa	246
4.4.2. Purificación de la actividad HMG-Coa reductasa fosfatasa M	247
4.5. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA UNIDA A MICROSOMAS	251
4.5.1. Clasificación	251
4.5.2. Ensayos de proteólisis y reactivación	252
4.5.3. Especificidad de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa	254
4.6. EL GLUCAGON Y LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA	256
4.7. PROPUESTA DE UN MODELO DE HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA RELACIONADA CON LOS MICROSOMAS	260
5.- <u>CONCLUSIONES</u>	264
6.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	267

ESQUEMAS

I	Principales factores determinantes de la homeostasis del colesterol	5
II	Vía metabólica de síntesis del colesterol	7
III	Representación de la estructura de la HMG-CoA reductasa	15
IV	Modelo de regulación de la actividad HMG-CoA reductasa por tres distintas proteínas quinasas	28
V	Sistema bicíclico de regulación de la actividad HMG-CoA reductasa	32
VI	Regulación del sistema bicíclico por inhibidores proteicos termoestables	41
VII	Regulación del sistema bicíclico por mevalonolactona	44
VIII	Regulación de la concentración y actividad del enzima HMG-CoA reductasa	48
IX	Modelo de regulación de la actividad PrP 1 citosólica por GSQ-3 y ATP-Mg ²⁺	57
X	Regulación de la actividad PrP por hormonas y otros agentes extracelulares.	88
XI	Regulación de la actividad PrP 1 por AMPc y Ca ²⁺	90
XII	Modelo de distribución subcelular de la PrP 1	104
XIII	Propuesta de un modelo que interrelaciona la HMG-CoA reductasa fosfatasa M y las membranas microsomales.	261

TABLAS

I	Clasificación de las serín/treonín proteínas fosfatasas	51
II	Subdivisión de las proteínas fosfatasas tipo 1	54
III	Subdivisión de las proteínas fosfatasas tipo 2A	65
IV	Distribución de las proteínas fosfatasas	70
V	Distribución subcelular de las proteínas fosfatasas	71
VI	Actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en el sobrenadante postmitocondrial de hígado de ratas alimentadas y ratas en ayunas tratadas con glucagon	164
VII	Subfraccionamiento del sobrenadante postmitocondrial obtenido a partir del hígado de ratas alimentadas	168
VIII	Subfraccionamiento del sobrenadante postmitocondrial obtenido a partir del hígado de ratas en ayunas y tratadas con glucagon	169
IX	Cuadro de purificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	195
X	Efecto de la precipitación con acetona sobre la actividad proteína fosfatasa solubilizada de microsomas	211
XI	Cuadro de purificación parcial de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa obtenida a partir del precipitado de glucógeno	219
XII	Cuadro de purificación de la actividad catalítica obtenida por precipitación con acetona de la HMG-CoA reductasa fosfatasa M	227

FIGURAS

1.	Efecto de la dilución en la actividad específica HMG-CoA reductasa fosfatasa	158
2.	Efecto de la dilución en la actividad específica glucógeno fosforilasa fosfatasa	159
3.	Efecto de la filtración de extractos iniciales sobre la actividad específica glucógeno fosforilasa fosfatasa	160
4.	Subfraccionamiento en gradiente de sacarosa continuo (15-60 %) del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas alimentadas	173
5.	Subfraccionamiento en gradiente de sacarosa continuo (15-60 %) en presencia de 500 mM KCl, del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas alimentadas	174
6.	Subfraccionamiento en gradiente de sacarosa continuo (15-60 %) del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas en ayunas tratadas con glucagon	177
7.	Subfraccionamiento en gradiente de sacarosa continuo (15-60 %) en presencia de 500 mM KCl, del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas en ayunas y tratadas con glucagon	178
8.	Solubilización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa a partir de microsomas de hígado de rata.	181
9.	Afinidad por el glucógeno de la actividad solubilizada de microsomas	183
10.	Cromatografía en DEAE-celulosa de las actividades solubilizadas de microsomas con Triton X-100	187
11.	Cromatografía en fosfocelulosa de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	189
12.	Cromatografía en Aminohexil-Sepharosa 4B de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	191
13.	Cromatografía en poli-L-lisina-Sepharosa 4B de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	192
14.	Cromatografía en Ultrogel AC4 de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	194
15.	Determinación de la actividad proteín fosfatasa en geles de acrilamida en condiciones no denaturantes.	197
16.	Cromatoenfoco de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	199
17.	Desfosforilación de la Ser(³² P)HMG-CoA reductasa por HMG-CoA reductasa fosfatasa M	201
18.	Inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M frente al inhibidor 2 de músculo de conejo.	203
19.	Inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M frente al RP inhibidor de hígado de rata	206
20.	Tripsinización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M	208
21.	Solubilización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa a partir del precipitado de glucógeno	214
22.	Cromatografía en DEAE-celulosa de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada del precipitado de glucógeno	216

	Página
23. Cromatografía en Aminohehil-Sepharosa 4B de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada del precipitado de glucógeno	218
24. Cromatografía en Bio Gel A 0.5m de las actividades HMG-CoA reductasa fosfatasa proteolizadas con tripsina y acetona	221
25. Cromatografía en Aminohehil-Sepharosa 4B de la subunidad de 37 kDa de la HMG-CoA reductasa fosfatasa M	223
26. Cromatografía en poli-L-lisina-Sepharosa 4B de la actividad catalítica de la HMG-CoA reductasa fosfatasa de 37 kDa	225
27. Electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida de la actividad catalítica purificada	226
28. Cromatografía en DEAE-celulosa de las actividades solubilizadas de microsomas con KCl 500 mM	230
29. Cromatografía en Bio Gel A 0.5m de las actividades HMG-CoA reductasa fosfatasa M tratada con KCl 0.5 M	232
APENDICES	287
I Aportaciones al estudio de las HMG-CoA reductasa fosfatasas	288
II Clasificación de las proteínas fosfatasas según Merlevede y relación de otras PrP purificadas por diversos autores	289

1. INTRODUCCION

1.1. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL

El colesterol o colesterina es el miembro más sencillo de un grupo de compuestos denominados esteroides que poseen en común un esqueleto tetracíclico de ciclopentanoperhidrofenantreno. Se aisló por primera vez en 1784 a partir de cálculos biliares humanos, y posteriormente se conoció su fórmula: $C_{27}H_{46}O$. Contiene un doble enlace, dos grupos metilo en un anillo y un grupo hidroxilo. La molécula es casi plana, con los tres anillos ciclohexánicos en forma de silla, y una cadena lateral ecuatorial, mientras que los grupos metilos son axiales.

Todas las células animales requieren colesterol para su crecimiento, siendo el componente mayoritario de las membranas de estas células. En organismos superiores supone un tercio de la fracción lipídica y en tejido nervioso representa una sexta parte del peso en seco. En insectos su importancia se debe a que es un componente esencial en la dieta, necesario para la producción de hormonas que, de otra forma, el insecto es incapaz de sintetizar. Sin embargo, está ausente en la membrana mitocondrial interna y en las membranas de muchas plantas superiores y de bacterias, muchas de las cuales mantienen su estructura con otro tipo de lípidos más insaturados.

Su función en las células animales es la de contribuir de forma esencial en el mantenimiento de la estructura de las membranas, siendo además preciso para una correcta funcionalidad de los enzimas y receptores unidos a ella. Con pocas excepciones, es imprescindible en la supervivencia de las células en cultivo o fuera de los tejidos del organismo. La estricta necesidad de colesterol en las membranas de las células animales se debe a que contribuye a facilitar una cierta rigidez a éstas, necesaria a temperaturas de alrededor 25-30°C.

En la célula se encuentra unido a las membranas o en microvesículas en el citosoma. En el organismo, el colesterol también se encuentra en la sangre unido a lipoproteínas plasmáticas y asociado con los ácidos biliares en la secreción biliar.

El colesterol que precisa la célula es sintetizado internamente a través de una larga vía que implica al menos 30 enzimas, o bien es introducido en la célula por endocitosis mediada por receptores específicos de las lipoproteínas de baja densidad, LDL, Goldstein y Brown (134). En las células animales el colesterol no se metaboliza en el sentido estricto del término, sino que es transformado en otros esteroides, dependiendo del tipo de célula y de sus productos de secreción, algunos de gran importancia fisiológica. La transformación del colesterol origina vitaminas -vitamina D-, hormonas sexuales -testosterona, progesterona, β -estradiol- y otras hormonas como la cortisona. Es también transformado a diversos ácidos biliares como ácido cólico y desoxicólico.

1.2. REGULACION DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL

Al igual que sucede en otras vías metabólicas esenciales, en la regulación del metabolismo del colesterol intervienen mecanismos homeostáticos que aseguran unos niveles adecuados de colesterol libre en el interior de la célula. Estos mecanismos deben controlar la entrada y salida de colesterol en la célula, la formación de membranas (reposición o proliferación celular) y la biosíntesis "de novo", (véase Esquema I).

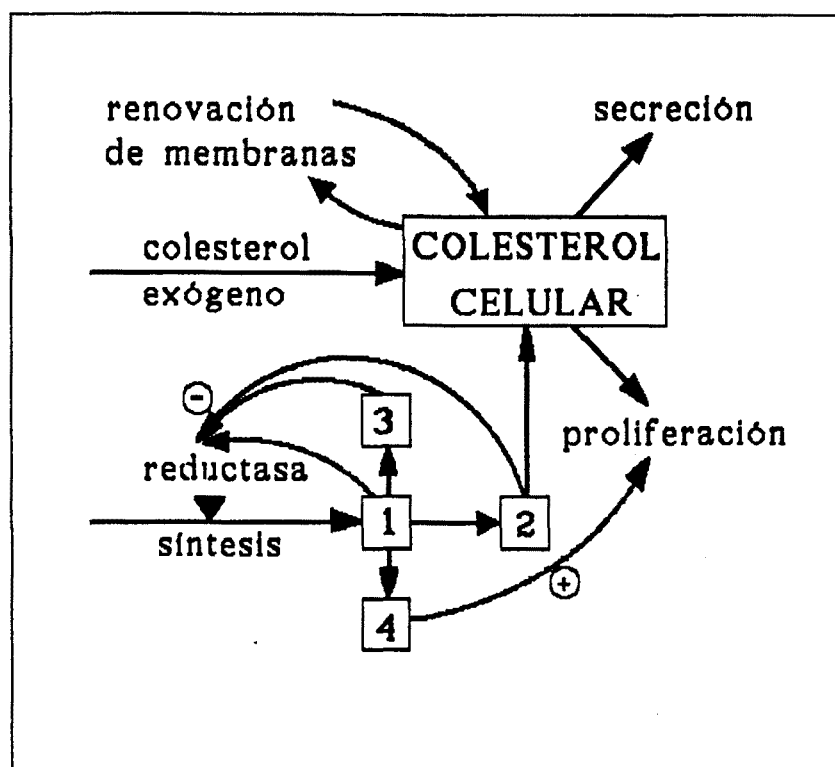
A la vista de los parámetros del Esquema I, debemos preguntarnos cuál es el mecanismo a través del que la célula es sensible al nivel de colesterol libre en un momento preciso, y cómo los demás parámetros se ven afectados.

En el interior de la célula, el colesterol puede movilizarse por unión a distintos tipos de proteínas transportadoras de esteroides, o puede ser transportado unidireccionalmente desde su lugar de síntesis hasta las membranas plasmáticas por medio de vesículas membranosas específicas. El transporte de colesterol desde las membranas plasmáticas hacia los orgánulos internos no parece realizarse por difusión, sino que puede estar dirigido por elementos contráctiles del citoesqueleto (231)(207).

De forma más sutil, la funcionalidad de las proteínas ligadas a las membranas, que depende de las características y de la estructura de éstas, es decir, del contenido de colesterol, colabora a su vez en la regulación del metabolismo del colesterol. Al mismo tiempo, moléculas relacionadas con el metabolismo del colesterol contribuyen a la homeostasis del mismo a nivel transcripcional: la acumulación de esteroides reprime la transcripción de genes que secuencian enzimas limitantes o receptores relacionados con los niveles intracelulares de colesterol.

Veremos a continuación con más detalle cuales son los principales enzimas responsables del metabolismo del colesterol, donde se localizan, como se regulan y también la importancia de las lipoproteínas en su control.

PRINCIPALES FACTORES DETERMINANTES DE LA HOMEOSTASIS
DEL COLESTEROL



ESQUEMA I

Principales factores determinantes de la homeostasis del colesterol. Los cuadros 1, 2 y 3 señalan los compuestos derivados del mevalonato, esteroides o no, que actúan inhibiendo la síntesis de colesterol, por inhibición feed-back de la actividad HMG-CoA reductasa. El cuadro 4 representa un derivado isoprénico que actúa como señal positiva, permitiendo la replicación celular. Gibson y col. (122).

1. Isopentenil pirofosfato. Precursor de los compuestos 2,3 y 4 (su importancia como inhibidor "feed-back" es una posibilidad aún no establecida).
2. Productos esteroidicos, incluye oxisteroles y colesterol
3. Intermediarios poliisoprénicos no esteroidicos
4. Isopentenil adenina

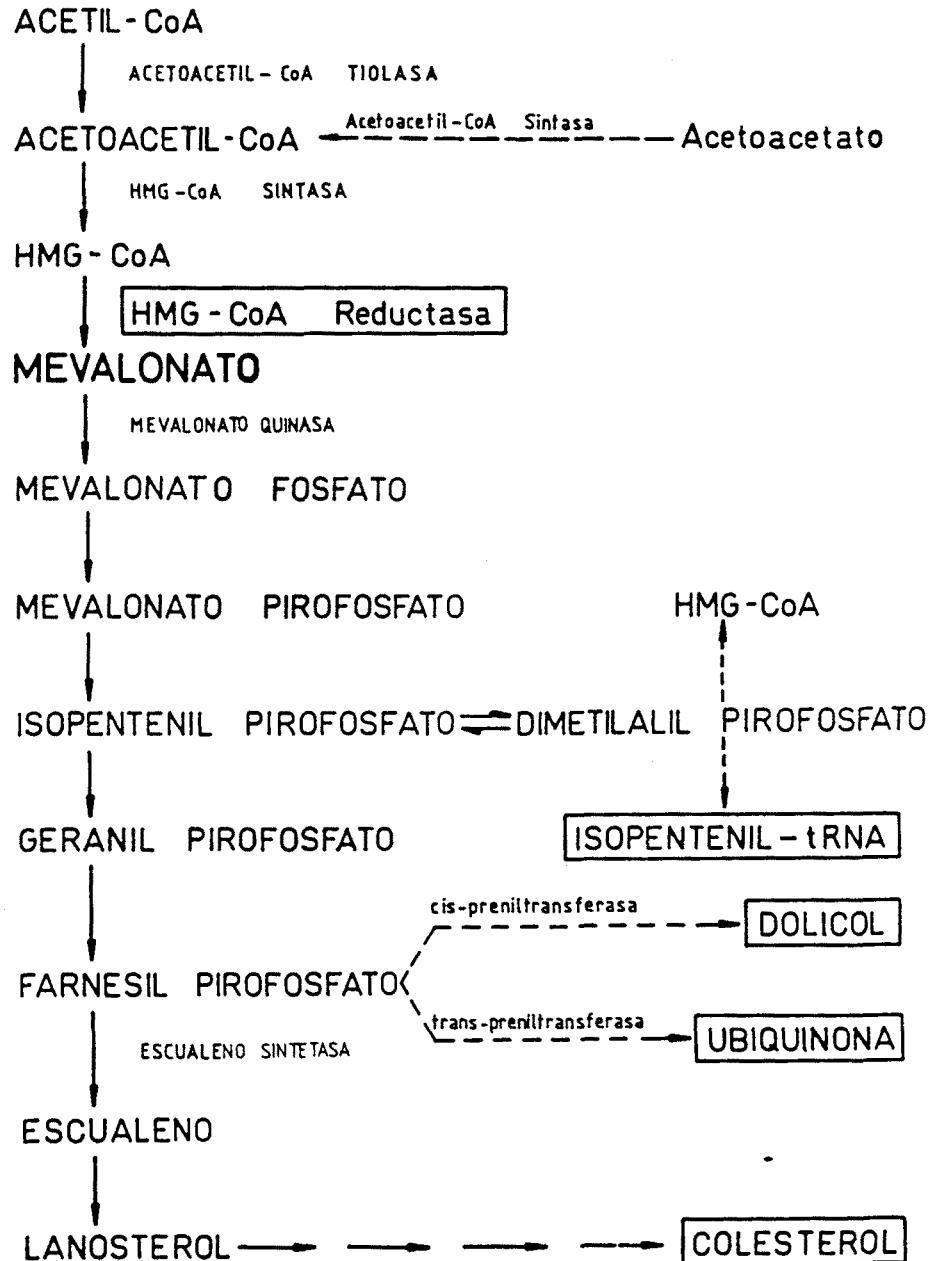
1.2.1. Enzimas que intervienen en el metabolismo de colesterol

La síntesis de colesterol se realiza a partir de acetil CoA a través de un largo proceso que implica gran número de reacciones enzimáticas, (véase Esquema II).

En la síntesis de colesterol podemos delimitar dos etapas: la primera desde acetil CoA hasta la producción de escualeno, que se produce en condiciones anaerobias y en la que se originan metabolitos solubles, y la segunda etapa que precisa de oxígeno molecular y abarca desde la producción de escualeno hasta colesterol, y da lugar a productos insolubles. El enzima limitante de esta vía de síntesis es el 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, HMG-CoA reductasa. En esta memoria es objeto de un estudio detallado en el apartado 1.3.

Recientemente, Gil y col. (128) han mostrado evidencias de que otro enzima, el 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintasa, HMG-CoA sintasa, localizado en citosol, colabora en la regulación de la vía controlando la cantidad de sustrato para la HMG-CoA reductasa. Dicho enzima cataliza la condensación de acetil CoA y acetoacetil CoA para formar HMG-CoA, sustrato de la HMG-CoA reductasa. A ambos enzimas puede corresponderles la regulación de la síntesis de colesterol, siendo a su vez regulados negativamente por colesterol.

VIA METABOLICA DE SINTESIS DEL COLESTEROL



ESQUEMA II

Vía metabólica de la biosíntesis del mevalonato, esteroides y compuestos isoprenicos. Rodwell y col. (284)

1.2.1.1. Localización subcelular

Retículo endoplasmático

El colesterol forma parte esencial de las membranas celulares, y tanto su síntesis como parte de los procesos de transformación se producen en una de estas membranas celulares. El principal enzima limitante de la vía, HMG-CoA reductasa, se encuentra en el retículo endoplasmático, (258)(302). Basándose en los trabajos de Orci y col. (258), Lange y col. (208) han propuesto su utilización como enzima marcador de retículo endoplasmático.

No sólo la HMG-CoA reductasa, también muchos de los enzimas relacionados con la síntesis o el metabolismo del colesterol, residen en la misma membrana, siendo frecuente una distribución doble, retículo endoplasmático liso (REL)/retículo endoplasmático rugoso (RER). El enzima escualeno sintasa, enzima que condensa dos moléculas de farnesil pirofosfato, es un enzima microsomal (92). Los enzimas involucrados en la conversión de lanosterol a colesterol: lanosterol 14-demetilasa, esteroid 14-reductasa, esteroid 8-isomerasa, citocromo P-450 y citocromo b₅, tienen todos ellos una distribución doble, REL/RER, (208).

Dado que el colesterol sólo puede ser sintetizado en presencia de los enzimas antes descritos, y puesto que éstos se localizan en el retículo endoplasmático, la síntesis de colesterol debe producirse en dicho sistema de membranas.

Una vez sintetizado, el colesterol sufre una serie de transformaciones en las que también intervienen enzimas ligados a la membrana microsomal, como el enzima responsable de la esterificación del colesterol libre: acil-CoA-colesterol-acil-transferasa (ACAT). La ACAT solamente se encuentra en el RER y no en el REL, pudiendo, por su localización corresponderle un interesante papel en el control de los bajos niveles de colesterol en aquella membrana (280). El bajo nivel de colesterol en el RER permite la unión de los ribosomas y la realización de las funciones propias del retículo endoplasmático rugoso. El enzima limitante de la vía de biosíntesis de los ácidos biliares, coles-

terol-7- α -hidrolasa, es también un enzima anclado en la membrana microsomal.

Peroxisomas

Recientemente, mediante técnicas de microscopía electrónica y con anticuerpos monoclonales, se ha detectado la presencia de HMG-CoA reductasa en la matriz de los peroxisomas de hígado de rata (185)(186). Por técnicas de fraccionamiento celular y microscopía, otros enzimas que intervienen en el metabolismo del colesterol en un principio únicamente ubicados en microsomas, como el citocromo P₄₅₀ y citocromo cb₅ reductasa se han localizado también en peroxisomas (143). La presencia de estas reductasas en peroxisomas indica que a este orgánulo puede corresponderle un importante papel en el metabolismo del colesterol y de los ácidos biliares.

1.2.1.2. Regulación coordinada

Los enzimas responsables del metabolismo del colesterol están regulados de forma coordinada. Las actividades de los enzimas HMG-CoA reductasa, HMG-CoA sintasa, ACAT y colesterol 7- α -hidrolasa, vienen reguladas "in vivo" a través de su concentración celular, pero también por la concentración de colesterol libre en el entorno de la membrana donde se localizan estos enzimas, (242)(277)(209).

En células de ovario de hamster, células CHO, las actividades HMG-CoA reductasa y HMG-CoA sintasa responden de forma cuantitativamente similar frente a la presencia de 25-hidroxicolesterol y de mevilonina en el medio de crecimiento. Esta regulación coordinada puede darse a nivel de la síntesis enzimática (277). En cultivos de fibroblastos humanos, la adición de LDL al medio de cultivo provoca una disminución de la actividad escualeno sintasa que se reduce hasta un 90 % transcurridas 48 horas. La adición de 25-hidroxicolesterol o colesterol suprimen igualmente la actividad escualeno sintasa (101).

La regulación de los enzimas HMG-CoA reductasa y HMG-CoA sintasa y del receptor de las LDL se realiza a nivel transcripcional en zonas del gen próximas a la región 5', sensibles a los esteroides (128)(259)(83).

En hígado, el enzima limitante de la biosíntesis de ácidos biliares es el colesterol-7- α -hidrolasa (247). Este enzima es estimulado por la concentración de su sustrato en el retículo endoplasmático. La presencia de resinas de intercambio iónico capaces de secuestrar los ácidos biliares intestinales, disminuyen la reabsorción y provocan un aumento en la actividad de la colesterol 7- α -hidrolasa y la consecuente disminución del nivel de colesterol. Ello provoca el aumento de la síntesis de colesterol, con incremento de la actividad HMG-CoA reductasa y de la endocitosis de lipoproteínas plasmáticas. El aumento de HMG-CoA reductasa por acción de las resinas secuestrantes de ácidos biliares es utilizado en la purificación del enzima para obtener mejores rendimientos.

Otro punto común en la regulación de los enzimas responsables del metabolismo del colesterol es la fosforilación reversible. En este trabajo dedicaremos un apartado al enzima HMG-CoA reductasa y su regulación por fosforilación/desfosforilación. Otros enzimas como la ACAT, la colesterol 7- α -hidrolasa y la colesterol ester hidrolasa (CEH) son asimismo sensibles a regulación por proteín quinasas (PrQ) y proteín fosfatasas (PrP) (86).

Finalmente, un mecanismo de regulación común es la variación diaria en los niveles de algunos enzimas. Los enzimas HMG-CoA reductasa, ACAT y colesterol 7- α -hidrolasa en rata están sometidos a ritmo circadiano de forma coordinada, para adaptarse mejor a las necesidades celulares de colesterol (30).

1.2.2. Lipoproteínas

La célula puede sintetizar "de novo" colesterol o, alternativamente, puede obtener de la dieta colesterol adicional, sin necesidad de sintetizarlo, a partir del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (133)(49).

El organismo es el responsable de la protección y el mantenimiento de las poblaciones celulares que lo constituyen a través de un control global del flujo de colesterol. En ese proceso el hígado juega un papel central: recibe colesterol exógeno procedente de la dieta a través del plasma en forma de quilomicrones; empaqueta el colesterol exógeno y el sintetizado "de novo" como productos de excreción para su exportación a otras células en forma de lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL; recibe colesterol de los tejidos a través del plasma: lipoproteínas de densidad intermedia, IDL y lipoproteínas de baja densidad, LDL; y, finalmente, excreta colesterol y ácidos biliares al exterior, realizando así un importante proceso regulador, (48).

En hepatocitos, si aumentan los niveles de colesterol, la entrada de colesterol exógeno puede limitarse por reducción de los receptores de las LDL, reprimiéndose la síntesis de éstos. El receptor de las LDL está sujeto a la clásica regulación por producto final. Recientemente se ha conocido que la sensibilidad del receptor a los productos finales de la biosíntesis de colesterol depende de un fragmento de 42 pares de bases que flanquea la región 5' del gen que codifica para el receptor (320) (83).

De forma coordinada a la entrada de colesterol, la célula responde modificando la actividad de los enzimas limitantes de la síntesis: disminuye la actividad HMG-CoA reductasa y la actividad HMG-CoA sintasa e incrementa la esterificación del colesterol por estimulación de la ACAT y la colesterol 7- α -hidrolasa, lo que lleva a un aumento en la producción de ácidos biliares. Si, por el contrario, la célula precisa de mayor cantidad de colesterol, los mecanismos actúan de forma inversa.

Otros esteroides, distintos al colesterol y que no precisan receptores para la entrada en la célula, producen los mismos efectos. Así el 25-hidroxicolesterol y el 7-cetocolesterol. También la mevalolactona provoca los mismos cambios. Veremos con más detalle estos mecanismos a continuación.

1.3. HMG-CoA-REDUCTASA

El enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa (E.C.1.1.1.34) cataliza el tercer paso de la vía que produce colesterol a partir de acetil-CoA, limitando no tan sólo la producción de colesterol, sino también la de otros compuestos poliisoprenicos como ubiquinona, dolicol e isopentenil-RNA_t (45)(46)(47)(102), (véase Esquema II).

El enzima se encuentra prácticamente en todas las células de mamíferos y también de otros animales: insectos, aves y peces. Asimismo se encuentra en plantas (292). En microorganismos el enzima HMG-CoA reductasa (E.C.1.1.1.88) que cataliza la formación de mevalonato, es dependiente de NADH en lugar de NADPH. Salvo una indicación expresa en otro sentido, en esta memoria la referencia a la HMG-CoA reductasa se entenderá hecha al enzima E.C.1.1.1.3.4.

1.3.1. Estructura

La determinación de la secuencia de nucleótidos y la deducción de la secuencia aminoacídica ha sido posible gracias al clonaje del cDNA obtenido de una línea de células en cultivo, células UT-1, procedentes de células de ovario de hamster (células CHO), seleccionadas en un medio de cultivo con compactina. En las células seleccionadas, UT-1, se amplifica hasta 15 veces el gen de la HMG-CoA reductasa (60).

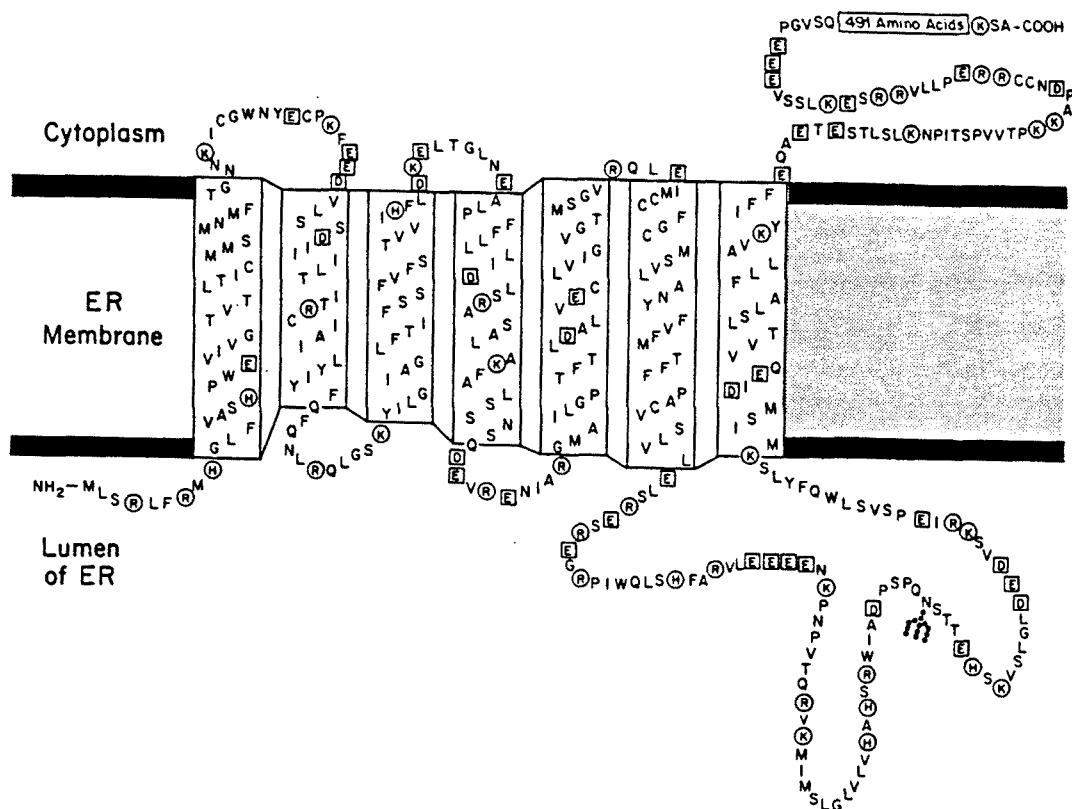
Tanto en células UT-1 (307), en hepatocitos de rata, (276) así como en otras células de mamífero (219) la HMG-CoA reductasa es una glicoproteína que atraviesa la membrana del retículo endoplasmático. El protómero tiene un peso molecular deducido de su secuencia aminoacídica (887 aminoácidos), de 97.092 daltons (60). Sin embargo, cuando se purifica el enzima en ausencia de inhibidores de proteasas, se provoca la proteólisis, (252), obteniéndose un fragmento soluble que contienen el centro activo (276) cuyo peso oscila entre 52.000 y 53.000 daltons y que ha sido purificado a homogeneidad en diversos tejidos (23).

Basándose en los estudios sobre la proteólisis del protómero, mediante tratamiento informático de la secuencia aminoacídica deducida, Liscum y col. propone un modelo de estructura secundaria que se presenta en el Esquema III, (218).

La proteína está dividida en dos dominios: un dominio de 62.000 daltons (548 residuos) que contiene el extremo carboxi-terminal, orientado al citosol, relativamente hidrofílico, en el que se encuentra el centro activo; y un dominio de 35.000 daltons (339 residuos) en el que hay siete regiones muy conservadas, altamente hidrofóbicas que atraviesan la membrana con el extremo amino terminal, menos hidrofóbico, localizado en el lumen del retículo endoplasmático, de esta zona (residuo 281) pende una cadena de carbohidratos, rica en manosas (217). El dominio citosólico es el responsable de la actividad del enzima, en tanto que el dominio hidrofóbico es fundamental en el anclaje de la proteína al retículo endoplasmático

Para la localización subcelular del enzima se han utilizado principalmente técnicas de centrifugación isopícnica en gradientes de densidad en sacarosa y microscopía electrónica, previa inmunoprecipitación con anticuerpos específicos marcados con [^{195}Au]-proteína A (258), o por inmunofluorescencia (302). Estos trabajos confirman que la HMG-CoA reductasa es una proteína del retículo endoplasmático

REPRESENTACION DE LA ESTRUCTURA DE LA HMG-CoA REDUCTASA



ESQUEMA III

Modelo estructural de la posible orientación del dominio hidrofóbico del enzima HMG-CoA reductasa en la membrana del retículo endoplasmático. Siete regiones hidrofóbicas (rectángulos claros) cruzan la membrana plasmática, y dos regiones menos hidrofóbicas se extienden una hacia el lumen (extremo amino terminal) y otra hacia el citosol (extremo carboxi terminal). Entre las regiones hidrofóbicas 6-7 que cruzan la membrana encuentra un oligosacárido unido por un enlace N- al aminoácido 281. La proteólisis parcial por proteasas endógenas de la región citosólica puede dar lugar a dos tipos de proteínas (62 kDa ó 53 kDa) según el lugar de rotura en la cadena aminoacídica, Liscum y col. (218).

1.3.2. Purificación

La purificación de HMG-CoA reductasa a partir de microsomas de hígado de rata ha implicado hasta ahora la rotura del protómero, por acción de proteasas endógenas, y la liberación del fragmento citosólico soluble que contiene el centro catalítico. La rotura puede evitarse por la presencia de inhibidores de proteasas como leupeptina y antipaina (252)(187). El método más utilizado para solubilizar la proteína es la utilización conjunta de la proteólisis producida por las proteasas endógenas y la rotura de los microsomas producida por congelación/descongelación brusca (150). Kleinsek y col. (197) presentan una revisión de los distintos métodos empleados para la solubilización y purificación a homogeneidad del enzima. El fragmento citosólico ha sido purificado a homogeneidad a partir de microsomas de hígado de rata y de hígado humano.

El enzima nativo, de 92.000 daltons, ha sido solubilizado en presencia de inhibidores de proteasas con la ayuda de detergentes no iónicos. Sin embargo, no ha sido purificado a homogeneidad (187). En cuanto al enzima HMG-Coa reductasa (E.C.1.1.1.88) ha sido purificado a homogeneidad a partir de levadura (278) y de bacterias (284).

1.3.3. Regulación del enzima HMG-CoA reductasa

Ya que la expresión de la actividad HMG-CoA reductasa es un punto clave en la homeostasis del colesterol, son de esperar múltiples mecanismos de control que permitan hacerla sensible a las necesidades celulares.

Aunque se hace difícil, y resulta en ocasiones forzado, separar y clasificar los mecanismos que actúan sobre la regulación de la HMG-CoA reductasa, los agruparemos en dos en vistas a simplificar la exposición : los que determinan o modifican la cantidad de enzima, y los que influyen en su grado de actividad.

Los primeros regulan la concentración celular de enzima a través de la modificación del equilibrio síntesis/degradación y son mecanismos de control a largo término. Los segundos modulan la actividad del enzima existente, ya sea modificando su conformación espacial o influyendo en sus propiedades catalíticas a través de modificaciones covalentes, como es la fosforilación/desfosforilación reversible, o de efectores como proteínas y lípidos inhibidores o por la acción de tioles. Son en general mecanismos de regulación a corto término.

Los distintos mecanismos de control están íntimamente interrelacionados entre sí. A modo de ejemplo: la modificación covalente por fosforilación/desfosforilación no sólo incide en la expresión de la actividad sino que a su vez es una señal para la degradación del enzima (266)(267)(226). Por otra parte la composición y el contenido en colesterol de la membrana incide tanto sobre la actividad como sobre la síntesis o degradación (266) (127).

En último extremo la regulación del enzima está eficazmente controlada por el colesterol o el hidroxicolesterol y los intermediarios metabólicos de su vía biosintética, ejerciendo un control feed-back negativo a distintos niveles. Los estudios de Liscum y col. (217) indican que en primer lugar el colesterol suprime la transcripción del gen de la HMG-CoA reductasa. Pero además el colesterol, por sí solo puede modificar la fluidez de la membrana y con ello el grado de exposición del dominio citosólico del enzima a las proteasas y por ende alterar la conformación del centro catalítico del mismo.

1.4. REGULACION DE LA CONCENTRACION DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA

La regulación a largo término de la actividad HMG-CoA reductasa conlleva cambios en la masa de enzima; lo que a su vez implica cambios en la velocidad de síntesis y degradación. Los ensayos se han realizado en gran parte en células en cultivo de distinto origen en las que se estudia el efecto de los distintos estímulos, con la ayuda de técnicas que frecuentemente implican la utilización de anticuerpos y/o sondas de cDNA.

1.4.1. Endocitosis mediada de LDL

Se han realizado experimentos en células en cultivo a las que se suministra colesterol a través de su incorporación por endocitosis mediada de las LDL. Estas células se mantienen viables, ya que la inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa no es total y por ello la síntesis de otros derivados del mevalonato, como dolicoles, ubiquinonas o compuestos poliisoprenicos, alcanza nivel suficiente para satisfacer las necesidades celulares.

En células en cultivo a las que se suministra colesterol a través de LDL, la cantidad de HMG-CoA reductasa disminuye, tanto por disminución de la síntesis como por aumento de la degradación (102). En células UT-1 disminuyen los niveles de RNAm de HMG-CoA reductasa, causando una regresión del retículo endoplasmático (58)(59)(258). En fibroblastos la endocitosis de LDL produce un aumento de la ACAT, a la vez que disminuye la cantidad de HMG-CoA reductasa y disminuyen los receptores de las LDL, indicando un mecanismo coordinado de control de las tres proteínas (48)(290). En fibroblastos genéticamente deficientes en receptores de LDL, aparece una elevada actividad HMG-CoA reductasa (61).

1.4.2. Compactina y mevilonina

Los compuestos compactina (58) y mevilonina (301) son potentes inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa. Bloquean la producción de mevalonato y con ello no sólo la de coles-

terol sino también la de los precursores del colesterol y productos como ubiquinona, dolicol e isopentenil-RNA. A la acción de estos inhibidores la célula responde aumentando la síntesis de HMG-CoA reductasa y disminuyendo la degradación del enzima.

La compactina ha sido utilizada en medios de crecimiento celulares para seleccionar, a partir de células de ovario de hamster (CHO), una línea de células, células UT-1, en las que se produce una amplificación de 15 veces del gen de la HMG-CoA reductasa y un aumento de la velocidad de transcripción de cada copia del gen, obteniéndose un número de moléculas de RNAm al menos 100 veces mayor que el de las células CHO. En estas células UT-1 se produce un aumento de la síntesis de HMG-CoA reductasa (x 500 veces las cantidades iniciales) y la proliferación del retículo endoplasmático, que presenta en estas condiciones una estructura particular de tipo cristaloides. Si a estas células se les suministra colesterol, a través de LDL, la acción se revierte. Ello remarca la interrelación que existe entre la biosíntesis de colesterol y la generación de membranas (58).

1.4.3. Mevalonato

La adición de mevalonato, a concentraciones milimolares, tiene los mismos efectos que la endocitosis de LDL (103). La incubación de hepatocitos con mevalonolactona produce una reducción del 40 % en la velocidad de incorporación de aminoácidos radioactivos al polipéptido de 97 kDa, al tiempo que se produce un aumento de 3 veces en la velocidad de degradación, (98)(301)(272).

En ensayos realizados en nuestro Laboratorio se ha demostrado que la incubación de hepatocitos en presencia de 10 mM mevalonolactona causa una disminución de la velocidad de síntesis y un incremento en la velocidad de degradación. La rápida disminución de la actividad HMG-CoA reductasa, aproximadamente en 20 minutos está asociada con un aumento en la fosforilación (incorporación de ^{32}P) del enzima HMG-CoA reductasa microsomal (92 kDa), lo que sugiere que en el mecanismo de degradación del enzima puede estar implicada la fosforilación del mismo (226).

En células de ovario de hamster incubadas con esteroides procedentes de LDL y compactina, las cantidades de enzima se mantienen elevadas y la célula puede mantener la síntesis de esteroides de colesterol gracias al aporte externo de esteroides. Cuando en estas condiciones las células reciben exceso de mevalonato, se produce una inhibición prácticamente total de la HMG-CoA reductasa (249). Esta supresión se debe, en un 80 %, a la menor traducción de los RNAm y al mismo tiempo al aumento de la degradación del enzima.

El efecto combinado de dos mecanismos a saber, los esteroides reprimen la transcripción del gen, y los productos no esteroides derivados del mevalonato inhiben la traducción de los RNA mensajeros, puede hacer disminuir cientos de veces la cantidad de HMG-CoA reductasa presente en las células animales.

1.4.4. Esteroides

La hipótesis de que los esteroides pueden regular la biosíntesis del colesterol a través de la modulación de la actividad del enzima HMG-CoA reductasa, fue propuesta en primer lugar por Kamdustch en 1973, 1974 (180)(181). Hoy se sabe que los esteroides actúan a dos niveles: disminuyen la transcripción del gen y aumentan la degradación del enzima.

a) Disminución de la transcripción del gen

Los esteroides disminuyen los niveles de RNAm de la HMG-CoA reductasa. De la disminución de la transcripción es responsable una corta secuencia que flanquea la región 5' del gen que codifica el enzima, ya que cuando se altera la secuencia por técnicas de DNA recombinante, la transcripción del gen se vuelve constitutiva y no es suprimida por esteroides, (259)(67).

b) Aumento de la degradación del enzima

Se ha estudiado ampliamente la acción de los oxisteroides sobre la degradación del enzima. Los oxisteroides apare-

cen en cantidades muy pequeñas durante la síntesis de colesterol, como intermediarios metabólicos. Se producen endógenamente por oxidación enzimática controlada del colesterol presintetizado, como intermediarios en la demetilación del lanosterol, o como productos del metabolismo del escualeno, vía escualeno 2,3:22,23-dioxido (264).

El oxiesterol mejor estudiado es el 25-hidroxicoles-terol. Provoca una disminución de la síntesis y un aumento de tres veces en la degradación, tanto en fibroblastos normales como en células UT-1 (103)(97). La degradación lleva consigo la desaparición del enzima y la posterior destrucción de la estructura cristaloiide del retículo endoplasmático. Estudios de Chin y col. (61) en células mutantes ponen de manifiesto que los esteroides aceleran la degradación de la HMG-CoA reductasa, independientemente de cualquier otro efecto inhibitor sobre la síntesis.

Martin y col. (228), utilizando derivados solubles del colesterol, concluyen que éstos causan directamente una disminución de la cantidad de enzima HMG-CoA reductasa. Los derivados solubles no afectan a la actividad ya que no provocan cambios en la composición de la membrana y por lo tanto en el entorno del enzima, ni cambios en la modificación covalente por fosforilación/desfosforilación (323). La acción de los derivados solubles se realiza a través de la disminución de RNAm de la HMG-CoA reductasa.

El dominio hidrofóbico anclado en la membrana del retículo endoplasmático es fundamental para la correcta localización del enzima y para la degradación mediada por esteroides. Experimentos con genes deleccionados en la región que codifica para el dominio hidrofóbico de la HMG-CoA reductasa, producen una proteína soluble con larga vida media y cuya degradación no se ve acelerada por la acción de esteroides. El anclaje de la proteína a la membrana del retículo endoplasmático es pues necesario para que se produzca la degradación del enzima (127).

También se han construido genes híbridos integrados por la región que codifica para el dominio hidrofóbico de la HMG-

CoA reductasa y la región que codifica para el enzima soluble con actividad β -galactosidasa. La expresión de este gen en células UT-1 produce una proteína de fusión (HMGal) localizada en el retículo endoplasmático que tiene actividad β -galactosidasa regulable por esteroides. Cambios puntuales en los nucleótidos que codifican para los residuos 64, 85 y 98 del dominio hidrofóbico de la HMG-CoA reductasa no alteran el anclaje en la membrana de la (HMGal) y sin embargo anulan el efecto de los esteroides (304).

Observaciones de Orci y col. (258) en células UT-1, indican que el colesterol puede ser una señal para la destrucción de la HMG-CoA reductasa, al tiempo que se produce la destrucción del retículo endoplasmático cristaloide.

1.4.5. Derivados no esteroides del mevalonato

En células en cultivo a las que se suministra esteroides en forma de LDL, la supresión de la actividad HMG-CoA reductasa no es completa y la célula puede sintetizar suficiente cantidad de mevalonato que es utilizado con preferencia en la síntesis de productos no esteroídicos. El isopentenil adenosina es uno de los metabolitos no esteroides de la síntesis del colesterol (102), (véase Esquema II).

En fibroblastos humanos incubados en presencia de compactina, se ha demostrado que la isopentenil adenosina produce los mismos efectos que el mevalonato, que es capaz de abolir la actividad residual HMG-CoA reductasa en células incubadas con compactina y con niveles saturantes de LDL. La total supresión de la actividad HMG-CoA reductasa requiere colesterol (LDL) y mevalonato o un producto de su metabolismo, isopentenil adenosina. La isopentenil adenosina forma parte del isopentenil RNA.

Una forma eficaz de disminuir la concentración de enzima es suprimiendo la traducción. Se ha demostrado (272) que en células que no son capaces de sintetizar mevalonato por un defecto genético en el enzima HMG-CoA sintasa, cuando en las células hay un exceso de colesterol y al mismo tiempo suficiente cantidad de mevalonato para satisfacer los requerimientos celu-

lares de la síntesis de compuestos no esteroídicos, la síntesis de HMG-CoA se inhibe hasta valores inferiores a los que corresponden por la cantidad de RNA mensajeros presentes. Esta desproporción puede deberse a una supresión de la traducción, en la que pueden estar implicados compuestos no esteroídicos derivados del mevalonato, como isopentenil-RNA, (129).

En la célula, empero, la acción de los derivados no esteroídicos no puede desligarse de los derivados esteroídicos del mevalonato. Trabajos recientes de Nakanishi y col. (249), en células CHO, a las que se les suministra compactina y LDL, indican que tanto los derivados esteroídicos como los no esteroídicos pueden actuar de forma acumulativa. Los esteroides suprimen de forma incompleta la transcripción del gen por represión parcial y los derivados no esteroídicos reducen la traducción de RNA mensajero, disminuyendo los niveles de HMG-CoA reductasa (67). Tanto unos como otros actúan al unísono aumentando la degradación de la proteína HMG-CoA reductasa. La combinación de los mecanismos de control transcripcional y postranscripcional permiten un amplio rango de concentraciones de HMG-CoA reductasa en las células animales.

1.4.6. Ritmo circadiano

La cantidad de HMG-CoA reductasa en rata está expuesta a evolución diaria (ciclo circadiano) observándose cambios de hasta 10 veces en la concentración de enzima, con máxima actividad en la fase oscura y la mínima en la fase de luz. Esta variación está relacionada con los hábitos nutricios del animal, que se alimenta cuando se inicia el período de oscuridad. La cantidad de HMG-CoA reductasa disminuye durante el ayuno y aumenta en ratas alimentadas. Diversos autores coinciden en que estas variaciones son inducidas por la insulina, y se deben a cambios en la velocidad de síntesis ya que no se modifica la velocidad de degradación. El aumento de HMG-CoA reductasa se corresponde con un aumento de RNAm, lo que es más evidente cuando las ratas se alimentan con colestiramina o mevilonina o con ambas (322)(98) (65)(66).

La variación de la cantidad de enzima es uno de los factores que se aprovechan cuando se purifica HMG-CoA reductasa, haciendo coincidir el máximo de actividad (6 horas después de iniciado el ciclo nocturno) con el sacrificio. Las variaciones diurnas de la cantidad de HMG-CoA reductasa se acompañan también de variaciones en la actividad expresada respecto a la potencial actividad total (94).

El enzima localizado en peroxisomas presenta un ritmo circadiano desfasado del que presenta el enzima del retículo endoplasmático, lo que sugiere mecanismos de regulación distintos (291).

1.4.7. Control hormonal

Los estudios sobre control hormonal se han desarrollado tanto en animal como en células en cultivo. Dos de las hormonas más estudiadas han sido la insulina y el glucagon, y se han relacionado con las variaciones diurnas del enzima.

El efecto del glucagon sobre la actividad HMG-CoA reductasa parece no detenerse en los procesos de regulación a corto plazo, implicando además disminución de la velocidad de síntesis. Edwards y col. (99) demuestran que la disminución de actividad en hepatocitos aislados tras tratamiento con glucagon se debe a la inhibición de la síntesis, sin cambios en la velocidad de degradación. Trabajos de Sample y col. (293), sugieren que la insulina puede actuar incrementando la cantidad de HMG-CoA reductasa presente en la célula.

1.5. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA POR FOSFORILACION/DESFOSFORILACION

De entre los mecanismos de control a nivel postrans-^xduccional de la actividad HMG-CoA reductasa, el más estudiado es el de inhibición/activación por procesos de fosforilación/desfosforilación reversible. La fosforilación/desfosforilación es uno de los mecanismos más frecuentes de modificación covalente de proteínas. No sólo la actividad HMG-CoA reductasa está regulada a corto plazo por el grado de fosforilación sino también otros enzimas del metabolismo del colesterol. Se ha descrito regulación a corto término por fosforilación reversible de los enzimas ACAT, colesterol 7- α -hidrolasa, y colesterol ester hidrolasa (CEH). De esta forma, la regulación a corto plazo de la actividad HMG-CoA reductasa puede estar coordinada con otros enzimas, sensibles tanto a niveles endocrinos como a señales feed-back, y su regulación coordinada por fosforilación/desfosforilación puede jugar un importante papel en el mantenimiento de los niveles fisiológicos de colesterol celular no esterificado.

Un gran número de laboratorios han estudiado la fosforilación "in vitro" de la HMG-CoA reductasa en distintos tejidos de diversos animales, incluido hígado humano y células en cultivo (20)(32)(33)(254)(166)(164)(263)(298)(50)(25)(257)(147)(27).

Recientemente se han publicado varias revisiones sobre la regulación de la HMG-CoA reductasa por fosforilación reversible, Kennelly y Rodwell (188), Gibson y Parker (122), Beg y col. (28), Zammit y Easom (351).

Nuestro Laboratorio ha sido uno de los pioneros en demostrar la importancia de la fosforilación del enzima: en 1978 Bové y Hegardt (41) incuban por primera vez microsomas de hígado de rata con [32 P]ATP-Mg²⁺ y demuestran que la actividad HMG-CoA^x reductasa en microsomas disminuye de forma paralela a la incorporación de radioactividad a las proteínas microsomales. La acción se revierte cuando se añade citosol al medio de incubación. Estos trabajos son confirmados por Keith y col (183). Dos

años más tarde, Gil y col. (124) purifican la HMG-CoA reductasa fosforilada e inactivada con [^{32}P]ATP-Mg $^{2+}$, obteniendo homogéneo el fragmento proteolítico de 53 kDa y demostrando por electroforesis en condiciones no denaturantes que la radioactividad va ligada a la actividad HMG-CoA reductasa. La incubación con proteín fosfatasas parcialmente purificadas de citosol implica la pérdida de radioactividad y al mismo tiempo la reactivación del enzima. El laboratorio de Rodwell, Rogers y col. (285) y Keith y col. (183) llega a análogas conclusiones.

A partir de la puesta a punto de un método para la obtención de HMG-CoA reductasa homogénea de elevada radioactividad específica, Font y col. (114) tripsinizan la HMG-CoA reductasa marcada radioactivamente, separando por electroforesis dos péptidos radioactivos. Keith y col. (184) un año más tarde, confirma los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, siendo localizados los fosfatos en residuos de serina

Como hemos expuesto, la fosforilación "in vitro" de la HMG-CoA reductasa es un hecho bien establecido. Sin embargo su importancia fisiológica es una cuestión controvertida, llegando algunos autores a cuestionar su transcendencia "in vivo". El estudio de los procesos de fosforilación "in vivo" implican una serie de dificultades técnicas que radican principalmente en cuantificar la actividad del enzima en células intactas, ya que es necesario detener la acción de quinasas y fosfatasas simultáneamente, utilizando soluciones tamponadas con suficiente concentración de EDTA y NaF, inhibidores clásicos de PrQ y PrP respectivamente. Por otro lado, la actividad expresada en condiciones fisiológicas puede ser solo del 10-20 % de la actividad que se expresa si la HMG-CoA reductasa está totalmente reactivada. La baja relación actividad expresada/actividad total dificulta la cuantificación de pequeños cambios como respuesta a manipulaciones en la dieta o en el tratamiento hormonal "in vivo". A pesar de las dificultades se han realizado estudios, en cultivos celulares y en hepatocitos aislados, cuantificando variaciones de actividad en respuesta a insulina y/o glucagon (167)(27).

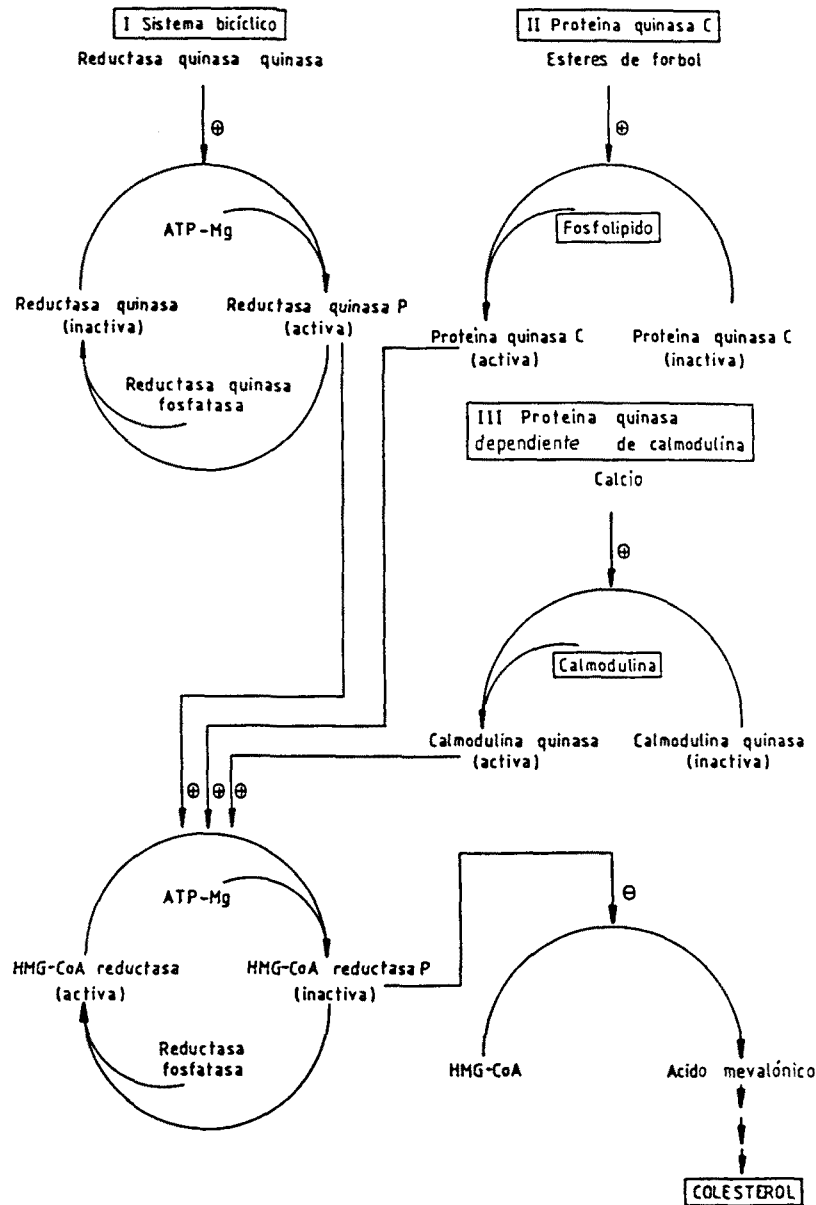
A pesar de las dificultades que entraña la cuantificación de las actividades "in vivo", existe suficiente consenso sobre la importancia fisiológica de la fosforilación reversible, especialmente en los procesos de regulación a corto plazo. Veamos qué enzimas intervienen en el mecanismo de la fosforilación/desfosforilación.

1.5.1. HMG-CoA proteín quinasas

Frecuentemente las PrQ catalizan la transferencia de fosfatos a más de una proteína sustrato y, viceversa, una proteína sirve de sustrato para más de una PrQ. En este último caso, distintas PrQ catalizan la fosforilación de los mismos lugares, si bien es más común el caso de que cada PrQ fosforile preferentemente ciertos centros. Así, las PrQ muestran un moderado grado de especificidad para sus sustratos, lo que no sucede en general con las PrP.

En el proceso de fosforilación "in vitro" de la HMG-CoA reductasa están implicados tres sistemas de fosforilación que incluyen tres PrQ distintas: HMG-CoA reductasa quinasa, proteín quinasa C y proteín quinasa dependiente de calcio y calmodulina, (véase Esquema IV). Otras PrQ, como la dependiente de AMPc, no han demostrado, hasta el momento, capacidad fosforilante sobre este sustrato (169).

**MODELO DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA
POR TRES DISTINTAS PROTEIN QUINASAS**



ESQUEMA IV

Modelo de regulación del enzima HMG-CoA reductasa por tres distintas protein quinasas: HMG-CoA reductasa quinasa, protein quinsa C y protein quinsa dependiente de calmodulina, Beg y col. (29).

1.5.1.1. HMG-CoA reductasa quinasa

Los primeros trabajos que reseñan actividad HMG-CoA reductasa quinasa se deben a Nordstrom y col. (254). Más tarde, Beg y col. (21)(24) purifican, a partir de citosol de hígado de rata, dicha actividad. La proteína nativa muestra, en gel filtración, un peso molecular aproximado de 380 kDa y en geles de electroforesis en presencia de SDS, una única banda de 58 kDa. También demuestran la presencia de actividad HMG-CoA reductasa quinasa en microsomas de hígado humano.

En nuestro Laboratorio se han realizado trabajos que han conducido a la purificación del enzima HMG-CoA reductasa prácticamente a homogeneidad, tanto a partir de citosol como de microsomas (107), presentando ambas proteínas idénticas características moleculares y enzimáticas, lo que sugiere una única especie. La actividad localizada en microsomas se debe a la eventual unión del enzima citosólico a las membranas microsomales (168). La HMG-CoA reductasa quinasa purificada en nuestro Laboratorio muestra un peso molecular aparente de 210 kDa y fosforila la HMG-CoA reductasa exclusivamente en residuos de serina. La incorporación de ^{32}P a partir de [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP al enzima HMG-CoA reductasa se acompaña de la inactivación del mismo (107).

a) Enzima dependiente de nucleótidos

El ADP es un activador alostérico de la HMG-CoA reductasa quinasa. Se requiere la presencia de ATP y ADP para que el enzima muestre máxima actividad. Harwood y col. (146) sugieren que los dos nucleótidos se une a lugares distintos del enzima. El ADP puede ser sustituido ventajosamente por AMP, siendo la afinidad 20 veces superior para este segundo nucleótido, con una K_m tres veces mayor.

El AMP actúa como activador a concentraciones micromolares, aumentando no sólo la actividad sino también el grado de fosforilación del enzima HMG-CoA reductasa (108). El trabajo realizado por Ferrer y col. (109)(111) con el compuesto fluorosulfonilbenzoiladenosina, FSBA, análogo sintético de nucleótidos,

indica que en la subunidad del enzima HMG-CoA reductasa quinasa se encuentran dos centros, uno catalítico y otro alostérico, siendo el AMP en presencia de Mg^{2+} el mejor activador del enzima. Hardie y col. proponen que la HMG-CoA reductasa quinasa, es el mismo enzima que fosforila otro sustrato clave del metabolismo lipídico, la acetil-CoA carboxilasa, y por ello la denominan por su activador alostérico: proteína quinasa activable por AMP, y no por el sustrato fosforilado. Esta proteína quinasa activable por AMP puede formar parte de una cascada que incide tanto en el metabolismo del colesterol como el de los ácidos grasos. De esta forma la regulación coordinada de la HMG-CoA reductasa y la acetil-CoA carboxilasa controlaría la síntesis de los dos principales componentes de las VLDL. Los mismos autores han localizado la secuencia de la acetil-CoA carboxilasa fosforilada por la proteína quinasa activable por AMP, esta secuencia no parece estar presente en la HMG-CoA reductasa. La actividad HMG-CoA reductasa quinasa es independiente de AMPc (168), calcio, calcio más calmodulina o calcio más fosfolípidos (110).

b) Enzima interconvertible por fosforilación/desfosforilación

Los primeros trabajos que indican la posibilidad de que la HMG-CoA reductasa quinasa sea un enzima interconvertible por fosforilación/desfosforilación datan de 1978 y se deben a Ingebritsen y col. (166). En 1979 Beg y col. (21) y más tarde Ingebritsen y col. (169) proponen un esquema de regulación de la HMG-CoA reductasa a través de un sistema bicíclico en que intervienen HMG-CoA reductasa quinasa quinasa y HMG-CoA reductasa quinasa fosfatasa, (véase Esquema V).

La fosforilación del enzima HMG-CoA reductasa quinasa por la HMG-CoA reductasa quinasa quinasa provoca su activación de forma paralela a la incorporación de ^{32}P (inversamente a lo que sucede en el enzima HMG-CoA reductasa) y la desfosforilación su inhibición. Hasta el momento no ha sido posible la purificación a homogeneidad de los enzimas HMG-CoA reductasa quinasa quinasa y HMG-CoA reductasa quinasa fosfatasa. Sin embargo proteínas fosfatasas purificadas utilizando como sustrato glucógeno sintasa ó glu-

cógeno fosforilasa son capaces de desfosforilar la HMG-CoA reductasa quinasa, así la PrP 2C (170) (172).

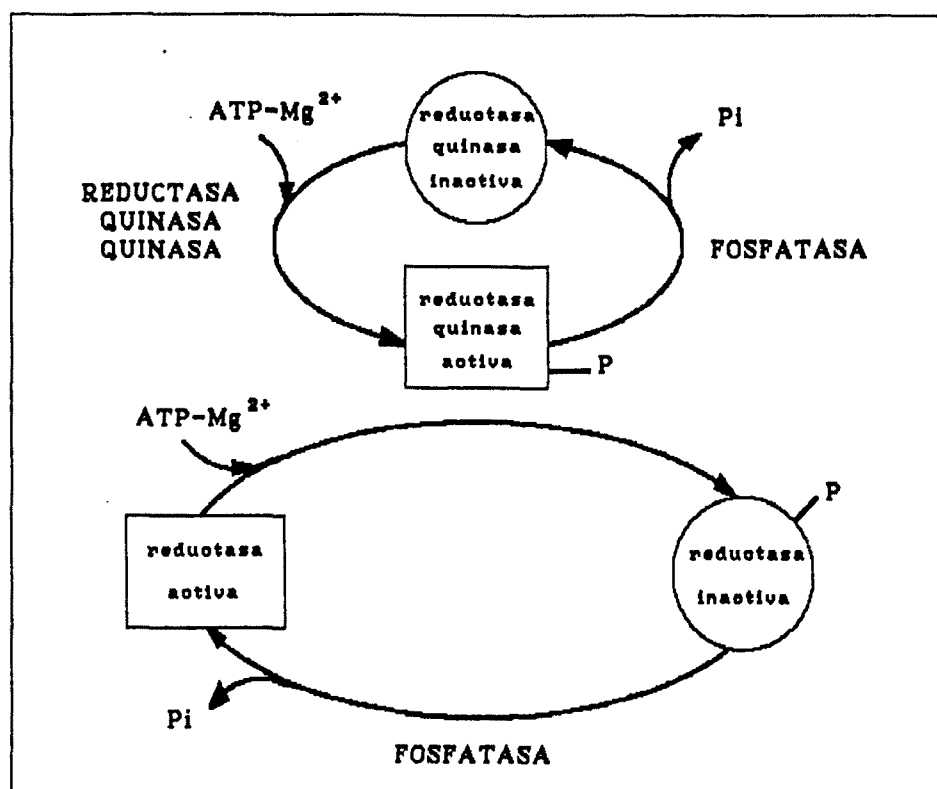
1.5.1.2. Proteín quinasa C

La proteín quinasa C es una PrQ dependiente de calcio y fosfolípidos, presente en las fracciones soluble y microsomal del tejido hepático (253). La actividad de esta PrQ se ve estimulada en condiciones fisiológicas al aumentar los niveles de diacilglicerol. La producción de diacilglicerol por hidrólisis de fosfatidilinositol es sensible a gran número de efectores: agentes colinérgicos, α -adrenérgicos, péptidos hormonales y factores de crecimiento. La PrQ C responde igualmente a la acción de agentes tumorales como los esteres de forbol.

Recientemente la PrQ C se ha mostrado capaz de fosforilar un gran número de sustratos, entre ellos tanto la forma soluble (53 kDa) como la nativa de la HMG-CoA reductasa (93 kDa). La máxima incorporación de fosfato enzima se produce cuando se incorpora 1 mol de fosfato por mol de enzima nativo (26). El interés que suscita la PrQ C en la regulación de la HMG-CoA reductasa es patente dado que "in vivo", la HMG-CoA reductasa puede responder en un corto plazo de tiempo a la acción de un gran número de efectores.

1.5.1.3. Proteín quinasa dependiente de calcio y calmodulina

Beg y col. (26) han purificado a partir de cerebro de rata una PrQ dependiente de calcio y calmodulina. Esta PrQ de 110 kDa desfosforila tanto la forma nativa (93 kDa) como la forma proteolizada (53 kDa) de la HMG-CoA reductasa. También es activa sobre otros dos sustratos: histona-1 y sinapsina. La PrQ dependiente de calcio y calmodulina incorpora entre 0,35 y 0,5 mols de fosfato por mol de enzima HMG-CoA reductasa. La incorporación de fosfatos conlleva la pérdida de actividad de la HMG-CoA reductasa.

SISTENA BICICLICO DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA**ESQUEMA V**

Regulación por fosforilación/desfosforilación reversible del enzima HMG-CoA reductasa. Los enzimas activos se representan como cuadrados y los inactivos como círculos.

La actividad HMG-CoA reductasa está regulada por dos enzimas, una HMG-CoA reductasa quinasa específica y una HMG-CoA reductasa fosfatasa específica o no. A su vez la actividad HMG-CoA reductasa quinasa está regulada por una HMG-CoA reductasa quinasa quinasa y por una proteína fosfatasa específica o no, Ingebritsen y col. (169).

1.5.2. HMG-CoA reductasa fosfatasas

En el Apéndice I presentamos los trabajos de mayor interés publicados sobre HMG-CoA reductasa fosfatasas. La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa ha sido objeto de extenso estudio en nuestro Laboratorio, fruto del cual son los trabajos de Gil y col. (124)(125), Calvet y col. (52) y Sitges y col. (303).

1.5.2.1. HMG-CoA reductasa fosfatasas citosólicas

Los primeros trabajos que se refieren a actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa datan de 1973 (20). En ellos se describe cómo la actividad HMG-CoA reductasa disminuye al incubar microsomas y citosol en presencia de ATP-Mg²⁺; la actividad se recupera en ausencia de ATP-Mg²⁺. La capacidad mostrada por el citosol en reactivar la HMG-CoA reductasa es suprimida por NaF, potente inhibidor de PrP.

La actividad citosólica ha sido parcialmente purificada por Nordstrom y col. (254). Las primeras evidencias concluyentes sobre la presencia de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en citosol se han realizado en nuestro Laboratorio: al incubar el enzima en presencia de la fracción citosólica y desfosforilar HMG-CoA reductasa marcada con ³²P, se obtiene aumento de actividad concomitante con la pérdida de radioactividad (123). La continuidad de estos trabajos ha permitido purificar de forma parcial y caracterizar cuatro PrP.

Las HMG-CoA reductasa fosfatasas citosólicas (I₁, I₂, I₃ y II₁) tienen unos pesos moleculares aparentes en gel filtración de 180, 200, 250 y 180 kDa respectivamente. El tratamiento con etanol provoca su rotura y se obtienen las formas catalíticas de bajo peso molecular. Las HMG-CoA reductasa fosfatasa I₁, I₃ y II₁ se clasifican como PrP tipo 2, ya que desfosforilan la subunidad α de la fosforilasa quinasa. La fosfatasa I₂ se cataloga como PrP tipo 1 al desfosforilar preferentemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa. La clasificación se refuerza con los resultados obtenidos en presencia de inhibidor 2 (52).

Las cuatro PrP purificadas, tanto las formas de alto peso molecular como las catalíticas, no muestran especificidad de sustrato y desfosforilan también la glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa. Los estudios hasta ahora realizados con diversos cationes y nucleótidos sobre la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, no permiten conferirles un carácter modulador específico de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa que lleve a la regulación de su actividad a nivel fisiológico (148).

Los sustratos HMG-CoA y NADPH inhiben la desfosforilación del enzima HMG-CoA reductasa por HMG-CoA reductasa fosfatasas (104). Estos compuestos "in vitro" son capaces de inhibir la desfosforilación (activación) del enzima HMG-CoA reductasa, bien por PrP citosólicas o bien por fosfatasa ácida de patata. Ello se debe a una selectiva protección de los centros de fosforilación de la HMG-CoA reductasa. El sustrato HMG-CoA puede unirse a las PrP en dos centros: el centro catalítico, que es bloqueado totalmente por compuestos como la compactina o la mevilonina, y al centro alostérico al cual sólo es capaz de unirse el sustrato. La unión de HMG-CoA al centro alostérico inhibe la activación de HMG-CoA reductasa por PrP. La unión del enzima HMG-CoA reductasa con sus sustratos puede producir un cambio en la conformación del enzima que limita la accesibilidad de las PrP al aminoácido fosforilado. No se conoce la importancia de este hecho "in vivo" (106).

1.5.2.2. HMG-CoA reductasa fosfatasas microsomales

La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y su relación con el precipitado microsomal se pone de manifiesto al incubar microsomas en presencia de EDTA, Mg^{2+} y sulfito sódico. Ello provocaba un aumento de la actividad HMG-CoA reductasa, la activación queda inhibida en presencia de 0.1 M fluoruro lo que indica que están implicadas PrP (221).

Posteriormente Feingold y col. (105) demuestran la presencia de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en microsomas de hígado de rata obtenidos por ultracentrifugación y por preci-

pitación cálcica, tanto en la fracción del retículo endoplasmático liso como rugoso. La ausencia de actividad marcadora glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 5'-nucleotidasa confirmaban que la actividad purificada no se debe a una contaminación citosólica ni a membranas plasmáticas.

Brown y Rodwell (50) inician estudios sobre la distribución de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en hígado de rata. Obtienen citosol por centrifugación a alta velocidad y del precipitado de 100.000 xg separan microsomas y glucógeno por decantación. En estas tres fracciones, citosol, microsomas y glucógeno encuentran actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en proporción 75, 14 y 3 % respecto a un 100 % en el extracto inicial. Los mismos ensayos realizados con sustrato glucógeno fosforilasa presentan una relación de 100, 14 y 0 % respectivamente.

La primera purificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa asociada a microsomas se realiza en nuestro Laboratorio. A partir extractos obtenidos a partir de hígado de rata, se obtiene por centrifugación a 100.000 xg, un precipitado del que se separan microsomas y glucógeno. De la fracción microsomal se solubiliza, con Triton X-100, la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. Los ensayos de actividades marcadoras demuestran que no se trata de una contaminación de otras membranas o de citosol. El soluble obtenido con Tritón X-100 se somete a cromatografía en DEAE-celulosa, fosfocelulosa P-11 y Aminohexil Sepharosa 4B, separándose tres actividades denominadas HMG-CoA reductasa fosfatasa E_r, I_n y II_n, con pesos moleculares aparentes por gel filtración de 90, 75 y 180 kDa. La actividad E_r se excluye de la cromatografía en DEAE-celulosa. Las otras dos actividades se separan en DEAE-celulosa con un gradiente salino. Las tres actividades son capaces de desfosforilar la HMG-CoA reductasa marcada radioactivamente con ³²P, demostrándose que la desfosforilación implica aumento paralelo de la actividad del enzima (303). Posteriores trabajos realizados por Teresita Royo, y orientados a caracterizar las tres PrP microsomales, demuestran que estas PrP pueden desfosforilar otros sustratos como glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa y que las actividades coeluyen a lo largo de la purificación.

Partiendo de microsomas de hígado de rata, Diven y col. (86) solubilizan mediante colato sódico una actividad proteín fosfatasa. La actividad solubilizada se ensaya para sustrato HMG-CoA reductasa y también para otros enzimas regulables por fosforilación/desfosforilación del metabolismo del colesterol como ACAT y colesterol 7- α -hidrolasa. Sobre cada sustrato la actividad PrP muestra distinta actividad específica. El enzima solublizada se fracciona por cromatografía en DEAE-Celulosa, excluyéndose gran parte de la actividad, siendo posible eluir el resto mediante un gradiente salino. Las distintas fracciones son parcialmente caracterizadas frente a dos efectores: NaF y tartrato. De los resultados se concluye que las distintas actividades son isoenzimas.

1.5.2.3. Especificidad de las HMG-CoA reductasa fosfatasas

Debido a la escasa especificidad de las proteín fosfatasas, gran número de las purificadas para otros sustratos y de muy diverso origen, son capaces de desfosforilar la HMG-CoA reductasa. En 1976, Lee y col. (213) reactivan HMG-CoA reductasa con glucógeno fosforilasa fosfatasa purificada parcialmente. Fosfatasas de muy diverso origen son igualmente capaces de desfosforilar nuestro sustrato, así la fosfatasa ácida de patata (275) y la fosfatasa alcalina obtenida de *E. coli* (46).

Ingebritsen y col. (169) purifican parcialmente a partir de hígado de rata, la subunidad catalítica de la PrP 2C, véase apartado 1.7.4. y con ella desfosforilan el enzima HMG-CoA reductasa. El mismo grupo demuestra que las PrP de hígado de rata o de músculo de conejo clasificadas como PrP 2A y PrP 1, son capaces de desfosforilar tanto el enzima HMG-CoA reductasa como la HMG-CoA reductasa quinasa. De estas PrP la 2C es la que muestra mayor especificidad sea para la HMG-CoA reductasa o HMG-CoA reductasa quinasa. Concluyen que las PrP que desfosforilan estos sustratos no son únicas y específicas y que participan a la vez en la glucólisis, la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos y proteínas. De forma inversa, las HMG-CoA reductasa fosfatasa purificadas a partir de hígado de rata, citosólicas o

microsomales, son también capaces de desfosforilar otros sustratos (52).

Trabajos recientes en nuestro Laboratorio sobre un inhibidor específico de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, indican que este inhibidor puede conferir especificidad a la acción enzimática. La modulación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa puede realizarse a nivel fisiológico a través de una proteína termoestable, ácido resistente, inhibidora de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa tipo 2 específicamente, y no de las actividades HMG-CoA reductasa tipo 1 o de la actividad fosfatasa sobre otros sustratos (glucógeno fosforilasa). Esta proteína inhibidora, RP-I, (inhibidor de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa), es distinta a los inhibidores 1 y 2 que actúan sobre PrP tipo 1, si bien mantiene con ellos ciertas similitudes en lo que se refiere a su bajo peso molecular, termoestabilidad y capacidad de ser precipitable con TCA (295). Los trabajos prosiguen orientados a conocer su secuencia aminoacídica y las posibles homologías con otros inhibidores ya secuenciados, (véase Apartado 1.11.1).

En los últimos años la bibliografía sobre HMG-CoA reductasa fosfatasas ha sufrido un incremento muy limitado, sin embargo la referente a otros sustratos, principalmente glucógeno fosforilasa y glucógeno fosforilasa es cada día mayor, por ello, y convencidos de la poca especificidad de las PrP creemos interesante en esta introducción, reseñar y actualizar los avances sobre otras actividades PrP, (véanse Apartados 1.7 a 1.14).

1.5.3. Regulación del sistema bicíclico

En 1978, Ingebritsen y col. (166) sugieren que la regulación de la actividad HMG-CoA reductasa puede realizarse a través de un sistema bicíclico, al menos como respuesta a dos hormonas: insulina y glucagon. Los resultados obtenidos "in vitro" a partir de hígado de rata y los obtenidos de hígado y fibroblastos humanos permiten mantener la propuesta de Ingebritsen. En el Esquema V se presenta un modelo de regulación de la

actividad HMG-CoA reductasa por fosforilación reversible en un sistema bicíclico abierto.

La cascada de reacciones se inicia tras la fosforilación de la HMG-CoA reductasa quinasa, por una PrQ específica, lo que provoca un aumento de actividad de la primera. La forma activa de la HMG-CoA reductasa quinasa fosforila la HMG-CoA reductasa disminuyendo la actividad de esta última. Los procesos de desfosforilación de los dos enzimas están a cargo una HMG-CoA reductasa fosfatasa y una HMG-CoA reductasa quinasa fosfatasa respectivamente. A la acción de la HMG-CoA reductasa quinasa se suman otras dos PrQ que también fosforilan la HMG-CoA reductasa descritas por Beg, la PrQ C y la PrQ dependiente de calcio y calmodulina, (véase esquema IV).

1.5.3.1. Regulación hormonal del sistema bicíclico

Toda una serie de evidencias indican que el sistema bicíclico es sensible a la acción de la insulina y glucagon.

a.- Glucagon

Ingebritsen y col. (167), demuestran que la relación actividad expresada/actividad total de la HMG-CoA reductasa se ve afectada significativamente por incubación de los hepatocitos con insulina o glucagon. La incubación con insulina produce disminución importante de la actividad expresada, afectando poco la actividad total, mientras que la acción del glucagon afecta tanto a la actividad expresada como a la total. La actividad HMG-CoA reductasa quinasa también responde a la acción hormonal, pero de forma inversa. En este sistema la insulina actúa como una señal de desfosforilación de ambas enzimas a la vez que el glucagon actúa como una señal de fosforilación.

La administración de glucagon "in vivo" produce un aumento de la incorporación de ^{32}P al enzima HMG-CoA reductasa a la vez que disminuye la actividad entre un 35-40 % (22). El glucagon, a través del incremento de la actividad de la HMG-CoA

reductasa quinasa, aumenta el grado de fosforilación de la HMG-CoA reductasa (inhibición). La insulina, al contrario, disminuye el grado de fosforilación de ambas enzimas.

Según Beg y col. (22) el glucagon afecta también la actividad HMG-CoA reductasa quinasa fosfatasa, produciendo una disminución neta la capacidad fosforilante de la HMG-CoA reductasa quinasa respecto de animales control.

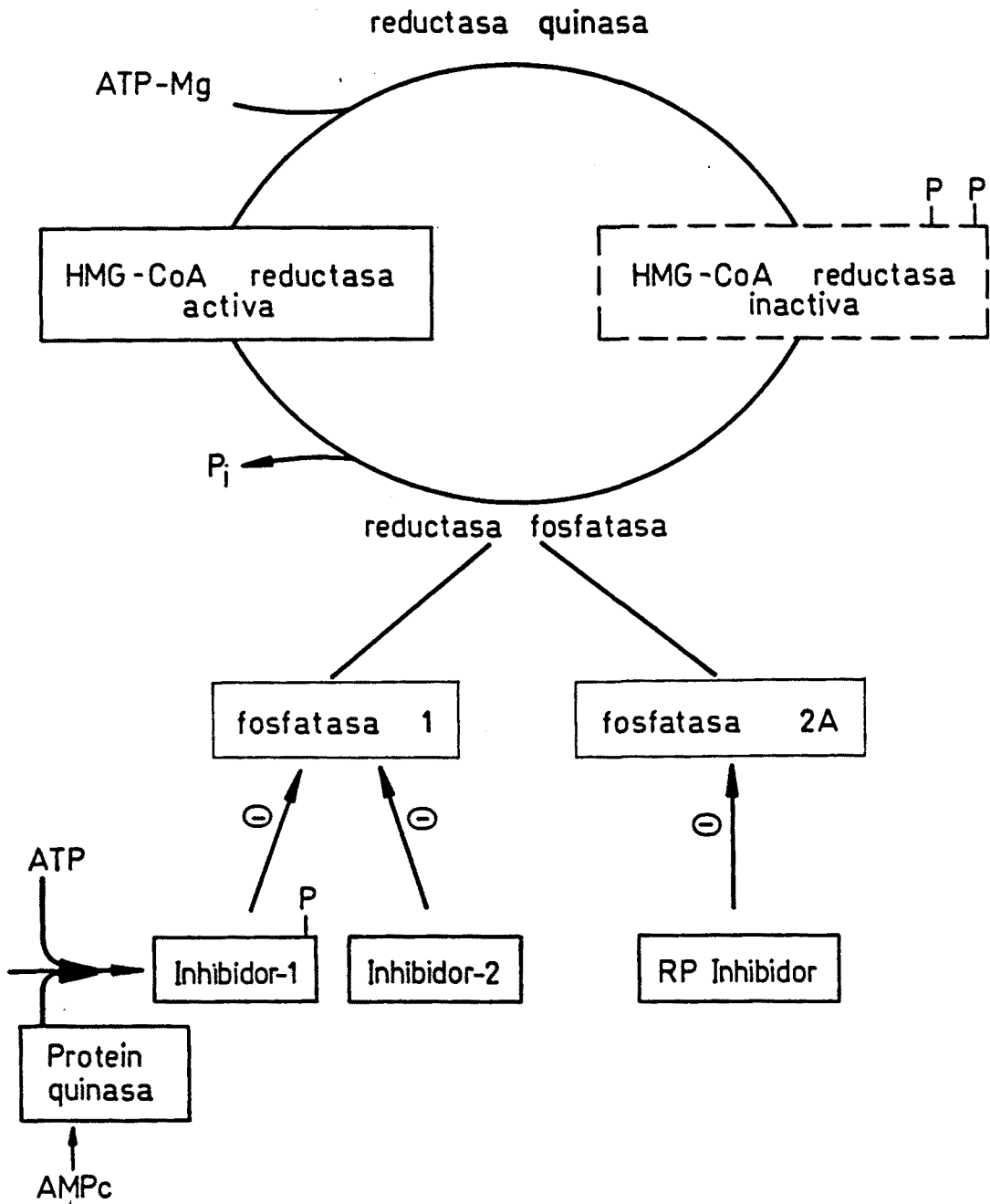
La acción del glucagon y la insulina "in vivo" han sido estudiados por Gibson y col. (122) y los resultados refuerzan los obtenidos "in vitro". "In vivo" el glucagon provoca disminución de la actividad HMG-CoA reductasa expresada y total, a través de un descenso de la actividad PrP y un aumento de la actividad PrQ. La insulina se opone a estos cambios. Gibson y col. proponen que la fosforilación de la HMG-CoA reductasa incrementa su susceptibilidad a la degradación intracelular, siendo la fosforilación una señal para su hidrólisis y solubilización.

Cómo el glucagón facilita la fosforilación de la HMG-CoA reductasa por HMG-CoA reductasa quinasa es una cuestión no resuelta. Una acción directa del glucagon (aumento de AMPc) sobre este enzima es difícil de explicar ya que las HMG-CoA reductasa quinasa son independientes de AMPc (21); por ello se ha propuesto una acción indirecta a través de inhibidores de la actividad proteín fosfatasa, (véase Esquema VI).

La acción del glucagon a través del I-1, se explica ya que valores elevados de AMPc provocan la fosforilación de este inhibidor por la PrQ-AMPc, el I-1 fosforilado es un potente inhibidor de la actividad PrP 1. El resultado final es un mayor grado de fosforilación de la HMG-CoA reductasa y HMG-CoA reductasa quinasa. Sin embargo hasta el momento la acción del glucagon a través del inhibidor 1 es solo una hipótesis, (véanse apartados 1.12.1. y 1.12.2.). Conviene señalar que las Prp tipo 2 (2A, 2B y 2C) también tienen actividad HMG-CoA reductasa, y que ésta no se ve afectada por la acción del I-1 o el I-2. Todo lo anterior evidencia que el mecanismo de acción del glucagon sobre el sistema bicíclico está lejos de hallarse totalmente explicado.

Resultados recientes obtenidos en nuestro Laboratorio sobre la capacidad del inhibidor 2 de actuar sobre las PrP cuando el sustrato utilizado es HMG-CoA reductasa a la vez del descubrimiento de un nuevo inhibidor (RP-I) que actúan específicamente sobre las PrP 2A cuando el sustrato utilizado es HMG-CoA reductasa permiten ampliar las posibilidades de regulación del sistema bicíclico por hormonas u otros agentes extracelulares.

REGULACION DEL SISTEMA BICICLICO POR INHIDORES
PROTEICOS TERMOESTABLES



ESQUEMA VI

Regulación del sistema biciclico por los inhibidores 1 y 2 y el inhibidor específico de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa

b.- Insulina

La administración intravenosa de insulina a ratas diabéticas provoca una rápida (menos de 20 minutos) y total desfosforilación del enzima HMG-CoA reductasa. Si la administración de insulina se realiza por vía intraperitoneal se observan respuestas a largo término (2-3 horas) y aumento de 5 a 6 veces en la actividad total (95). Cómo la insulina es capaz de provocar la rápida desfosforilación de la HMG-CoA reductasa es una cuestión no resuelta. La insulina puede actuar activando la PrP 1 a través de la GSQ-3 (glucógeno sintasa quinasa 3) y el I-1, sin embargo este mecanismo no incluye a otras PrP con elevada actividad específica sobre la HMG-CoA reductasa como es la PrP 2C Ingebritsen y col. (169-170).

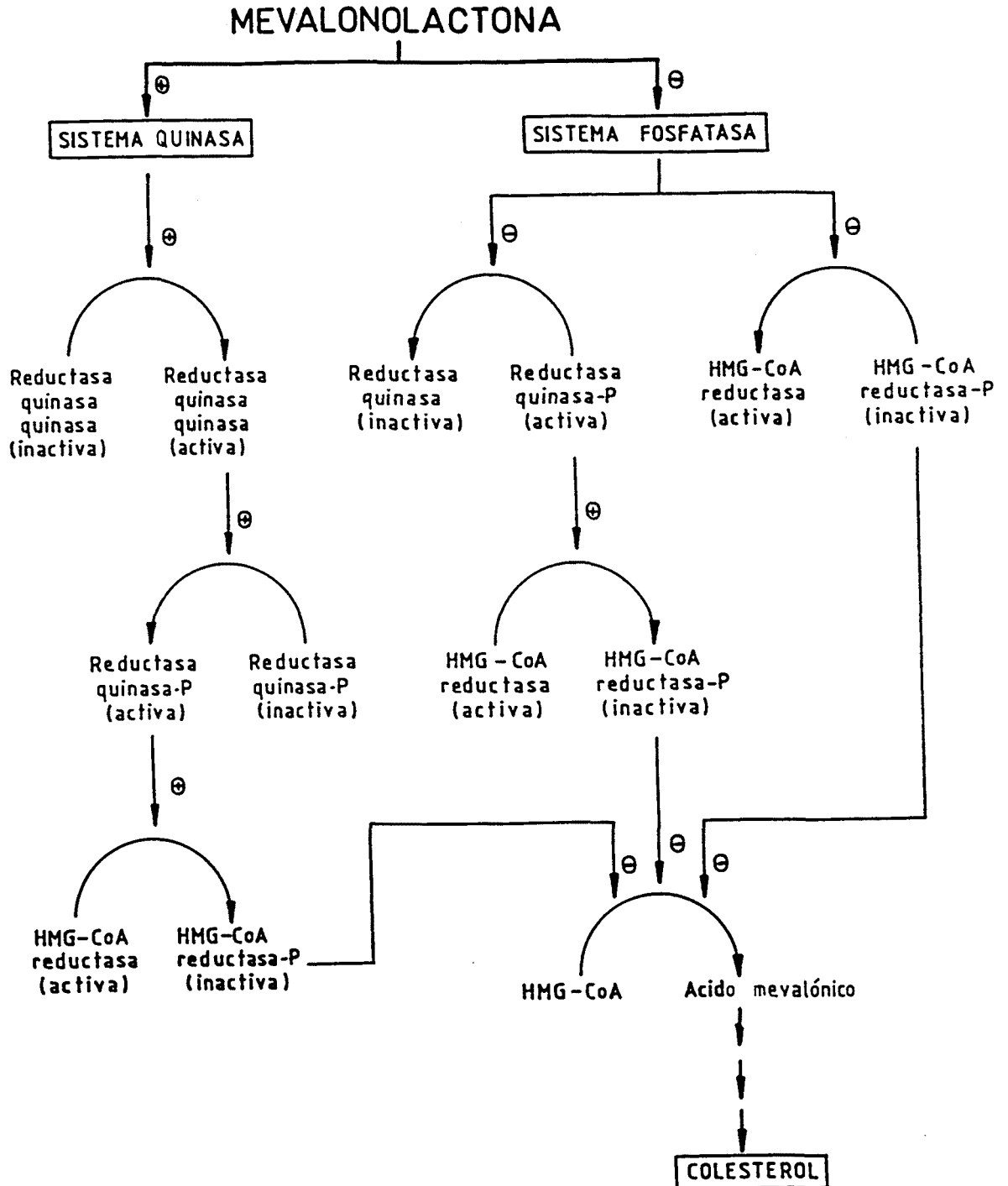
1.5.3.2. Regulación por mevalonato

El mevalonato interviene en el sistema bicíclico determinando inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa y también causa variaciones en la cantidad de enzima por aumento de la degradación como respuesta a la fosforilación.

Beg y col. (24) demuestran que la administración de mevalonolactona a ratas produce de forma rápida (20 minutos), inhibición reversible de la actividad HMG-CoA reductasa, que está directamente relacionada con el aumento de la fosforilación del enzima. La administración de mevalonolactona causa un aumento de 2 a 3 veces en la actividad HMG-CoA reductasa quinasa que a su vez está relacionado con un aumento de actividad HMG-CoA reductasa quinasa. La mevalonolactona también produce inhibición de las PrP. Estos resultados indican que la administración "in vivo" de mevalonolactona origina un aumento en el grado de fosforilación del enzima HMG-CoA reductasa y HMG-CoA reductasa quinasa y una reducción de la actividad PrP. La suma de estos efectos provoca disminución de la actividad HMG-CoA reductasa, y por lo tanto menor formación de mevalonato, (véase Esquema VII).

El mecanismo de acción de la mevalonolactona sobre las PrP es indirecto y está mediado según Beg y col (24) por algún inhibidor de las PrP, I-1 ó I-2, sin embargo no se han aportado evidencias en este tema.

REGULACION DEL SISTEMA BICICLICO POR MEVALONOLACTONA



ESQUEMA VII

Regulación del sistema bicíclico por mevalonolactona. Beg y col. 1984 (24) Beg y col. 1987 (28).

1.6. OTROS MECANISMOS DE CONTROL DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA

1.6.1. Composición y la fluidez de la membrana

El colesterol puede actuar como represor de la síntesis de HMG-CoA reductasa y también directamente es un inhibidor de la actividad mediante la disminución de la fluidez de la membrana en el entorno inmediato del enzima HMG-CoA reductasa (242) (282). Se ha sugerido que el contenido en colesterol del retículo endoplasmático puede afectar la inserción de la proteína recién sintetizada en la propia membrana (122).

En ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol, la actividad HMG-CoA reductasa no sólo disminuye sino que también varía su actividad en función de la temperatura a que se ensaya. Cuando se reproducen "in vitro" las mismas condiciones al añadir colesterol a microsomas se obtienen los mismos resultados. Estas variaciones no se reproducen en ratas alimentadas normalmente. El aumento de colesterol en el entorno del enzima debe ser la causa directa de la pérdida de actividad.

1.6.2. Control hormonal

En apartados anteriores hemos recordado la importancia del control hormonal en la regulación de la concentración y en la regulación de la actividad del enzima HMG-CoA reductasa por fosforilación reversible (apartados 1.4.7. y 1.5.3.1.). Se han descrito otros mecanismos de acción hormonal, referidos a variaciones en la actividad del enzima, que no se explican por cambios en la tasa de fosforilación.

Así la progesterona causa, en células epiteliales de intestino, una fuerte inhibición de la biosíntesis del colesterol. La progesterona activa la HMG-CoA reductasa, aunque la formación de colesterol en si mismo se reduce debido a la inhibición de los pasos terminales de la biosíntesis. La acción de la progesterona sobre la actividad HMG-CoA reductasa no parece deberse a de modificaciones covalentes (264).

1.6.3. Activadores alostéricos y compuestos con grupos tiol

Algunos compuestos que contienen la mitad estructural del NAD(P)(H) son efectores de la actividad HMG-CoA reductasa. La esencial y suficiente estructura requerida para la activación alostérica es la del AMP. Cuando se fosforila la posición 2' del nucleótido la activación alostérica disminuye (286)(287).

Los disulfitos y el glutatión oxidado son inhibidores de la reductasa al tiempo que los tioles orgánicos, como el DTT y el glutatión reducido son activadores. El mecanismo de acción propuesto consiste en una modificación conformacional de la HMG-CoA reductasa que altera la afinidad del enzima por su sustrato (HMG-CoA). En condiciones fisiológicas el efecto alostérico del sustrato sobre el enzima puede estar modulado por grupos sulfhidrilos (88)(89)(288).

La relación glutatión reducido/oxidado determina el nivel de activación del enzima hepático, modificando rápidamente la relación entre la forma activa (reducida) y la forma inactiva (oxidada) del enzima HMG-CoA reductasa. Independientemente de la presencia o no de sustratos la actividad del enzima depende de la relación $[GSH]^2/[GSSG]$, lo que sugiere que la transición redox conlleva la formación de puentes disulfuro entre proteínas [proteína-SS-proteína] (53).

1.6.4. Proteínas reguladoras

Una proteína citosólica, fermodulina, descrita por Menon y col. (235) y Dotan y col. (90) que en presencia de Fe^{2+} inhibe la actividad del enzima HMG-CoA reductasa, permite ampliar las posibilidades de modulación del enzima. La presencia combinada de la proteína y hierro son esenciales para la inhibición. La fermodulina ha sido purificada y presenta por gel filtración un peso molecular aparente de 58 kDa, siendo rica en triptófano.

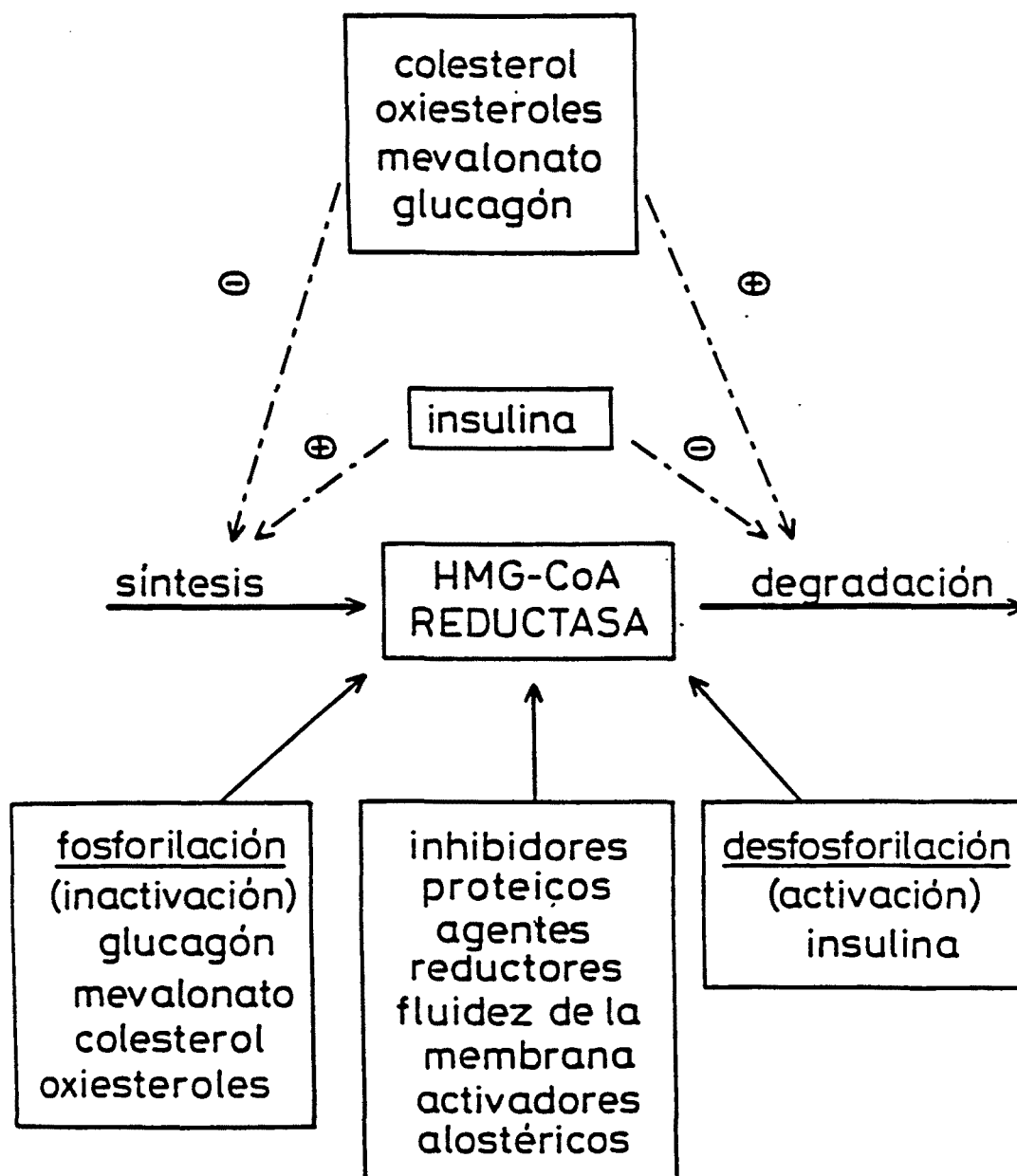
Recientemente se ha purificada a homogeneidad una proteína citosólica activadora de la HMG-CoA reductasa (RAP), que es capaz de activar la HMG-CoA reductasa al menos tan eficazmente

como los tioles orgánicos. Contrariamente a éstos, la RAP requiere de NADPH para la activación de la HMG-CoA reductasa. Todo ello orienta a un posible papel regulador de la RAP en la síntesis de colesterol y de otros productos del mevalonato (90) .

En el Esquema VIII se presenta un resumen de las principales factores que afectan la concentración y la actividad del enzima HMG-CoA reductasa.

REGULACION DE LA CONCENTRACION Y LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA

HMG-CoA REDUCTASA



Esquema VIII

Resumen de los principales efectores que regulan la síntesis/ degradación y la actividad del enzima HMG-CoA reductasa.

1.7. FOSFOPROTEIN FOSFATASAS. CLASIFICACION

En células de mamífero, la mayor parte de los fosfatos ácido-resistentes unidos a proteínas, se presentan como fosfoserinas o fosfotreoninas y se forman por la acción de las serín-treonín proteín quinasas. Una cifra mucho menor, aproximadamente el 0,2 % del total, se presentan como fosfotirosinas y son el resultado de la acción de las tirosín proteín quinasas. A pesar del reducido número de proteínas fosforiladas en tirosina, el descubrimiento de que muchos oncogenes codifican para actividades proteín tirosín quinasas, ha aumentado sensiblemente el catálogo de proteín quinasas (casi un centenar) al igual que su importancia en la regulación celular.

Las fosfoproteín fosfatasas desfosforilan residuos de serina/treonina o de tirosina. Son, en número, menos abundantes que las proteín quinasas y la especificidad de sustrato parece ser también muy inferior. Las quinasas y fosfatasas que actúan sobre residuos de serina/treonina no presentan por lo general actividad sobre residuos de tirosina y viceversa.

Excelentes revisiones sobre los enzimas que intervienen en este proceso se suceden frecuentemente. Son de destacar, por recientes, las que versan sobre proteín quinasas de Hunter y col. (165), Edelman y col. (96) y sobre proteín fosfatasas de Ballou y col. (19), Lau y col. (211). También hay que citar la recopilación de métodos de purificación y caracterización reunidos en la colección "Methods in Enzimology" vol. 107 y 159, y la colección "Advances in Protein Phosphatases", vol. 1-4. De forma más general sobre procesos de fosfo/desfosforilación y su importancia en el control del metabolismo celular, crecimiento y diferenciación de Krebs (202)(203)(204).

Una de las clasificaciones es la que distingue entre serín/treonín y tirosín PrP. En esta memoria nos referiremos especialmente a las fosfoproteín serín/treonín fosfatasas denominándolas proteín fosfatasas, o abreviadamente PrP. Las serín/treonín PrP han sido clasificadas en función de la especificidad de sustrato o del efecto de ciertos inhibidores y estimuladores.

Las clasificaciones que han obtenidos una mayor aceptación son las propuestas por Ingebritsen y Cohen (172) (véase Tabla I), y Merlevede (237) (véase Apéndice II), que en ningún caso son contrapuestas.

La poca especificidad de las PrP ha propiciado que durante años se considerase proteínas distintas a las mismas especies moleculares en función del sustrato empleado. La utilización del enzima glucógeno fosforilasa ha permitido la propuesta de clasificación que a seguido detallamos. La glucógeno fosforilasa es un sustrato clásico para las PrP. Fue el primer sistema descrito regulable por fosforilación reversible (200) y tiene las siguientes ventajas frente a otros sustratos posibles: su proceso de purificación es muy accesible (puede incluso obtenerse comercialmente); se fosforila en un solo residuo de serina (Ser-14) en una reacción estequiométrica; no es sustrato de las tirosín proteín fosfatasas y sí de las serín/treonín proteín fosfatasas; el seguimiento de la desfosforilación puede realizarse directamente cuantificando la salida de ^{32}P o la pérdida de actividad que conlleva la hidrólisis del fosfato. La glucógeno fosforilasa es pues una proteína bien conocida y de la que recientemente se han descrito los cambios estructurales inducidos por su fosforilación (307).

a.- Clasificación propuesta por Ingebritsen & Cohen

El grupo de Cohen propone una terminología numérica: PrP tipo 1 y PrP tipo 2, en función principalmente de tres criterios: sensibilidad frente a ciertas proteínas termoestables y ácido resistentes (inhibidores 1 y 2), especificidad de sustrato y dependencia de iones (171)(172), (véase Tabla I).

CLASIFICACION DE LAS SERIN TREONIN PROTEIN FOSFATASAS

tipo	Nombre común	Sensible a I-1 e I-2	Activadores	Subunidad catalítica kDa	Sustratos preferentes
1	PrP dependiente de ATP-Mg ²⁺	si	GSK-3; ATP-Mg ²⁺ Mn ²⁺	38.000	Glucógeno fosforilasa Fosforilasa quinasa sub. B Glucógeno sintasa Histona H1 y H2B HMG-CoA reductasa quinasa
2A	-	no	proteínas básicas poliaminas Mn ²⁺	36.000	Cadena ligera de la miosina Protamina Glucógeno fosforilasa Histonas H1 y H2B Inhibidor 1 e Inhibidor 2
2B	calcineurina	no	calmodulina Ca ²⁺ , Mn ²⁺ Ni ²⁺	61.000	Inhibidor 1 Fosforilasa quinasa sub α Cadena ligera de la miosina
2C	PrP dependiente de Mg ²⁺	no	Mg ²⁺ , Mn ²⁺	46.000	Cadena ligera de la miosina Histona H2B HMG-CoA reductasa HMG-CoA reductasa quinasa Glucógeno sintasa

TABLA I

Resumen del cuadro de clasificación presentado por Ballou y Fischer (19), basado en la clasificación de Ingebritsen y Cohen (172).

Las PrP tipo 1 desfosforilan selectivamente la subunidad β de la fosforilasa quinasa y son inhibidas a concentraciones nanomolares por los inhibidores 1 y 2. Las PrP tipo 2 desfosforilan preferentemente la subunidad α de la fosforilasa quinasa y son poco sensibles a los inhibidores. Las PrP tipo 2 a su vez se subdividen en 2A, 2B, y 2C. Dentro de las de tipo 2A pueden encontrarse nuevas subdivisiones. De esta forma las serín treonín PrP de células de mamífero quedan subdivididas en cuatro grupos principales: 1, 2A, 2B y 2C.

La separación en PrP tipos 1 y 2 presenta claras ventajas y permite la propuesta de esquemas y mecanismos de regulación. Sin embargo la distinción no es absoluta; las diferentes subunidades catalíticas son proteínas con alto grado de homología, razón que explica que anticuerpos obtenidos frente a una de las subunidades presenten reactividad cruzada, y que la falta de sensibilidad a los inhibidores proteicos de las PrP tipo 2 pueda superarse elevando la concentración de inhibidores (44).

b.- Clasificación propuesta por Merlevede

La clasificación propuesta por Merlevede emplea una terminología descriptiva basada en la directa regulación del enzima. Al igual que en el caso anterior, las PrP quedan agrupadas en cuatro grupos principales: 1) proteínas fosfatasa dependientes de ATP-Mg^{2+} , 2) calcineurina, 3) proteínas fosfatasa dependiente de Mg^{2+} y 4) proteínas fosfatasa estimuladas por policalcaciones, PCS (policalcación stimulated) que corresponden a las PrP 1, 2B, 2C y 2A respectivamente.

En esta clasificación se tiene especial consideración a la regulación de las PrP y se las denomina por los efectores que las regulan. En el Apéndice 2 reproducimos el resumen presentado por Merlevede en el Congreso celebrado en 1985 "Advances in Protein Phosphatases" y publicado más tarde en la colección "Advances in Protein Phosphatases", en el que se entrelazan ambas clasificaciones y se recogen la nomenclatura y contribuciones de otros autores al estudio de las PrP.

1.7.1. Proteín fosfatasas tipo 1

Las PrP 1 difieren de otras por su sensibilidad a la proteínas inhibidoras: inhibidor 1 (I-1) e inhibidor 2 (I-2), a concentraciones nanomolares, y por desfosforilar la subunidad β de la fosforilasa quinasa más rápidamente que la subunidad α .

Las distintas PrP 1 tienen en común una misma subunidad catalítica, 1_c , que ha sido purificada a homogeneidad por técnicas que incluyen precipitación con etanol en los primeros pasos de purificación. Si se incorporan inhibidores de proteasas, en los distintos pasos de purificación, la subunidad 1_c muestra un peso de 37-38 kDa en geles de electroforesis. La subunidad 1_c posee un dominio (4 kDa) próximo al carboxi-terminal sensible a proteasas, que es degradado fácilmente por proteasas endógenas y por tripsina y quimiotripsina. Especies parcialmente degradadas de 33 y 34 kDa retienen la actividad PrP pero presentan algunas diferencias con la subunidad de 37 kDa. Una de ellas es no ser fosforiladas e inactivadas por la proteín quinasa producto del virus RSV (pp60^{v-src}), lo que indica que han perdido el fragmento que contiene un centro de fosforilación en tirosina (178).

La subunidad catalítica 1_c no existe "in vivo" en forma libre sino que se encuentran acompañada con otras subunidades, las cuales se eliminan por tratamientos denaturantes en el proceso de purificación. La subunidad catalítica se acompaña de otras subunidades reguladoras o específicas en función de su localización subcelular, dando lugar a las siguientes proteín fosfatasas: PrP 1_r , PrP 1_o , PrP 1_m , y PrP 1 microsomal, (véase Tabla II). Algunas subunidades acompañantes han sido también purificadas a homogeneidad y de ellas se conoce la estructura primaria (I-2) o fragmentos de secuencia (subunidad G), pero de otras no existen estudios a nivel molecular e incluso falta su purificación. En extractos de tejidos las PrP 1 pueden presentarse como formas de elevado peso molecular y de composición no definida. Describimos a continuación estas cuatro PrP tipo 1.

SUBDIVISION DE LAS PROTEIN FOSFATASAS TIPO 1

Nombre	Localización	Actividad	Mr	Subunidades
PrP 1 _i	citosol	inactiva	38 + 32	1 _c + Inhibidor 2
PrP 1	citosol	activa	37 + 75	1 _c + subunidad ?
PrP 1 _o	glucógeno	activa	38 + 103	1 _c + subunidad G
PrP 1 _m	unida a miosina	activa	(110)*	1 _c ? + subunidad M ?
PrP 1 _a ?	microsomas	activa	(50-60)*	1 _c ? + subunidad R ?

TABLA II

Subdivisión de las PrP tipo 1. Las PrP 1 tienen en común un mismo tipo de subunidad catalítica: 1_c, de 37-38 kDa. La subunidad G, en hígado de rata, tiene un peso molecular de 161 kDa, superior al de músculo de conejo (103 kDa). Elaborado a partir de las propuesta de Cohen y col. (74), P.T.W. Cohen (75), Alemany y col. (9) y Goris y Merlevede (139).

*) determinaciones en gel filtración

1.7.1.1. PrP 1 (dependientes de ATP-Mg²⁺)

a) Forma inactiva (PrP 1_i)

La PrP 1_i es una forma citosólica inactiva de la PrP 1, compuesta por la subunidad 1_c y el I-2, formando un complejo de peso molecular 70 kDa, suma del peso de sus subunidades: 38 kDa y 32 kDa.

La actividad PrP 1_i se ve afectada negativamente por el I-2 de dos formas: por un lado la interacción provoca inhibición de la actividad PrP, por otro, provoca un cambio de conformación en la subunidad 1_c que produce su inactivación y que permite lograr una conformación favorable a la acción de la GSQ-3. El primer proceso de inhibición es instantáneo y se ve afectado por la tripsinización del I-2; el segundo proceso de inactivación es sensible a cantidades diez veces inferiores de I-2 la reactivación en este último caso requiere la presencia de ATP-Mg²⁺ GSQ-3. Este comportamiento dual ha propiciado la propuesta de dos centros de unión entre la subunidad 1_c y el I-2, y a favorecido que algunos autores prefieren denominar modulador al I-2 por su doble función inactivadora/inhibidora sobre la PrP 1_i (281)(335)(348).

No hay evidencias de que la fosforilación del complejo formado por la subunidad 1_c y el I-2 provoque su disociación. No obstante, el complejo reconstituido formado por el fragmento proteolizado de 33 kDa de la subunidad 1_c más el I-2, parece disociarse tras la fosforilación del I-2 (152). La actividad PrP 1_i está regulada también por el inhibidor 1, (véase apartado 1.11.1).

La forma citosólica inactiva de la PrP 1_i puede activarse "in vitro" por dos vías: a) tripsinolisis limitada en presencia de Mn²⁺, y b) por una reacción dependiente de ATP-Mg²⁺ que precisa GSQ-3. Veamos con algún detalle cómo transcurren estas dos activaciones:

1.- El complejo inactivo de 70 kDa, se activa totalmente en presencia de 1 mM Mn²⁺ y tripsina. El Mn²⁺ o la tripsina

separadamente no son capaces de provocar la activación. Durante la tripsinolisis se destruye la subunidad I-2, y sólo es parcialmente degradada la subunidad 1_c a formas de 33 kDa, muy estables, especialmente en presencia de Mn^{2+} , y que además se activan en presencia de este catión. Se obtienen resultados similares si se hidroliza con quimiotripsina.

2.- La interacción entre la subunidad 1_c y el I-2 está influenciada por la GSQ-3 y precisa de ATP- Mg^{2+} . Se han propuestos distintos modelos para explicar dicha interacción entre el I-2 la subunidad 1_c : entre ellos son de destacar los de Ballou y col (18), Merlevede y col. (236), Villa-Moruzzi y col. (336), Tung y col. (328), Li y col. (215). Reproducimos en el Esquema IX el formulado por Ballou y Fischer (19).

b) Forma espontaneamente activa

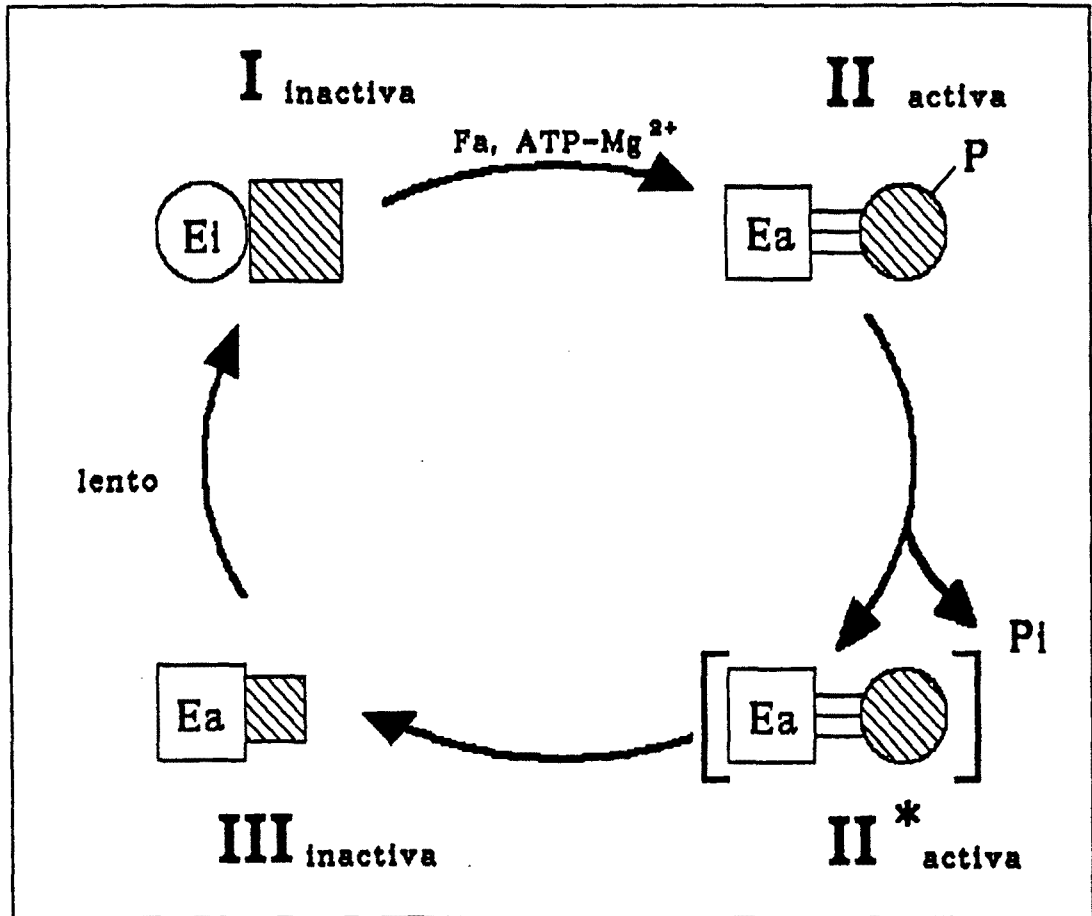
El Laboratorio de Merlevede, Goris y col. (139), a partir de hígado de perro, ha purificado una proteína fosfatasa que la clasifica dentro de las dependientes de ATP- Mg^{2+} que por comportamiento frente a ciertas proteínas reguladoras y otros efectores, así como por su peso molecular se distingue de la PrP 1_i . Esta nueva PrP 1 es espontaneamente activa y presenta dos subunidades de 75 y 37 kDa en relación equimolecular; la subunidad de 37 kDa es la subunidad catalítica 1_c , y los autores no excluyen que la subunidad de 75 kDa tenga asimismo actividad catalítica y que pudiera ser un precursor de la subunidad de 37 kDa.

Esta PrP se transforma en una forma inactiva de la PrP 1 por rotura por tripsina transformándose en una forma sensible a activación por GSQ-3 y ATP- Mg^{2+} . No contiene inhibidor 2 o inhibidor 1 y las concentraciones necesarias de inhibidor 2 para causar inactivación varían considerablemente si la proteína se encuentra en su estado activo (se precisan concentraciones de 870 nM para inhibir el 30 %) o ha sido tripsinizada (5 nM de I-2 produce una inhibición del 50 % y una concentración de 10 nM produce inhibición total).

ESQUEMA IX

Modelo de regulación de la actividad PrP 1 (70 kDa). Las subunidades activas se representan como cuadrados y las inactivas por círculos. El inhibidor 2 está representado por formas llenas y la subunidad catalítica por formas vacías.

El complejo inactivo de 70 kDa está representado por I. La fosforilación del I-2 por la GSQ-3 (también denominada Fa) en presencia de ATP-Mg²⁺, transforma el complejo inactivo en otro activo, complejo II, provocando cambios conformacionales tanto en el inhibidor 2, que pierde su capacidad inhibitoria, como en la subunidad catalítica, que se transforma en una forma activa. EL complejo II se desfosforila sin que por ello pierda la actividad, porque posiblemente la propia fosfatasa activada cataliza la autodesfosforilación del inhibidor 2, que conserva su conformación no inhibitoria a pesar de la pérdida de fosfatos, complejo desfosforilado II*. En la autodesfosforilación el Mg⁺ puede actuar como cofactor necesario. El complejo II* es metaestable y paulatinamente se transforma en su forma inactiva al recuperar I-2 su conformación inhibitoria, complejo III inactivo. Lentamente la subunidad catalítica recobra su conformación inactiva, volviendo a su estado inicial I. Ballou y Fischer (19).

MODELO DE REGULACION DE LA PRP II CITOSOLICA POR GSO-3 Y ATP-Mg²⁺

1.7.1.2. Proteín fosfatasa G (PrP 1_c)

La PrP 1_c es una proteín fosfatasa tipo 1 compuesta por las subunidades 1_c y G, formando un complejo espontaneamente activo unido a la fracción glucógeno-proteína.

La PrP 1_c ha sido caracterizada y purificada a homogeneidad a partir de músculo esquelético de conejo (del que se obtienen aproximadamente 3 mg de enzima puro a partir de 5000 g de músculo). La purificación del enzima a partir de la separación del glucógeno se inicia con la degradación de éste por acción de α -amilasa. Si la PrP 1_c se purifica a partir de extractos que no hayan sufrido tratamientos de rotura, se obtienen dos subunidades que copurifican: la subunidad G, de peso molecular aparente de 103 kDa en geles denaturantes, y la subunidad 1_c, de 38 kDa (complejo 1_c-G). La subunidad 1_c que se obtiene es la misma que la producida por rotura de la PrP 1_r de citosol ya que los mapas peptídicos no se distinguen uno de otro, (339)(18)(319)(158).

Aunque la PrP 1_c no ha sido purificada a homogeneidad a partir de hígado de rata, ha sido caracterizada en partículas de glucógeno o en muestras parcialmente purificadas (9)(309)(223)(321)(327). Al igual que en músculo, en hígado la PrP 1_c está constituida por una subunidad G y una subunidad 1_c. El componente G presenta un peso molecular aparente determinado en gradiente de sacarosa entre 150 y 160 kDa, siendo mucho mayor cuando se determina en gel filtración. Los últimos estudios de Hubbard y Cohen ((163) confirman que la subunidad G no proteolizada tiene un peso molecular de 161 kDa y tiene funciones reguladoras a la vez que actividad proteín fosfatasa.

Stalmans y col. (309) ensayan esta proteín fosfatasa sobre sustrato glucógeno sintasa fosfatasa y propone el siguiente modelo: la PrP 1_c consiste en dos componentes, uno unido al glucógeno, G, y otro soluble, S, cuya cooperación es necesaria para que se muestre toda la actividad glucógeno sintasa fosfatasa, lo que no excluye que ambos componentes, G y S, tengan actividad catalítica en función del tipo de sustrato empleado, Bollen y col. (36).

La PrP 1_c es inhibida por los inhibidores 1 y 2, pero son necesarias concentraciones más elevadas para ello que las empleadas para la subunidad catalítica, Bollen y col (37). La baja afinidad de la PrP 1_c por el I-2 exige concentraciones de 6 μ molar para alcanzar un 70 % de inhibición (38). Recientemente los mismos autores, Bollen y Stalmans (39) indican que este comportamiento diferenciado se debe a la presencia en los ensayos de compuestos como el PMSF que impiden el proceso de inactivación.

a.- Interacción con el inhibidor 2

La interacción del I-2 con PrP 1_c promueve en primer lugar la disociación de la subunidad catalítica y la traslocación de ésta desde el glucógeno al citosol. Al mismo tiempo, la unión del I-2 a la PrP 1_c disminuye su afinidad por el glucógeno. Empero, la interacción no provoca la conversión de la PrP 1_c en formas dependientes de ATP-Mg²⁺ y GSQ-3, como sucede con la subunidad catalítica de la PrP 1_i . Tras la incubación del I-2 la PrP 1_c , la recuperación de la actividad fosfatasa perdida se consigue por tripsinización (335).

También se ha postulado que la PrP 1_c de músculo esquelético interactúa con el I-2, sin provocar la disociación 1_c -G, y por lo tanto incrementando el peso molecular aparente al cromatografiarse en gel filtración. La misma subunidad G, o bien otra subunidad, denominada desinhibidor, DI, relacionado con el complejo, le confiere resistencia al I-2 además asegura su afinidad por el glucógeno. A ello coadyuvan uno o más polipéptidos que le confieren especificidad de sustrato (310).

b.- Fosforilación/desfosforilación

La fosforilación "in vitro" de la subunidad G de hígado de rata por PrQ-AMPC promueve el desprendimiento de la subunidad 1_c , de la subunidad G, al tiempo que se produce la traslocación del enzima desde el glucógeno al citosol (157). Aunque no se observan cambios de actividad, sí se incrementa la

facilidad para ser inactivado por el inhibidor 1 (319). Se ha determinado la secuencia del péptido que contiene la serina fosforilada por esta proteína quinasa. La fosforilación de la PrP 1G por esta quinasa u otras como la GSQ-3, no modifica la sensibilidad de la proteína frente al I-2. (56)(112).

La fosforilación de la PrP 1G "in vivo" puede producirse por acción de la adrenalina, (véase Apartado 1.12). Dado que el complejo glucógeno-proteico contiene gran parte de los enzimas responsables del metabolismo del glucógeno, la PrP 1_o puede ser importante en la regulación de este metabolismo.

1.7.1.3. PrP 1_n

Recientemente P.T.W. Cohen (75) propone la inclusión entre las PrP tipo 1 de la fosfatasa que desfosforila la cadena ligera de la miosina, dando lugar a la relajación del proceso de contracción muscular, iniciado por la fosforilación de la miosina. Esta PrP 1_n, al igual que la PrP 1_o, es una especie activa. Por analogía con la PrP 1_o, la PrP 1_n puede estar compuesta por una subunidad catalítica y una subunidad de anclaje.

Ha sido parcialmente caracterizada a partir de músculo esquelético. Presenta en gel filtración un peso molecular aparente de 100-110 kDa. Cuando se trata con etanol se obtiene una subunidad catalítica de 35-37 kDa, cuyos mapas peptídicos no la diferencian de las otras catalíticas tipo 1. El comportamiento frente a los inhibidores 1 y 2 es idéntico al de otras PrP 1, pues concentraciones 100 nM de ambos inhibidores son suficientes para anular completamente la actividad PrP.

La PrP 1_n es la responsable de la desfosforilación de la miosina nativa en corazón bovino y en músculo de conejo, y es la única proteína fosfatasa que se une a la miosina. La PrP 1_n se une fuertemente a la miosina y la actimiosina a través de una subunidad específica M (63)(64).

La PrP 1_n puede ser la misma proteína que la ya descrita y conocida como SMP-IV (smooth muscle myosin) purificada a

aparente homogeneidad desde músculo liso de pavo, su concentración en el tejido muscular es 6 μ M. La SMP-IV está compuesta por dos subunidades: una reguladora de 58 kDa y una catalítica de 40 kDa. Esta PrP, aunque es activa frente a un gran número de proteínas, desfosforila preferentemente las proteínas contráctiles y presenta algunas características diferenciadas. La SMP-IV es menos sensible a inhibición por ATP, NaF y pirofosfatos que otras PrP, inhibiciones del 50 % requieren concentraciones de NaF y PP_i superiores a 10 mM (269)(270). Desfosforila preferentemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa (propiedad de las PrP 1) y es insensible al inhibidor 2 (propiedad de las PrP 2) por lo que según estos investigadores (270)(271) no puede ser clasificada según los criterios propuestos por Ingebritsen y Cohen. La actividad del enzima SMP-IV es independiente de la presencia de cationes.

Sí la PrP 1_m es la misma que la SPM-IV se podrá contestar cuando se conozca la secuencia y la homología con otras subunidades catalíticas. Sí esta proteína se comporta de forma ambivalente se hace preciso revisar la nomenclatura o los criterios de clasificación de Ingebritsen y Cohen.

1.7.1.4. PrP 1_m

La actividad PrP presente en microsomas es esencialmente tipo 1 (10)(40). Alemany y col. (9) proponen que en microsomas existe una actividad PrP tipo 1 (PrP 1_m) que contiene una subunidad catalítica idéntica o similar a las PrP 1_r , PrP 1_o y PrP 1_m y con una o más subunidades, distintas hasta las ahora descritas, que le permiten un anclaje específico a los microsomas y posiblemente una regulación característica. La disociación entre la subunidad catalítica y la de anclaje se producen por simple dilución y es la causa del aumento de actividad específica en las muestras diluidas. Esta PrP, como sucede con las PrP 1_o y 1_m se muestra espontáneamente activa.

Aunque no ha sido purificada, se han realizado algunos trabajos con microsomas de músculo esquelético e hígado de rata. La PrP tipo 1 que se extrae de los microsomas de músculo

esquelético es una mezcla de complejos de pesos moleculares entre 300 kDa y 70 kDa. Cuando se purifica la subunidad catalítica, previa precipitación con acetona, se obtiene una proteína de peso molecular aparente 35-38 kDa en gel filtración. Esta subunidad, al igual que las descritas para el precipitado de glucógeno es de tipo 1, pues su actividad disminuye sensiblemente en presencia de I-2, con el que forma un complejo de 70 kDa, Villa-Moruzzi y col. (339).

Microsomas de los que se ha extraído totalmente la actividad PrP, son capaces de recaptarla por preincubación de las membranas con el enzima. La asociación se produce cuando se encuentran a alta concentración pero puede ser inhibida si los microsomas son tratados con tripsina. Se supone por ello que implica la presencia de una proteína receptora (R) ó (M) microsomal que permite el anclaje en el retículo endoplásmico, pero hasta el momento no ha sido purificada ni caracterizada. La asociación se inhibe cuando la subunidad catalítica se halla bloqueada por unión al inhibidor 2.

La actividad PrP 1 microsomal tampoco ha sido purificada de microsomas de hígado de rata. Cuando se extrae con NaCl, la proteína presenta un peso molecular aparente en gel filtración entre 50 y 60 kDa. La tripsinización de dicha actividad da lugar a la subunidad catalítica de 35-37 kDa. Los estudios de caracterización con inhibidores indican que es de tipo 1, con un comportamiento similar a la subunidad catalítica obtenida de glucógeno (10).

1.7.2. Proteín fosfatasas tipo 2A

Las PrP 2 desfosforilan la subunidad α de la fosforilasa quinasa más rápidamente que la subunidad β y son necesarias concentraciones cien veces superiores de I-2 para alcanzar el mismo grado de inhibición respecto a las PrP 1. Las PrP 2A tienen características de PrP 2 además la particularidad de ser activables por proteínas básicas y por poliaminas (44)(331).

Al igual que sucede con las PrP 1, las PrP 2A ($2A_0$, $2A_1$ y $2A_2$) tienen en común una misma subunidad catalítica, que ha sido purificada a homogeneidad y presenta en geles de acrilamida-SDS un peso molecular aparente de 36 kDa. La subunidad catalítica, "in vivo", se encuentra acomplejada con otras subunidades, A, B y B' de pesos moleculares 60, 55 y 54 kDa respectivamente, cuyas proporciones relativas determinan finalmente el peso molecular, (véase Tabla III). Las subunidades B y B' deben ser productos de genes distintos dada la diferencia de sus mapas peptídicos. La PrP $2A_2$ puede ser producto del proceso de purificación de la PrP $2A_0$ y/o $2A_1$, por lo que sólo dos tipos de PrP 2A se encuentran "in vivo". Las tres PrP 2A han sido purificadas a homogeneidad desde diversos tejidos, aproximadamente se obtienen entre 10-25 μ g de cada tipo de PrP 2A por 100 g de tejido tanto a partir músculo esquelético como de hígado (172)(330).

Waelkens y col. (340)(341) purifican a homogeneidad a partir de músculo de conejo tres PrP distintas. Siguiendo la nomenclatura de Merlevede las denominan: PCS_H , PCS_M y PCS_L , y muestran en gel filtración unos pesos moleculares aparentes de 390, 250 y 200 kDa respectivamente. Estas proteínas fosfatasa son comparables a las descritas como PrP 2A, al igual que las tres PrP purificadas a partir de eritrocitos humanos (332) que salvo algunas diferencias en los pesos moleculares corresponden a las ya descritas.

Las discrepancias entre los distintos trabajos sobre PrP 2A pueden deberse a diferencias entre los distintos tejidos y/o a procesos proteolíticos no controlados.

SUBDIVISION DE LAS PROTEIN FOSFATASAS TIPO 2A

Nombre	Localización	Mr	Mr	Subunidades
PrP 2A ₀	citosol	181 kDa	60 + 54 + 36x2	A B' 2 _c
PrP 2A ₁	"	202 kDa	60 + 55 + 36x2	A B 2 _c
PrP 2A ₂	"	107 kDa	60 + + 36	A 2 _c

TABLA III

Subdivisión de las PrP tipo 2A purificadas a partir músculo esquelético de conejo por Tung y col. (330) Los pesos moleculares entre paréntesis se refieren a los determinados por centrifugación en equilibrio de sedimentación .

1.7.3. Proteín fosfatasa tipo 2B

La PrP 2B fue aislada por vez primera como una proteína unida a calmodulina, de peso molecular 80.000 kDa y designada como CaM-BP80. Se ensayó por su capacidad de inhibir la activación por calmodulina de la fosfodiesterasa y la adelinato ciclasa. Esta proteína es idéntica a la proteína denominada calcineurina o PrP dependiente de calcio y calmodulina, PrP 2B, (314)(324).

Es muy abundante en tejido nervioso y ha sido purificada a homogeneidad a partir de cerebro y de músculo esquelético y de otros tejidos (342)(315)(260).

La PrP 2B está compuesta por las subunidades α y β , de 61 y 19,2 kDa, respectivamente. La subunidad α posee el dominio catalítico; la subunidad β tiene afinidad por el calcio a concentraciones micromoleculares, une 4 mols de calcio por mol de subunidad. Se conoce la secuencia de la subunidad β . La proteína consiste en una cadena de 168 residuos y muestra elevada homología con otras proteínas que unen calcio como calmodulina y troponina C, 35 % y 29 %, respectivamente (7).

Es la PrP que presenta mayor especificidad de sustrato, desfosforila preferentemente la subunidad α de la fosforilasa quinasa, el inhibidor 1, la histona H1 y la cadena ligera de la miosina (P). No desfosforila otros sustratos utilizados frecuentemente como son: glucógeno fosforilasa, glucógeno sintasa y HMG-CoA reductasa.

Al contrario de lo que acontece con otras PrP, tiene actividad tanto serín/treonín como tirosín fosfatasa: desfosforila la DARPP-32 (una fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y AMPc) fosforilada en treonina (227)(57).

La PrP 2B es totalmente dependiente de calcio. La interacción de la calcineurina con los cationes divalentes es compleja y ocurre a múltiples niveles: 1. el enzima nativo (subunidades A-B) es inactivo en ausencia calcio; 2. la unión de 4

mols de calcio por mol de subunidad B provoca una activación parcial que aumenta en presencia de calcio-calmodulina; 3. la actividad de las distintas formas de PrP 2B aumenta considerablemente por unión a la subunidad A de ciertos metales de transición (Ni^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}); 4. la proteína purificada contiene zinc y hierro. Diversos autores han propuesto modelos que interrelacionan la acción de los cationes divalentes con cambios conformacionales de la PrP 2B (261)(315)(19)

1.7.4. Proteín fosfatasa tipo 2C

El enzima consiste en una sola subunidad de 43 kDa que ha sido purificada a homogeneidad desde diversos tejidos. A partir de 2.500 g de músculo esquelético se obtienen 0,3-0,4 mg de PrP 2C; y 0,2 mg a partir de 120 gramos de hígado. Las concentraciones son aproximadamente de $0,1\mu\text{M}$ y $0,8\mu\text{M}$ en músculo e hígado respectivamente.

El peso molecular aparente del enzima purificado es de 40 kDa por gel filtración y de 48 kDa en geles de acrilamida-SDS si bien en pasos previos de purificación el enzima muestra un peso molecular de 69 kDa lo que indica interacciones con otras proteínas en extractos crudos. Tanto en músculo como en hígado la purificación proporciona dos isoenzimas, separadas por cromatografía de intercambio iónico en Mono-Q, de pesos moleculares 42 y 44 kDa que poseen idénticas características enzimáticas y especificidad de sustrato, pudiendo ser proteólisis una de otra (156)(230).

La PrP 2C es dependiente de Mg^{2+} , al que puede sustituir parcialmente el Mn^{2+} pero no el Ca^{2+} . No es inhibida por los inhibidores 1 y 2; no desfosforila la glucógeno fosforilasa pero sí la subunidad α de la fosforilasa quinasa, la glucógeno sintasa y la histona II-A. La precipitación con etanol al 80 % de la PrP 2C no produce una especie de bajo peso molecular como sucede con las otras PrP, la proteína resultante es igualmente dependiente de Mg^{2+} , pero menos activa.

De las distintas proteínas fosfatasa, la PrP 2C es la que muestra mayor actividad sobre el sustrato HMG-CoA reductasa y HMG-CoA reductasa quinasa, pero dado que esta PrP 2C se encuentra únicamente en citosol y que la HMG-CoA reductasa es microsomal la importancia fisiológica es incierta (174).

1.8. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LAS PROTEIN FOSFATASAS

Las PrP 1, 2A, 2B y 2C están presentes en todas las células de mamífero, si bien su concentración y distribución subcelular varía considerablemente en función del tejido. La mejor fuente de PrP 1 es el músculo esquelético, las PrP 2A y 2C son abundantes en hígado y la PrP 2B se extrae principalmente de cerebro y músculo esquelético. En esta memoria nos referiremos con preferencia a la distribución en hígado y músculo esquelético, (véase Tabla IV).

Las PrP han sido purificadas a homogeneidad a partir de pocos tejidos y casi exclusivamente de la fracción citosólica, por ello los porcentajes de distribución subcelular se expresan en tanto por ciento de actividad relativa respecto a un ciento por ciento en extractos iniciales. Estos porcentajes oscilan sensiblemente no solo en función del tejido sino también del sustrato utilizado, de la dilución de las PrP en el ensayo y de la presencia de efectores, a causa de lo cual los porcentajes fluctúan según los autores consultados.

1.8.1. Citosólicas

En la fracción citosólica están presentes todas las PrP. En hígado y músculo esquelético la actividad PrP 2 (A, B y C) está localizada casi exclusivamente en la fracción citosólica. La actividad PrP 1 es también fundamentalmente citosólica, aproximadamente el 70 % en hígado y entre 40-50 % en músculo esquelético, para sustrato glucógeno fosforilasa (174). Los porcentajes de distribución para músculo esquelético y sustrato glucógeno fosforilasa presentados por Villa-Moruzzi y col. (338) son muy similares a los referidos por Ingebritsen y Cohen (174), (véase Tabla V -A-).

Sin embargo, en citosol de hígado de rata los porcentajes de distribución subcelular calculados varían ostensiblemente en función de sustrato utilizado: el 40 % de la actividad permanece en citosol cuando se ensaya con sustrato fosforilasa y menos del 20 % cuando se ensaya con sustrato glucógeno sintasa (37)(40). (véase Tabla V -B-).

DISTRIBUCION DE LAS PROTEIN FOSFATASAS

<u>Proteín fosfatasa</u>	<u>Músculo esquelético</u>	<u>Hígado</u>
PrP 1	0,5 μM^{a}	-
PrP 2A	30-75 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$	30-75 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$
PrP 2B	12-25 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$	-
PrP 2C	0,1 μM^{b}	0,8 μM^{b} 50-100 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$
<u>Inhibidores</u>		
I-2	0,3-0,5 μM^{c}	-
I-1	1,5-1,8 μM^{b}	-

TABLA IV

Distribución de las PrP y los inhibidores proteicos en músculo esquelético e hígado. Los datos se expresan en concentraciones μM o en μg de proteína purificada por cada 100 gramos de tejido.

^a Tung y col. (329), ^b Ballou y Fischer (19), ^c Tonks y Cohen (325).

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LAS PROTEIN FOSFATASAS

-A-

Fracción celular	Porcentajes de actividad PrP			
	Sustrato Glucógeno fosforilasa			
	PrP 1	PrP 2A	PrP 2B	PrP 2C
Citosol	43	62	88	103
Glucógeno	10	3	2	4
Microsomas	20	6	5	2

-B-

Fracción celular	PrP	Porcentajes de actividad PrP	
		Sustratos	
		Glucógeno fosforilasa	Glucógeno sintasa
Citosol	1 y 2	39 ± 1	18 ± 4
Glucógeno	1	38 ± 2	73 ± 5
Microsomas	1	23 ± 2	9 ± 2

TABLA V

En la Tabla A se expresan los porcentajes de actividad PrP sobre sustrato glucógeno fosforilasa, en hígado de rata, referidos a un 100 % de actividad en el sobrenadante postmitocondrial. Estos porcentajes se expresan para cada tipo de PrP. Ingebritsen y Cohen (174).

En la Tabla B se expresan los porcentajes de actividad PrP en hígado de rata referidos a un 100 % de actividad en el sobrenadante postmitocondrial, en relación a dos sustratos, glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa, con las desviaciones estándar para n= 3, Bollen y col. (37) Stalmans y Bollen (310).

1.8.2. Unidas a la fracción de glucógeno

La actividad que precipita con el glucógeno es fundamentalmente de tipo 1. Otras actividades PrP, como 2A, 2B o 2C, no están asociadas con el glucógeno, o si lo están es a niveles muy bajos (273). La actividad PrP 1 que reside en glucógeno tiene características especiales que la distinguen de la PrP 1 citosólica (173)(8). (véase Apartado 1.7.1.2).

En hígado de rata cuando el sustrato ensayado es glucógeno fosforilasa, a esta fracción le corresponde el 10 % o el 40 % según los autores y el 73 % si el sustrato es glucógeno sintasa. En músculo esquelético el porcentaje de actividad es del 20-25 % respecto al total (338).

1.8.3. Microsomales

En hígado de rata, con microsomas precipita el 20 % de la actividad total inicial (para sustrato glucógeno fosforilasa), que, al igual que sucede en glucógeno, es fundamentalmente de tipo 1, aunque pueden cuantificarse cantidades pequeñas de otras PrP.

En músculo esquelético el 25 % de la actividad total glucógeno fosforilasa fosfatasa, precipita con el complejo glucógeno-proteico y no se solubiliza por tratamiento con α -amilasa, permaneciendo unido a las membranas del retículo sarcoplásmico.

En otros tejidos la actividad relacionada con microsomas también es predominantemente tipo 1, así en glándulas parotídeas (238) o en leucocitos humanos (248).

1.8.4. Otras localizaciones

1.8.4.1. Núcleo

En núcleos aislados de hígado de rata se han separado dos actividades PrP: PrP 1 y PrP 2A; no se han encontrado actividades 2B ni 2C. La actividad PrP 1 es inhibida por los inhibidores 1 y 2, y los mapas peptídicos de la subunidad catalítica no se diferencia de los obtenidos para la subunidad catalítica de citosol. La PrP 2A es estimulada en presencia de proteínas básicas y es insensible a los inhibidores 1 y 2 (87)(205)(176).

La actividad nuclear se encuentra mayoritariamente en el interior del núcleo, nucleosol, y la concentración es siete veces superior a la extranuclear. Núcleos no lisados, tratados con Tritón X-100, de forma que no se produzca lisis, proporcionan el 15 % de la actividad total, lo que corresponde a la actividad PrP asociada a la pared externa de la membrana. Las membranas nucleares de hígado de rata contienen actividad PrP capaz de desfosforilar proteínas nucleares, así como proteínas exógenas. El distinto comportamiento en presencia de efectores indica que existe más de una actividad PrP en las membranas (312)(199).

1.8.4.2. Membranas plasmáticas

Se ha localizado actividad serín PrP en membranas plasmáticas de astrocitomas humanos (214), si bien parte de la actividad PrP en membranas plasmáticas de células de mamífero es actividad tirosín PrP que puede estar inhibida "in vivo" por inhibidores específicos y que durante los procesos de purificación se disocia con facilidad y se recupera en forma soluble (289). Se han localizado actividades PrP 1, 2A y 2B en membranas plasmáticas de linfoblastos T, Alexander y col. (11)

1.8.4.3. Mitocondrias

Se han purificado tres distintas PrP de origen mitocondrial a partir de corazón y riñón bovinos. Dos de ellas están localizadas en la membrana interna de la matriz mitocondrial y están relacionadas con el complejo multienzimático piruvato des-

hidrogenasa, son la piruvato deshidrogenasa fosfatasa y la branched-chain α -ceto ácido deshidrogenasa fosfatasa. La tercera fosfatasa, SP, es similar o idéntica a la PrP 2A citosólica y desfosforila no sólo los dos sustratos (PDH y BCKDH) sino también glucógeno fosforilasa y caseína (279).

1.8.4.4. Ribosomas

A partir de reticulocitos lisados, se han aislado tres tipos de PrP: PrP 1, PrP 2A (2A₁, 2A₂) y 2B, de estas, el 7 % de la actividad PrP 1 está fuertemente unida a los ribosomas (120).

Al contrario de lo que sucede con las PrQ ribosomales, hay muy pocos trabajos sobre PrP ribosomales. La mayor parte de los trabajos relacionados con ribosomas y PrP se refieren a proteínas ribosomales capaces de ser desfosforiladas por PrP 1 y 2B purificadas a partir músculo esquelético de conejo (12).

1.9. ESPECIFICIDAD DE LAS PROTEIN FOSFATASAS

Así como las proteínas quinasas reconocen preferentemente una secuencia aminoacídica específica, que a menudo se organiza como estructura beta, las proteínas fosfatasas necesitan mayores niveles de organización en torno al aminoácido fosforilado y por ello requieren un reconocimiento espacial del sustrato. Las proteínas quinasas precisan de segmentos que sobresalgan de la estructura a las cuales envuelven excluyendo el agua para minimizar la hidrólisis de ATP y aumentar su actividad fosfotransferasa, en cambio las PrP operan óptimamente en interfases proteicas. Por ello factores que pueden modificar la estructura espacial como son la interacción con metabolitos o la unión con otras subunidades es determinante para la especificidad (172) (305).

La influencia de sustratos y efectores alostéricos en la actividad PrP puede afectar significativamente la tasa de fosforilación/desfosforilación de los sustratos implicados, (256) (273). Es bien conocido que la unión de AMP a la glucógeno fosforilasa "a" previene la desfosforilación de ésta. La glucógeno fosforilasa "a" y no la glucógeno fosforilasa "b" es un potente inhibidor alostérico de la actividad glucógeno sintasa fosfatasa, (9)(244)(311). En músculo esquelético determinadas concentraciones de glucógeno pueden inhibir la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa, cuya sensibilidad al glucógeno aumenta en presencia de pequeñas concentraciones de AMP (233).

Las distintas PrP desfosforilan un gran número de proteínas que controlan el metabolismo del glucógeno (glucógeno fosforilasa quinasa, glucógeno fosforilasa, glucógeno sintasa, inhibidor 1), la glucólisis/glucogenólisis (piruvato quinasa), síntesis de ácidos grasos (ATP citrato liasa, acetil CoA carboxilasa), síntesis de colesterol (HMG-CoA reductasa, HMG-CoA reductasa quinasa), síntesis de proteínas (factor de iniciación, eIF-2), contracción muscular (cadena ligera de la miosina, histona 1, histona 2B) entre otros. Durante años se ha hecho corresponder una PrP para cada proceso de desfosforilación, con lo que el número de PrP era cada día mayor aunque entre ellas mostraban

idéntico comportamiento cromatográfico y escasas diferencias en la especificidad de sustrato.

Si las diferencias en especificidad se deben a proteínas distintas es una polémica que aún no está cerrada. Se ha publicado un gran número de trabajos en los que se propone la existencia de dos PrP, una específica para sustrato glucógeno fosforilasa y otra con mayor afinidad para el sustrato glucógeno sintasa. Estas afirmaciones se fundamentan principalmente en los distintos comportamientos cromatográficos en cromatografías de intercambio iónico (DEAE-celulosa, fosfocelulosa), distinta estabilidad para el sustrato glucógeno sintasa, la pérdida de la actividad glucógeno sintasa fosfatasa procedente del precipitado de glucógeno (cuestión ampliamente documentada), y diversa sensibilidad a la tripsina, entre otras diferencias, (131)(156) (193)(334).

Sin embargo, Alemany y col. (8)(9) no creen que estas diferencias sean suficientes para sostener la hipótesis de dos proteínas ya que anticuerpos obtenidos frente a la PrP 2A conjuntamente con I-2 son capaces de anular la actividad glucógeno sintasa fosfatasa en las muestras ensayadas.

La PrP 1_o tiene actividades glucógeno fosforilasa fosfatasa y glucógeno sintasa fosfatasa, obteniéndose los mismos patrones de comportamiento con los dos sustratos en todos los experimentos realizados, excepto en aquellos que llevan implícita rotura parcial y reactivaciones con cationes divalentes. Una posible explicación postula la destrucción de una(s) específica subunidad reguladora, necesaria para que se muestre la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa (37).

Otra posible explicación es que los comportamientos distintos se deban a propiedades intrínsecas del mismo enzima, o que pequeñas diferencias entre la forma nativa y las formas proteolizadas de aquélla, muestren relaciones de actividad desiguales para sustratos desiguales, que no son exclusivas de un tipo de tejido sino que se muestran tanto en hígado de rata como en músculo esquelético de conejo.

Si bien se hacen necesarios estudios a nivel molecular para conocer la identidad o diversidad de estas dos actividades, la opinión mayoritaria es que se trata de una única proteína.

Las PrP, además de los sustratos proteicos desfosforilan también péptidos sintéticos y sustratos no proteicos, como p-nitrofenilfosfato (pNPP), sin que ello pueda atribuirse a fosfatasas contaminantes.

Especial interés tienen los trabajos del Laboratorio de Merlevede, sobre la especificidad de las PrP 2A en desfosforilar caseína fosforilada por la caseína quinasa 2 ciertos péptidos sintéticos, que no son desfosforilados por otras PrP (2). En la misma línea de investigación se desarrolla el trabajo de Jakes y col. (177) en el que se propone el uso del sustrato histona H1 fosforilado por la PrP C para el ensayo específico de PrP 2A en extractos con actividad PrP 1 sin necesidad de utilizar inhibidores proteicos.

1.10. OBTENCION DE ANTICUERPOS FRENTE A LAS PrP

Las PrP 1 y 2A son inmunoprecipitadas específicamente por antisueros obtenidos frente a las subunidades catalíticas respectivas, pero sin embargo anticuerpos monoclonales obtenidos frente a PrP 1 y 2A muestran reactividad cruzada, lo que indica la existencia, confirmada tras la secuenciación, de epítopos comunes (44)(8)(306).

Anticuerpos obtenidos frente a la subunidad catalítica 2A de *Acanthamoeba* por Shacter y col. (297), reconocen la subunidad catalítica 2A de músculo de conejo y de otros tejidos, así como la PrP 2B de corazón bovino, si bien no reconocen la PrP 1_c. Los anticuerpos no inhiben la actividad catalítica 2A ni 2B, lo que indica que no se unen al centro activo. La inmunoreactividad cruzada entre las formas 2A y 2B indica que puede pertenecer a una misma familia de genes.

Se han obtenido anticuerpos policlonales frente al inhibidor 2. La incubación de estos anticuerpos con la PrP dependiente de ATP-Mg²⁺ impide la reactivación del complejo. Los anticuerpos frente al I-2 no presentan reactividad frente al I-1 ni a la subunidad 1_c (333).

1.11. REGULACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN FOSFATASA

Hemos comentado en el Apartado 1.9. el elevado número de rutas metabólicas en las que intervienen PrP y la relativa especificidad mostrada por éstas. Se hacen necesarios mecanismos selectivos que permitan modular su actividad desfosforilante en función de las necesidades celulares. Uno de los mecanismos que pueden ser más eficaces "in vivo" es la regulación por proteínas moduladoras, activadoras o inhibidoras y a las que nos referiremos a continuación. También se incluyen en esta sección la regulación por cationes y otros compuestos.

1.11.1. Proteínas termoestables

La actividad PrP tipo 1 se ve afectada por dos proteínas denominadas inhibidor 1 e inhibidor 2, descritas por vez primera por Huang y Glinsmann (162), que provocan disminución de la actividad PrP. Estas proteínas monoméricas de bajo peso molecular, tienen en común su resistencia a los procesos de denaturación (SDS, acidez, elevada temperatura), ausencia de cisteínas, bajo coeficiente de sedimentación y ser proteínas no globulares con fuerte asimetría.

La actividad PrP tipo 2A es poco sensible a estos inhibidores pues se requieren concentraciones cientos de veces superiores que las necesarias para causar inhibición en las PrP tipo 1. Como ya hemos visto el distinto comportamiento de las PrP frente a estos inhibidores es utilizado como criterio de clasificación. Se considera que una proteína es de tipo 1 si es inhibida por una concentración 5 nM de inhibidor 2, y se cataloga como tipo 2 si no se ve afectada. Las concentraciones de inhibidor 1 son iguales o ligeramente inferiores a las necesarias para el inhibidor 2 (171)(172).

Además de los inhibidores 1 y 2, otras proteínas termoestables de bajo peso molecular están implicadas en la modulación de la actividad PrP: el desinhibidor (DI) y el inhibidor específico de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa (RP-I).

1.11.1.1. Inhibidor 1 (I-1)

Ha sido purificado a homogeneidad a partir de músculo esquelético de conejo y su estructura primaria dilucidada (69) (4). Es una proteína monomérica, muy asimétrica, de peso molecular 18.640 daltons cuyo extremo N-terminal está acetilado. La zona más altamente hidrofóbica, localizada entre los aminoácidos 9 y 22, es esencial para su actividad inhibidora (5). Los valores dados de concentración intracelular en músculo esquelético oscilan entre 1,5 y 1,8 μM .

El inhibidor 1 disminuye la actividad PrP tipo 1 a concentraciones nanomolares, y muestra capacidad inhibitoria si previamente es fosforilado por la PrQ-AMPC en el residuo de treonina-35. La fosforilación del inhibidor 1 en este preciso residuo provoca su activación y la consiguiente inhibición de la PrP 1. La forma desfosforilada del inhibidor es inactiva (154). La desfosforilación del residuo de treonina puede conseguirse tanto por acción de la PrP 1 como por las PrP 2A y 2B (174).

El inhibidor 1 puede estar implicado en el control hormonal del metabolismo del glucógeno. La fosforilación del inhibidor 1 aumenta en presencia de isoproterenol o adrenalina, y disminuye en respuesta a la insulina (117)(250), ello sugiere que la actividad PrP tipo 1 está controlada por estas hormonas, regulando el metabolismo del glucógeno especialmente en músculo esquelético (115).

Así como la actividad de la subunidad catalítica de la PrP 1 es inhibida de forma instantánea por el I-1, la actividad de la PrP 1G no se afecta en igual grado, precisando una incubación previa y la presencia de concentraciones relativamente altas de sales en el ensayo.

1.11.1.2. Inhibidor 2 (I-2)

El inhibidor 2 (I-2) también denominado modulador (M), comparte con el inhibidor 1 su termoestabilidad, sensibilidad a la tripsina y ser resistente a la acción del ácido tricloroacético.

La obtención de I-2 libre implica siempre la separación de la subunidad l_c , lo que se consigue por calentamiento a 100 °C. Su actividad se muestra espontáneamente, siendo activo en su forma desfosforilada, al contrario de lo que acontece al I-1. Ha sido purificado a homogeneidad a partir de músculo esquelético, habiéndose localizado en numerosos tejidos de mamífero (283). El peso molecular determinado por secuenciación es de 22,8 kDa. Es una proteína muy hidrofílica en la que no se encuentra ninguna cisteína. No existen zonas de homología entre las secuencias de los inhibidores 1 y 2, si bien, al igual que el inhibidor 1, en el inhibidor 2 el extremo N-terminal está acetilado. La concentración intracelular en músculo esquelético es aproximadamente entre cuatro y seis veces inferior a la del I-1, alrededor de 0,3 μ M (62)(116)(159)(328).

No existen suficientes datos para saber si el inhibidor 2 "in vivo" se encuentra libre como tal, o en forma de precursor, o si en condiciones fisiológicas únicamente se encuentra unido a la subunidad l_c . Anticuerpos policlonales frente al I-2 de músculo reconocen mayoritariamente en extractos crudos, una proteína de 32 kDa, acompañada de otros polipéptidos de peso molecular mayor. "Inmunoblots" de extractos crudos, empleando anticuerpos monoclonales, muestran una proteína de 60 kDa, posible precursor de este inhibidor (141).

El inhibidor 2 puede ser fosforilado "in vitro" por acción de la QSQ-3 y ATP-Mg²⁺, en el residuo de treonina-72. La desfosforilación se realiza tanto por PrP tipo 1, 2A o 2B. Otras quinasas distintas de la QSQ-3, como la caseína quinasa II, caseína quinasa I y la PrQ-AMPC, son capaces de fosforilar el inhibidor 2 en otros residuos distintos de la treonina-72, sin embargo su incidencia sobre su comportamiento como inhibidor es incierta y

no se conoce el papel de estas fosforilaciones "in vivo" (1)(3)(6)(160).

1.11.1.4. El Desinhibidor (DI)

El desinhibidor es una proteína termoestable, sensible a la acción de la tripsina, que fue detectada por vez primera en las partículas de glucógeno de hígado de perro, como una actividad que protege la PrP 1_o de la acción de los inhibidores 1 y 2 (84). Se ha purificado y obtenido homogéneo de diversos tejidos, presentando un peso molecular aproximado de 8,3 kDa en geles de acrilamida y SDS (136)(137)(138).

El DI está regulado por fosforilación/desfosforilación y solo se muestra activo en forma desfosforilada. El estado de fosforilación del desinhibidor puede estar controlado "in vivo" por la PrQ-AMPC y por las PrP 2A, las más activas frente al desinhibidor. El DI interviene en la conversión de formas inactivas a formas espontáneamente activas "in vivo", ya que no sólo antagoniza la acción del inhibidor 1 sino que también estabiliza la PrP 1I es su estado activado (135). La presencia de desinhibidor en las preparaciones de glucógeno explica por qué éstas son tan poco sensibles a la acción de los inhibidores 1 y 2 (319).

La adición del DI purificado a la fracción filtrada del sobrenadante postmitocondrial de hígado de rata incrementa varias veces la actividad PrP. Ello ha permitido a Goris y Merlevede (139) la purificación de una nueva PrP tipo 1, dependiente de $ATP-Mg^{2+}$, espontáneamente activa a la que nos referimos en el apartado 1.7.1.1.

1.11.1.5. Inhibidor de la actividad proteín fosfatasa 2A (RP-I)

Es el primer inhibidor descrito que afecta la actividad PrP tipo 2. Inhibe la actividad PrP 2A, sin alterar la actividad PrP tipo 1 cuando el sustrato fosforilado es HMG-CoA reductasa. Si el sustrato es glucógeno fosforilasa no afecta ni la actividad PrP 1 ni la 2A, lo que sugiere una acción específica para el sustrato HMG-CoA reductasa y permite proponer nuevos

mecanismos de regulación a través de procesos de fosforilación/-desfosforilación para este último enzima.

Ha sido purificado en nuestro Laboratorio a homogeneidad partir de citosol de hígado de rata, mostrando un peso molecular aparente de 21 kDa en geles de acrilamida-SDS (295). Mantiene en común con las proteínas hasta ahora descritas su resistencia a elevadas temperaturas, ser ácido resistente y la sensibilidad a la tripsina.

1.11.1.6. Otras proteínas termoestables

Una proteína termoestable y ácido resistente denominada DARPP-32 (fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc-32 kDa) se muestra capaz de inhibir la PrP 1 a concentraciones nanomolares. Esta proteína mantiene muchas analogías con el inhibidor 1 y puede ser importante en el tejido nervioso (153)(345).

A partir de tejido nervioso se ha aislado otra proteína, sustrato G, con actividad inhibidora sobre PrP 1, que mantiene ciertas características comunes con el inhibidor 1 y la proteína DARPP-32, como son la capacidad de fosforilación en treonina y la homología en torno al centro fosforilado (154).

También se ha aislado una proteína termoestable y ácido resistente que inhibe específicamente una de las fosfatasa mitocondriales asociada al complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa. Esta proteína no inhibe la PrP 1 o PrP 2A (81) (279).

1.11.2. Proteínas básicas y poliaminas.

A la conocida clasificación de las PrP basada en la sensibilidad a los inhibidores 1 y 2, distintos grupos proponen la utilización del comportamiento diferenciado frente a los policationes en la caracterización de las PrP, ya que pequeñas concentraciones de éstos ($\mu\text{g/mL}$) activan las PrP tipo 2, especialmente si se utiliza glucógeno fosforilasa como sustrato. Si una PrP no es sensible al inhibidor 2 pero aumenta su actividad

en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de histona H1 o de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de protamina se considera tipo 2 (234)(331).

Pelech y Cohen (274) proponen la utilización de protamina a concentraciones de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de glucógeno fosforilasa como sustrato a modo de criterio suficiente para distinguir entre PrP 1 y 2A.

Las proteínas básicas como la protamina, poli-L-lisina e histona H1, activan las PrP 2A ($2A_0$, $2A_1$ y $2A_2$) sin provocar disociación de la subunidad catalítica. La protamina y la poli-L-lisina son capaces de estimular las actividades PrP A_1 y A_2 en todos los casos, sin depender del sustrato utilizado, estimulando también la actividad catalítica pero en menor grado. La subunidad catalítica precisa de mayores concentraciones (4 μM) que la fosfatasa nativa PrP $2A_1$ (0,4 μM). La acción de estas proteínas básicas se debe tanto a la interacción con las PrP como con sus sustratos.

La importancia fisiológica es discutible ya que a excepción de la histona H1, que se encuentra en el núcleo, protamina y poli-L-lisina no se encuentran en células de mamíferos. La reactivación debida a sustancias básicas puede indicar que otros compuestos intracelulares básicos regulan la actividad PrP de forma similar.

Es sabido que las poliaminas básicas espermina y espermidina son capaces de activar las PrP 1 y 2A. El grado de activación varía en función del sustrato. A concentraciones fisiológicas la espermina actúa promoviendo la actividad PrP sobre sustrato glucógeno sintasa, e inhibiendo la PrP sobre sustrato glucógeno fosforilasa. En el caso de la espermidina se requieren concentraciones más elevadas. El mecanismo de acción de la espermidina sobre las PrP 1 y 2A parece ser el resultado de su interacción tanto con las PrP como con el sustrato. Otras poliaminas ensayadas como la putrescina no tienen efecto (331).

1.11.3. Otros activadores e inhibidores

1.11.3.1. Cationes divalentes

La importancia de los cationes divalentes, en particular el Mn^{2+} , en la reactivación de las PrP se puso de manifiesto en los primeros trabajos sobre PrP publicados por Cori en 1945. La respuesta a cationes divalentes de las PrP varía en función de su estado inicial de actividad y del sustrato empleado; también es distinta sobre extractos iniciales o sobre proteínas purificadas y almacenadas, pudiendo obtener resultados opuestos. Diferencias muy marcadas se producen cuando los sustratos son fosfopéptidos sintéticos (232).

a) Acción de los cationes divalentes sobre la PrP 1

La l_c inactiva libre se transforma en una subunidad catalítica activa en presencia de $1mM Mn^{2+}$. La activación transcurre en dos etapas: en la primera se forma un complejo que puede revertir a su forma inicial inactiva en presencia de EDTA, en la segunda etapa, tras la incubación con Mn^{2+} , se obtiene una forma activa que no precisa Mn^{2+} , al contrario, si la l_c se encuentra en forma activa el Mn^{2+} puede inhibirla significativamente, especialmente cuando se utiliza glucógeno fosforilasa como sustrato. Otros cationes como Mg^{2+} y Ca^{2+} a concentraciones milimolares no modifican la actividad. Cuando la l_c se encuentra unida al inhibidor 2 no se ve afectada.

b) Acción de los cationes divalentes sobre las PrP 2

Todas las formas de PrP 2A son reactivables en presencia de concentraciones entre 0.1 y 5 $mM Mn^{2+}$. El grado de reactivación y la concentración de catión varían de un sustrato a otro, aunque se produce en todos los sustratos ensayados. La acción del Mg^{2+} es selectiva sobre el sustrato. El Ca^{2+} no provoca activación e incluso puede producir una ligera inhibición. Otros cationes como Zn^{2+} o Fe^{2+} producen siempre fuerte inactivación (19).

Ya se vio en el Apartado 1.7.3. la importancia de los cationes divalentes en la activación de la PrP 2B.

La PrP 2C es absolutamente dependiente de Mn^{2+}/Mg^{2+} para todos los sustratos ensayados. La máxima actividad se consigue con concentraciones de 5-10 mM Mg^{2+} . El Mn^{2+} y el Co^{2+} pueden sustituir al Mg^{2+} , pero no al Ca^{2+} .

1.13.3.2. Fluoruros - Compuestos pirofosforilados y otros

Es bien conocido que el ión fluoruro inhibe las serín-treonín proteín fosfatasas. Se utiliza NaF (50 mM) como inhibidor de las PrP 1 y PrP 2 (221). También los compuestos pirofosforilados, como ATP, PPI, CTP o GTP tienen el mismo efecto. Tras prolongada exposición a estos compuestos, la actividad no se recupera aunque se eliminen del medio por dilución, si bien parte de la actividad puede recuperarse por adición de Mn^{2+} (281).

Contrariamente a las tirosín fosfatasas, poco sensibles a la acción de los quelantes, las serín/treonín fosfatasas son sensibles a la presencia de quelantes de cationes como el EDTA (119). El efecto activador de los cationes divalentes y el hecho de que ciertos compuestos acomplejantes inhiban la actividad PrP, ha llevado a considerar que las serín-treonín proteín fosfatasas son metaloenzimas, aunque esta hipótesis no es compartida por gran número de investigadores. Compuestos como el fluoruro o el ATP no inhiben las PrP por quelación de los cationes divalentes y cada uno de estos factores se relaciona con la PrP por puntos distintos (39)(296).

La trifluoroperacina es un compuesto que inhibe la PrP 2B sin afectar las PrP 1, 2A o 2C hasta concentraciones de 150 μ M (315).

1.12. CONTROL DE LA ACTIVIDAD PROTEIN FOSFATASA POR HORMONAS Y OTROS AGENTES EXTRACELULARES

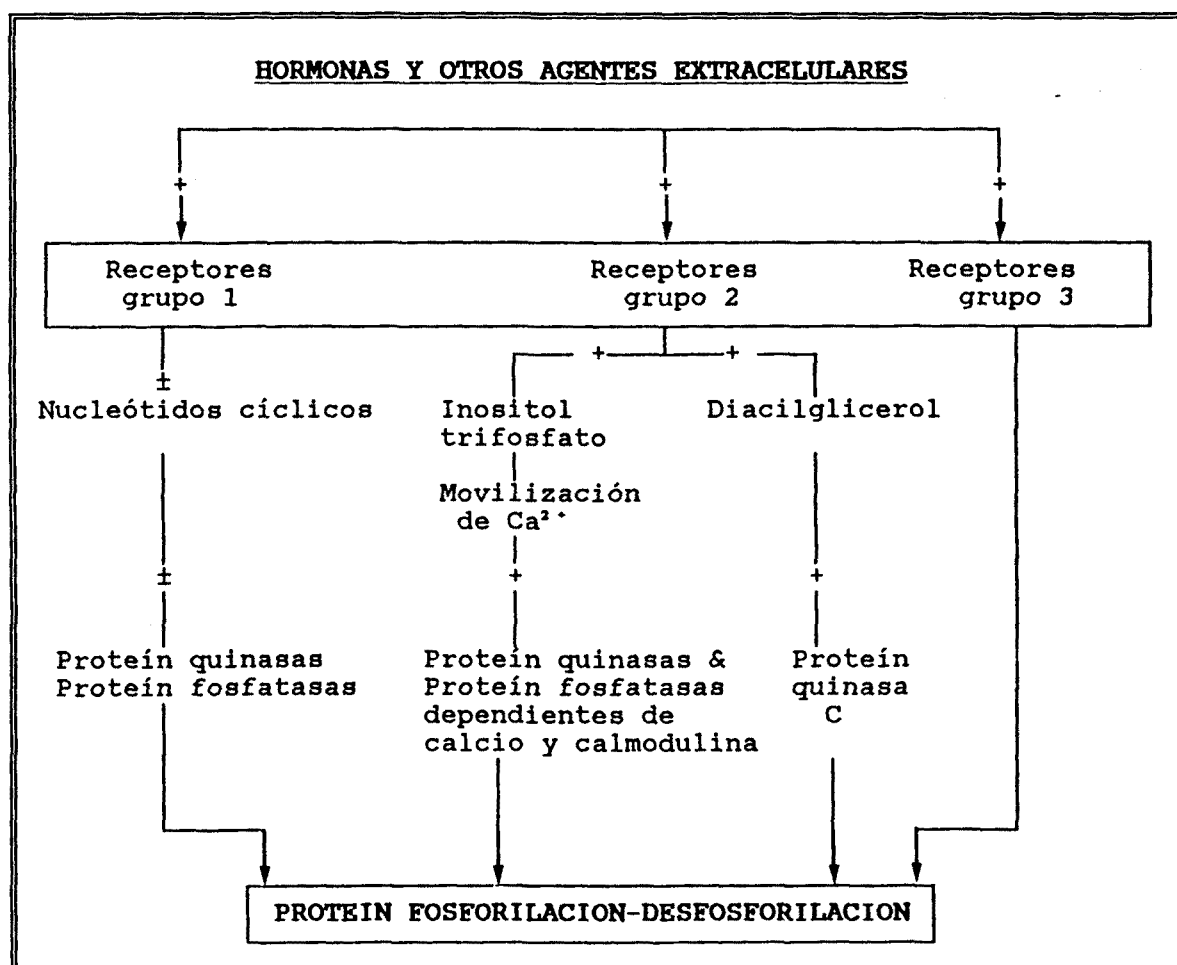
La fosforilación reversible es probablemente uno de los mecanismos más importantes en la regulación celular a nivel postransduccional. Gran número de serín proteín quinasas, como las dependientes de AMPc, GMPc, o calcio y calmodulina y también diversas tirosín proteín quinasas, son activadas como respuesta a señales extracelulares, principalmente hormonas y factores de crecimiento. A través de mensajeros secundarios intracelulares (AMPc, GMPc, calcio, calmodulina, diacilglicerol) estas proteín quinasas pueden provocar cambios en la fosforilación de numerosos sustratos proteicos tal como se muestra en el modelo propuesto por Krebs (204) (véase Esquema X). Siendo las proteín fosfatasas las responsables de revertir la acción de las proteín quinasas, es de esperar que no sean espectadores pasivos de este proceso y que a su vez se hallen reguladas directamente por hormonas.

1.12.1. Variación de la concentración de nucleótidos cíclicos

Un primer grupo de hormonas, arbitrariamente designado como grupo I, actúa a través de receptores que provocan un aumento de nucleótidos cíclicos, afectando de este modo la fosforilación de los sustratos de las proteín quinasas dependientes de estos nucleótidos. En este grupo I se incluyen hormonas como el glucagon, las adrenocorticotropas, catecolaminas β -adrenérgicas y gonadotropinas, que interactúan con receptores específicos y estimulan la adenilato ciclasa. También incluye este grupo a otros efectores capaces de inhibir la adenilato ciclasa como son los agentes α -adrenérgicos.

¿Cómo el aumento o la disminución de AMPc puede ejercer un control sobre la actividad de las distintas PrP?. Esta es una cuestión controvertida. Ya en 1978, Burchell y col. (51) sugieren que la actividad PrP 1 está relacionada con las fosforilaciones catalizadas por la PrQ-AMPc. Posteriormente numerosos laboratorios han intentado hallar una relación entre el tratamiento con glucagon y la actividad PrP (239)(255)(308).

REGULACION DE LA ACTIVIDAD PROTEIN FOSFATASA
POR HORMONAS Y OTROS AGENTES EXTRACELULARES



ESQUEMA X

Principales vías de actuación de hormonas y otros agentes intracelulares que finalmente modifican el estado de fosforilación de las proteínas, Krebs E.G. (204).

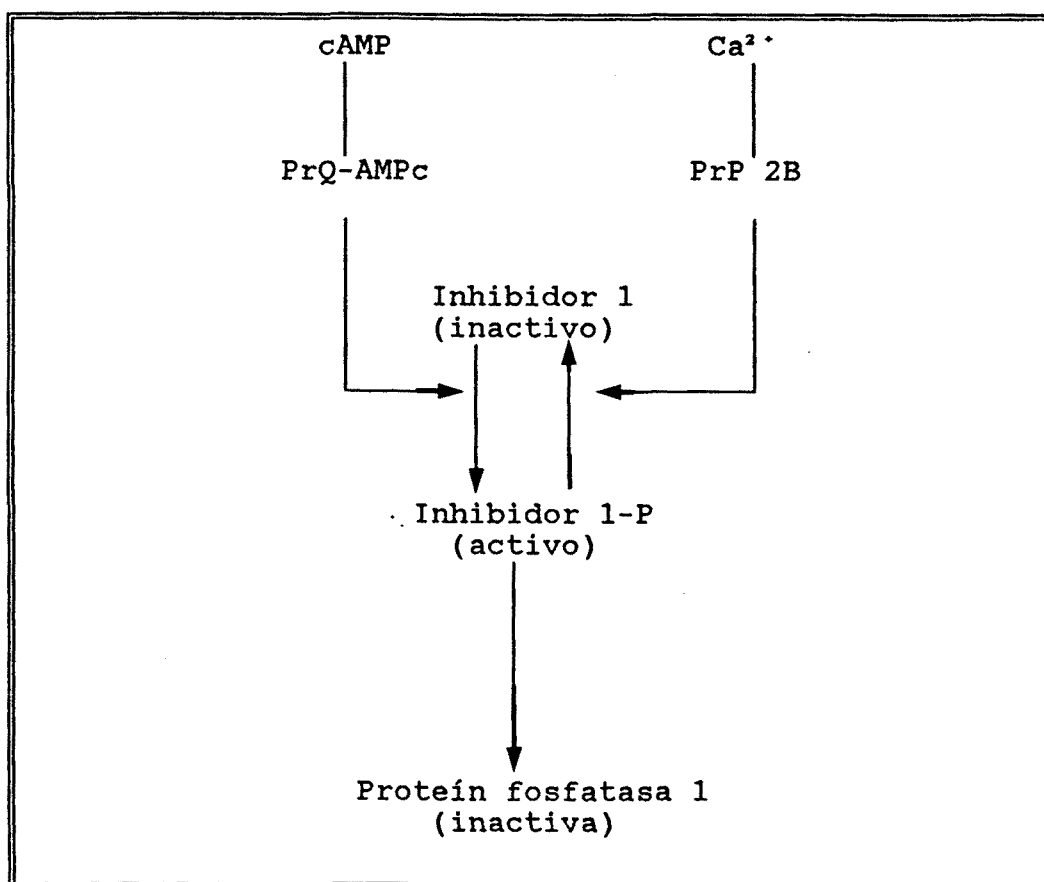
Para explicar la acción del glucagon y de otras hormonas que modifican los niveles de AMPc se ha propuesto el siguiente mecanismo: el efector, al unirse a su receptor de membrana, provoca la estimulación de la adenilato ciclase y el consiguiente aumento de AMPc intracelular. La acumulación de AMPc causa la disociación de las subunidades C y R (catalítica y reguladora) de la PrQ-AMPc. La unión del AMPc a la subunidad R libera la subunidad C que puede así expresar su actividad PrQ. La acción del glucagon sobre las PrP se explica tanto a través de cambios en la actividad de la subunidad catalítica como de la liberación de la subunidad reguladora. Veámos como se explican estos mecanismos:

a) Cambios en la subunidad reguladora de la PrQ-AMPc

El glucagon modula la cantidad y el grado de fosforilación de la subunidad reguladora de la PrQ-AMPc. La subunidad reguladora de la PrQ-AMPc II inhibe la desfosforilación de la glucógeno fosforilasa por PrP 1 y 2A, lo que sugiere que la subunidad reguladora tiene una función inhibidora propia sobre las PrP paralela a su capacidad de inhibición de la subunidad catalítica de la PrQ-AMPc (191).

b) Aumento de actividad de la subunidad catalítica de la PrQ-AMPc

La acción del glucagon mediada por la subunidad catalítica de la PrQ-AMPc tiene como intermediario al inhibidor 1 (véase Esquema XI). El hecho de que la PrQ-AMPc fosforile el inhibidor 1 y que una vez fosforilado muestre su actividad sobre la PrP 1, permite sugerir que el glucagon puede modular la actividad PrP tipo 1. Se ha demostrado que dicha fosforilación se produce "in vivo" por acción de hormonas que aumentan los niveles intracelulares de AMPc; la adrenalina y el isoproterenol, a través de un aumento del AMPc intracelular y aumento de la actividad PrQ-AMPc puede incrementar el estado de fosforilación del inhibidor 1 y ello conlleva un incremento en la inhibición de la PrP tipo 1 (72)(115)(117)(118)(189)(250).

REGULACION DE LA ACTIVIDAD PrP 1 POR AMPc Y Ca²⁺

ESQUEMA XI

Hipótesis de regulación de la actividad PrP 1 por AMPc y Ca²⁺, via fosforilación y desfosforilación del inhibidor 1, Ingebritsen y Cohen, (171).

Sin embargo, la mediación del I-1 en esta cascada es discutida. La capacidad del I-1, una vez fosforilado, de actuar sobre formas nativas de la PrP 1 ha sido puesta en duda por Khatra y col. (190). En los experimentos "in vivo" realizados por Farkas y col. (100) en hígado de rata, la administración de glucagon provoca disminución (20-40 %) de la actividad PrP sobre sustrato glucógeno fosforilasa con un valor máximo a los 7 minutos y un retorno a los valores normales a los 30 minutos. Sin embargo no se ven afectadas las actividades de los inhibidores 1 y 2.

Los últimos trabajos se orientan a explicar la acción del glucagon según los distintos tipos de PrP 1, (PrP 1₁ y PrP 1₀) y la redistribución de las actividades PrP 1 tras el efecto hormonal, ya sea por traslocaciones de las actividades catalíticas de uno a otro compartimento o por la traslocación de efectores de esta actividad.

Se ha propuesto que PrP 1₀ está regulada estrechamente tanto por niveles hormonales como por el estado metabólico del animal. Así en animales en ayunas y tratados con glucagon, de forma que la concentración de glucógeno en hígado baja drásticamente, la PrP 1₀ es esencialmente citosólica, pudiendo no obstante recuperarse al añadir glucógeno a la preparación y centrifugar luego para obtener el precipitado. Cantidades de 0,1 mg/mL de glucógeno son suficientes para unir el 50 % de la actividad soluble (246). Toth y col. (326) demuestran que la administración de glucagon "in vivo" provoca, a los 5 minutos, disminución en extractos crudos de la actividad PrP sobre sustrato glucógeno fosforilasa (-17 %) sin modificar la actividad sobre sustrato glucógeno sintasa si bien transcurridos 30 minutos la acción del glucagon no es apreciable sobre ninguno de los dos sustratos (326).

Se había observado "in vitro" que la PrP 1₀ es sustrato de la PrQ-AMP₀; "in vivo" la PrP 1₀ parece ser también sustrato de esta quinasa. La adrenalina es capaz de aumentar "in vivo" el grado de fosforilación de la subunidad G de la PrP 1₀, provocando disociación de la subunidad catalítica, que de esta

forma es desprendida en un 50 % hacia el citosol. La acción de la adrenalina provoca la traslocación de la I_c desde el glucógeno al citosol, donde posiblemente se une a otra proteína, quedando la subunidad G mayoritariamente ligada al glucógeno (157)(222). Ello insinúa un posible mecanismo de control de la glucogenólisis e inhibición de la síntesis de glucógeno, hasta ahora no considerado. A la vez, la fosforilación de la subunidad G la hace más sensible a la acción del inhibidor 1, disminuyendo la proporción de PrP I_c sedimentable por glucógeno, favoreciendo su paso al citosol, con lo que se previene la desfosforilación de enzimas regulables del metabolismo del glucógeno, Hubbard y Cohen (163).

En el trabajo de Toth y col. (326) se propone que los cambios de actividad PrP debidos a la acción hormonal se producen exclusivamente en el citosol, sin alterar las PrP localizadas en otros compartimentos, mitocondrias, núcleo o la fracción glucógeno/microsomas. El control de las actividades PrP está mediado por efectores citosólicos, unidos fuertemente al enzima, de alto peso molecular y transferibles, que permiten modular la actividad de las PrP sobre los sustratos glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa, en citosol.

1.12.2. Variación en la concentración de calcio y diacilglicerol

Diversas hormonas como noradrenalina, vasopresina y angiotensina provocan glucogenólisis en hígado de rata por procesos que generan dos mensajeros intracelulares: diacilglicerol y calcio. La producción de estos mensajeros se inicia con la rotura de fosfatidil inositol difosfato que genera diacilglicerol y trifosfato de inositol.

El aumento de diacilglicerol puede causar activación de las diferentes especies de proteína quinasa C, cuyo estado de fosforilación está controlado por PrP estimulables por poliaminas (PrP 2A) (265), o por las mismas poliaminas, que evitando la asociación de las PrQ C a las membranas impiden su activación, (243).

Por su parte, el trifosfato de inositol causa la salida de calcio de depósitos intracelulares, con el consiguiente aumento de calcio accesible, lo que puede afectar tanto a las PrP dependientes de calcio y calmodulina como a la PrP 2B, dependiente también de calcio y calmodulina (72). Además el aumento de calcio intracelular determina variaciones en la actividad de la PrP 1 a través de la modificación del estado de fosforilación del inhibidor 1, (véase Esquema XI).

Las hormonas que aumentan los niveles intracelulares de calcio provocan la inhibición de la PrP sobre sustrato glucógeno sintasa. Concentraciones de $0,3 \mu\text{M Ca}^{2+}$ son suficientes para provocar inhibición del componente G de la glucógeno sintasa fosfatasa. Sin embargo no se encuentran variaciones en la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa (245).

La vasopresina provoca una disminución de la actividad PrP (-30 %) sobre sustrato glucógeno fosforilasa sin afectar la actividad sobre sustrato glucógeno sintasa (326).

Algunas hormonas, como el glucagon y la adrenalina, son capaces de activar los receptores indicados como 1 y 2 en el esquema X, liberando AMPc y calcio como mensajeros secundarios, y permitiendo flexibilizar y versatilizar la acción hormonal. Uno de los mecanismos alternativos que se ha propuesto para la acción del glucagon con independencia del aumento de AMPc, está relacionado con el aumento del Ca^{2+} intracelular por movilización de las reservas del retículo endoplásmico. Se ha demostrado que el glucagon puede modificar estructuras membranosas, en especial el retículo endoplasmático. La relación entre el glucagon, el calcio y la actividad PrP puede ser de gran interés. Si bien el AMPc continúa siendo el principal mensajero de la acción del glucagon (308).

1.12.3. Receptores con actividad tirosín proteín quinasa

Finalmente, el tercer grupo actúa a través de receptores con actividad tirosín PrQ. De este grupo la insulina es la hormona más estudiada.

La importancia de la insulina en la regulación del metabolismo del glucógeno está ampliamente comentada en Molecular Basis in Insulin Action, en los capítulos escritos por Miller y col. (240), Avruch y col. (16) y Cohen y col. (71). Muchos de los efectos de la insulina sobre la estimulación de la síntesis de glucógeno y sobre la inhibición de la glucogenólisis, se explican si la PrP 1 se activa como respuesta a esta hormona, ya que tiene como sustratos la glucógeno fosforilasa, la glucógeno sintasa, y la fosforilasa quinasa.

La administración de insulina incrementa específicamente la actividad espontánea de la PrP 1, sobre sustrato glucógeno fosforilasa y sobre glucógeno sintasa (35)(239). La actividad PrP 2A no se ve afectada por acción de la insulina, aunque sí puede incidir sobre las PrP 2B y 2C (326).

La administración de insulina "in vivo" provoca aumento de actividad PrP sobre sustrato glucógeno fosforilasa, Farkas y col. (100). Toth y col. (326) demuestran que la administración de insulina más glucosa "in vivo" provoca, a los 5 minutos, aumento de la actividad PrP, tanto sobre sustrato glucógeno fosforilasa (+30 %) como sobre sustrato glucógeno sintasa (+35 %), alcanzando estos cambios tan sólo a la fracción citosólica, sin afectar a las fracciones glucógeno/microsomales

Dragland y col. (91) han probado que en ratas, cuya diabetes ha sido inducida experimentalmente con alloxana, disminuye la actividad PrP 1, resultados que coinciden con otros autores que aprecian una disminución del 50 % en la actividad PrP 1 en las mismas condiciones. Si la diabetes es espontánea, adquirida genéticamente y no inducida experimentalmente, se produce un incremento del 25 % de la actividad PrP 1 sin que se modifique la actividad PrP 2 (144). Sin embargo si se aumentan los niveles

circulantes de insulina por alimentación de animales en ayuno, no se producen variaciones en los niveles de glucógeno sintasa fosfatasa y sí incrementos en la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa (224) lo que indica distinta regulación de la actividad en función del sustrato.

Se han propuesto dos mecanismo de acción de la insulina: directamente, a través del aumento de actividad tirosín PrQ del receptor de la insulina, o bien a través del aumento de mensajeros intracelulares, que interactúan con PrQ y PrP. Veámos a continuacuíón como se explican estos mecanismos:

1.12.3.1. Actividad tirosín proteín quinasa del receptor de la insulina

Cohen (71) ha probado la capacidad del receptor de la insulina para fosforilar las diversas PrP y los inhibidores 1 y 2. Tan solo el I-2 se fosforila en un residuo de tirosina por acción del receptor de la insulina, por lo que la importancia fisiológica es cuestionable. La incubación de la PrP 1, con los receptores de la insulina y con el receptor del factor de crecimiento EGF, provoca la fosforilación del I-2, sin afectar la actividad.

Estos resultados han orientado la búsqueda de mecanismos alternativos de la acción de la insulina distintos a la acción directa del receptor de la insulina, como es a través de aumentos intracelulares de mensajeros secundarios.

1.12.3.2. Aumento de mensajeros intracelulares por acción de la insulina

Se ha propuesto que los cambios de actividad de la PrP 1 debidos a la acción de la insulina, pueden deberse a: a) variaciones en la actividad del inhibidor 1, b) variaciones en la actividad del inhibidor 2, c) cambios en los mecanismos de inactivación reversible de la PrP 1. En los tres casos la insulina controla la actividad PrP a través de cambios en el grado de

fosforilación de residuos serina o treonina de estas proteínas a través de mensajeros secundarios (318).

a) Cambios en la actividad del inhibidor 1

Se ha demostrado "in vivo" que el inhibidor 1 está bajo control de la insulina. El grado de fosforilación del I-1 está controlado negativamente por la insulina y positivamente por isoproterenol o adrenalina. El I-1 puede fosforilarse por acción de la PrQ-AMP_c, activándose, y al mismo tiempo evitando la acción de la PrP 1 sobre otros sustratos fosforilados por la PrQ-AMP_c o por otras PrQ independientes. De esta manera el aumento de AMP_c incide en el grado de fosforilación de sustratos que no son fosforilados por la PrQ-AMP_c. (118).

b) Variaciones en la actividad del inhibidor 2

El control hormonal sobre la PrP 1 se produce a través de la GSQ-3 que fosforila al I-2 permite mostrar la actividad catalítica de la PrP 1. Se ha observado en células de tejido adiposo un aumento del 40 % de la fosforilación en el I-2 por acción de la insulina, concomitante con un aumento de la actividad PrQ II. Por otro lado, se ha de mostrado que la actividad PrQ II y la actividad GSQ-3 se sinergizan en la fosforilación "in vivo" del I-2, lo que permite sugerir nuevos mecanismos de la acción hormonal de la insulina sobre la PrP 1 (212).

c) Inactivación reversible de la PrP 1,

La insulina, a través de un mensajero podría bloquear la autofosforilación del complejo II, (véase Esquema IX) congelando la actividad PrP en su forma activa (347). Otros autores también propone la interconversión de las formas activa/inactiva de la PrP 1, como posible diana de la acción hormonal (326).

Algunos trabajos parecen contradecir los mecanismos a) y b); en células de hepatocitos en cultivo la administración de insulina aumenta entre 30-50 % la actividad PrP de forma re-

versible, sin que los inhibidores 1 y 2 se vean afectados por la acción de la insulina, Farkas y col. (100).

Alternativamente la acción de la insulina se explica también a través de cambios en los niveles intracelulares de oxalil-tioesteres, esperminina y AMPc. La administración de insulina comporta la disminución de los niveles de oxalil-tioesteres, mensajeros intracelulares negativos de esta hormona y de otros efectores que actúan sobre receptores con actividad PrQ y así controlan negativamente la actividad PrP (142). La insulina a través de un mensajero secundario provoca cambios en los niveles de esperminina (73). Se sabe también que la insulina disminuye la afinidad de la proteína quinasa por el AMPc, lo que evita la disociación del enzima y neutraliza a las hormonas que producen variaciones en los niveles de este nucleótido, como glucagon y agentes α -adrenérgicos (121).

Se precisan más estudios estructurales de las PrP y de las proteínas reguladoras para clarificar el papel hormonal de la insulina en este sistema, conocer como varían los niveles de los I-1 e I-2 como responde la actividad GSQ-3 en condiciones fisiológicas y en ratas diabéticas.

1.13. ESTUDIOS DE CLONACION. HOMOLOGIA ENTRE LAS SUBUNIDADES CATALITICAS

A partir de 1987 se ha producido un gran avance en el conocimiento molecular de las proteínas fosfatasa gracias a la utilización de técnicas de DNA recombinante, desarrolladas simultáneamente en distintos laboratorios. Ello ha permitido deducir las secuencias aminoacídicas de numerosas PrP y también de otras fosfatasas como la fosfatasa alcalina o la fosfatasa ácida a la vez que ha puesto de manifiesto homologías entre subunidades y la existencia de diversos isotipos.

Trabajos previos realizados en el Laboratorio de P. Cohen, con las subunidades catalíticas 1 y 2A, purificadas a partir de músculo esquelético de conejo, indicaban que éstas eran producto de genes distintos, ya que la rotura de los polipéptidos por proteasas producía mapas peptídicos distintos Tung y col. (329).

1.13.1. Subunidades catalíticas tipo 1.

A partir de una genoteca obtenida de músculo de conejo (34) con sondas de oligonucleótidos sintetizados a partir de las secuencias peptídicas de la subunidad catalítica 1_c, se ha conseguido un clon de cDNA de 1,5 kb que se relaciona bien con un RNA_m de 1,6 kb que codifica para la subunidad catalítica tipo 1, cuya secuencia deducida es de 311 residuos con un peso molecular de 35.432 daltons (PrP 1_B). Zheng y Lee (352) han traducido "in vitro" un poli A⁺ RNAm obtenido de músculo de conejo que codifica únicamente para la proteína de 35,4 kDa y no para polipéptidos de mayor tamaño por lo que confirman el trabajo anterior. Con posterioridad se ha obtenido un nuevo clon de cDNA que codifica para una proteína de 330 residuos y 37,5 kDa, que corresponde a la PrP 1_α (34)(75).

La comparación de las secuencias deducidas de ambas proteínas muestra que el isotipo 1_α tiene 19 residuos más que el 1_B en el extremo aminoterminal, y que a partir del residuo aminoacídico 33 del isotipo 1_α la identidad de la secuencia de nucleó-

tidos es total, no sólo en la región codificante sino también en la región 3' no codificante. Ello sugiere que ambas proteínas están codificadas por un mismo gen y las diferencias se producen a nivel del inicio de la transcripción (75).

1.13.2. Subunidades catalíticas tipo 2A

Se han aislados dos clones de cDNA que codifican para dos isotipos de la PrP 2A: 2A₁ y 2A₂, a partir de una genoteca de cDNA de músculo esquelético de conejo, construida en plasmido pgt10. La secuencia aminoacídica deducida para la subunidad 2A₁ es homóloga en un 97 % a la descrita para la subunidad 2A₂, ambas con el mismo número de residuos aminoacídicos (309) y con un peso molecular casi idéntico (35,59 kDa y 35,58 kDa respectivamente) (77)(78).

También se han aislado dos clones de cDNA a partir de cortex adrenal bovino (140) de riñón de cerdo (317) de hígado humano (14) y de hígado de rata (195). Los distintos clones presentan una elevada homología en su secuencia de nucleótidos, hasta el 97 % el clon aislado de músculo esquelético y el de hígado humano y también en su secuencia aminoacídica: las secuencias obtenidas se distinguen tan solo en el residuo 55, que en unos casos es cisteína y en otros arginina para uno de los isotipos; en el otro las diferencias son de 8 y 9 aminoácidos. La gran homología entre los isoenzimas explica que no sean detectadas las diferencias por técnicas de mapeo peptídico.

Al contrario de lo que sucede con las formas 1 α y 1 β de la PrP 1, que están codificados por un mismo gen y cuyas diferencias se producen a nivel transcripcional, los isotipos 2A α y 2A β son productos de genes distintos, ya que la región 3' no codificante no presenta ninguna homología, aun cuando la región codificante presenta una identidad del 82 % (78). Los clones de cDNA aislados de distintos órganos y animales son asimismo producto de genes distintos. El hecho de que la PrP 2A comprenda una familia de isoenzimas codificados por genes distintos sugiere un importante papel regulador de esta PrP en el metabolismo celular, y posibilita que los dos genes se expresen y distribuyan espe-

cíficamente en un determinado tejido, de forma similar a como sucede con las PrQ C y PrQ-AMPC (316)(317).

1.13.3. Subunidad catalítica 2B

La subunidad catalítica de la PrP 2B , o subunidad α , ha sido purificada a homogeneidad y presenta un peso molecular de 61 kDa (314)(324). Como en el caso de la 2C, tampoco de esta subunidad contamos hasta el momento con su secuencia, sin embargo en ello están trabajando dos grupos de investigación, Kincaid y col. col. (194) y Klee y col. (196).

1.13.4. Subunidad catalítica 2C

Se han purificado a partir de músculo esquelético dos isoformas de PrP 2C, denominadas 2C₁ y 2C₂, de pesos moleculares 44 y 42 kDa. Se conoce el 65 % de la secuencia (aprox. 250 aa). La comparación de algunos fragmentos de estos isoenzimas y los estudios subsiguientes, revelan una homología del 80 %, con 49 aminoácidos idénticos de 62 residuos comparados. Los dos isoenzimas son productos de genes distintos ya que los 13 aminoácidos se encuentran distribuidos a lo largo de la secuencia, no siendo pues derivados de un mismo RNAm y diferentemente procesados (229).

1.13.5. Subunidad catalítica X

Cruz e Silva y col. (79) han aislado y secuenciado un cDNA obtenido de una genoteca de hígado de conejo que codifica para una proteína con un 45 y 65 % de homología con las PrP 1 y 2A catalíticas. Esta nueva proteína, denominada por ellos X, no corresponde a las PrP 2B ni 2C, ni tampoco a las PrP 1 y 2A. Debido a la mayor homología con las subunidad catalítica 2A los autores opinan que posiblemente en los ensayos de caracterización cinética haya sido catalogada como PrP 2A o PCS y que pueda tener un origen mitocondrial o nuclear.

1.13.6. Homología entre distintos tipos de subunidades catalíticas

Con anterioridad al conocimiento de las secuencias de las PrP 1 y 2A, el estudio de los fragmentos proteolíticos y de la reactividad cruzada mostrada por anticuerpos monoclonales obtenidos, hacían suponer que las subunidades catalíticas de las PrP 1 y 2A eran proteínas relacionadas y que poseían diversos determinantes antigénicos comunes (306).

Tras la comparación de las secuencias obtenidas de los polipéptidos purificados o las deducidas de los cDNA, se sabe que la identidad entre las subunidades 1 y 2A es elevada, aproximadamente el 60 %, o del 85 % si se consideran los aminoácidos homólogos, incluso entre especies diferentes, indicando que las PrP, al igual que las PrQ, son miembros de un familia de genes homólogos.

Las diferencias se producen esencialmente en los extremos. Las regiones carboxi terminal de la PrP 1 y PrP 2A presentan una secuencia sensible a la tripsinolisis. La región sensible a la proteólisis de la PrP 1 está a su vez relacionada con el inhibidor 2. En la región central existen seis zonas que conservan una alta homología, hecho posiblemente relacionado con la actividad catalítica. La gran homología en determinados fragmentos explica que anticuerpos monoclonales presenten reactividad cruzada entre ambos tipos de PrP (14)(43)(179).

La homología entre las distintas subunidades catalíticas se da no sólo entre las PrP 1 y 2A en que es elevada incluso en proteínas de diversos órganos y de distintos origen, sino también entre éstas y la nueva proteína X o entre la subunidad catalítica 2A (residuos 55-95) y la fosfatasa alcalina de células de mamífero, que presentan en esta región una homología del 27 % (77). Existe también una gran homología entre la PrP 1 (residuos 1-101) y la fosfatasa alcalina de diversos tejidos de mamífero (34)(241).

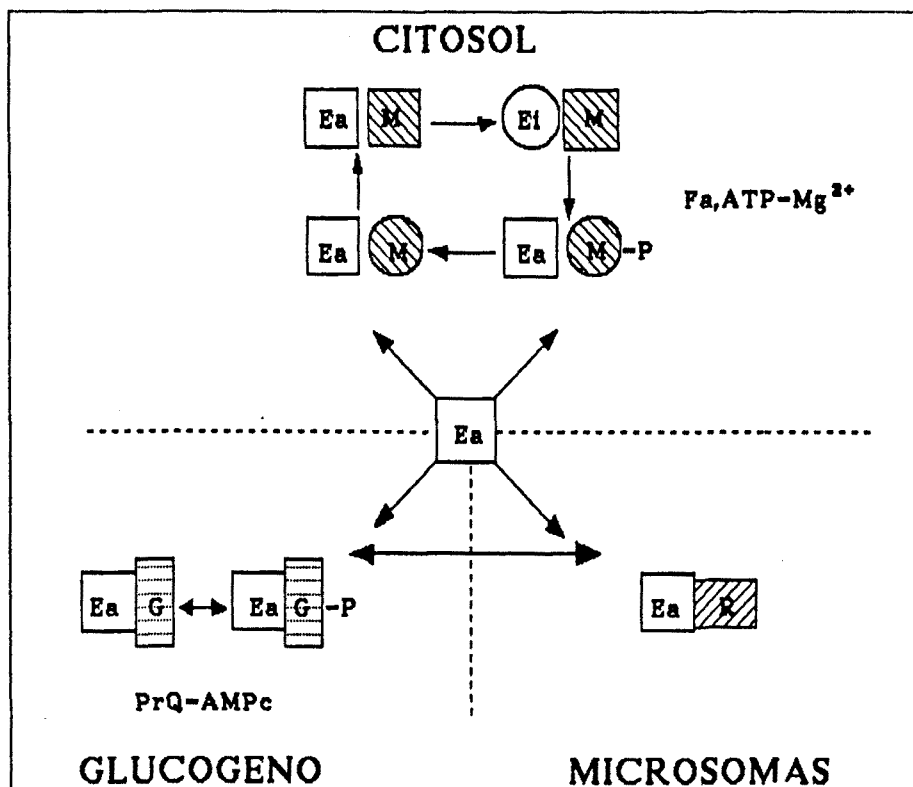
Falta determinar si las regiones conservadas son importantes para la actividad fosfatasa en células de mamífero o si corresponden a restos de un punto común en su evolución. Recientemente se ha determinado que la subunidad responsable de la actividad fosfatasa del complejo microsomal, glucosa-6-fosfatasa, tiene un peso molecular de 36,5 kDa (76). Será interesante conocer la secuencia de esta fosfatasa de peso molecular tan próximo a las catalíticas tipo 1 y tipo 2.

1.14. RELACION ENTRE LAS PROTEIN FOSFATASAS DE LOS DISTINTOS COMPARTIMENTOS CELULARES. MODELOS PROPUESTOS.

En lo que hace referencia a la actividad PrP tipo 1 se han formulado diversas hipótesis que relacionan las PrP de los distintos "pools" celulares. De estas propuestas la formulada por Villa-Moruzzi es la más elaborada.

Villa-Moruzzi y Heilmeyer (338) sugieren que parte de la actividad en citosol puede redistribuirse hacia las membranas y partículas de glucógeno y entre éstas últimas. Ya vimos al describir la PrP 1- ATP-Mg²⁺, el modelo de regulación de la PrP 1, en función del estado de fosforilación del inhibidor 2, (véase Esquema IX). El nuevo modelo presentado engloba la PrP citosólica, la microsomal y de glucógeno, (véase Esquema XII).

La subunidad catalítica se une a las distintas subunidades reguladoras. En citosol, el I-2 o modulador se une a la subunidad 1_c. En el complejo glucógeno-proteico, la subunidad catalítica, idéntica a la citosólica, se une a la subunidad G, que sirve de anclaje al glucógeno y le confiere insensibilidad al inhibidor 1. En el retículo sarcoplasmático, la subunidad catalítica activada se une a la proteína receptora, R. La unión subunidad catalítica/subunidad receptora (C-R) es reversible y presenta fenómenos de saturación, por lo que se trata de una relación específica. La distinta unión de la subunidad catalítica a las subunidades G, M y R determina su conformación y localización en función de las necesidades celulares. La posible redistribución de la actividad catalítica permite que este mecanismo sea efectivo durante el proceso de contracción muscular o de estimulación hormonal.

MODELO DE DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA PRP 1**ESQUEMA XII**

Modelo de distribución subcelular de la PrP 1, en músculo esquelético de conejo, entre el citosol, los microsomas y el complejo glucógeno-proteico, propuesto por Villa-Moruzzi y Heilmeyer (338). La actividad se ensaya sobre sustrato glucógeno fosforilasa. (E_a : subunidad catalítica activa, E_i : subunidad catalítica inactiva, M: modulador, M-P: modulador fosforilado, G: subunidad G del glucógeno, R: subunidad reguladora en microsomas, GSQ-3 o Fa: glucógeno sintasa quinasa 3).

En los últimos trabajos publicados por el Laboratorio de P. Cohen se apunta hacia una específica localización de las distintas subunidades catalíticas (isotipos 1α y 1β), que en cada caso se acomplejan con el inhibidor 2 en el citosol para formar la PrP 1, con la subunidad G en el glucógeno, para formar PP1 G, o con la subunidad M que la une a la miosina para dar lugar a la PP1 M (75). La existencia de dos isotipos (1α y 1β) que difieren únicamente en el extremo amino terminal permite avanzar la hipótesis de que es este extremo el responsable de la interacción con las subunidades I-2, G o M. El isotipo 1α es probablemente el que se une a la subunidad G.

El modelo molecular de interacción entre las membranas microsomas y la PrP 1 es más especulativo. Alemany y col. (9) proponen que la actividad PrP microsomal en hígado de rata se debe a una subunidad catalítica, tipo 1, unida a otra subunidad M. A ésta puede unirse otra, P, que le confiere sensibilidad para la inhibición por glucógeno fosforilasa "a" cuando el sustrato de la fosfatasa es glucógeno sintasa. En los procesos de solubilización se extraen las subunidades M-C en tanto que la subunidad P permanece anclada en los microsomas. El complejo M-C muestra una sensibilidad menor hacia el inhibidor 2 citosólico, lo cual tiene importancia desde el punto de vista fisiológico.

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1. PRODUCTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS

Los productos y reactivos utilizados en este trabajo se agrupan bajo el nombre de la casa comercial suministradora, y éstas se relacionan en orden alfabético.

2.1.1. Reactivos generales

"AGFA-GEVAERT"

Revelador para autorradiografía G-150. Fijador para autorradiografía G-334.

"BIO-RAD Labs"

Acrilamida, Affi-Gel Blue, azul de Coomassie R-250, Bio-Gel A 0.5m, N,N'-dimetil-bis-acrilamida, hidroxiapatita, persulfato sódico, reactivo para determinación de proteínas, SDS, TEMED.

"FARMITALIA CARLO ERBA"

Triton-X-100

"GELMAN INSTRUMENT Co"

Papel cromatográfico ITLC, tipo SG

"KOCK-LIGHT"

Acetona, benceno, naftaleno

"LKB"

Ultrogel Ac4

"MERCK"

Acetato de magnesio, ácido acético, ácido fórmico, bicarbonato amónico, bicarbonato potásico, bicarbonato sódico, n-butanol, cloruro cálcico, cloruro de litio, cloruro potásico, cloruro magnésico, cloruro sódico, etanol, fluoruro potásico, fosfato monopotásico, glicina, hidróxido potásico, hidróxido sódico, imidazol, maleato sódico, nitrato de plata, PEI-celulosa F cromatofolio PL, piruvato sódico, sacarosa, silicagel HF₂₅₄+₃₆₆, sulfato amónico, trietilamina, trietanolamina, urea.

"PANREAC"

Acido acético, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido sulfúrico, dicromato potásico, hidróxido amónico, isopropanol, lana de vidrio lavada, norita, n-propanol, tolueno.

"PHARMACIA FINE CHEMICALS"

Agarosa-hexano-HMG-CoA, Aminohexil-Sepharosa 4B, Blue-Sepharosa CL-6B, DEAE-Sephadex A-50, gel PBE 94, polibuffer 74-HCl, Sephadex G-50 superfino, Sephadex G-75 superfino, Sepharosa 4B, Sepharosa 4B activada con CNBr.

"SIGMA CHEMICAL Co."

Acido hidroximetil glutárico, ácido oxalacético, ADP sal disódica, AMP ácido, ATP sal disódica, azul de bromofenol, benzamidina, Bis-Tris, Brij 35, coenzima A, DTT, EDTA sal disódica, EGTA sal disódica, etilenglicol-monometil éter, formaldehído, glicerol, glicerol-1-fosfato sódico, α -D-glucosa-1-fosfato sal disódica, glucosa-6-fosfato sal monosódica, glucógeno de hígado de conejo, β -mercaptoetanol, mevalonolactona, NAD, NADP, PMSF, PPO, reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteus, Tris base.

"VALCA"

Placas para autorradiografía rápida 90.

"WHATMAN"

DEAE-celulosa (DE-52), fosfocelulosa P-11, papel cromatográfico tipo 3MM, papel cromatográfico tipo 31 ET

2.1.2. Productos radioactivos**"RADIOCHEMICAL CENTER, AMERSHAM"**

Acido 3-hidroxi-3-metil[^{14}C]glutárico, ácido 3-hidroxi-3-metil[^3H]glutárico, α -D[^{-14}C]-glucosa-1-P $\mu\text{C/mL}$, ortofosfato solución acuosa [^{32}P]PO₄H₃.

2.1.3. Proteínas y preparaciones enzimáticas

"BOEHRINGER MANHEIM"

Citrato sintasa, 3-fosfoglicerato quinasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, láctico deshidrogenasa, triosafosfato isomerasa, amilo- α -1,4- α -1,6-glucosidasa, hexoquinasa.

"SIGMA CHEMICAL Co"

Albúmina bovina fracción V, albúmina de huevo, alcohol deshidrogenasa de levadura, aldolasa de músculo de conejo, catalasa, 1,4- α -D-glucano-glucanohidrolasa de saliva humana, calcineurina, calmodulina, ferritina, inhibidor de tripsina de soja, mioglobina, poli-L-lisina, tripsina tratada con TPCK.

2.1.4. Síntesis de productos

2.1.4.1. Síntesis de R,S HMG-CoA, R,S [14 C] HMG-CoA, y R,S [3 H] HMG-CoA

El R,S 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A, HMG--CoA, sustrato del enzima HMG-CoA reductasa, se sintetizó en nuestro Laboratorio a partir del ácido 3-hidroxi-3-metil glutárico (HMG) y de coenzima A, siguiendo una modificación de Golfarb y Pitot (132). La valoración del producto se efectuó siguiendo una modificación del método descrito por Knappe y col. (198).

La obtención de HMG-CoA marcado radioactivamente con 3 H o 14 C, compuestos: R,S 3-hidroxi-3-metil [3 - 14 C]glutaril coenzima A y R,S 3-hidroxi-3-metil [3 - 3 H]glutaril coenzima A, se sintetizó siguiendo el mismo protocolo, utilizando en estos casos 500 μ Ci del ácido 3-hidroxi-3-metil-[3 - 14 C]glutárico y 500 μ Ci del ácido 3-hidroxi-3-metil-[3 - 3 H]- glutárico, respectivamente. Una vez sintetizados y valorados, como en el caso de HMG-CoA, se ajustaron para una radioactividad específica de 3.500 y 4.000 cpm/nmol, y una concentración de 2,3 mg/mL.

2.1.4.2. Síntesis de [γ - 32 P] ATP

El [γ - 32 P] ATP se sintetizó en nuestro Laboratorio según el método descrito por Walseth y Johnson (343) modificado por Palmer y Avruch (262) a partir de ADP y [32 P]PO₄H₃.

El seguimiento de la transformación de [32 P]PO₄H₃ en [γ - 32 P]ATP se realizó por cromatografía en un soporte de PEI-celulosa F cromatofolio PL de 0,1 mm. La cromatografía fue de tipo ascendente, utilizando como fase líquida cloruro de litio 0,7 M y ácido fórmico 2M a temperatura ambiente. La detección de los productos radioactivos se realizó por autorradiografía. El [γ - 32 P]ATP y el [32 P]PO₄H₃ se separaron y presentaron unos Rf de 0,6 y 0,8 respectivamente.

Finalizada la síntesis, no se apreciaron cantidades significativas de ortofosfato radioactivo, por lo que consideramos que la transformación era del 100 % y cuantificamos el [γ - 32 P] ATP depositando una dilución de la muestra en papel Whatman 3MM. Los papeles se secaron en estufa y se introdujeron en viales de centelleo con tolueno-PPO 0.8 %. El rendimiento de la síntesis fue superior al 90 %.

Previamente a la utilización del [γ - 32 P] ATP, éste se liofilizó para eliminar el carbonato de trietilamina que acompaña las muestras. La radioactividad obtenida por este método fue 4000 cpm/pmol de [γ - 32 P] ATP.

2.1.4.3. Síntesis de poli-L-lisina-Sepharosa 4B

Se partió de 7,5 gramos Sepharosa 4B activada con CNBr y 200 mg de poli-L-lisina. Se siguieron las especificaciones de la casa comercial y se obtuvieron aproximadamente 25 mL de gel sedimentado, que se guardó a temperatura entre 4-8°C. Una vez utilizada la resina, ésta se regeneró con 10 volúmenes de 0.5 M NaCl en tampón bicarbonato sódico 0.1 M pH 8,5, seguido de un lavado con 10 volúmenes de 0.5 M NaCl en tampón acetato sódico 0.1 M pH 5,5. La poli-L-lisina-Sepharosa 4B se reutiliza una sola vez.

2.2. ANIMALES UTILIZADOS. CONDICIONES

2.2.1. Ratas

Las ratas utilizadas fueron albinas de la raza Sprague-Dawley, en la mayoría de los casos, machos de un peso aproximado de 250 gramos. Los animales se mantuvieron en el estabulario del Laboratorio en ciclo artificial de luz día/noche de 12 horas, coincidiendo el inicio de luz con las 15 horas y el inicio de la fase oscura con las 3 horas. Se alimentaron con pienso de mantenimiento y agua, a los que tuvieron acceso en todo momento.

Cuando las ratas fueron destinadas a la obtención de HMG-CoA reductasa, se mantuvieron durante los cinco días previos al sacrificio con una dieta suplementada con 5 % de colestiramina, compuesto cedido por los Laboratorios Rubió. Durante este período las ratas fueron estabuladas en jaulas individuales, ya que ello mejoraba los rendimientos de la purificación del enzima HMG-CoA reductasa.

Si las ratas se destinaban a la purificación de PrP se mantenían con una dieta normal. Si interesaba eliminar las reservas de glucógeno hepático, las ratas se mantenían en ayunas 24 horas, y 30 minutos antes del sacrificio se administraba a cada animal 0,5 mg de glucagon por vía intraperitoneal.

En las pruebas en que interesaba obtener un hígado libre de contaminación sanguínea, a la rata, previamente anestesiada, se le abrió la cavidad torácica y se perfundió el hígado con una solución de sacarosa 250 mM, libre de iones, cortocircuitando la arteria hepática con el fin de limpiar el hígado de la sangre que lo bañaba.

2.2.2. Conejos

Los conejos fueron de la raza New-Zeland, normalmente de gran tamaño. Se adquirieron a la casa Freixas y en caso de no ser sacrificados el mismo día, se mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Medicina con dieta de mantenimiento.

De los conejos se utilizó el músculo esquelético para la purificación de enzimas relacionados con el metabolismo del glucógeno: glucógeno fosforilasa, fosforilasa quinasa, inhibidor 2 las subunidades catalíticas de las PrP 1 y 2A.

2.3. OBTENCION DE PREPARADOS ENZIMATICOS

2.3.1. Purificación a homogeneidad de HMG-CoA reductasa inactiva

En los ensayos de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa se utiliza como sustrato HMG-CoA reductasa purificada a homogeneidad y parcialmente inactivada, es decir fosforilada en el mismo proceso de purificación por quinasas endógenas.

La obtención de HMG-CoA reductasa se realizó siguiendo básicamente el método descrito por Ness y col. (251) y modificado en nuestro Laboratorio por Gil y col. (126), a partir de microsomas de hígado de rata.

2.3.1.1. Obtención de microsomas

Las ratas se decapitaron a las 9 de la mañana, lo que corresponde con las 6 horas de su ciclo nocturno, momento en que se alcanza el máximo de actividad HMG-CoA reductasa en estos animales. Una vez desangrado el animal, se extrajo el hígado, se eliminaron los restos de tejido conjuntivo y grasa que quedaban adheridos y se lavó en frío con el mismo tampón que luego se utilizó para la homogenización, finalmente el hígado se pesó y troceó. La homogenización del hígado se llevó a cabo con una relación 1:2 (p/v), a 4°C en baño de hielo, en un homogenizador del tipo Potter-Elvehjem de la casa Thomas Co., con pistilo de teflón que se conectó a un motor.

La solución de homogenización fue la siguiente : sacarosa 100 mM, fosfato potásico 40 mM pH 7,2, EDTA 30 mM, KCl 50 mM y DTT 1 mM, solución A. El homogenado se centrifugó a 12.000 xg durante 25 minutos en un rotor de gran capacidad, (frecuentemente se partió de 150-200 gramos de hígado de rata, por lo que se utilizó un rotor del tipo GSA, en una centrífuga Sorvall). El sobrenadante de esta primera centrifugación se decantó a través de lana de vidrio y se centrifugó 80 minutos a 105.000 xg a 4°C en una ultracentrífuga Beckman modelo L5-65 y un rotor del tipo TY 35, con capacidad para 400 mL. Se obtuvo un precipitado que se resuspendió en la solución A en relación 1:1

(p/v). Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones para eliminar los restos de citosol que arrastraban los microsomas en su sedimentación. Obtuvimos así unos microsomas lavados que se separaron fácilmente del precipitado de glucógeno por simple decantación ya que el glucógeno queda fuertemente adherido a las paredes del tubo de centrifuga.

2.3.1.2. Solubilización de la HMG-CoA reductasa

La rotura del fragmento orientado al citosol puede conseguirse por proteólisis con proteasas dependientes de calcio o bien por roturas físicas: congelación/descongelación brusca y sonicación. En nuestro Laboratorio utilizamos la congelación rápida a bajas temperatura y posterior descongelación a temperatura ambiente en presencia de elevada concentración de glicerol, Brown y col. (45).

Los microsomas se sumergieron en nitrógeno líquido hasta que se congeló perfectamente toda la masa microsomal. Se dejó descongelar a temperatura ambiente teniendo la precaución de homogenizar, a medida que se descongelaba la muestra, en un homogenizador manual de vidrio, con la misma solución A, pero para una concentración de 50 % de glicerol (v/v). La relación utilizada fue de 1 mL por cada 9 gramos de hígado. Una vez homogenizados se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Transcurrido este período se llevó la preparación a un volumen final igual al peso en gramos de hígado inicial, por adición de cantidad suficiente de solución A. Se centrifugó a alta velocidad (105.000 xg) durante 80 minutos, de forma que se obtuvo un primer sobrenadante, soluble 1, que contenía la proteína solubilizada. Si interesaba se procedía a una segunda solubilización siguiendo la misma pauta. La primera solubilización significó entre el 50 y 80 % de la actividad inicial. Con una segunda solubilización se extrajo el resto de actividad.

La HMG-CoA reductasa es estable a temperatura ambiente, por lo que los pasos siguientes se realizaron a la temperatura del Laboratorio. Si en el transcurso de la purificación la

muestras se congelaban se inactivaba el enzima, lo que hizo necesario calentar las preparaciones durante 30 minutos a 37°C antes de medir su actividad. El efecto de inactivación por frío ha sido descrito por Heller y col. (149).

2.3.1.3. Precipitación con sulfato amónico

Los solubles reunidos se precipitaron añadiendo sulfato amónico sólido hasta una concentración final del 50 % (313 gramos por cada 1000 mL de soluble). El precipitado se recogió por centrifugación a 10.000 xg durante 30 minutos, y se resuspendió en solución tamponada: sacarosa 100 mM, KF 20 mM, fosfato potásico 20 mM pH 7,2, DTT 1 mM y glicerol 10 % (v/v), solución B, en relación 1:30, es decir, 1 volumen de solución B por cada 30 volúmenes de soluble antes de la precipitación. Se resuspendió con la ayuda de un homogenizador manual de vidrio, y se dializó durante toda la noche con el mismo tampón B, a 4°C.

Durante la diálisis precipitó parte de la proteína denaturada y por ello se clarificó la muestra por centrifugación a 15.000 xg durante 30 minutos. Con este cambio de solución amortiguadora se consiguieron dos objetivos, por un lado desalar la muestra y por otro disponerla para la posterior fosforilación, al eliminar la elevada concentración de EDTA, que inhibía la acción de las PrQ. Se añadió KF, potente inhibidor de las PrP, y glicerol al 10 % lo que mejoró la estabilidad de las PrQ y de la HMG-CoA reductasa.

2.3.1.4. Inactivación por quinasas endógenas

Durante el proceso de purificación de la HMG-CoA reductasa, parte de las PrQ microsomales la acompañan hasta este punto. Estas PrQ fosforilan nuestra proteína en el proceso de fosforilación/inactivación .

El sobrenadante del anterior paso de purificación se incubó a 37°C durante 20 minutos, en una mezcla de reacción con ATP 4 mM, MgCl₂ 20 mM. La incubación se detuvo por adición de EDTA 30 mM, KF 100 mM y PPI 10 mM. La elevada concentración de

EDTA queló el $MgCl_2$, presente, necesario para la actuación de las PrQ; el KF y el PPI aseguraba la inactivación de las PrP presentes aún en este paso de la purificación. Fue preciso mantener elevadas concentraciones de inhibidores de PrP durante el resto de la purificación para evitar la desfosforilación del enzima.

El seguimiento de la fosforilación por pérdida de actividad HMG-CoA reductasa mostró un máximo de inactivación transcurridos entre 15 y 20 minutos de incubación y una pérdida de actividad entre el 80 y el 85 %, lo que suponía una actividad residual del 15 % respecto a la inicial. La HMG-CoA reductasa inactivada fue capaz de reactivarse, por pérdida de fosfatos, entre 4 y 5 veces.

2.3.1.5. Calentamiento a 64°C

Una característica de la HMG-CoA reductasa es su estabilidad frente al calor; puede superar, sin pérdida de actividad, el calentamiento a 64°C durante 10 minutos, en condiciones adecuadas. Por ello se utiliza el calentamiento como un paso importante en el proceso de purificación, ya que un elevado número de proteínas se denaturan y pueden eliminarse del medio.

Para que la temperatura no afecte el enzima es necesario elevar las concentraciones de glicerol, KCl y KF hasta concentraciones finales de 33 % (v/v), 900 y 100 mM respectivamente. En este medio aumenta considerablemente su estabilidad. Tras el calentamiento durante 10 minutos a 64°C la muestra se enfrió en baño de hielo. Cuando descendió la temperatura se centrifugó a 30.000 xg durante 30 minutos, recogiendo el sobrenadante, en el que normalmente se recuperó toda la actividad HMG-CoA reductasa.

2.3.1.6. Cromatografía en Affi-Gel Blue Sepharosa

El sobrenadante del paso anterior se diluyó cinco veces con solución A sin KCl, por lo que la concentración de K^+ disminuyó a 200 mM. Para asegurar la inactivación de PrP se mantuvo una concentración 100 mM KF y se añadió PPI para una

concentración final de 10 mM. El pirofosfato es también un potente inhibidor de PrP.

La muestra se cromatografió, a temperatura ambiente, en una columna (1,9 x 6 cm) de Affi-Gel Blue equilibrada previamente con la solución: sacarosa 100 mM, fosfato potásico 40 mM pH 7,2, EDTA 30 mM, DTT 1 mM, KCl 100 mM, KF 100 mM y PPI 10 mM. La velocidad de la columna se mantuvo en 60 mL/h, se lavó con suficiente cantidad de solución amortiguadora y se instaló un gradiente de KCl entre 200 y 2000 mM KCl. Las fracciones con actividad HMG-CoA reductasa (400-1600 mM KCl) se reunieron y concentraron en una célula de concentración por presión, Amicon, de 100 mL de capacidad, utilizando un filtro PM-10. En la misma célula Amicon se consiguió el desalado por lavado con solución sin sal y nueva concentración. El proceso se repitió dos veces para asegurar una disminución de la concentración de haluros por debajo de 100 mM.

La muestra concentrada y desalada se congeló a -80°C , teniendo la precaución de añadir glicerol para una concentración final del 50 % (v/v), lo que favoreció la estabilidad de la HMG-CoA reductasa.

2.3.1.7. Cromatografía en Agarosa-hexano-HMG-CoA

La cromatografía en Agarosa-hexano-HMG-CoA permitió la obtención del enzima a homogeneidad. La matriz de agarosa, a la que se une covalentemente un brazo de hexano-HMG-CoA, muestra alta afinidad con nuestro enzima.

Antes de introducir la muestra en la columna fue necesario reactivar el enzima, inactivado por congelación, y disminuir la concentración de glicerol a la mitad, por dilución con el mismo volumen de agua destilada. Se añadieron KF y PPI para mantener unas concentraciones finales de 75 y 10 mM respectivamente. La muestra se cromatografió en columna (1,4 x 3 cm) equilibrada con el mismo tampón en que se hallaba la muestra, a temperatura ambiente y a una velocidad no superior a 20 mL/h. Se recogieron fracciones de 1 a 2 mL. Introducida la muestra y

lavada con 20 mL de la misma solución con que se ha equilibrado la columna, se eluyó el enzima al añadir en la solución de lavado suficiente cantidad de HMG-CoA para una concentración final de 200 μ M. La alta concentración de HMG-CoA compite con el brazo de HMG-CoA de la columna y permite la salida del enzima. Las fracciones más activas, aproximadamente 6 mL, se reunían y concentraban en célula de Amicon, de pequeño volumen, utilizando un filtro PM-10, hasta un volumen final de 2 mL.

En este paso se consiguió una preparación del enzima a homogeneidad. Para mejorar su estabilidad se añadió albúmina bovina, 0,5-0,7 mg/mL, y se dializó durante toda la noche a 4°C, frente a la siguiente solución amortiguadora: sacarosa 250 mM, Bis-Tris/HCl 40 mM pH 7, DTT 1 mM. De esta forma la elevada concentración de HMG-CoA que había servido para la elución de la columna de afinidad se redujo considerablemente y no alteró en los ensayos la actividad específica del sustrato.

Una vez dializado el enzima se congeló en alícuotas de 100 μ L a -80°C, permaneciendo estable durante varios meses.

2.3.2. Preparación de Ser(³²P) HMG-CoA reductasa homogénea e inactiva

Con el objeto de demostrar que la acción de las proteínas fosfatasa sobre sustrato HMG-CoA reductasa provoca su activación como consecuencia directa de la hidrólisis de fosfatos, se preparó HMG-CoA reductasa homogénea, inactiva y marcada con ³²P en residuos de serina. Se siguió el método puesto a punto en nuestro Laboratorio por Gil y col. (125), con cuyo método se consiguió una HMG-CoA reductasa de elevada radioactividad específica.

Para ello, se inició la purificación siguiendo el protocolo descrito para la obtención del enzima inactivo y homogéneo, variando únicamente las condiciones de la inactivación: el sobrenadante obtenido como en el apartado 2.3.1.3. se inactivó con 5 mCi de [γ -³²P] ATP, a una concentración de 0,4 mM, en presencia de Mg²⁺ 20 mM. La muestra se incubó durante 20 minutos en

un baño a 37°C. La reacción de inactivación por quinasas endógenas se finalizó con la adición de EDTA, KF y PPI para unas concentraciones finales de 30 mM, 100 mM y 10 mM respectivamente. La purificación se prosiguió como en el apartado anterior.

Se obtuvo una HMG-CoA reductasa de una radioactividad específica de 1,3 $\mu\text{C}/\text{mg}$ de proteína y con una actividad específica de 1.600 U/mg de proteína.

2.3.3. Purificación de glucógeno fosforilasa

Para la obtención de glucógeno fosforilasa (EC 2.4.-1.1.) se partió de músculo esquelético de conejos de mediano o gran tamaño, según el método de Fischer y Krebs (113).

2.3.3.1. Obtención y extracción del músculo

El animal se sacrificó por desnucación y se desangró rápidamente. El músculo del lomo y de las extremidades posteriores se separó con la ayuda de un bisturí. Se guardó en hielo y una vez frío se pesó y troceó en piezas pequeñas, eliminando el tejido conectivo que le acompañaba. De un conejo de gran tamaño se obtenían hasta 750 gramos de músculo.

El músculo se homogenizó con una solución de Tris/HCl 5 mM pH 7, PMSF 1 mM 1:1 (p/v) a 4°C en un homogenizador Waring Blandor de alta capacidad. El homogenado se dejó macerar durante 10 minutos y se centrifugó a 4.000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio recogiendo en un vaso de precipitados enfriado en baño de hielo.

2.3.3.2. Precipitación ácida

Los extractos fríos se acidificaron hasta pH 5,1-5,2 adicionando lentamente ácido acético 1 N con agitación continua. Normalmente se incrementaba la turbidez, pudiendo aparecer flóculos. Se dejó reposar algunos minutos en frío y se centrifugó a 1.370 xg durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de papel de filtro para eliminar trazas de material sobre-

nadante que podían quedar y se ajustó el pH a 6,8 por adición de bicarbonato potásico sólido.

2.3.3.3. Precipitación con sulfato amónico

Se utilizó para la precipitación una solución de sulfato amónico saturado a 25°C que se obtuvo añadiendo 767 gramos de sulfato amónico sólido a un litro de agua a dicha temperatura. La molaridad del sulfato amónico resultante fue de 4,1.

Por cada 1.000 mL de extracto a pH 6,8 se añadían 700 mL de sulfato amónico saturado, por lo que la concentración final fue del 41 % ó 1.68 M. Se dejó precipitando durante 12 horas a 4°C de forma que el sobrenadante pudo separarse fácilmente por aspiración. El precipitado se recogió por centrifugación en frío y se resuspendió con agua destilada a 25°C. Por cada 100 g iniciales de músculo se emplearon entre 6 y 7 mL de agua. La solución se dializó durante 24 horas frente a 3 litros de Tris/HCl 1 mM, pH 7,5.

2.3.3.4. Calentamiento a pH alcalino

A la solución dializada se añadió: cisteína 0,3 M, solución extemporánea y neutralizada, para una concentración final de 0,03 M; EDTA 0,1 M, solución neutralizada, para una concentración final de 0.5 mM; y cantidad suficiente de Tris base 2 M para pH 8,8. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, se enfrió y se ajustó a pH 7 con ácido acético 1 N. Si aparecía turbidez se centrifugaba para eliminar el precipitado.

2.3.3.5. Cristalización y liofilización

Para obtener la cristalización se añadieron AMP 0,1 M y acetato magnésico 1.0 M neutralizado, para una molaridad final de 0,001 y 0,01 respectivamente. Se dejó reposar en baño de hielo y sal. La glucógeno fosforilasa "b" cristalizó en un intervalo de 2 a 6 horas. Los cristales se recogieron por centrifugación a 0°C y se recrystalizaron dos veces más con las mismas precauciones, disolviendo los cristales cada vez en un volumen igual al de la

primera cristalización y ajustando el pH a 7. Una vez obtenidos los cristales de glucógeno fosforilasa "b" (desfosforilada) se congelaron y liofilizaron, adquiriendo en este paso un típico color amarillo. El enzima liofilizado es estable a -20°C . A partir de 1.500 gramos de músculo de conejo se obtuvieron 500 mg de glucógeno fosforilasa cristalizada.

2.3.3.6. Valoración

Para determinar la concentración de proteína se procedió primero a la eliminación del AMP utilizado en la cristalización. Para ello, la proteína liofilizada se resuspendió en la solución amortiguadora: β -glicerolfosfato 50 mM pH 6,8, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, en relación 1:5 (p/v), en un baño a 30°C . Una vez resuspendido el enzima se añadió la misma cantidad de carbón activado (Norit A) que peso de enzima liofilizado. Se incubó durante 30 minutos con frecuente agitación y se centrifugó finalmente a 15.000 xg durante 10 minutos. De esta forma el sobrenadante quedaba libre de AMP. Se diluyó en agua al 1 % y se realizó la lectura espectrofotométrica. La relación A_{260}/A_{280} debe ser inferior a 0.6 para asegurar la eliminación de AMP.

La glucógeno fosforilasa tiene un máximo de absorción a 279 nm. El coeficiente de extinción a esta longitud de onda es $E_{279}^{1\%} = 11,7$, Fischer y Krebs (113), por lo que la concentración de proteína, en mg/mL, se calcula multiplicando la lectura de absorbancia por la dilución y dividiendo por 1,31.

2.3.4. Fosforilación de la glucógeno fosforilasa

Para la obtención de glucógeno fosforilasa "a" (fosforilada) a partir de glucógeno fosforilasa "b" seguimos el método propuesto por Krebs y Fischer (201).

Partimos de glucógeno fosforilasa "b" libre de AMP resuspendida en solución amortiguadora: β -glicerolfosfato 50 mM pH 6,8, EDTA 2 mM, DTT 1 mM. La fosforilación del único centro fosforilable de la fosforilasa "b" se realizó con fosforilasa quinasa obtenida como se describe en el apartado 2.3.6.

2.3.4.1. Fosforilación con fosforilasa quinasa

La mezcla de incubación estuvo compuesta por: glucógeno fosforilasa, 50 mg, diluída en solución amortiguadora para unas concentraciones finales de: glucógeno fosforilasa 5 mg/mL, ATP 5 mM, MgCl₂ 15 mM, CaCl₂ 0,4 mM y β -glicerolfosfato 40 mM/Tris/HCl 40 mM pH 8,2. A la mezcla de incubación anterior se añadió 30 μ g/mL de fosforilasa quinasa purificada como se detalla en el apartado 2.3.6.4. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 30°C.

2.3.4.2. Precipitación con sulfato amónico

La fosforilación se detuvo por precipitación con sulfato amónico al 100 % neutralizado y frío para una concentración final del 45 %. El precipitado se recogió por centrifugación a 4°C durante 20 minutos a 10.000 xg. En el precipitado de esta primera centrifugación pudo observarse el cambio de color del amarillo de la glucógeno fosforilasa "b" al blanco lechoso de la glucógeno fosforilasa "a". La proteína se lavó con un volumen igual al de incubación con solución amortiguadora Tris/HCl 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM y sulfato amónico para una concentración final del 45 %. Se centrifugó de nuevo a 4°C a 6.000 xg durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y la proteína precipitada se resuspendió en el mínimo volumen posible de tampón Tris/HCl 50 mM pH 7, EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol 15 mM. La muestra, aproximadamente 1 mL, se dializó contra 1 L de la misma solución durante 12 horas, con dos cambios de solución. Pequeños cristales de glucógeno fosforilasa "a" pudieron observarse a las pocas horas.

2.3.4.3. Condiciones de almacenaje

Los cristales de glucógeno fosforilasa "a" formados durante la diálisis se recogieron por centrifugación a 6000 xg durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. Los cristales de glucógeno fosforilasa "a" se resuspendieron en el mínimo volumen posible, entre 25-50 mg/mL, en solución: Tris/HCl 50 mM pH 7, NaCl 250 mM, DTT 5 mM y glicerol 50 % a temperatura ambiente para

favorecer su disolución. El enzima, resuspendido en estas condiciones, fue estable a 4°C durante al menos un mes. Con el decurso del tiempo la glucógeno fosforilasa "a" puede cristalizar de nuevo, por lo que antes de su uso se recomienda calentar a 30°C durante 5 minutos.

2.3.5. Preparación de Ser(³²P) glucógeno fosforilasa

En la obtención de ³²P glucógeno fosforilasa se siguieron las condiciones descritas en el apartado 2.3.4., modificando sólo las concentraciones de ATP y MgCl₂ a 0,4 mM y 10 mM respectivamente, con el fin de no disminuir en exceso la radioactividad específica del [γ -³²P] ATP utilizado, 500 dpm/-pmol, cuyo aporte de masa consideramos despreciable

Para la cuantificación del fosfato radioactivo incorporado por pmol de proteína se realizó una cromatografía ascendente en un soporte de papel ITLC, tipo SG, siguiendo el método descrito por Huang y Robinson (162). Se sembró una dilución adecuada de la muestra sobre el origen de la cromatografía, donde previamente se depositó el mismo volumen de solución de TCA al 20 %. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente y se desarrolló en un vaso de precipitados utilizando como fase líquida una solución de KCl al 5 % en agua. Los papeles de ITLC se secaron en estufa y se recortó la zona de siembra de la muestra, donde permanecía precipitada la proteína. A continuación se depositaron en viales de centelleo con 5 mL Tolueno/PPO 0,8 %, y se contaron en contador para radiaciones beta.

La transformación de fosforilasa "b" en "a" se determinó por el ensayo de glucógeno fosforilasa (véase el apartado 2.4.4). Se obtuvo una transformación media del 80 %. La radioactividad específica de la fosforilasa "a" obtenida de este modo fue de aproximadamente de 700.000 cpm de [³²P]/nmol de enzima

2.3.6. Obtención de fosforilasa quinasa

2.3.6.1. Obtención y extracción del músculo

La purificación de fosforilasa quinasa se llevó a cabo tal como describe Cohen (68). La obtención y extracción del músculo se realizó como se describe en el apartado 2.3.3.1. Todos los pasos posteriores se desarrollaron a 4°C. El músculo se homogenizó durante un minuto a baja velocidad en un homogenizador Waring Blandor de alta capacidad con tampón Tris/HCl 10 mM, EDTA 2 mM pH 7,0, en una relación 1:2,5 (p/v). El homogenado se centrifugó a 6.000 xg durante 45 minutos, el sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio recogiendo en un vaso de precipitados enfriado en baño de hielo.

2.3.6.2. Precipitación ácida

La suspensión se acidificó hasta pH 5,2 con ácido acético 1 N y se centrifugó a 6.000 xg durante 45 minutos. El precipitado se resuspendió en tampón glicerol-1-fosfato 100 mM, 4 mM EDTA pH 8,2 (30 mL) en un homogenizador manual de vidrio. Se llevó hasta un volumen de 90 mL con tampón 50 mM glicerol-1-fosfato pH 6,8, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, solución A. Se centrifugó a 78.000 xg durante 100 minutos. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se recogió a través de lana de vidrio.

2.3.6.3. Precipitación con sulfato amónico

Un volumen de sulfato amónico del 90 % (475 g/L) neutralizado y frío, se añadió a dos volúmenes de la suspensión enzimática, se dejó reposar unos minutos en baño de hielo y se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos para recoger el precipitado. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el menor volumen posible con solución A, aproximadamente 5 mL, dializándose contra este mismo tampón para bajar la concentración de sulfato amónico. El dializado se clarificó por centrifugación a 15.000 xg durante 2 minutos.

2.3.6.4. Cromatografía en Sepharosa 4B

Se tomaron 2,5 mL de la muestra clarificada y se cromatografiaron a una velocidad de 12 mL/h en una columna de Sepharosa 4B (135 x 1,8 cm) equilibrada con solución A. Se recogieron fracciones de 5 mL. Las fracciones más activas (fracciones 36-42), que coincidían con el segundo pico de absorbancia a 280 nm, se reunieron y se dializaron en frío contra vacío, en un saco de colodión. El concentrado se guardó a -20°C y se utilizó para la fosforilación de la glucógeno fosforilasa.

2.3.7. Purificación del inhibidor 2

Seguimos el método propuesto por Yang y col. (349) incorporando algunas modificaciones referidas a la elución de la cromatografía en Blue-Sepharosa CL-6B.

2.3.7.1. Preparación del extracto crudo de músculo de conejo

La obtención y extracción del músculo se realizó en la forma descrita en el apartado 2.3.3.1. Se partió de 1 Kg de músculo fresco de conejo obtenido de dos conejos de gran tamaño. Se homogenizó en dos volúmenes de la solución Tris/HCl 20 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, 0,5 mM benzamidina y 0,1 mM PMSF. El homogenado se centrifugó a 4°C durante 45 minutos a 9.000 xg en un rotor de alta capacidad, tipo GS3, en centrífuga Sorvall.

El sobrenadante se decantó y filtró a través de lana de vidrio recogiendo en un vaso de precipitados sumergido en hielo. Se comprobó y reajustó el pH a 7 con Tris-base 2 M.

2.3.7.2. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50

El extracto crudo ajustado a pH 7 se adsorbió directamente sobre un volumen de resina, DEAE-Sephadex A-50, igual a la mitad del volumen inicial de extracto. La matriz se equilibró previamente con la solución amortiguadora: Tris/HCl 20 mM pH 7, DTT 0,5 mM, solución A. Con ayuda de una placa filtrante y un erlenmeyer al que se aplicó el vacío, la resina se lavó con

solución A, y a ésta se añadió NaCl para una concentración final 200 mM. Interesaba que el volumen de lavado sea cuatro veces el volumen inicial de extracto crudo. En este paso, debido a la presencia de NaCl, se observaba que el DEAE-Sephadex A-50 disminuía sensiblemente de volumen. Seguidamente se empaquetó en una columna de vidrio (5 x 30 cm) y se eluyó con 1,2 L de un gradiente lineal de 200-400 mM NaCl en solución A. Se ensayaron las fracciones con sustrato glucógeno fosforilasa y subunidad catalítica tipo 1, de músculo de conejo, obtenidas como se indica en los apartados 2.3.5. y 2.3.8. El ensayo se realizó tal como se indica en el apartado 2.4.6.

2.3.7.3. Precipitación con sulfato amónico

Se reunieron las fracciones con mayor actividad y se concentraron por precipitación con sulfato amónico frío al 100 % hasta una concentración final del 45 %. El precipitado se recogió por centrifugación a 9.000 xg durante 45 minutos en un rotor de alta capacidad, tipo GS3. El precipitado se resuspendió en solución A en el menor volumen posible, entre 5 y 10 mL, dializándose contra la misma solución A con cambios repetidos de solución A durante 2 horas, con el fin de disminuir la elevada concentración de sulfato.

2.3.7.4. Calentamiento a 95°C

La muestra dializada se calentó de forma brusca dejándola caer gota a gota sobre un volumen igual de solución A que se mantuvo en ebullición. Es importante que durante el proceso la temperatura no descienda por debajo de 95°C, para lo cual la adición de nuevas gotas se realizó lentamente. Una vez completada la mezcla se dejó en ebullición cinco minutos. Finalmente la muestra se enfrió en un baño de hielo y las proteínas denaturadas durante el proceso se clarificaron por centrifugación a 9.000 xg durante 20 minutos. El precipitado se lavó con la solución A en un homogenizador manual de vidrio y se centrifugó de nuevo, recogiendo el sobrenadante. El proceso se repitió una vez más. El sobrenadante de la primera clarificación y los dos lavados

consecutivos se reunieron y se dializaron extensivamente contra la solución A.

2.3.7.5. Cromatografía en Blue-Sepharosa CL-6B

La muestra dializada (30-40 mL) se cromatografió en Blue-Sepharosa CL-6B, (1,8 x 12 cm) equilibrada previamente con la solución A, a 10 mL/h. Se recogieron fracciones de 4 mL. La resina se lavó primero con solución A, a la que se añadió NaCl para una concentración 100 mM y seguidamente con solución A adicionada de NaCl para una concentración final 0,6 M NaCl. Las fracciones más activas (27-50) se dializaron frente a la solución A y se concentraron por liofilización. La proteína liofilizada se resuspendió en un pequeño volumen y se guardó en alícuotas a -20°C .

Se comprobó la pureza de la preparación por electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida SDS al 12 %, seguida de tinción con Coomassie-Blue. El inhibidor mostró una doble banda de peso molecular aproximado de 31 Kd.

2.3.8. Purificación de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa tipo 1

La purificación de la subunidad catalítica de la PrP tipo 1 de músculo de conejo se llevó a cabo según las indicaciones de Resink y col. (281). La PrP tipo 1 catalítica fue utilizada para seguir la purificación del I-2 de músculo de conejo, y como referencia en los ensayos de clasificación de las PrP microsomales.

Los ensayos para el seguimiento de la actividad en la purificación se realizaron con Ser(^{32}P) glucógeno fosforilasa e inhibidor 2. En presencia de inhibidor 2 se muestra la actividad catalítica tipo 2A y en ausencia del mismo, tanto la actividad tipo 1 como la 2A. Los ensayos se realizaron tal como indicamos luego en el apartado 2.4.6., incubando las fracciones 10 minutos con el inhibidor 2 y después 10 minutos con sustrato glucógeno fosforilasa marcada con ^{32}P .

2.3.8.1. Preparación del extracto crudo de músculo de conejo

La obtención y extracción del músculo se realizó como se describe en el apartado 2.3.3.1. Se partió del músculo esquelético de tres conejos de mediano tamaño y se obtuvieron 1300 g de tejido. El músculo se homogenizó a 4°C, en un Waring Blandor de gran capacidad, a baja velocidad durante 45 segundos, en relación 1:2 (p/v) con la solución amortiguadora Tris/HCl 20 mM pH 7, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, 0,1 % de β -mercaptoetanol, solución A. Extemporáneamente se añadió un preparado de inhibidores de proteasas: PMSF 0,1 mM, TPCK 0,1 mM, TLCK 0,1 mM, benzamidina 1 mM, leupeptina 4 μ g/mL, antipaina 4 μ g/mL y aprotinina 4 μ g/mL. Si no se indica lo contrario, todos los pasos sucesivos de la purificación se realizaban a 4°C.

Tras homogenizar el tejido, se centrifugó durante 30 minutos a 6.000 xg y luego se decantó sobre lana de vidrio, recogiendo el filtrado. Se comprobó el pH y si era necesario se ajustó a pH 7,2 con NH_4OH 10 M.

2.3.8.2. Precipitación con sulfato amónico

El filtrado se precipitó con sulfato amónico sólido hasta una concentración final del 70 % (472 gramos en 1.000 mL) dejando reposar durante 30 minutos para favorecer la precipitación. Se centrifugó a 6.000 xg durante 35 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución A con la ayuda de un homogenizador manual de vidrio. El precipitado se resuspendió en la décima parte del volumen inicial obtenido en la primera centrifugación.

2.3.8.3. Precipitación con etanol

A la muestra resuspendida se añadieron cinco volúmenes de etanol 96°, con lo que se produjo la rotura de las PrP presentes y se obtuvieron las subunidades catalíticas. Se dejó reposar unos minutos y el precipitado se recogió por centrifugación a 6.000 xg durante 5 minutos. El precipitado se extrajo dos veces con solución A, 800 mL primero y 400 mL en el segundo

lavado, obteniéndose unos solubles que se concentraron por precipitación con sulfato amónico sólido hasta una concentración final del 65 %. Después de dejar reposar durante 30 minutos se centrifugó el precipitado 60 minutos a 6.000 xg. El precipitado se resuspendió en aproximadamente 50 mL de solución A, a la que se añadió glicerol para una concentración final del 10 % y se dializó 12 horas frente a 2 litros de solución.

2.3.8.4. Cromatografía en DEAE-celulosa

La solución dializada se diluyó con el mismo volumen de solución amortiguadora y se cromatografió en DEAE-celulosa (5 x 5 cm) equilibrada con la solución A más 10 % de glicerol. La velocidad de la columna fue de 240 mL/h. Tras la entrada de la muestra, la columna se lavó durante una hora con la misma solución de equilibrado más NaCl para una concentración de 80 mM. Se aplicó seguidamente un gradiente lineal (500 + 500 mL) entre 80-400 mM NaCl. Las fracciones activas se recogieron y diluyeron con la solución de equilibrado hasta un volumen final doble del inicial, con objeto de disminuir la concentración de NaCl.

2.3.8.5. Cromatografía en poli-L-lisina-Sepharosa 4B

La muestra diluída se aplicó a una columna (5 x 1,7 cm) de poli-L-lisina Sepharosa 4B equilibrada con la misma solución A, a la que se añadió 10 % de glicerol. La velocidad de la columna fue de 80 mL/h. Una vez entrada la muestra, se lavó con 30 mL de la solución de equilibrado y a continuación se eluyó con 100 mL de la misma solución a la que se añadió NaCl para una concentración final de 200 mM. El eluido de NaCl se guardó y se utilizó para purificar la subunidad catalítica de la PrP 2A. La subunidad catalítica de la PrP 1 aún retenida en la columna se eluyó con NaCl 500 mM. Las fracciones activas se concentraron en frío y al vacío en una membrana de colodión hasta un volumen final de 2 mL.

2.3.8.6. Cromatografía en Sephadex G-75

La muestra concentrada se aplicó a una columna de Sephadex G-75 superfino (2 x 75 cm) equilibrada con la solución amortiguadora: Tris/HCl 50 mM pH 7, 10 % glicerol y 0,1 % (v/v) β -mercaptoetanol. La columna se llevó a baja velocidad (5 mL/h) y se recogieron fracciones de 2 mL. Las fracciones activas se concentraron al vacío en una membrana de colodión hasta un volumen de 1-2 mL. Para mejorar la conservación se añadió glicerol para una concentración final del 50 % (v/v) y se guardó en alícuotas a -20°C .

2.3.9. Purificación de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A

La subunidad catalítica tipo 2A se purificó conjuntamente con la subunidad tipo 1 hasta la cromatografía en poli-L-lisina-Sepharosa 4B (véase apartado 2.3.8.5.) donde las actividades se separaban, excluyéndose la actividad 2A a menor concentración salina. La muestra excluida de la columna de poli-L-lisina-Sepharosa 4B a 200 mM NaCl se concentró por diálisis al vacío, en membrana de colodión, hasta un volumen final de 2 mL y se aplicó, como en el caso de la actividad catalítica PrP 1 a una columna de Sephadex G-75 superfino, en las mismas condiciones.

Las fracciones activas se concentraron al vacío hasta un volumen final de 1-2 mL, y se procesaron como en el apartado anterior.

2.3.10. Obtención de la glucógeno sintasa quinasa-3

El enzima GSQ-3 obtenido a partir de músculo de conejo fue amablemente suministrado por la Dra. Montserrat Arró. El método utilizado para su purificación está basado en los descritos por Hemmings y col. (151) y Cohen (70). Tras la purificación sucesiva de los extractos iniciales por las cromatografías de DEAE-Sephadex A-50, fosfocelulosa P-11 y Affi-gel Blue, se obtuvieron las fracciones activas que se concentraron en una membrana de colodión.

2.4. TECNICAS ANALITICAS

2.4.1. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa con sustrato [³H]-HMG-CoA

La determinación enzimática de la actividad HMG-Coa reductasa se basa en la reducción del HMG-CoA a ácido mevalónico, que conlleva la cesión de cuatro electrones a partir de dos moléculas de NADPH. El sustrato HMG-CoA se marca radioactivamente con ³H o ¹⁴C y se cuantifican los productos de reacción. La diferencia entre las dos determinaciones radica en la forma de separar el sustrato de los productos de reacción. En la determinación con sustrato tritiado se sigue el método propuesto por Philipp y Shapiro (275).

Cantidades de HMG-CoA reductasa, cuya actividad no debía ser superior a 0,12 unidades, se ensayaron en un volumen de 50 µL con 60 µL de la disolución que contenía: 25 µmols de Tris-/HCl pH 7,2, 0,6 U de glucosa-6-p-deshidrogenasa, 6 µmols de EDTA, 6 µmols de glucosa-6-fosfato, 0,5 µmols de DTT, 0,3 µmols de NADP⁺, 0,06 µg de albúmina bovina y 11,2 µg [³H]-HMG-CoA (3.500-4.000 cpm/nmol).

La reacción se desarrolló a 37°C durante 15 minutos y finalizó añadiendo 40 µL de HCl 2,5 N. El ácido mevalónico tritiado, producto de la reacción, se lactonizó a 50°C durante 10 minutos, formándose mevalonolactona [³H]-MVL a la vez que se hidrolizaba el sustrato formándose [³H]-HMG y CoA. Los tubos de ensayo se centrifugaron dos minutos a 12.000 xg previamente enfriados a 4°C, para favorecer la precipitación de proteínas.

Se tomaron 100 µL del sobrenadante y se depositaron en viales de vidrio para centelleo, añadiendo 5 mL de líquido de centelleo: tolueno/PPO 0,8 %. La agitación enérgica de los 100 µL acuosos en el medio orgánico favoreció el reparto de los compuestos radioactivos, quedando el [³H]-MVL en la fase orgánica y el ácido [³H]-HMG, más hidrofílico en la fase acuosa. El líquido de centelleo orgánico permitió el recuento de las partículas β emitidas por el [³H]-MVL sin que las emitidas por la fase acuosa

interfirieran, ya que su radiación, de baja energía, fue detenida por el agua.

En este tipo de ensayo fue necesario realizar un blanco de todos los componentes, ya que el contaje varía en función de la distribución real entre ambas fases y del tiempo transcurrido desde la formación de la emulsión hasta la lectura.

2.4.2. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa con sustrato [^{14}C]-HMG-CoA

La determinación se realizó sobre el sustrato [^{14}C]-HMG-CoA de una radioactividad específica de 3.500-4.000 cpm/nmol. Se siguió, en casi todo, lo descrito en el apartado anterior, modificando el método de separación de los productos radioactivos [^{14}C]MVL y [^{14}C]-HMG ácido, y sustituyendo los 40 μL de HCl 2,5 N por 60 μL de la siguiente disolución: HCl 3,3 N, 1 mg MVL y 0,2 mg de ácido HMG. Con ello se consiguió que en la separación cromatográfica de los productos radioactivos, el ácido HMG y la MVL sirvieran tanto para visualizar la separación como para aportar masa, actuando como transportadores de los productos radioactivos.

La separación de los productos radioactivos se realizó según el método propuesto por Shapiro y col. (299). Ali-cuotas de 100 μL procedentes de las muestras lactonizadas, enfriadas y centrifugadas, se cromatografiaron en un soporte de silicagel $\text{HE}_{2,5,4+3,6,6}$, en capa fina, en placas de 20 x 20 cm. Las placas debían activarse previamente por calefacción en estufa a 100°C durante 1 hora. La cromatografía fue de tipo ascendente y se desarrolló en una cubeta de vidrio utilizando como fase móvil 100 mL de acetona-benceno a partes iguales.

Finalizada la cromatografía, las placas se dejaron secar en corriente de aire y se visualizó la separación con la ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de 254 nm. El producto de la reacción MVL corrió por delante del ácido HMG. Los Rf fueron de 0,8 y 0,2 para la MVL y el ácido HMG respectivamente. La zona de silicagel que contenía el MVL se separó con una espá-

tula metálica y se depositó en viales de vidrio para centelleo, con 10 mL del siguiente líquido de centelleo: PPO 0,7 % (p/v), naftaleno 8 % (p/v), etilenglicol monometil éter 40 % (v/v) y tolueno 60 % (v/v). Tras remover suavemente los viales se dejaron reposar unos minutos y se realizó el recuento radioactivo en un contador de centelleo líquido para radiaciones β .

Una unidad de HMG-CoA reductasa se define como la cantidad de enzima que convierte 1 nmol de HMG-CoA en mevalonato, por minuto, a 37°C.

2.4.3. Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa

Se utilizó como sustrato HMG-CoA reductasa purificada a homogeneidad e inactiva, obtenida como se detalla en el apartado 2.3.1. El ensayo se basa en el aumento de actividad HMG-CoA reductasa consecuencia de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa referido a una actividad control HMG-CoA reductasa que se procesa paralelamente.

Los enzimas se diluyeron convenientemente en solución amortiguadora: Bis-Tris/HCl 40 mM pH 7, DTT 1 mM y albúmina 0,5 mg/mL. A 20 μ L de la dilución de HMG-CoA reductasa (0,22 μ g) se añadieron 30 μ L de la dilución de HMG-CoA reductasa fosfatasa y se incubó durante 15 minutos a 37°C. A partir de este punto se prosiguió con el ensayo de actividad HMG-CoA reductasa descrito en los apartados 2.4.1. ó 2.4.2., en función del sustrato utilizado. En el control de actividad HMG-CoA reductasa los 30 μ L de muestra se sustituyeron por 30 μ L de solución de dilución.

Se define una unidad de HMG-CoA reductasa fosfatasa como la cantidad de enzima que incrementa la actividad HMG-CoA reductasa en una mU por minuto, a 37°C.

2.4.4. Determinación de la actividad glucógeno fosforilasa

Se utilizó el método de Gilboe y col. (130). Se cuantifica la actividad glucógeno fosforilasa por el aumento de incorporación de [14 C]glucosa 1-fosfato a glucógeno.

La actividad enzimática de la glucógeno fosforilasa "a" se determina en ausencia de AMP ya que en estas condiciones la glucógeno fosforilasa "b" de músculo de conejo es enzimáticamente inactiva. La forma inactiva "b" se cuantifica por diferencia entre la actividad total (a + b) medida en presencia de AMP y la actividad de la forma "a" medida en ausencia de AMP.

La muestra enzimática a ensayar se diluyó convenientemente con solución amortiguadora: Bis-Tris/HCl 40 mM pH 7, DTT 1 mM y albúmina 0,5 mg/mL. La mezcla de sustratos contenía: α -D-[U- 14 C]glucosa-1-fosfato sal potásica, 50-70 mM (7.500-10.000 cpm/ μ mol), 1 % de glucógeno, 1 mM AMP y maleato sódico 100 mM, pH 6,5.

La reacción se inició al incubar 30 μ L de la muestra enzimática con 60 μ L de la mezcla de sustratos, a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo al sembrar 75 μ L de la mezcla de ensayo en un trozo de papel (2 x 2 cm) Whatman 31 ET que se sumergió seguidamente en etanol del 66 % enfriado a 4°C. Se realizaron tres lavados con etanol para eliminar toda la radioactividad que no estaba ligada al glucógeno. Los papeles se secaron en estufa y se colocaron en viales de centelleo líquido para su posterior contaje. Utilizamos tolueno/PPO al 5 % como líquido de centelleo.

Una unidad de glucógeno fosforilasa se define como la cantidad de enzima que incorpora un μ mol de glucosa al glucógeno por minuto, a 30°C.

2.4.5. Determinación de la actividad fosforilasa quinasa

En la determinación de la actividad fosforilasa quinasa se siguió el método propuesto por Cohen 1973 (68) basado en la capacidad del enzima en fosforilar su sustrato, glucógeno fosforilasa "b".

A 30 μ l de la dilución de Tris/HCl 125 mM, glicerol-1-fosfato 125 mM pH 8,6, que contenía 0,2 mg de glucógeno fosforilasa y 0,3 nmol de CaCl₂, se añadieron 20 μ L de muestra di-

luída convenientemente en tampón glicerol-1-fosfato 50 mM, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 6,8 y 20 μ L de ATP-Mg²⁺ 30mM y 100 mM respectivamente, pH 7,2. Se incubó durante 5 minutos a 30°C. Transcurrido este tiempo se tomaron 20 μ L que se añadieron a 200 μ L de la solución: maleato 0,1 M, albúmina bovina 0,1 %, DTT 1 mM pH 6,5 en baño de hielo, con lo que se detuvo la reacción. En estas alícuotas se ensayó la actividad fosforilasa en ausencia y presencia de AMP, tal como se indica en el apartado 2.4.4., llevándose el ensayo de la actividad glucógeno fosforilasa en la dirección de la síntesis de glucógeno.

Una unidad glucógeno fosforilasa quinasa se define como aquella cantidad de enzima capaz de transformar 1 μ mol de glucógeno fosforilasa "b" monómero en glucógeno fosforilasa "a" monómero en un minuto, a 30°C.

2.4.6. Determinación de la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa

En la determinación de actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa se utilizó Ser(³²P) glucógeno fosforilasa, convenientemente diluída con glucógeno fosforilasa no marcada radioactivamente, para obtener una radioactividad específica de 50.000 cpm/nmol en el ensayo.

Se incubaron 20 μ L de la solución que contenía el sustrato (15.000 cpm/20 μ g) y 30 μ L de la muestra a ensayar, diluída en la solución Bis-Tris/HCl 40 mM pH 7, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM y albúmina bovina 0,5 mg/mL. El ensayo transcurrió durante 10 minutos a 30°C y finalizó al añadir 50 μ L de TCA al 20 %. Se enfrió a 4°C y se centrifugó a 12.000 xg durante 5 minutos para favorecer la precipitación de la proteína marcada radioactivamente. Del sobrenadante se tomaron 75 μ L que se depositaron en papel Whatman 31 ET (2 x 2 cm). Los papeles se secaron y se introdujeron en viales de vidrio, para contaje de centelleo, que contenían 10 mL de PPO al 0.8 % en tolueno.

Se hizo necesario llevar controles sin actividad PrP, que se procesaron paralelamente. También fue preciso conocer

exactamente la radioactividad presente en el ensayo, para lo cual se sustituyeron los 50 μL de TCA al 20 % por 50 μL de agua destilada. El ensayo fue lineal siempre que el fosfato liberado no superó el 25 % del fosfato inicial unido a proteína.

Una unidad de glucógeno fosforilasa fosfatasa es la cantidad de enzima que libera 1 nmol de fosfato por minuto, a 30°C.

2.4.7. Determinación de la actividad inhibidora del inhibidor 2

Se determinó la capacidad inhibidora del inhibidor 2, obtenido a partir de músculo esquelético de conejo, sobre la actividad proteín fosfatasa según el método propuesto por Foulkes y Cohen (116).

Las diluciones se realizaron con solución amortiguadora Bis-Tris/HCl 40 mM pH 7, MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM y albúmina 0,5 mg/mL. La reacción se inició incubando 15 μL del inhibidor 2 convenientemente diluido y 15 μl de la preparación con actividad proteín fosfatasa, durante 15 minutos a 30°C, seguidamente se añadieron 20 μL de glucógeno fosforilasa marcada radioactivamente con ³²P, incubando la mezcla durante 10 minutos, a 30°C. La determinación de actividad glucógeno fosfatasa se siguió como en el apartado 2.4.6.

Una unidad de inhibidor 2 es la cantidad de proteína necesaria para producir una inhibición del 50 % de la actividad proteín fosfatasa, en las condiciones descritas.

2.4.8. Identificación de la actividad proteín fosfatasa tipo 1

En la identificación de las actividades 1, 2A, 2B y 2C se siguieron las recomendaciones propuestas por Shenolikar e Ingebritsen (300). Cuando las muestras procedían de extractos de tejidos, previamente a la identificación de actividades se eliminaron los inhibidores de bajo peso molecular por gel filtración en columnas preparadas en jeringas de 2 mL, en las que se deposi-

tó 1 mL de Sephadex G-50 superfino, equilibrado con la solución amortiguadora: Tris/HCl 40 mM pH 7, 0,1 % β -mercaptoetanol. Las columnas se centrifugaron a 3.000 xg durante 2 minutos antes y después de depositar 500 μ L de la muestra. La operación fue rápida, la recuperación de proteína prácticamente total, y no se produjo dilución de las muestras.

La actividad PrP 1, espontaneamente activa, se determinó sobre sustrato glucógeno fosforilasa tal como se indica en el apartado 2.4.6. El ensayo se realizó en presencia de cantidades crecientes de I-2. La glucógeno fosforilasa es mal sustrato de las PrP 2B y 2C, ello hace innecesario la inclusión de trifluoroperazina en el ensayo para inhibir las PrP 2B. La ausencia de cationes divalentes evita que se muestre actividad PrP 2C.

La actividad PrP 1, inactiva, se determinó por incubación de la muestras con GSQ-3 y ATP-Mg²⁺. El ensayo se realizó como en el caso anterior siguiendo la hidrólisis de la Ser(³²P) glucógeno fosforilasa, con las siguientes modificaciones:

A 20 μ L de actividad a ensayar se añadieron 10 μ L de glucógeno sintasa quinasa-3 y 10 μ L de la solución: Tris/HCl 40 mM pH 7, 0,2 mM ATP, 0.4 mM acetato de magnesio, 0,1 % (v/v) β -mercaptoetanol. Se incubaron las muestras durante 15 minutos a 30°C. El ensayo de la actividad glucógeno fosforilasa se inicia al añadir 20 μ l del enzima convenientemente diluido tal como se indica en el apartado 2.4.6. Se llevaron controles en ausencia de ATP-Mg²⁺ para corregir el aporte de otras actividades. La GSQ-3 se diluyó adecuadamente en la solución amortiguadora: Tris/HCl 40 mM, pH 7, 0,1 % β -mercaptoetanol y 0,5 mg/mL de albúmina bovina.

2.4.9. Identificación de la actividad proteína fosfatasa tipo 2A

La identificación de la actividad PrP 2A puede realizarse por ensayos de reactivación frente a policaciones (274) o en ensayos en presencia de inhibidor 2.

Las PrP 2A se identificaron por reactivación de la actividad inicial en presencia de proteínas básicas. Proteínas como protamina, poli-L-lisina o histona H1 estimulan la defosforilación de las PrP 2A para todos los sustratos ensayados. Para ello, en el medio de incubación se incluyeron 30 µg/mL de protamina (la protamina es inestable a concentraciones inferiores a 5 µg/mL por lo que se guarda concentrada en una solución a 3.0 mg/mL). El ensayo se realizó tanto para sustrato glucógeno fosforilasa como para sustrato HMG-CoA reductasa.

2.4.10. Identificación de la actividad proteín fosfatasa 2B

La PrP 2B es activa sobre un limitado número de sustratos. Se ha descrito que no es activa sobre los sustratos glucógeno fosforilasa, y que tiene muy baja actividad sobre la HMG-CoA reductasa. Sin embargo, desfosforila el sustrato no fisiológico pNPP, prefiriéndose este sustrato en estudios cinéticos y de estimulación por cationes inorgánicos, por la comodidad que representa seguir la reacción de forma continuada por medida espectrofotométrica, Pellen y col.(260)(261).

2.4.10.1. Ensayo sobre sustrato para-nitrofenilfosfato (pNPP)

Para poner a punto el ensayo sobre pNPP utilizamos PrP 2B purificada de cerebro bovino, obtenida comercialmente de Sigma. La actividad PrP 2B es dependiente de cationes divalentes. Cuando se ensaya sobre sustrato pNPP tanto el Ca^{2+} como el Mn^{2+} pueden utilizarse para estimular su actividad, siendo más efectivo el Mn^{2+} . La actividad es también estimulada por calmodulina.

La reacción transcurrió a 30°C en semimicrocubetas termostatzadas, pudiéndose seguir la cinética por lectura espectrofotométrica a 405 nm, o bien a punto final deteniendo la reacción al añadir 100 µL de K_2HPO_4 al 13 % y midiendo el incremento de absorbancia a 405 nm.

La reacción se inició al añadir 17 µg de calcineurina PrP 2B, disuelta en 100 µL de Tris/HCl 50 mM pH 7,2 a 900 µL de la mezcla de sustratos: Tris/HCl pH 7,2 50 mM; para-nitrofenil-

fosfato 10 mM (0,94 mg/mL); Mn^{2+} 10 mM. Transcurridos 5 minutos se añadieron 10 μ g de calmodulina diluída para una concentración en el ensayo 1 μ M. En las condiciones de ensayo se comprobó que la reacción es lineal durante los primeros 10 minutos, aumentando la velocidad de reacción cuatro veces al añadir calmodulina.

Puesto a punto el método, la determinación de actividad PrP 2B en nuestras muestras se realizó de la misma forma, sustituyendo los 100 μ L iniciales de la dilución de calcineurina por la muestra a ensayar. Se preparó una dilución adecuada de forma que los incrementos de absorbancia no fueran superiores a 0.002 por minuto. Transcurridos cinco minutos se añadieron 10 μ g de calmodulina para una concentración en el ensayo de 1 μ M y se comprobó el aumento de actividad.

Una unidad fosfatasa sobre sustrato pNPP se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de un nmol de p-nitrofenil fosfato, a 30°C.

2.4.10.2. Ensayo sobre HMG-CoA reductasa

Se ha descrito que la HMG-CoA reductasa es mal sustrato de la PrP 2B, Ingebritsen y col. (172). Estos autores realizan el ensayo sobre HMG-CoA reductasa microsomal no homogénea, por ello creímos de interés conocer si sobre sustrato homogéneo (utilizado por nosotros en la determinación de actividad HMG-CoA reductasa fosftasa) es activa.

Partimos de 15 μ g de PrP 2B de cerebro bovino y determinamos la actividad sobre sustrato HMG-CoA reductasa, tal como se indica en el apartado 2.4.3., con pocas modificaciones. A la muestra diluída se añadió $MgCl^2$ para una concentración en el ensayo de 1 mM. El ensayo se realizó en presencia y en ausencia de 11 μ g de calmodulina para comprobar que la actividad era activada por este compuesto, prosiguiendo la determinación de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.

2.4.11. Identificación de la actividad proteín fosfatasa 2C

La actividad PrP 2C es facilmente discernible de las otras PrP, por ser dependiente de Mg^{2+} . Sustratos de la PrP 2C son la glucógeno sintasa fosforilada en el sitio 2, la subunidad α de la fosforilasa quinasa y también la HMG-CoA reductasa. La glucógeno fosforilasa no es buen sustrato para la PrP 2C, lo que facilita su diferenciación de la 2A que sí es activa sobre este sustrato.

Se eligió como sustrato para la identificación de la actividad PrP 2C el enzima HMG-CoA reductasa. Para determinar la actividad PrP 2C y distinguirla de otras actividades PrP utilizamos el ensayo descrito por Ingebritsen y col. (173).

Las muestras a ensayar se incubaron durante 60 minutos, a $30^{\circ}C$, en presencia de 50 mM NaF y 10 mM EDTA. Este tratamiento inactiva la PrP 2A, pero no afecta la PrP 2C. Una vez inactivada la PrP 2A se dializaron las alícuotas para eliminar el exceso de NaF y EDTA. El ensayo de HMG-CoA reductasa fosfatasa se llevó a cabo en presencia o ausencia (control) de 10 mM Mg^{2+} , y se siguió la determinación como en el apartado 2.4.2.

2.4.12. Determinación de la actividad glucosa-6-fosfatasa

La glucosa-6-fosfatasa se encuentra en la superficie interna de la membrana del retículo endoplasmático y se utiliza frecuentemente como marcador de esta membrana. Para la determinación de actividad glucosa-6-fosfatasa se siguió el método de Aronson y Touster (15), introduciendo pequeñas variaciones propuestas por Baginski y col (17).

Las muestras a ensayar se guardaron congeladas a $-70^{\circ}C$ sin pérdida sensible de actividad. Sin embargo una vez descongeladas el enzima se vuelve inestable. La incubación con el sustrato se realizó a $30^{\circ}C$. En todos los ensayos fue necesario llevar un control de la solución de dilución de las muestras ya que el sustrato, glucosa-6-fosfato, interfiere en la posterior valoración colorimétrica.

En los extractos iniciales, la actividad glucosa-6-fosfatasa da valores falsamente elevados, debido principalmente a la presencia de enzimas hidrolíticos no específicos de origen lisosomal (fosfatasa ácida). Por ello los ensayos de extractos iniciales se realizaron antes y después de calentar las muestras a pH ácido. En estas condiciones la actividad glucosa-6-fosfatasa se inactivó y se valoró la actividad hidrolasa no específica. Las muestras se llevaron a pH 5,0 con solución amortiguada de acetato sódico y se calentaron durante 30 minutos, después se enfriaron y alcalinizaron hasta un pH 6,6, prosiguiéndose la determinación de la actividad glucosa-6-fosfatasa.

Se incubaron 30 μ L de la muestra convenientemente diluída en solución de sacarosa 250 mM, EDTA 1mM, histidina 35 mM, pH 6,5, con 300 μ L de 22 mM glucosa-6-fosfata. Transcurridos 10 minutos la reacción se detuvo con 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %. Se centrifugó a 12.000 xg durante 1 minuto en centrífuga Eppendorf y se tomaron 100 μ L del sobrenadante prosiguiendo en él la determinación de fosfato inorgánico liberado.

La diferencia entre actividad fosfohidrolasa total y la actividad fosfohidrolasa no específica se debe a la actividad glucosa-6-fosfatasa. Esta corrección es trivial en caso de microsomas lavados y sus subfraccionamientos, pero se hace necesaria en pasos iniciales.

Cuantificación del fosfato inorgánico liberado

El fosfato inorgánico liberado se cuantificó por el método de Itaya (175) modificado por Lanzeta y col. (210). El fosfato inorgánico se acompleja con el molibdato amónico a pH ácido y en presencia de verde malaquita forma compuestos coloreados con un máximo de absorción a 660 nm. La reacción es muy sensible y puede determinar cantidades inferiores a 0,01 μ g con gran precisión.

Soluciones:

1. Verde de malaquita al 0,045 % en agua acidificada con HCl 50 mM
2. Molibdato amónico al 4,2 % en HCl 4 N
3. Se toman 300 mL de la solución 1 y 100 mL de la solución 2, se agita durante 20-30 minutos y se deja reposar en oscuridad al menos 12 horas. El reactivo es estable 3 semanas.
4. Triton X-100 al 5 %
5. Antes del ensayo se prepara una solución añadiendo 40 μ L de Triton X-100 al 5 % por cada 5 mL del reactivo 3.
6. Citrato sódico 34 % (p/v)

Se tomaron 100 μ L de la muestra y se le añadieron 800 μ L de la solución 5. Transcurrido un minuto se añadieron 100 μ L de la solución 6 dejando reposar a temperatura ambiente un mínimo de 30 minutos para que se estabilizara el color, que se midió en espectrofotómetro a 660 nm. Dada la alta afinidad del molibdato por la glucosa-6-fosfato fue necesario llevar un control para el sustrato. Se prepara una curva patrón con KH_2PO_4 para una concentraciones entre 0,05 y 1 $\mu\text{g/mL}$.

2.4.13. Determinación de la actividad láctico deshidrogenasa

El enzima láctico deshidrogenasa es frecuentemente utilizado como marcador citosólico. La valoración de la actividad láctico deshidrogenasa se realizó por ensayo espectrofotométrico, a 340 nm, en cubeta termostatzada a 25°C, siguiendo el método propuesto por Bergmeyer y col. (31).

A 20 μ L de la solución a ensayar se añadieron 960 μ L de la solución: 50 mM fosfatos pH 7,5, 0,63 mM piruvato, y 20 μ L de la solución 11,3 mM NADH disuelto en (15 mg de bicarbonato sólido en 1,5 mL de agua). La muestra se mantuvo en cubeta termostatzada a 25°C. Se realizaron lecturas cada minuto; la variación de absorbancia debe mantenerse constante y no ser superior a 0,05 por minuto, por lo que la muestra a ensayar se diluyó adecuadamente en solución amortiguadora fosfatos 50 mM pH 7,5.

Una unidad de láctico deshidrogenasa es aquella cantidad de enzima capaz de transformar 1 μ mol de sustrato por minuto, a 25°C.

2.4.14. Determinación de la concentración de glucógeno

Seguimos el método propuesto por Katz y col. (182) basado en el de Lus y col (220). El método es preciso, evita la extracción previa del glucógeno y permite la detección de 10 μ g de glucógeno por gramo de hígado, cantidad no cuantificable cuando se utiliza el método de precipitación etanólica. Tiene la ventaja de que no es necesaria una cuantificación separada de la glucosa preexistente pues la glucosa inicial se destruye por tratamiento de las muestras en medio alcalino durante 10 minutos a 100°C. El calentamiento afecta también a otros azúcares como fructosa o glucosa-1-fosfato, sin afectar al glucógeno. El tratamiento alcalino obvia la necesidad de extraer los tejidos con etanol para eliminar la glucosa inicial y la determinación de glucógeno puede realizarse directamente por hidrólisis enzimática de las muestras sin precisar de otros tratamientos. La glucosa formada se valora espectrofotométricamente por la formación de NADPH a partir de las reacciones con ATP-hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

El hígado, una vez extraído se pesó y se homogenizó en baño de hielo en un homogenizador de alta velocidad con ácido perclórico 0.6 N en relación 1:5 (p/v). En caso de no poder proceder a su homogenización se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se homogenizó como se ha dicho, siguiendo los mismos pasos.

Se tomó una alícuota de 0,5 mL del homogenado anterior, se depositó en tubo de centrifuga Eppendorf y se añadieron 0,25 mL de NaOH 1,3 N, para una concentración final en álcali de 0,1 M. Se taparon los tubos y se hirvieron durante 10 minutos, con lo que se consiguió la destrucción de la glucosa libre presente en la muestra. Tras la incubación se enfriaron las muestras y se acidificaron con 0,25 mL de una mezcla 1:1 de 0.3 M ácido acético y tampón acetato 2 M pH 4,8 conteniendo 1 mg de

amilo- α -1,4- α -1,6-glucosidasa. La hidrólisis enzimática se prosiguió durante 2 horas a 45°C. La incubación se finalizó al añadir 100 μ L de ácido perclórico al 3 %. Se centrifugó la muestra a 12.000 xg en centrífuga Eppendorf.

La glucosa liberada se determinó espectrofotométricamente a 340 nm, a temperatura ambiente, en cubetas de 1 cm. Se tomaron 50 μ L del sobrenadante de la hidrólisis enzimática y se hicieron reaccionar con 1 mL de la siguiente solución: se disuelven 6 mg de ATP- $\text{Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 8 mg de NADP- Na_2H en 10 mL de la solución trietanolamina 0,3 M pH 7,5, 4,05 mM MgSO_4 y se añaden 0,05 mL de la suspensión de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (1 mg/mL, 140 U/mg). La absorbancia aumentó hasta un valor constante, E_1 . Estabilizada la reacción se añadieron 5 μ L de una suspensión de hexoquinasa (2 mg/mL, 140 U/mg). La absorbancia aumentó hasta alcanzar un valor constante, E_2 , aproximadamente entre los 5 y 10 minutos.

El incremento de absorbancia, diferencia entre E_2 y E_1 , corresponde a la glucosa presente en la muestra que se originó por la hidrólisis del glucógeno. Los resultados se expresan en mg de glucógeno por gramo de hígado homogenizado.

2.4.15. Determinación de RNA

La determinación de RNA se realizó por el método descrito por Reinhart y col. (280), basado en la absorción del RNA a 260 nm, habiendo eliminado previamente otras sustancias que interfieren a esta longitud de onda. Las muestras procedían del sobrenadante postmitocondrial obtenido de hígado de rata, por lo que los núcleos habían sido previamente separados en centrifugaciones previas y la absorbancia a 260 nm, una vez precipitada la proteína, se debe mayoritariamente al RNA presente.

A 100 μ L de la muestra se añadió 1 mL de solución de ácido perclórico al 6 %, manteniendo la muestra en baño de hielo durante 3 horas. Se centrifugó en centrífuga Eppendorf durante 7 minutos a 12.000xg y el precipitado se lavó de nuevo con 1 mL de ácido perclórico al 3 %. Se repitió la centrifugación y el pre-

precipitado se disolvió en 200 μL de NaOH 1 M. La muestra se calentó 1 hora a 37°C , y transcurrido ese tiempo se añadieron 800 μL de ácido perclórico frío. Se descartó el precipitado por centrifugación y en el sobrenadante se realizó la lectura espectrofotométrica a 260 nm. Por este tratamiento se rompen los polisomas y se hidroliza el RNA, quedando en el sobrenadante los nucleótidos que absorben a 260 nm. Las proteínas no interfieren pues quedan en el precipitado.

2.4.16. Determinación de la concentración de proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford (42) y se utilizó albúmina bovina como solución patrón. A 100 μL de la muestra se añadieron 700 μL de agua y 200 μL del reactivo de Folin-Ciocalteus. El aumento de absorbancia se leyó a 595 nm, siendo estable el color hasta 15 minutos después de iniciada la reacción. El método es muy sensible y puede determinar $5\mu\text{g/mL}$ de proteína en el ensayo.

2.5 TECNICAS ELECTROFORETICAS

2.5.1. Geles de acrilamida denaturantes. Tinción con Coomasie.

Tinción con plata

Las electroforesis se realizaron según Laemmli (206) en geles de acrilamida-bisacrilamida de 1 mm de grosor, en presencia de SDS. Los geles eran de tipo discontinuo, con un gel apilador de baja concentración de acrilamida y un gel resolutivo, cuya concentración de acrilamida varía en función del peso molecular de las proteínas que se desean separar.

Gel apilador: acrilamida 5 %, bisacrilamida 0,08 %, SDS 0,1 %, persulfato amónico 0,05 %, TEMED 0,025 %, en Tris/HCl 125 mM pH 6,8 %.

Gel resolutivo : acrilamida 7,5-10 % en función de las necesidades de resolución, bisacrilamida 0,2 %, SDS 0,1 %, persulfato amónico 0,05 %, TEMED 0,025 %, en Tris/HCl 375 mM pH 8,9.

Las muestras se prepararon en una solución de Tris/-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 5 % (p/v), β -mercaptoetanol 5 % (v/v) EDTA 0,33 % (p/v), azul de bromofenol 0,0125 % (v/v) y sacarosa 0,5 % (p/v).

La solución amortiguadora que se utilizó para el desarrollo de la electroforesis fue Tris 25 mM glicina 129 mM, pH 8,3 y SDS 0,2 %. La electroforesis transcurrió a 15 mA en su recorrido por el gel apilador y se aumentó a 25 mA para el gel resolutivo.

Finalizada la electroforesis se visualizó la proteína por tinción con Coomasie o con nitrato de plata. La tinción con Coomasie se realizó con la solución : Coomasie Blue 0,1 % en 45 % de metanol y 9 % de ácido acético. Los geles se mantuvieron en esta solución durante 15-30 minutos, se destañaron en continua agitación durante 10 minutos en 75 mL de metanol 50 % y ácido

acético 10 % y seguidamente durante 50 minutos en 75 mL de 7,5 % de metanol y 10 % ácido acético.

La tinción con nitrato de plata se inició preparando los geles para fijar las proteínas y eliminar el SDS: los geles se sumergieron durante 60 minutos en TCA 20 % y metanol 10 %, y se prosiguió con dos lavados de 30 minutos cada uno con etanol 10 % y ácido acético 5 %. Los geles se trataron durante 5 minutos con solución oxidante de dicromato potásico 3,4 mM y 32 mN ácido nítrico, y se tiñeron con nitrato de plata 12 mM en agua durante 20 minutos. El revelado se inició con lavados continuados en la solución: carbonato sódico 0,28 M y formaldehído 0,019 %. Para finalizar el revelado los geles se sumergieron en ácido acético al 3 %.

Si interesaba guardar los geles, se sumergían en alcohol metílico 50 % y glicerol 3 % (v/v) durante 2 horas y se secaban entre papel de celofán en un secador termostatzado conectado al vacío.

2.5.2. Geles de acrilamida no denaturantes. Determinación de la actividad PrP

En separación electroforética en condiciones no denaturantes se siguió básicamente el método propuesto por Davis (82). La electroforesis se realizó en geles discontinuos de 1 mm de grosor, con un gel apilador del 3 % de acrilamida y un gel resolutivo del 5%. Este tipo de geles apila a pH 8,3 y separa a pH 9,5.

Gel apilador: acrilamida 3 %, bis-acrilamida 0,2 %, persulfato amónico 0,05 % TEMED 0,025 %, en Tris/HCl 125 mM pH 6,8.

Gel resolutivo : acrilamida 5 %, bis-acrilamida 0,2 %, persulfato amónico 0,05 % TEMED 0,025 %, en Tris/HCL 375 mM pH 8,8.

La solución amortiguadora utilizada para desarrollar la electroforesis fue Tris 25 mM glicina 129 mM pH 8,3.

Se realizó un "preruning" de 20 minutos con azul de bromofenol como marcador de frente, para lavar el persulfato amónico. Las muestras se prepararon en 250 mM sacarosa, 40 mM DTT y Tris/HCl 125 mM pH 6,8 y albúmina 0,5 mg/ml. Los geles se refrigeraron a 4°C y se mantuvieron en un amperaje de 15 mA durante 7 horas.

Finalizada la electroforesis el gel se cortó, primero verticalmente para separar los distintos carriles y luego en pequeños fragmentos de 5 mm, que se incubaron en 100 µL de bicarbonato amónico 20 mM pH 7,4 y 0,5 mM DTT durante 3 horas a 4°C. Se centrifugaron luego en centrifuga Eppendorf a 12.000 xg durante 2 minutos y en el sobrenadante se determinó la actividad proteín fosfatasa

2.6. TECNICAS DE CENTRIFUGACION

Se han utilizado dos técnicas de centrifugación en el estudio de la localización y purificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa: centrifugación diferencial y centrifugación en gradiente continuo de sacarosa.

2.6.1. Fraccionamiento subcelular de hígado de rata por centrifugación diferencial

Las ratas se decapitaron a las 9 de la mañana. Una vez desangrado el animal, se extrajo el hígado, se eliminaron los restos de tejido conjuntivo y grasa que quedaban adheridos y se lavó en frío con el mismo tampón que luego fue utilizado para la homogenización, se pesó y troceó. La homogenización del hígado se llevó a cabo con una relación 1:3 (p/v), a 4°C en baño de hielo, en un homogenizador del tipo Potter-Elvehjem de la casa Thomas, con pistilo de teflón que se conectó a un motor. La solución amortiguadora utilizada fue: sacarosa 500 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, β -mercaptoetanol 15 mM en Tris/HCl 40 mM pH 7.2. Cuando se indica, se añadió extemporáneamente una mezcla de inhibidores de proteasas compuesta por PMSF 0,5 mM, benzamidina 1.0 mM, leupeptina 4 μ g/mL, TPCK 0.1 mM.

El homogenado se subfraccionó esencialmente como describe Duve y col. (93) y Daller G. (80). Brevemente: se centrifugó 10.000 xg durante 15 minutos a 4°C, lo que causó que mitocondrias, lisosomas y otras partículas se depositaran en un precipitado. El sobrenadante se recogió por aspiración con una jeringa, de forma que se recogieron solo las 3/4 partes superiores (252). Se filtró sobre un vaso de precipitados en baño de hielo a través de lana de vidrio, con lo que se consiguió eliminar parte de las grasas. A este primer sobrenadante le denominamos sobrenadante postmitocondrial (SPM).

El SPM se centrifugó a 100.000 xg durante 90 minutos, en una ultracentrífuga Beckman, a 4°C. Se obtuvo un sobrenadante, citosol, que se separó por decantación, y un precipitado, mezcla de glucógeno y membranas microsomales. Las membranas microsomales

quedaban en la parte superior, poco adheridas al precipitado de glucógeno, por lo que pudieron separarse añadiendo un pequeño volumen de solución y agitando suavemente. Estas membranas resbalaban y se despegaban del precipitado de glucógeno recogiendo por decantación.

Tanto las membranas microsomales como el precipitado de glucógeno se resuspendieron, separadamente, con la ayuda de un homogenizador manual de vidrio en solución tamponada de la misma composición de la solución de homogenización, pero con menor concentración de sacarosa, en este caso 250 mM, solución A, hasta un volumen final igual al peso inicial de hígado en gramos. Se centrifugaron de nuevo a 100.000 xg durante 70 minutos y se obtuvieron los microsomas lavados y el precipitado de glucógeno lavado. A estas fracciones las denominamos microsomas (M) y precipitado de glucógeno (G).

Las fracciones microsomales y de precipitado de glucógeno se resuspendieron con la ayuda de un homogenizador manual de vidrio, en solución A, para una concentración entre 20-25 mg de proteína por mL. Si se precisaba guardar alícuotas de las fracciones obtenidas para ensayos posteriores, el almacenaje se realizaba en pequeñas alícuotas, mantenidas a -70°C, que se descongelaban una sola vez, en baño de hielo.

2.6.2. Subfraccionamiento en gradiente de sacarosa

El fraccionamiento en gradiente de sacarosa se realizó en una centrífuga Beckman provista de rotor basculante del tipo 28-SW, en tubos de propileno de capacidad de 35 mL, centrifugándose las muestras durante 4 horas a 25.000 rpm y 4°C, adaptando el método propuesto por Hino y col. (155).

El gradiente se preformó en los tubos de centrifugación con la ayuda de una bomba peristáltica y dos vasos comunicantes con la solución amortiguadora: Tris/HCl 5 mM pH 7, EDTA 10mM, β -mercaptoetanol 0,1 % (v/v) y sacarosa 15-60 %. En los casos en que se indica, a la solución se añadió cantidad suficiente de KCl para una concentración final de 500 mM. La presen-

cia de 10 mM EDTA y, en su caso 500 mM KCl, tenía el propósito de eliminar los polisomas y las proteínas adheridas de los microsomas.

Una vez formado el gradiente, en la parte superior del tubo de centrifuga (15 % de sacarosa) se depositaron con suavidad 3 mL del SPM obtenido minutos antes, tal como se indica en el apartado 2.6.1.

Finalizada la centrifugación, se realizó la extracción por aspiración con una pipeta que se introdujo hasta el fondo del tubo, teniendo cuidado de no distorsionar el lecho. La extracción se realizó a velocidad constante con una bomba peristáltica y se tomaron alícuotas que se recogieron con la ayuda de un recolector de fracciones. De cada una de las fracciones obtenidas se tomaron varias alícuotas de 200 μ L que se congelaron seguidamente a -70°C .

Dos de los seis tubos de centrifugación se utilizaron como control. Se depositó en ellos 3 mL de la solución A. Una vez finalizada la centrifugación, el contenido de estos tubos se subfraccionó como ya hemos descrito y de cada alícuota se determinó el índice de refracción en un refractómetro de Abbe 3L (Bausch and Lomb. Inc.). Los valores de índice de refracción pueden transformarse en % de sacarosa o en densidad mediante la utilización de tablas.

2.7. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En distintos pasos del fraccionamiento o de la purificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa interesó solubilizar o proteolizar la actividad. Los tratamientos que se siguieron fueron los siguientes:

2.7.1. Solubilización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa

En el caso de que interesara solubilizar los microsomas o el precipitado de glucógeno con solución de detergente (Triton X-100), KCl o simplemente solución tamponada, siempre se mantuvieron los microsomas 1-3 horas en la solución A (apartado 2.6.1) suplementada con el detergente o la sal y se centrifugaron las muestras a 100.000 xg durante 90 minutos, con lo que se obtuvo un precipitado microsomal y un sobrenadante o soluble.

2.7.2. Tratamiento de las muestras con α -amilasa

Se siguió la metodología descrita por Ingebritsen y col. (174). Las fracciones: microsomas y precipitado de glucógeno obtenidas como se describe en el apartado 2.6.1. se resuspendieron en solución A con ayuda de un homogenizador manual de vidrio, para una concentración final en proteína de 20 ± 5 mg/mL.

Cada una de las fracciones, microsomas y glucógeno, se dividió en dos alícuotas que se trataron con α -amilasa salival (0,1 mg/mL) y se dializaron durante 3 horas a 4°C frente a la solución A (apartado 2.6.1.), que se suplementó con la mezcla de inhibidores de proteasas: PMSF 0,5 mM, benzamidina 1.0 mM, leupeptina 4 μ g/mL y TPCK 0.1 mM. El dializado se centrifugó a 100.000 xg durante 90 minutos. El sobrenadante, soluble, se decantó y el precipitado se resuspendió en la misma solución de homogenización.

2.7.3. Precipitación con acetona

Seguimos básicamente el procedimiento propuesto por Ballou y col. (18) y Villa-Moruzzi (337). Se añadió a la muestra 1 mM Mg^{2+} , teniendo en consideración si las muestras contenían o no quelantes de este catión. A continuación, a temperatura ambiente y lentamente, se añadió el mismo volumen de acetona que volumen inicial de muestra. La mezcla se realizó con agitación continuada y suave. Rápidamente se centrifugó a 6.000 xg, en tubos de vidrio Corex, y el precipitado de proteína se resuspendió en un homogenizador manual de vidrio con un pequeño volumen de la solución amortiguadora: imidazol 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 15 mM, PMSF 0,002 %, benzamidina 0,1 mM y NaCl 1 M. La elevada concentración salina favoreció la resuspensión. La muestra resuspendida se dializó contra la misma solución exenta de NaCl hasta una conductancia de 6,5 mS. Se centrifugó a 10.000 xg durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante, donde permanece la actividad PrP.

2.7.4. Tratamiento de las muestras con tripsina

Las muestras se tripsinizaron en una relación proteína/tripsina (90/1) a 30°C durante los tiempos de incubación especificados. La incubación se finalizó por adición de una cantidad 10 veces superior de inhibidor de tripsina de soja que de tripsina. En los casos que se indican la incubación con tripsina se realizó en presencia de 5 mM Mn^{2+} .