

Purificació i caracterització de dues proteïnes inhibidores termoestables de l'activitat HMG-CoA reductasa fosfatasa de fetge de rata

Dolors Serra i Cucurull

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAT DE FARMACIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

PURIFICACIO I CARACTERITZACIO DE DOS PROTEINES
INHIBIDORES TERMOESTABLES DE L'ACTIVITAT HMG-CoA
REDUCTASA FOSFATASA DE FETGE DE RATA

DOLORS SERRA i CUCURULL

Tesi presentada per la llicenciada
Dolors Serra i Cucurull per optar al
grau de Doctor en Farmàcia.

Aquesta Tesi ha estat realitzada,
sota la direcció del Dr. Fausto García
Hegardt, en la Unitat de Bioquímica de la
Facultat de Farmàcia del Departament de
Ciències Fisiològiques Humanes i de la
Nutrició de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Octubre de 1988

Voldria expressar el meu sincer agraïment a totes aquelles persones, sense l'ajut de les quals no hagués estat possible la realització d'aquesta Tesi:

Al Dr. Fausto Garcia Hegardt, Cap del Departament, per la dedicació que en tot moment ha tingut en la direcció i en la discussió de la mateixa.

A Guillermina Asins, per les agradables hores compartides, així com per la seva total disposició i col.laboració en la discussió i realització d'aquest treball.

A Victòria Esser, per haber estat la primera en guiar-me en els inicis d'aquest treball i oferir-me la seva amistad i, a Albert Ferrer pels seus valuosos consells i atencions que han sigut de gran ajuda.

A tots els companys de la Unitat, per les estones relaxants i divertides viscudes, amb els quals el treball de cada dia ha estat més agradable.

A Ramon Morera, per la part gràfica d'aquest treball, així com pel seu estímul i encoratjament constants.

PRESENTACIO:

El principal regulador de la biosíntesi de colesterol és l'enzim 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A reductasa. Aquest enzim, està sotmés a nombrosos mecanismes que li regulen tant la seva quantitat com la seva activitat. Aquests mecanismes es classifiquen en dos grups, els que actuen a llarg plaç controlant fonamentalment la quantitat d'enzim i els que actuen a curt plaç, controlant-ne l'activitat. Un dels principals mecanismes que actuen a curt plaç, és el de la modificació covalent per fosforilació reversible.

En el nostre Laboratori s'ha desenvolupat una línia d'investigació centrada en l'estudi del procés de fosforilació de l'HMG-CoA reductasa, degut a l'acció de la reductasa quinasa i, del de desfosforilació, per acció de les reductasa fosfatases.

En l'esquema de regulació de l'HMG-CoA reductasa i de molts altres sistemes interconvertibles per fosforilació, cada vegada més, es dona una major importància al paper de les proteïna fosfatases en la regulació del sistema subjecte a interconversió. Aquest fet condueix al plantejament de l'existència d'altres proteïnes, com ho són les proteïnes inhibidores que regulen, a la vegada, l'actuació de les proteïna fosfatases.

L'objectiu principal d'aquesta Memòria fou, per tant, aprofundir en el conèixement del control del procés d'activació per fosforilació covalent de l'HMG-CoA reductasa, mitjançant l'estudi dels inhibidors de proteïna fosfatases.

Donat que no s'ha realitzat, fins el present moment, cap estudi referent a proteïnes inhibidores específiques de

Les activitats de proteïna fosfatasa tipus 1 i de la proteïna fosfatasa tipus 2A, quan el substrat emprat era l'HMG-CoA reductasa, ens proposarem, en primer lloc, l'obtenció d'aquestes proteïnes en estat homogeni a partir de citosol de fetge de rata. En segon lloc, caracteritzar aquestes proteïnes inhibidores i finalment, fer-ne un estudi comparatiu amb altres inhibidors ja descrits.

Des de fa temps, es coneix l'existència de dos inhibidors de l'activitat fosfatasa, denominats inhibidor-1 i inhibidor-2. Aquests inhibidors han estat purificats a partir de múscul esquelètic de conill. L'activitat inhibidòria d'ambdues proteïnes inhibidores ha estat mesurada, en tot moment, enfront la proteïna fosfatasa tipus 1 utilitzant com a substrat la glicogen fosforilasa i, en cap cas s'emprà el substrat HMG-CoA reductasa.

Creiem doncs, que els estudis realitzats en aquesta Memòria, han contribuït a ampliar el coneixement actual sobre la regulació de l'activitat reductasa fosfatasa a l'aprofundir, fonamentalment, en l'estudi i caracterització d'inhibidors proteics específics d'aquesta activitat reductasa fosfatasa i, en conseqüència a engrandir el coneixement de la regulació del metabolisme del colesterol.

ABREVIATURES MES UTILITZADES EN AQUEST TREBALL

ADP	adenosin-5'difosfat
dADP	desoxiadenosin-5'difosfat
AMP	adenosin-5'monofosfat
AMP cíclic	adenosin-3',5'monofosfat cíclic
ATP	adenosin-5'trifosfat
Bis-Tris	bis(2-hidroxietil) imino-tris-(hidroximetil) metà
^{14}C	carbó 14
CDP	citidin-5'difosfat
CTP	citidin-5'trifosfat
Ci, mCi, μCi	curie, mil.licurie, microcurie
CoA	coenzim A
DCCI	diciclehexilcarbodiimida
DEAE	dietilaminoetileter
DMSO	dimetilsulfòxid
DTT	ditiotreitòl
EDTA	etilen-diamino-tetraacetat
EGTA	etilenglicol-bis(β -aminoetil èter)
x g	gravetats
GMP	guanosin-5'monofosfat
GSK-3	glicogen sintasa quinasa 3
GTP	guanosin-5'trifosfat
HMG, àcid	àcid 3-hidroxi-3-metilglutàric
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzim A
^3H	triti
LDL	lipoproteïnes de baixa densitat
M, mM, μM , nM	molar, milimolar, micromolar, nanomolar
mA	miliamperi
MVL	mevalonolactona
NAD $^{+}$	nicotin-adenin-dinucleòtid
NADH	nicotin-adenin-dinucleòtid reduït
NADP $^{+}$	nicotin-adenin-dinucleòtid fosfat
NADPH	nicotin-adenin-dinucleòtid fosfat reduït

nm	nanòmetre
³² P	fosfor 32
Pi	fosfat inorgànic
pNPP	para-nitrofenilfosfat
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorur
PPi	pirofosfat inorgànic
PPO	2, 5-difeniloxazol
SDS	dodecil sulfat sòdic
TCA	àcid tricloroacètic
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
Tris	tris (hidroximetil) aminoacetà
TPCK	L-1-tosilamido-2-feniletilclorometilce- tona
U	unitats internacionals
UDP	uridin-5'difosfat

INDEX

1. <u>INTRODUCCIO</u>	
1.1 METABOLISME DEL COLESTEROL	1
1.2 CARACTERISTIQUES GENERALS DE L'ENZIM HMG-CoA REDUCTASA.....	4
1.2.1 Estructura.....	4
1.2.2 Característiques de l'HMG-CoA reductasa.....	6
1.2.2.1 Solubilització.....	6
1.2.2.2 Sensibilitat a la temperatura.....	8
1.2.2.3 Ritme circadià.....	8
1.3 REGULACIO DE L'ENZIM HMG-CoA REDUCTASA.....	10
1.3.1 Regulació de la quantitat d'HMG-CoA reductasa.....	10
1.3.2 Regulació de l'expressió de l'activitat de l'HMG-CoA reductasa.	12
1.3.3 Regulació de l'enzim HMG-CoA reductasa per fosforilació i desfosforilació reversible.....	15
1.3.3.1 Inactivació i reactivació d'HMG-CoA reductasa.....	15
1.3.3.2 Fosforilació i desfosforilació de l'HMG-CoA reductasa.	16
1.4 PROTEINA QUINASES.....	19
1.4.1 HMG-CoA reductasa quinasa.....	19
1.4.1.1 Dependència de nucleòtids.....	21
1.4.1.2 Fosforilació i desfosforilació de l'HMG-CoA reductasa quinasa.....	22
1.4.2 Proteïna quinasa C.....	24
1.4.3 Proteïna quinasa dependent de calmodulina i Ca ²⁺	25
1.5 PROTEINA FOSFATASA.....	26
1.5.1 HMG-CoA reductasa fosfatasa.....	26
1.5.2 Especificitat de substrat de les proteïna fosfatases.....	30
1.5.3 Classificació de les proteïna fosfatases.....	31
1.5.4 Formes moleculars i estructura de les proteïna fosfatases.....	34
1.5.4.1 Proteïna fosfatasa tipus 1.....	34
1.5.4.2 Proteïna fosfatasa tipus 2A.....	35
1.5.4.3 Proteïna fosfatasa 2B (calcineurina).....	36
1.5.4.4 Proteïna fosfatasa 2C.....	37
1.5.5 Regulació de les proteïna fosfatases.....	38
1.5.5.1 Proteïna fosfatasa tipus 1 (Complex de 70 Kd).....	39
1.5.5.2 Proteïna fosfatasa tipus 2A.....	44
1.5.5.3 Proteïna fosfatasa tipus 2B.....	45
1.5.5.4 Proteïna fosfatasa tipus 2C.....	46

	VI
1.6	INHIBIDORS TERMOESTABLES I DESINHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASES..... 48
1.6.1	Inhibidor-1..... 48
1.6.1.1	Localització i estructura..... 48
1.6.1.2	Regulació..... 50
1.6.1.3	Control hormonal..... 50
1.6.2	Inhibidor-2..... 51
1.6.2.1	Localització i estructura..... 51
1.6.2.2	Efecte inhibitori i modulador..... 54
1.6.2.3	Control hormonal..... 58
1.6.3	Altres inhibidors..... 59
1.6.3.1	DARPP-32..... 59
1.6.3.2	Substrat G..... 60
1.6.4	Desinhibidor..... 60
1.6.4.1	Localització i estructura..... 60
1.6.4.2	Regulació..... 61
1.7	REGULACIO DEL SISTEMA BICICLIC DE L'HMG-CoA REDUCTASA..... 63
1.7.1	Regulació per hormones..... 63
1.7.2	Regulació per esterols i mevalonat..... 65
2.	<u>MATERIAL I METODES</u>
2.1	REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS..... 69
2.1.1	Reactius generals..... 69
2.1.2	Preparacions enzimàtiques comercials i proteïnes marcadores.... 70
2.1.3	Reactius per a cromatografia..... 70
2.1.4	Productes radioactius..... 71
2.1.5	Productes per a autorradiografia..... 71
2.1.6	Síntesi d'HMG-CoA..... 71
2.1.6.1	Valoració espectrofotomètrica de L'HMG-CoA..... 74
2.1.6.2	Preparació de L'HMG-CoA liasa..... 76
2.1.7	Síntesi de [γ - 32 P]ATP..... 76
2.2	ANIMALS UTILITZATS..... 79
2.2.1	Rates..... 79
2.2.2	Conills..... 80

2.3	DETERMINACIO DE L'ACTIVITAT DELS DIFERENTS ENZIMS.....	81
2.3.1	Determinació de l'activitat HMG-CoA reductasa utilitzant com a substrat [³ H]HMG-CoA.....	81
2.3.2	Determinació de l'activitat HMG-CoA reductasa utilitzant com a substrat [¹⁴ C]HMG-CoA.....	83
2.3.3	Determinació de l'activitat HMG-CoA reductasa fosfatasa.....	84
2.3.4	Determinació de l'activitat glicogen fosforilasa.....	85
2.3.5	Determinació de l'activitat fosforilasa fosfatasa.....	86
2.3.6	Determinació de l'activitat fosforilasa quinasa.....	87
2.3.7	Determinació de l'activitat GSK-3.....	88
2.3.8	Determinació de l'activitat inhibidòria sobre proteïna fosfatases i substrat glicogen fosforilasa.....	88
	2.3.8.1 Inhibidor-1.....	88
	2.3.8.2 Inhibidor-2.....	89
2.3.9	Determinació de l'activitat inhibidòria sobre proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.....	90
2.4	METODES D'OBTENCIO I PURIFICACIO DE PROTEINES.....	91
2.4.1	Purificació de l'HMG-CoA reductasa.....	91
	2.4.1.1 Obtenció dels microsomes.....	91
	2.4.1.2 Solubilització de l'HMG-CoA reductasa de microsomes...	92
	2.4.1.3 Inactivació de l'HMG-CoA reductasa.....	94
	2.4.1.4 Escalfament a 64 °C.....	94
	2.4.1.5 Cromatografia en columna d'Affi-Gel Blue.....	95
	2.4.1.6 Cromatografia en columna d'Agarosa-hexano-HMG-CoA.....	95
2.4.2	Purificació de la glicogen fosforilasa de múscul de conill.....	96
	2.4.2.1 Obtenció de l'extracte de múscul i precipitació àcida.	96
	2.4.2.2 Precipitació amb sulfat amònic.....	97
	2.4.2.3 Tractament a pH alcalí.....	97
	2.4.2.4 Cristal·lització i liofilització.....	98
2.4.3	Purificació de la fosforilasa quinasa.....	98
	2.4.3.1 Extracció i precipitació àcida de l'extracte cru.....	98
	2.4.3.2 Cromatografia en columna de Sepharosa 4B.....	99
	2.4.3.3 Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa.....	100

2.4.4	Fosforilació de la glicogen fosforilasa "b".....	100
2.4.4.1	Transformació de la glicogen fosforilasa "b" en "a"...	101
2.4.4.2	Obtenció de la glicogen fosforilasa "a" marcada amb [³² P].....	102
2.4.5	Purificació de la proteïna fosfatasa tipus 2A de citosol de fetge de rata d'alt pes molecular.....	102
2.4.5.1	Obtenció del citosol.....	103
2.4.5.2	Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa.....	103
2.4.5.3	Cromatografia en columna d'Aminohexil-Sepharosa 4B....	104
2.4.5.4	Cromatografia en columna de Bio-Gel 1.5m.....	104
2.4.6	Purificació de la proteïna fosfatasa 2A de citosol de fetge de rata de baix pes molecular.....	105
2.4.7	Purificació de la proteïna fosfatasa tipus 1 de citosol de fetge de rata d'alt pes molecular.....	106
2.4.7.1	Cromatografia en columna d'Aminohexil-Sepharosa 4B....	106
2.4.7.2	Cromatografia en columna de Bio-Gel A 1.5m.....	107
2.4.8	Purificació de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1 de citosol de fetge de rata.....	107
2.4.9	Purificació de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1 de múscul de conill.....	108
2.4.9.1	Extracció i concentració de l'extracte cru.....	108
2.4.9.2	Precipitació amb etanol.....	109
2.4.9.3	Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa.....	110
2.4.9.4	Cromatografia en columna de Polilisina-Sepharosa.....	110
2.4.9.5	Cromatografia en columna de Sephadex G-75.....	110
2.4.10	Purificació de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 2A de múscul de conill.....	111
2.4.11	Purificació de l'inhibidor-2 de múscul de conill.....	111
2.4.11.1	Obtenció de l'extracte cru.....	112
2.4.11.2	Cromatografia en columna de DEAE-Sephadex A-50.....	112
2.4.11.3	Precipitació fraccionada amb sulfat amònic.....	113
2.4.11.4	Escalfament a 95 °C.....	113
2.4.11.5	Cromatografia en columna de Blue Sepharosa CL-6B.....	113

2.4.12	Purificació de La GSK-3.....	114
2.4.12.1	Cromatografia en columna de fosfocel·lulosa Watman-P11.....	114
2.4.12.2	Cromatografia en columna d'Affi-Gel Blue.....	114
2.5	TECNiques ELECTROFORETIQUES.....	116
2.5.1	Electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de SDS....	116
2.5.2	Electroforesi en gels d'agarosa en presència de SDS.....	118
2.5.2.1	Electorforesi.....	118
2.5.2.2	Extracció de proteïnes.....	119
2.6	TECNiques D'ULTRACENTRIFUGACIO DIFERENCIAL.....	120
2.7	DETERMINACIO DEL ³² P INCORPORAT A PROTEINA.....	122
2.8	AUTORRADIGRAFIA INDIRECTA.....	123
2.9	DETERMINACIO DE LA CONCENTRACIO DE PROTEINA.....	123

3. RESULTATS

3.1	DISTRIBUCIO SUBCEL·LULAR DE L'ACTIVIDAD INHIBITORIA DE FETGE DE RATA SOBRE PROTEINA FOSFATASA TIPUS 1 I SUBSTRATE HMG-CoA REDUCTASA.....	124
3.1.1	Subfraccionament cel·lular.....	124
3.1.2	Preparació de les mostres i determinació de l'activitat inhibitòria.....	125
3.2	PURIFICACIO D'UN INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 1 A PARTIR DE CITOSOL DE FETGE DE RATA.....	128
3.2.1	Obtenció del citosol i escalfament a 95 °C.....	128
3.2.2	Precipitació àcida amb TCA al 15%.....	129
3.2.3	Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8.5.....	129
3.2.4	Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 5.....	132
3.2.5	Cromatografia en columna de Bio-Gel A 0.5m.....	134
3.2.6	Cromatografia en columna de Blue Sepharosa CL-6B.....	136
3.3	CARACTERITZACIO MOLECULAR MOLECULAR DE L'INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 1.....	140
3.3.1	Determinació del pes molecular en gels d'acrilamida en SDS.....	140
3.3.2	Detecció d'activitat inhibitòria en gels d'agarosa.....	140
3.3.3	Sensibilitat a la tripsina.....	142
3.3.4	Tractament amb etanol.....	145

3.4	ESTUDIS CINETICS DE L'INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 1.....	146
3.4.1	Estudi de l'activitat inhibidora sobre proteïna fosfatases tipus 1 i 2 amb substrat HMG-CoA reductasa.....	146
3.4.2	Estudi de l'activitat inhibidora sobre proteïna fosfatases tipus 1 i 2 amb substrat glicogen fosforilasa.....	147
3.5	FORMACIO DEL COMPLEX D'ATP-Mg PROTEINA FOSFATASA 1 D'ALT PES MOLECULAR.....	150
3.6	FOSFORILACIO PRODUIDA PER PROTEINA QUINASES.....	152
3.6.1	Fosforilació produïda per acció de la quinasa dependent d'AMPC i [γ - 32 P]ATP.....	152
3.6.2	Fosforilació produïda per acció de la GSK-3 i [γ - 32 P]ATP.....	153
3.7	COMPARACIO AMB L'INHIBIDOR-1 DE MUSCUL DE CONILL.....	156
3.8	DISTRIBUCIO SUBCEL·LULAR DE L'ACTIVITAT INHIBITORIA DE FETGE DE RATA SOBRE PROTEINA FOSFATASA TIPUS 2A I SUBSTRAT HMG-CoA REDUCTASA.....	157
3.8.1	Subfraccionament cel·lular.....	157
3.8.2	Determinació de l'activitat inhibidora.....	157
3.9	PURIFICACIO D'UN INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 2A A PARTIR DE CITOSOL DE FETGE DE RATA.....	160
3.9.1	Obtenció del citosol i escalfament a 95 °C.....	160
3.9.2	Precipitació àcida amb TCA al 15%.....	160
3.9.3	Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8.5.....	161
3.9.4	Etaques cromatogràfiques de baixa resolució.....	163
3.9.4.1	Cromatografia en columna de Fosfocel·lulosa W. P-11... ..	164
3.9.4.2	Cromatografia en columna d'Aminohehexil-Sepharosa 4B....	164
3.9.4.3	Cromatografia en columna d'Affi-Gel Blue.....	166
3.9.4.4	Cromatografia en columna de Sephadex G-100.....	169
3.9.4.5	Cromatografia en columna d'Hidroxiapatita.....	171
3.9.5	Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 5.....	173
3.9.6	Cromatografia en columna de Bio-Gel A 0.5m.....	175
3.2.7	Cromatografia en columna de Blue Sepharose CL-6B.....	177
3.10	COMPARACIO DEL COMPORTAMENT CROMATOGRAFIC DELS DOS INHIBIDORS AILLATS DE CITOSOL DE FETGE DE RATA.....	181

3.11	CARACTERITZACIO MOLECULAR DE L'INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 2A.....	183
3.11.1	Determinació del pes molecular en gels d'acrilamida en SDS.....	183
3.11.2	Detecció d'activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 2A en gels d'agarosa.....	185
3.11.3	Digestió amb tripsina.....	186
3.11.4	Tractament amb etanol.....	189
3.12	ESTUDIS CINETICS DE L'INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 2A.....	190
3.12.1	Estudi de l'activitat inhibidora sobre proteïna fosfatases tipus 1 i 2 amb substrat HMG-CoA reductasa.....	190
3.12.2	Estudi de l'activitat inhibidora sobre proteïna fosfatases tipus 1 i 2 amb substrat glicogen fosforilasa.....	193
3.13	DETECCIO D'ACTIVITAT D'INHIBIDOR-1.....	195
3.14	FOSFORILACIO PER ACCIO DE PROTEINA QUINASES.....	196
3.14.1	Fosforilació produïda per acció de la quinasa dependent d'AMPc i [γ - 32 P]ATP.....	196
3.14.2	Fosforilació produïda per acció de la GSK-3 i [γ - 32 P].....	197
3.15	COMPARACIO AMB L'INHIBIDOR DE LA QUINASA DEPENDENT D'AMP CICLIC.....	198
3.15.1	Estudi comparatiu realitzat sobre proteïna fosfatasa 2A i HMG-CoA reductasa.....	198
3.15.2	Estudi comparatiu realitzat sobre la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.....	200
4.	<u>DISCUSSIO</u>	
4.1	INHIBIDOR DE LA PROTEINA FOSFATASA TIPUS 1.....	203
4.1.1	Purificació i caracterització molecular.....	204
4.1.2	Propietats cinètiques de l'inhibidor de la fosfatasa 1.....	209
4.1.3	Formació del complex de 70 Kd de la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg.....	210
4.2	INHIBIDOR DE LA PROTEINA FOSFATASA 2A.....	214
4.2.1	Purificació i caracterització molecular.....	214
4.2.2	Comportament cinètic.....	220
4.2.3	Comparació amb altres inhibidors.....	221

5. <u>CONCLUSIONS</u>	223
-----------------------------	-----

6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	226
------------------------------	-----

7. ESQUEMES

Esquema I. Via de la síntesi de mevalonat, esterols i compostos isoprenoides.....	2
Esquema II. Estructura de l'HMG-CoA reductasa.....	5
Esquema III. Mecanismes de regulació de l'enzim HMG-CoA reductasa.....	11
Esquema IV. Model de regulació de l'HMG-CoA reductasa per fosforilació reversible.....	18
Esquema V. Model de regulació de l'HMG-CoA reductasa per tres sistemes de proteïna quinasa diferents.....	20
Esquema VI. Model del sistema bicíclic de regulació de l'HMG-CoA reductasa per fosforilació reversible.....	23
Esquema VII. Model de regulació de la proteïna fosfatasa tipus 1 (complex de 70 kd).....	41
Esquema VIII. Model de regulació del sistema bicíclic de l'HMG-CoA reductasa per mevalonolactona.....	66

8. FIGURES

Figura 1. Cromatografia de bescanvi iònic en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8.5 de l'inhibidor de la fosfatasa 1.....	131
Figura 2. Cromatografia de bescanvi iònic en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 5 de l'inhibidor de la fosfatasa 1.....	133
Figura 3. Cromatografia de gel filtració en columna de Bio-Gel A 0.5m de l'inhibidor de la fosfatasa 1.....	135
Figura 4. Cromatografia d'afinitat en columna de Blue Sepharosa CL-6B de l'inhibidor de la fosfatasa 1.....	137
Figura 5. Determinació del pes molecular de l'inhibidor de la fosfatasa 1 en gels d'acrilamida en SDS.....	141
Figura 6. Mesura d'activitat inhibidora de l'inhibidor de la fosfatasa 1 en gels d'agarosa en SDS.....	143

Figura 7.	Digestió amb tripsina de l'inhibidor de la fosfatasa 1.....	144
Figura 8.	Inhibició de les proteïna fosfatases 1 i 2A per l'inhibidor de la fosfatasa 1 fetge de rata i l'inhibidor-2 de múscul de conill i substrat HMG-CoA reductasa.....	148
Figura 9.	Inhibició de les proteïna fosfatases 1 i 2A per l'inhibidor de la fosfatasa 1 de fetge de rata i l'inhibidor-2 de múscul de conill i substrat glicogen fosforilasa.....	149
Figura 10.	Formació del complex ATP-Mg proteïna fosfatasa 1 d'alt pes molecular.....	151
Figura 11.	Fosforilació de l'inhibidor de la fosfatasa 1 per proteïna quinases i [γ - 32 P]ATP.....	154
Figura 12.	Cromatografia de bescanvi iònic en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8.5 de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	162
Figura 13.	Cromatografia de bescanvi iònic en columna de Fosfocel·lulosa de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	165
Figura 14.	Cromatografia d'afinitat en columna d'Aminohexil-Sepharosa 4B de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	167
Figura 15.	Cromatografia d'afinitat en columna d'Affi-Gel Blue de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	168
Figura 16.	Cromatografia de gel filtració en columna de Sephadex G-100 de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	170
Figura 17.	Cromatografia en columna d'Hidroxiapatita de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	172
Figura 18.	Cromatografia de bescanvi iònic en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 5 de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	174
Figura 19.	Cromatografia de gel filtració en columna de Bio-Gel A 0.5m de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	176
Figura 20.	Cromatografia d'afinitat en columna de Blue Sepharosa CL-6B de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	178
Figura 21.	Comparació del comportament cromatogràfic de l'inhibidor de la fosfatasa 1 (inhibidor-2) i l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	182
Figura 22.	Determinació del pes molecular de l'inhibidor de la fosfatasa 2A en gels d'acrilamida en SDS.....	184
Figura 23.	Mesura de l'activitat inhibidora de l'inhibidor de la fosfatasa 2A en gels d'agarosa en SDS.....	187
Figura 24.	Digestió amb tripsina de l'inhibidor de la fosfatasa 2A.....	188

Figura 25. Inhibició de les proteïna fosfatases 1 i 2A per l'inhibidor de la fosfatasa 2A de fetge de rata i l'inhibidor-2 de múscul de conill i substrat HMG-CoA reductasa.....	192
Figura 26. Inhibició de les proteïna fosfatases 1 i 2A per l'inhibidor de la fosfatasa 2A de fetge de rata i l'inhibidor-2 de múscul de conill i substrat glicogen fosforilasa.....	194
Figura 27. Comparació de l'inhibidor de la fosfatasa 2A amb l'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, sobre proteïna fosfatasa 2A i substrat HMG-CoA reductasa.....	199
Figura 28. Comparació de l'inhibidor de la fosfatasa 2A amb l'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, sobre proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i substrat Histona 2A...	201

9. TAULES

Taula I. Classificació de les proteïna fosfatases.....	33
Taula II. Distribució subcel·lular de l'activitat inhibidòria sobre la proteïna fosfatasa tipus 1.....	127
Taula III. Resum del procés de purificació de l'inhibidor de la fosfatasa 1 de citosol de fetge de rata amb substrat HMG-CoA reductasa.....	138
Taula IV. Resum del procés de purificació de l'inhibidor de la fosfatasa 1 de citosol de fetge de rata amb substrat glicogen fosforilasa.....	139
Taula V. Distribució subcel·lular de l'activitat inhibidòria de la proteïna fosfatasa 2A.....	159
Taula VI. Resum del procés de purificació de l'inhibidor de la fosfatasa 2A de citosol de fetge de rata amb substrat HMG-CoA reductasa.....	180

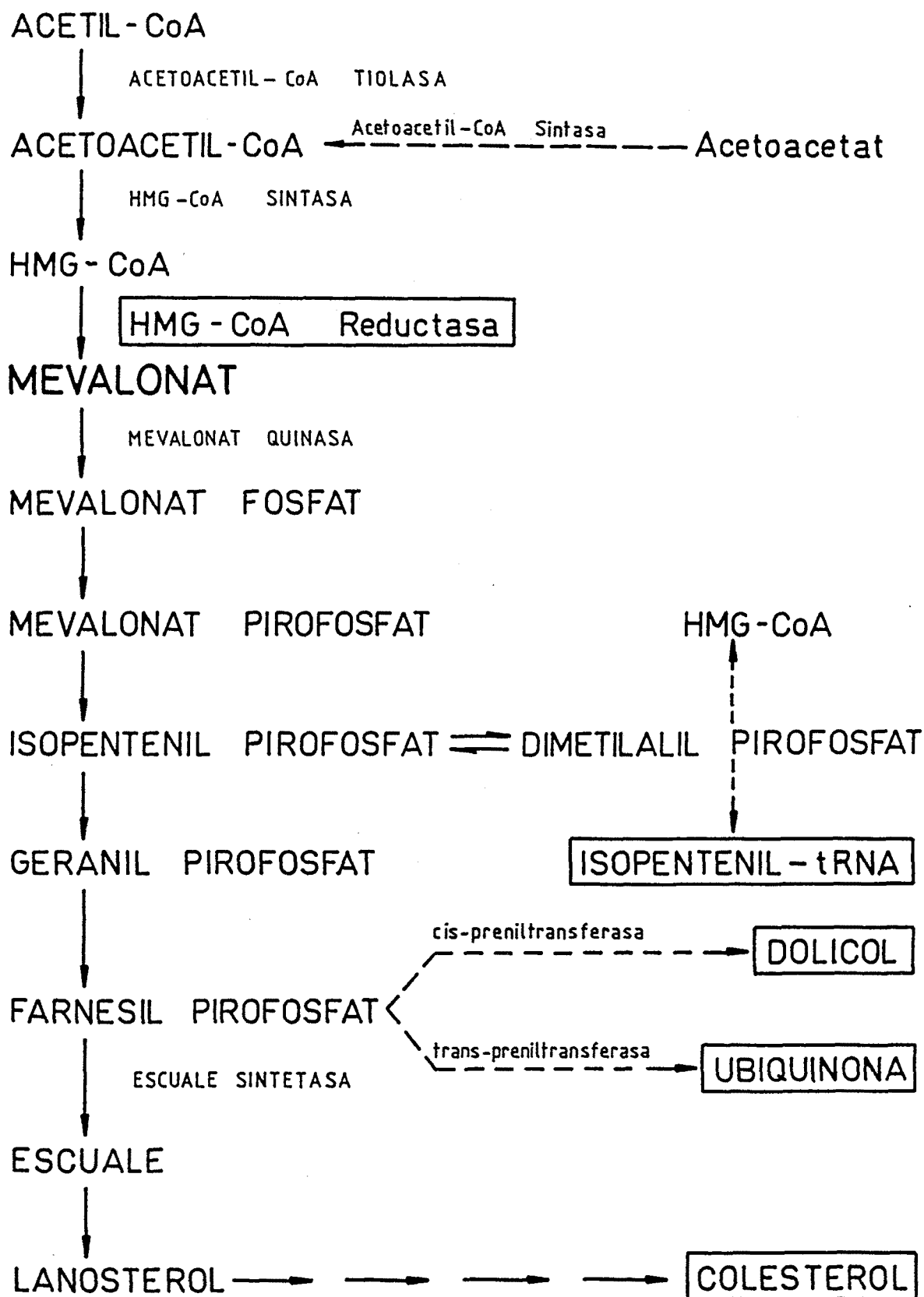
1. INTRODUCCIO

1.1 METABOLISME DEL COLESTEROL

El colesterol és un esteroide que va ésser aïllat de càlculs biliars a finals del segle XVIII, però no se'n va determinar l'estructura fins l'any 1932. Es un component essencial de les membranes de les cèl·lules animals on, segons la distribució i concentració a la que es troba, els modifica el grau de fluïdesa i per tant, modifica també la capacitat catalítica dels enzims lligats a aquestes membranes. Es troba també, formant part de les lipoproteïnes circulants, que el transporten d'un teixit a l'altre. A més a més, és el precursor principal de la síntesi de compostos esteròidics com són, els àcids biliars, les hormones esteròidiques i algunes vitamines.

Dos són els mecanismes que posseeixen les cèl·lules animals per a obtenir el colesterol necessari per a la síntesi de membranes o de compostos esteròidics: el de la síntesi de "novo" i el de la captació de LDL mitjançant els receptors cel·lulars.

La síntesi de noves molècules de colesterol es du a terme a través d'una de les vies metabòliques més llargues on hi participen 45 enzims. La síntesi presenta dues etapes ben diferenciades; la primera etapa és totalment anaeròbica, on el compost inicial és l'acetat i el producte final l'esqualè. La segona etapa, es realitza en presència d'oxigen molecular, i compren des de l'esqualè fins l'obtenció del colesterol. A través d'aquesta via també es sintetitzen altres compostos necessaris per a la funció cel·lular com són : el dolicol (50), la ubiquinona (195) i la isopentenil adenosina de certs RNAs de transferència (230). (Esquema I).



ESQUEMA I. VIA DE LA SINTESI DE MEVALONAT, ESTEROLS I COMPOSTOS ISOPRENOIDES

Són varis els enzims de la via de síntesi del colesterol que es veuen regulats per esterols. Entre ells cal destacar: l'HMG-CoA reductasa (43), l'esqualè sintetasa (89, 251), l'HMG-CoA sintasa (52, 242) i alguns més que intervenen en la transformació d'esqualè a colesterol (120, 107). L'HMG-CoA reductasa és l'enzim que catalitza la principal reacció, limitant de la biosíntesi de "novo" del colesterol, i té un paper fonamental en la regulació de la colesterogènesi.

1.2 CARACTERISTIQUES GENERALS DE L'ENZIM HMG-CoA REDUCTASA

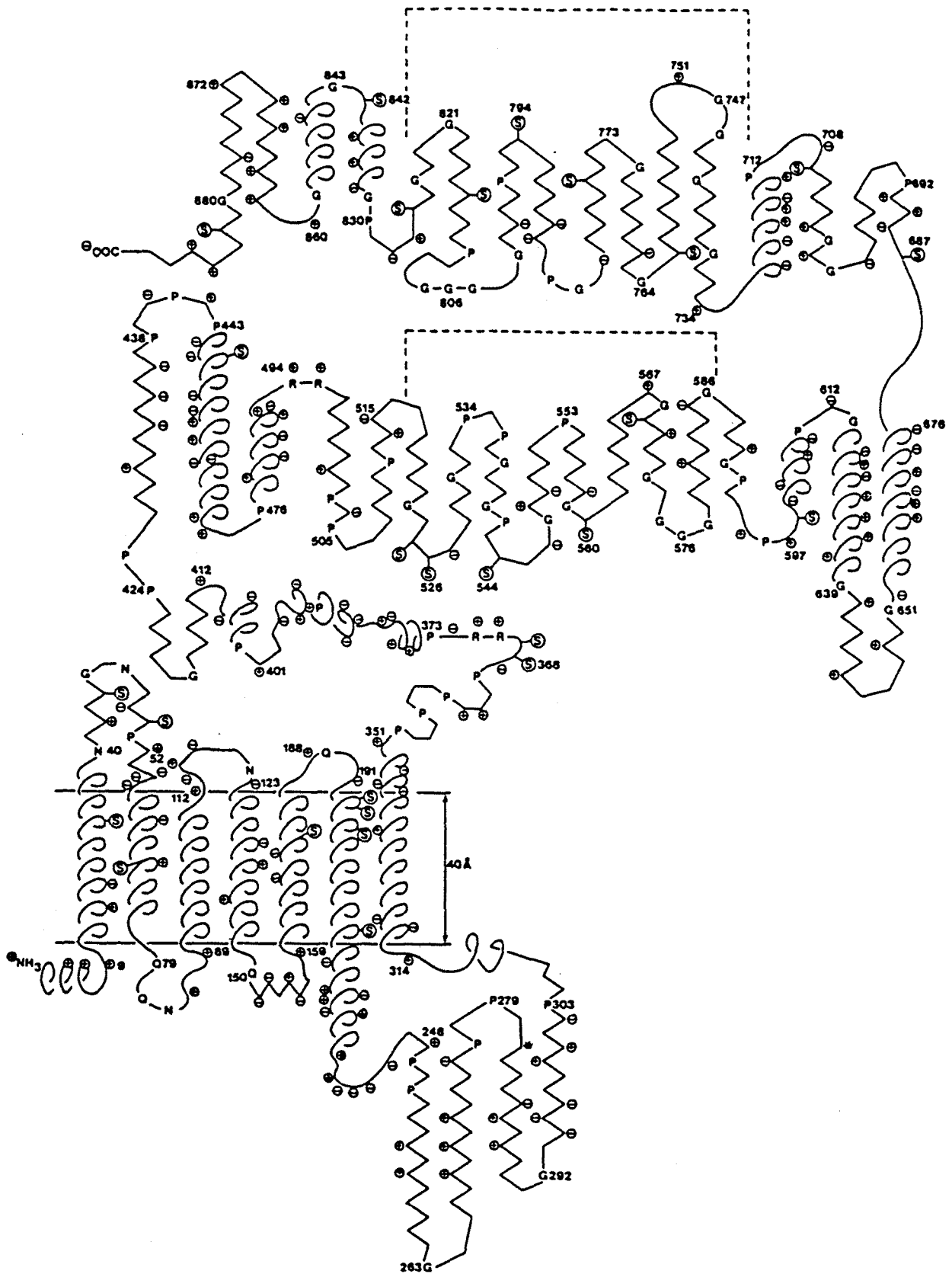
La hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) (EC 1.1.1.34) és l'enzim que catalitza la reducció de l'HMG-CoA a mevalonat utilitzant dos molècules de NADPH. El gran interès general en aquest enzim es deu fonamentalment a dos motius; un, és el d'ésser un model excel·lent de regulació d'activitat enzimàtica per múltiples i diversos factors. L'altre, és el paper fisiològic que té aquest enzim en la regulació del metabolisme del colesterol.

1.2.1 Estructura

En cultius de cèl·lules de hamsters s'ha demostrat que l'HMG-CoA reductasa és una glucoproteïna que forma part del retícul endoplasmàtic i, està construïda per una cadena polipeptídica glucosilada (47, 201).

Estudis de l'estructura proteica, conjuntament amb les dades obtingudes de la seqüència de nucleòtids del cDNA de l'HMG-CoA reductasa, han permès determinar que el pes molecular de l'enzim en hamsters és de 97.092 daltons i que conté 887 residus aminoacídics (201, 57).

La proteïna es troba dividida en dos dominis (201). El primer, el de l'amino-terminal de 35.000 daltons, és extremadament hidrofòbic i es considera el punt d'anclatge a la membrana del retícul endoplasmàtic. L'anàlisi computertzada de la seqüència aminoacídica de la molècula, permet deduir que aquest domini atravesava la membrana set vegades (201, 202). L'extrem amino-terminal (9 aminoàcids) està localitzat en el lumen del retícul endoplasmàtic. (Esquema II).



ESQUEMA II. ESTRUCTURA DE L'HMG-CoA REDUCTASA

El segon domini, que conté el centre catalític de l'enzim, té un pes molecular aparent de 62.000 daltons. La seqüència d'aminoàcids que el componen són de tipus soluble, i es troben projectats cap al citoplasma. Aquest domini citoplasmàtic es pot separar de la resta de la molècula d'HMG-CoA reductasa per tractament amb diverses proteases (201, 202).

Aquestes regions s'han identificat gràcies a l'ús d'anticossos específics obtinguts enfront de pèptids sintètics corresponents a regions específiques de la molècula (201). Una de les funcions concretes de la regió hidrofòbica de la membrana és modular la degradació de l'HMG-CoA reductasa. Experiments realitzats amb cèl·lules mutants on el gen de l'HMG-CoA reductasa està tallat de forma que expressa solament la part carboxi-terminal de 62.000 daltons, mostra que l'HMG-CoA reductasa té una vida mitja més llarga. Construccions quimèriques en les quals la part corresponent a les "spaning regions" es fusionen amb el gen de la β -galactosidasa han mostrat que la degradació d'aquesta proteïna és regulable per colesterol (117).

La inserció de la proteïna a la membrana del retícul endoplasmàtic es produeix, simultàniament, a l'inici de la traducció de RNAm (47); particularitat que sembla ésser exclusiva d'aquest enzim, i amb la que es diferencia d'altres enzims integrals. La seqüència hidrofòbica de reconeixement, situada en l'extrem amino-terminal, no s'escindeix i apareix conservada en la llum del retícul endoplasmàtic (47, 57). Aquesta segona propietat és comú a moltes de les proteïnes integrals de membrana del retícul endoplasmàtic.

1.2.2 Característiques de l'HMG-CoA reductasa

1.2.2.1 Solubilització

Inicialment l'HMG-CoA reductasa fou solubilitzada per tractament amb deoxicolat sòdic (170). Posteriorment, s'utilitzaren tècniques de congelació i descongelació (39, 134) que, combinades amb una incubació en un medi de glicerol al 50% (v/v) i KCl 1 M (134), donaven gran estabilitat a la mostra.

L'enzim de fetge de rata solubilitzat per aquestes tècniques, ha estat purificat a homogeneïtat per diferents Laboratoris, presentant un pes molecular entre 50 i 56 Kd (82, 84, 186, 217, 253). Idèntics resultats s'obtingueren amb l'HMG-CoA reductasa de fetge humà (22).

Posteriorment, Ness i col. (218) demostraren que la solubilització de l'HMG-CoA reductasa de fetge de rata era conseqüència de l'acció de les proteases de lisosomes, alliberades durant el procés de congelació i descongelació.

La incorporació en el medi de solubilització d'inhibidors de les sulfidril proteases (antipaina o leupeptina) disminuïa el grau de solubilització; en canvi, la incorporació d'inhibidors de serin proteases i carbonil proteases no modificava aquest grau.

Experiments posteriors, realitzats per Chin i col. (56) amb cèl·lules UT-1, demostraren que la forma nativa de l'HMG-CoA reductasa era de 90 a 92 Kd, i que es transformava a un fragment de 62 kd per acció de proteases dependents de Ca^{2+} ; ja que, la presència d'EGTA en el medi de

solubilització impedia el trencament de l'HMG-CoA reductasa nativa.

El fragment actiu de l'HMG-CoA reductasa (de 50 a 56 Kd), purificat a homogeneïtat, s'ha emprat en quasi la totalitat dels treballs que han permès el coneixement de les propietats cinètiques i regulatòries de l'enzim.

1.2.2.2 Sensibilitat a la temperatura

L'enzim solubilitzat de fetge de rata s'inactiva amb el fred (1, 39, 134). Heller i Gould (135) demostraren que la inactivació produïda pel fred era revertida per la incubació de l'enzim a 37 °C durant 20 min. La presència de KCl 4 M, o de glicerol al 50% (134), o de NADPH o NAD⁺ (136), impedeixen aquesta inactivació de l'enzim.

L'enzim, solubilitzat pel procediment de congelació i descongelació, presenta una considerable resistència a temperatures elevades. Fet que s'aprofita per a purificar-lo. En canvi, l'HMG-CoA reductasa nativa, obtinguda per solubilització amb detergents no iònics sense cap procés de congelació i descongelació, no presenta aquesta propietat, i a més a més, sembla ésser molt sensible al calor (173).

1.2.2.3 Ritme circadià

L'activitat HMG-CoA reductasa de fetge de rata està sotmesa a una profunda variació diürna (42); així, s'observen canvis d'activitat fins a deu vegades el seu valor mínim. En rates mantingudes en un sistema de control d'il·luminació, amb 12 hores de llum i 12 hores d'obscuritat, l'activitat HMG-CoA reductasa arriba al seu màxim

nivell 6 hores després del començament de la fase obscura, i cau en el mínim 6 hores després d'iniciar-se la fase lluminosa.

Després de varis treballs realitzats per diferents autors (77, 80, 83, 85, 141, 142, 164, 186), s'ha arribat a la conclusió que el ritme circadià de l'activitat HMG-CoA reductasa és una conseqüència de la superposició de dos cicles d'activitat de l'enzim; un, que afecta a la quantitat total de proteïna, i l'altre, que afecta a l'estat de fosforilació.

1.3 REGULACIO DE L'ENZIM HMG-CoA REDUCTASA

La modulació de l'activitat enzimàtica de l'HMG-CoA reductasa i la formació de mevalonat han despertat un gran interès general des que es conegué, que el mevalonat era el precursor en la formació de quatre productes metabòlics de vital importància, com són : colesterol, ubiquinona, dolicol i isopentenil-tRNAs.(Esquema I).

De tots els estudis realitzats es dedueix l'existència de dos mecanismes bàsics de control de l'activitat de l'HMG-CoA reductasa (Esquema III):

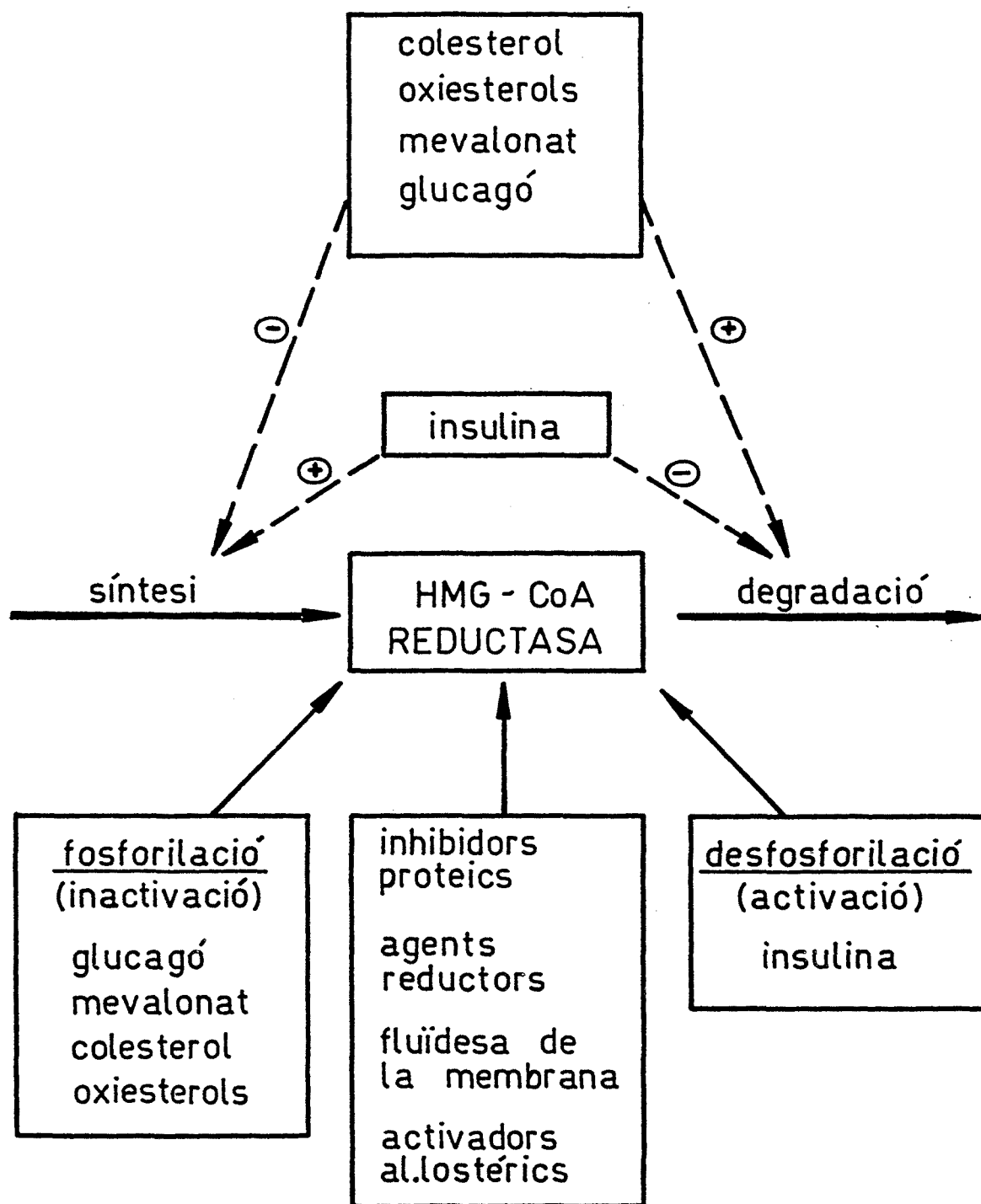
a) La regulació de la quantitat de proteïna d'HMG-CoA reductasa que depen de la síntesi i degradació de l'enzim.

b) La modulació de l'HMG-CoA reductasa existent, produïda per diferents agents que li modifiquen la conformació i li alteren les propietats catalítiques.

Si bé es consideren mecanismes diferents de control de l'HMG-CoA reductasa, alguns efectors poden actuar en ambdós nivells de regulació, com és el cas del colesterol; que a la vegada que és un repressor de la síntesi de l'HMG-CoA reductasa (88, 167, 168) també pot inhibir l'activitat de l'enzim directament, o d'una forma indirecta alterant la fluïdesa de la membrana i en definitiva canviant l'entorn de l'enzim (215, 248).

1.3.1 Regulació de la quantitat d'HMG-CoA reductasa

La regulació dels nivells de l'enzim s'ha fet palesa en diferents experiments. Així, s'ha comprovat que l'addició de LDLs riques en colesterol a cèl·lules en



ESQUEMA III. MECANISMES DE REGULACIÓ DE L'ENZIM HMG-CoA REDUCTASA

cultiu, provoca una disminució de la síntesi d'HMG-CoA reductasa i un augment de la degradació (44). S'obté el mateix efecte si el producte addicionat és el mevalonat (90, 206).

El colesterol i els seus derivats oxigenats tal com són: el 25-hidroxicolesterol i el 7-cetocolesterol (40, 90) produeixen un forta disminució de la quantitat de proteïna de l'HMG-CoA reductasa. Aquests compostos actuen fonamentalment a dos nivells :

a) suprimint la traducció del gen de l'HMG-CoA reductasa (60, 200, 203).

b) augmentant la velocitat de degradació per proteolisi (53, 86, 90).

Altres agents actuen de forma inversa a la descrita. Així, inhibidors competitiu (mevinolina i compactina) de l'HMG-CoA reductasa, n'indueixen la síntesi i en disminueixen la degradació (8, 87).

La variació diürna de l'activitat de l'HMG-CoA reductasa és atribuïda a un augment de la síntesi (augment en RNAm d'HMG-CoA reductasa) (190), i a una disminució de la degradació de l'enzim. S'ha demostrat que el cicle cardíac de l'HMG-CoA reductasa està relacionat amb els nivells sanguinis d'insulina i glucagó (80, 236).

1.3.2 Regulació de l'expressió de l'activitat de l'HMG-CoA reductasa

El mecanisme més important d'aquest tipus de regulació és la modificació covalent de l'enzim per fosforilació i desfosforilació. Aquest tema es tractarà a continua-

ció, però previament es farà una breu descripció d'altres mecanismes que actuen en la mateixa direcció.

S'ha descrit que tant les proteïnes com els lípids continguts en la membrana del retícul endoplasmàtic, poden afectar a l'activitat de l'enzim. L'augment del contingut de colesterol en la membrana li provoca una disminució de la fluïdesa, a la vegada que desplaça les proteïnes cap a la superfície de la membrana; causant un canvi de conformació en l'enzim i, una major exposició de la regió catalítica de l'HMG-CoA reductasa a les proteases o bé a altres enzims que li modulen l'activitat (246).

Un altre tipus de regulació de l'activitat de l'enzim seria el produït per proteïnes moduladores i per efectors. Un gran nombre de proteïnes citosòliques tenen influència sobre l'activitat HMG-CoA reductasa. Així, es creu que proteïnes portadores de lípids o esterols, podrien tenir un paper regulador. Proteïnes dependents de Fe^{2+} també actuarien com inhibidors de l'activitat HMG-CoA reductasa (233, 210).

Recentment, s'ha purificat a homogeneïtat una proteïna activadora de l'HMG-CoA reductasa (RAP), dependent de NADPH, i que actua a nivells de tiols reduïts (76).

S'ha descrit que l'activitat de l'HMG-CoA reductasa hepàtica pot ésser regulada, de forma reversible, per nivells de metabolits amb grups tiol, que actuarien activant l'HMG-CoA reductasa; mentre que nivells de metabolits amb grups disulfits actuarien inactivant l'enzim. Es a dir, actuarien com a reguladors de l'activitat reductasa mitjançant la interconversió de l'enzim entre formes oxidades (inactives) i formes reduïdes (actives) (74).

El mecanisme d'acció proposat consistiria en una modificació conformacional que alteraria la capacitat d'unió de l'HMG-CoA reductasa amb el substrat (HMG-CoA), encara que ambdues formes es podrien unir a l'altre substrat de la reacció (NADPH) (75). Estudis posteriors han demostrat que el NADPH es pot unir al centre catalític de l'HMG-CoA reductasa de forma cooperativa, existint la possibilitat addicional d'unió a un centre regulador de la molècula enzimàtica (238). Aquest efecte al·lostèric aniria disminuint progressivament a mesura que es produís un augment de la concentració d'agents reductors (238). Aquests autors han observat també que l'HMG-CoA reductasa microsomal pot ésser regulada al·lostèricament per NAD^+ i NADH, quan les concentracions d'agents reductors són baixes (239). En estudis estructurals s'ha demostrat que l'estructura mínima i suficient per activar al·lostèricament a l'HMG-CoA reductasa, és la del 5'-AMP (237). Aquests resultats indiquen que les interaccions entre els diferents centres funcionals de l'HMG-CoA reductasa, requereixen la formació de ponts disulfur que, a mesura que es redueixen, s'anul·la la capacitat de regulació al·lostèrica.

Es interessant assenyalar l'existència d'un control de l'activitat HMG-CoA reductasa produït per la disponibilitat en el citosol del substrat HMG-CoA (108, 109). Aquests mateixos autors observaren que no hi havia una bona correlació entre les variacions de l'activitat HMG-CoA reductasa deguda a certes hormones, i els canvis en la velocitat de síntesi del colesterol. A més a més, les concentracions d'HMG-CoA presents en la cèl·lula intacta no són saturants; i per tant, la velocitat de reacció de l'HMG-CoA reductasa és inferior a la mesurada en experiments "in vitro".

Així i tot, existeix la possibilitat de que, canvis en la concentració d'HMG-CoA en el citosol, regulin de manera addicional a l'HMG-CoA reductasa. Aquests canvis podrien ser conseqüència de les activitats dels enzims precedents en la via de síntesi de colesterol; que a la vegada depenen de les disponibilitats d'acetil-CoA citosòlic. Per poder compensar aquestes fluctuacions en la disponibilitat d'HMG-CoA, causades per l'activitat metabòlica cel·lular, l'activitat de l'HMG-CoA reductasa es modifica de manera que es manté constant en tot moment el flux de síntesi d'esterols.

1.3.3 Regulació de l'enzim HMG-CoA reductasa per fosforilació i desfosforilació reversible

La modulació de l'HMG-CoA reductasa per fosforilació i desfosforilació és un dels principals mecanismes de control a curt plaç. D'una forma general es pot dir que l'activitat de l'HMG-CoA reductasa i, incloent-hi la seva degradació, depenen de les activitats relatives dels enzims que la fosforilen (reductasa quinasa) i dels enzims que la desfosforilen (reductasa fosfatasa).

1.3.3.1 Inactivació i reactivació d'HMG-CoA reductasa

Les primeres dades sobre la inactivació de l'HMG-CoA reductasa, causada per la incubació de microsomes amb ATP-Mg a 37 °C, foren aportades per Beg i col. (17) l'any 1973. Aquests mateixos autors identificaren una activitat inactivadora dependent d'ATP-Mg, no solament en microsomes sinó també en citosol (17, 18).

L'HMG-CoA reductasa microsomal, prèviament inactivada, quan s'incubava en presència de fraccions citosòliques on hi mancava l'ATP-Mg, recuperava la seva activitat original. Aquests autors suggeriren que la fosforilació i desfosforilació era el mecanisme responsable de la inactivació i reactivació de l'HMG-CoA reductasa.

Nordstrom i col. (221) demostraren que, proteïnes parcialment purificades de citosol de fetge de rata, eren capaces d'inactivar (proteïna quinasa) i activar (proteïna fosfatasa) l'HMG-CoA reductasa en microsomes o bé la solubilitzada. Estudis posteriors (30), demostraren que un potent inhibidor de fosfatases, el NaF, inhibia l'activació de l'HMG-CoA reductasa inactivada. Ingebritsen i col. (154) confirmaren un cop més la inactivació i reactivació de l'HMG-CoA reductasa microsomal i, demostraren que l'activador citosòlic podia ser substituït per una fosforilasa fosfatasa de 35 Kd parcialment purificada segons el mètode de Brandt (34). Aquests estudis suggerien que la fosforilació i desfosforilació era el mecanisme responsable de la inactivació i reactivació de l'HMG-CoA reductasa.

Aquests i altres resultats obtinguts en els últims anys confirmen el procés reversible de la inactivació de l'HMG-CoA reductasa, no solament de fetge de rata, sinó en una gran quantitat de teixits i espècies animals (24, 46, 150).

1.3.3.2 Fosforilació i desfosforilació de l'HMG-CoA reductasa

Un cop demostrada l'existència d'un mecanisme d'interconversió de l'HMG-CoA reductasa entre formes actives i formes menys actives, es feia necessari demostrar

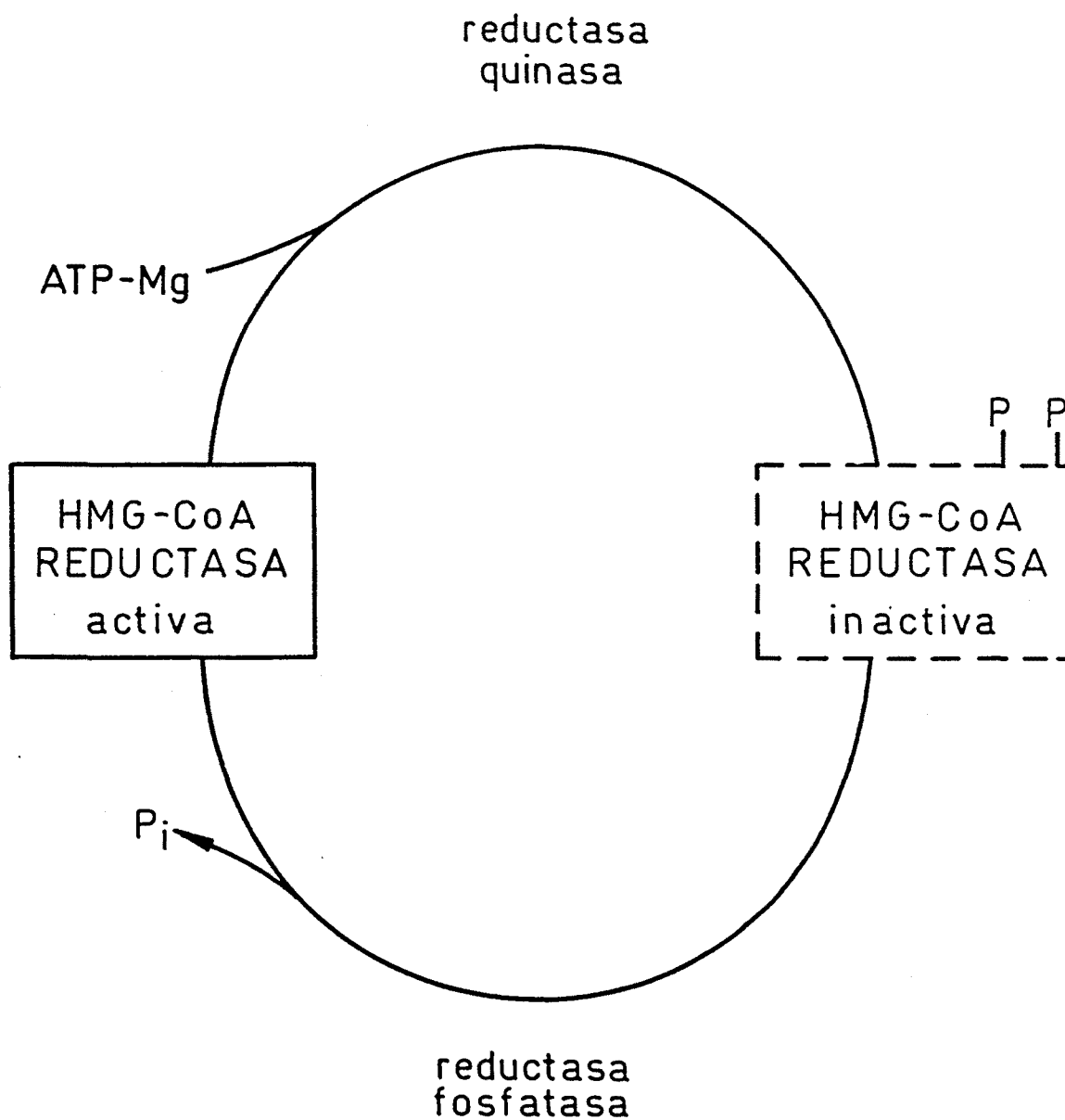
d'una forma directa que aquesta interconversió anava lligada a la fosforilació i desfosforilació de l'enzim.

Estudis realitzats per Bové i Hegardt (30) mostren que la inactivació de l'HMG-CoA reductasa microsomal, produïda per la reductasa quinasa en presència de [γ - 32 P]-ATP, comportava la incorporació de radioactivitat a la molècula d'HMG-CoA reductasa i, que aquest efecte d'inactivació i fosforilació, era revertit per acció de les fosfatases citosòliques. Estudis posteriors realitzats per Keith i col. (171), Gil i col. (112) mostraren que el marcatge radioactiu introduït en l'HMG-CoA reductasa microsomal es mantenia en el procés de purificació de l'enzim a homogeneïtat.

Treballs realitzats per Beg i col. (21) establiren definitivament que la inactivació d'HMG-CoA reductasa purificada va relacionada amb el grau d'incorporació de 32 P i, que la desfosforilació de [32 P]HMG-CoA reductasa va acompanyada d'una pèrdua de radioactivitat i un augment de l'activitat enzimàtica. Ferrer i Hegardt (92) mostraren resultats similars utilitzant reductasa quinasa i HMG-CoA reductasa purificades.

L'anàlisi de pèptids triptics de [32 P]HMG-CoA reductasa (97) suggereix la presència de dos centres de fosforilació per mol de l'enzim, de 53 Kd. Keith i col. (172) han demostrat el caràcter covalent de la fosforilació de l'HMG-CoA reductasa a l'aïllar [32 P]fosfoserina després d'una hidrolisi àcida de [32 P]HMG-CoA reductasa purificada.

D'aquest i d'altres estudis realitzats en diferents teixits i espècies, es dedueix que la fosforilació i desfosforilació és, fonamentalment, un mecanisme de regulació de l'activitat de l'HMG-CoA reductasa. (Esquema IV).



ESQUEMA IV. MODEL DE REGULACIO DE L'HMG-CoA REDUCTASA PER FOSFORILACIO REVERSIBLE

1.4 PROTEINA QUINASES

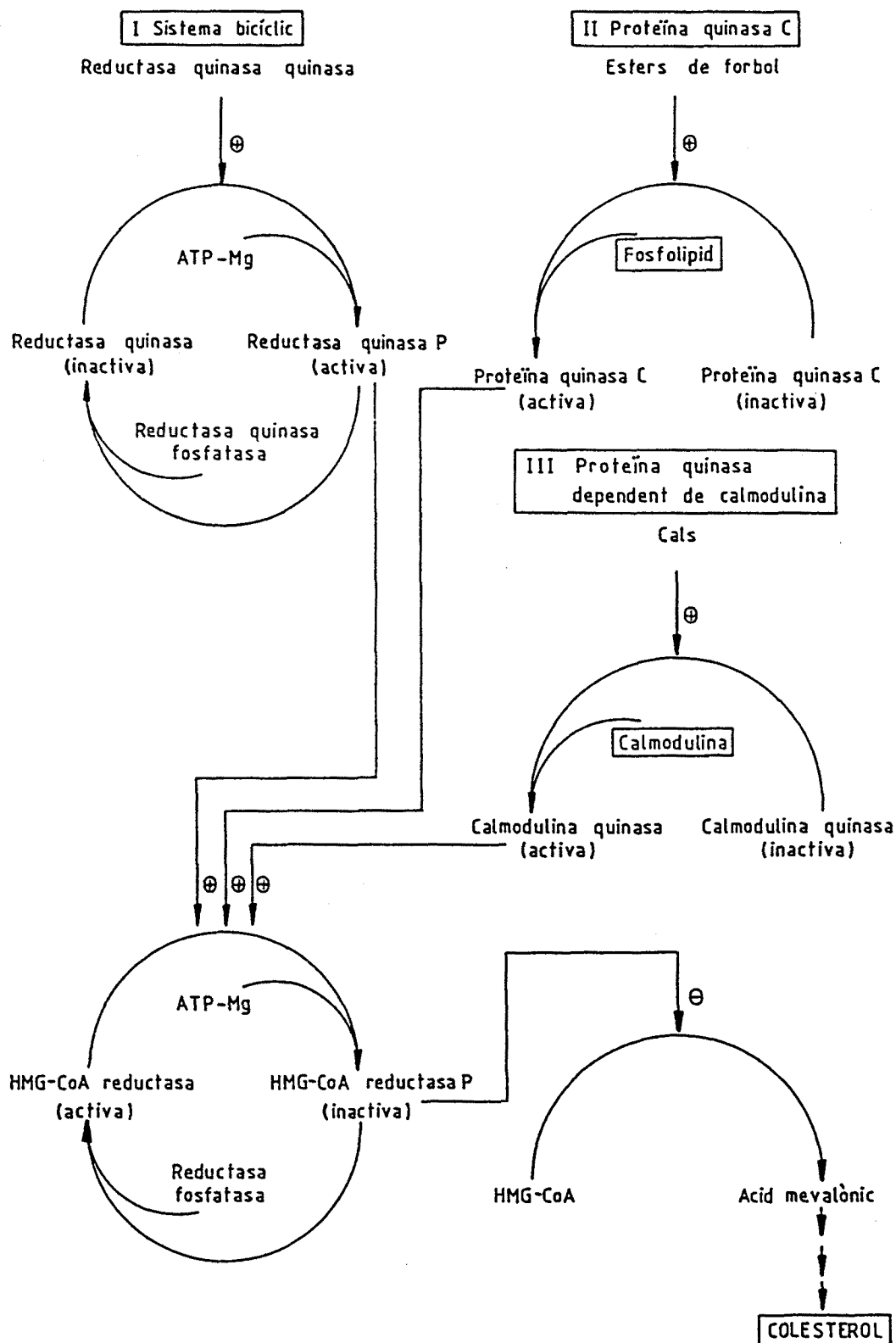
S'ha establert últimament (26) que la modulació de l'activitat HMG-CoA reductasa a curt plaç per fosforilació reversible, està produïda per tres sistemes separats en els que estarien implicades tres proteïna quinases diferents: la reductasa quinasa, la proteïna quinasa C i la proteïna quinasa dependent de calmodulina i Ca^{2+} . (Esquema V).

1.4.1 HMG-CoA reductasa quinasa

La reductasa quinasa fou detectada inicialment en microsomes i en citosol de fetge de rata per Beg i col. (17). Nordstrom i col. (221) varen purificar, parcialment, una reductasa quinasa citosòlica d'un pes molecular aparent de 200 Kd. Treballs posteriors realitzats per Beg i col. (20) varen proposar un pes molecular de 360-380 Kd per aquesta proteïna.

En estudis més recents, Ferrer i Hegardt (92) han aïllat una reductasa quinasa altament purificada a partir de microsomes de fetge de rata. Aquest enzim presenta una subunitat de 105 Kd, mentre que a la forma holoenzimàtica li correspon un pes molecular aproximat de 210 Kd; la qual cosa està en desacord amb el pes descrit per Beg i col. (20) de 380 Kd.

Per tal d'esbrinar si la reductasa quinasa és un enzim dependent d'AMP cíclic, diferents grups han realitzat investigacions sobre aquest tema. Bové i Hegardt (30) observaren que la inactivació de l'HMG-CoA reductasa en microsomes no es modificava per addició d'AMP cíclic, a concentracions entre 10^{-4} i 10^{-2} M. Aquests resultats foren confirmats per Beg i col. (21). Es més, Ingebritsen i



ESQUEMA V. MODEL DE REGULACIÓ DE L'HMG-CoA REDUCTASA PER TRES SISTEMES DE PROTEÏNA QUINASA DIFERENTS

col. (158) mostraren que la reductasa quinasa no es veu afectada per l'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. D'acord amb aquests autors, la proteïna quinasa purificada per Ferrer i Hegardt (92) tampoc és dependent d'AMP cíclic.

1.4.1.1 Dependència de nucleòtids

La primera evidència referent a requeriments de nucleòtids no cíclics, per la inactivació de l'HMG-CoA reductasa en presència d'ATP-Mg, fou aportada per Brown i col. (41) utilitzant reductasa quinasa de fibroblasts humans. Posteriorment Nordstrom i col. (221) realitzaren experiments similars però en aquest cas, utilitzant reductasa quinasa de fetge de rata. Ambdós grups, observaren que la reductasa era inactiva en presència d'ATP o d'ADP. L'ADP era tant efectiu com l'ATP, la qual cosa suggeria que l'ADP es transformava en ATP per acció de l'adenilat quinasa present en microsomes (41).

Recentment, s'ha demostrat que preparacions altament purificades, no homogènies, de reductasa quinasa de citosol de fetge de rata, requereixen la presència simultània d'ATP i ADP per inactivar l'HMG-CoA reductasa soluble (131). L'ADP pot ésser reemplaçat per altres nucleòtids difosfat com són: CDP, dADP, UDP; encara que l'eficiència aniria disminuint amb l'ordre indicat (131). Aquests resultats indiquen que l'ADP i l'ATP s'unien a diferents llocs en l'enzim i, a més a més, l'ADP actuaria com un activador al·lostèric tal com inicialment havien proposat Brown i col. (41).

Ferrer i col. (93) mostraren que el 5'-AMP és un activador de la reductasa quinasa parcialment purificada,

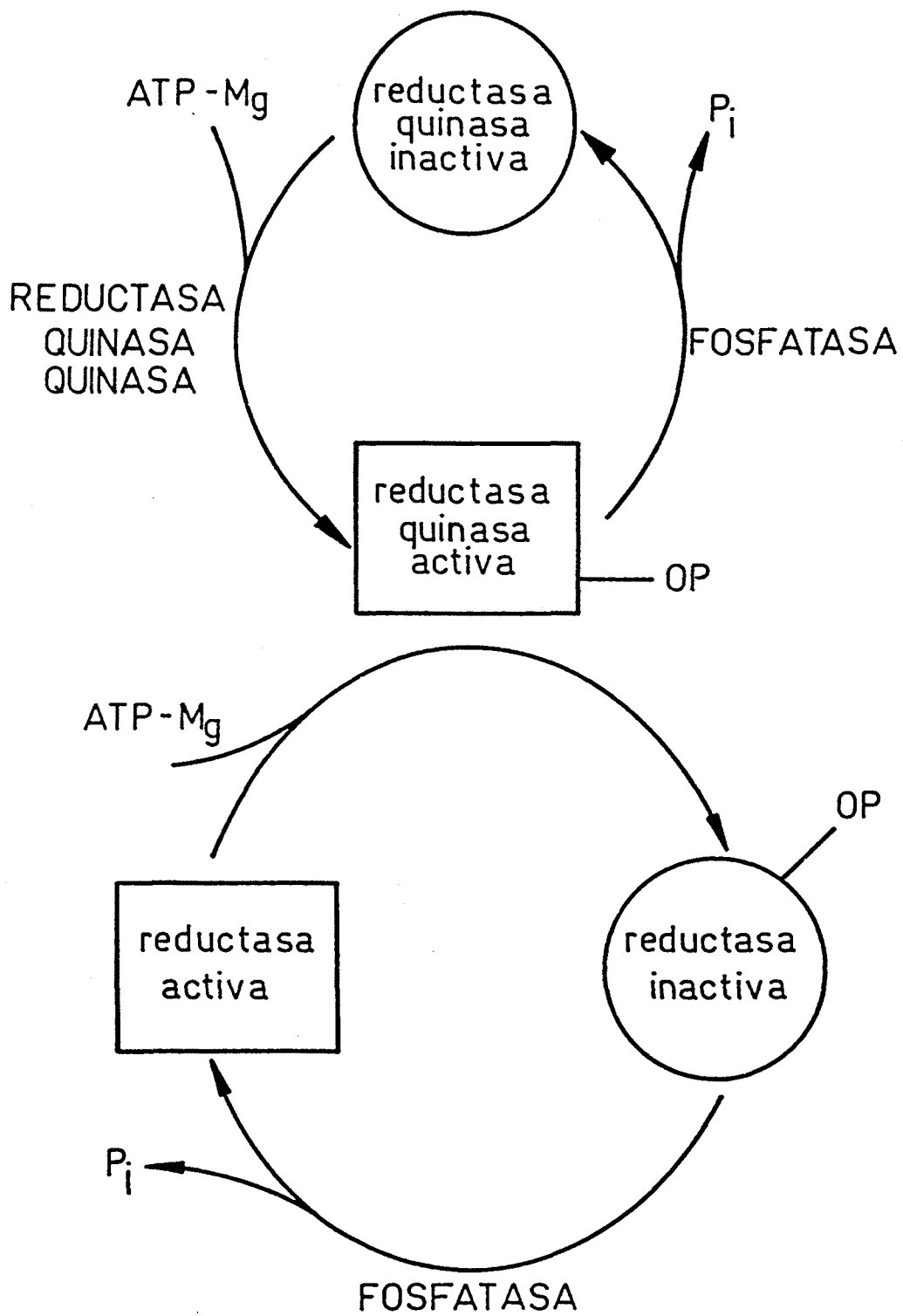
més eficient que l'ADP i, que el 5'-AMP en presència d'ATP i Mg^{2+} produeix un augment, no tant sols en l'activació de l'HMG-CoA reductasa, sinó també en el grau de fosforilació amb [γ - ^{32}P]ATP de l'HMG-CoA reductasa purificada.

Treballs realitzats per aquests mateixos autors amb anàlegs sintètics de nucleòtids (FSBA), mostren que la subunitat de l'enzim reductasa quinasa conté un centre catalític i un centre al·lostèric, éssent l'AMP-Mg el millor activador de l'enzim (94, 95).

1.4.1.2 Fosforilació i desfosforilació de l'HMG-CoA reductasa quinasa

Diferents dades experimentals obtingudes pel grup de Gibson i col. (110, 154, 156) feien pensar que la reductasa quinasa era un enzim interconvertible per fosforilació i desfosforilació. Aquests autors observaren que preparacions de reductasa quinasa de microsomes, s'inactivaven a 37 °C si no s'addicionava NaF. La reductasa quinasa es reactivava parcialment en presència d'ATP-Mg. Posteriorment, varen mostrar que proteïna fosfatasa C, parcialment purificada, reactivava l'HMG-CoA reductasa de microsomes que prèviament havia estat tractada amb ATP-Mg; i a la vegada, inactivava la reductasa quinasa (158).

Aquests mateixos autors (158) mostraren l'existència de l'enzim reductasa quinasa quinasa i que aquest era diferent de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Després de diversos estudis realitzats en aquest camp, Ingebritsen i el seu grup (110) varen plantejar un sistema de regulació de l'HMG-CoA reductasa (Esquema VI), de tipus bicíclic. En aquest sistema l'HMG-CoA reductasa i la reductasa quinasa són interconvertibles per fosforilació i



ESQUEMA VI. MODEL DEL SISTEMA BICICLIC DE REGULACIO DE L' HMG-CoA REDUCTASA PER FOSFORILACIO REVERSIBLE

desfosforilació però mentre que l'HMG-CoA reductasa s'activa per desfosforilació, la reductasa quinasa s'activa per fosforilació.

Es va proposar que la forma de baix pes molecular de la fosfatasa C, com la responsable de la desfosforilació d'ambdós enzims (158). Ingebritsen i col. (162) assenyalaren posteriorment que proteïna fosfatases tipus 1, 2A i 2C de fetge de rata, desfosforilen a l'HMG-CoA reductasa i a la reductasa quinasa. L'existència del sistema bicíclic proposat per Ingebritsen fou confirmat posteriorment per Beg i col. (20), no solament en de fetge de rata, sinó també en altres teixits (20, 110).

1.4.2 Proteïna quinasa C

Un segon sistema de regulació de l'activitat HMG-CoA reductasa és aquell en el que intervé la proteïna quinasa C (Esquema VI), enzim capaç de fosforilar i inactivar ambdues formes purificades, la nativa de 100 Kd i la soluble de 53 Kd, d'HMG-CoA reductasa (110). Aquest fet, suggereix la influència de tota una sèrie de substàncies biològicament actives (hormones, neurotransmisors, factors de creixement, etc.) sobre la velocitat de síntesi d'esterols a través de la degradació del fosfatidilinositol, i la simultània movilització del Ca^{2+} . Aixó, unit a l'increment de la fosforilació de l'HMG-CoA reductasa en presència d'esters de forbol, fa pensar que la fosforilació de l'HMG-CoA reductasa per la proteïna quinasa C podria ésser un mecanisme de regulació addicional de considerable importància.

1.4.3 Proteïna quinasa dependent de calmodulina i Ca^{2+}

El tercer sistema de modulació de l'activitat de l'HMG-CoA reductasa per fosforilació reversible implica l'acció d'una tercera proteïna quinasa dependent de calmodulina i Ca^{2+} (Esquema V). Recentment, s'ha purificat a homogeneïtat, procedent de citosol de cervell de rata, una proteïna quinasa dependent de calmodulina i Ca^{2+} de baix pes molecular (110 Kd) (26), que fosforila fonamentalment l'HMG-CoA reductasa i la histona H_1 . Estudis fets "in vitro" demostraren que la proteïna quinasa dependent de calmodulina i Ca^{2+} de baix pes molecular fosforila i inactiva, tant la forma nativa com la forma soluble de l'HMG-CoA reductasa (26).

Si bé, són necessaris estudis addicionals sobre el paper fisiològic d'aquest fet, hom creu que la proteïna quinasa dependent de calmodulina i Ca^{2+} pot actuar com a mitjancer en l'acció de certes hormones o de senyals extracel·lulars, les quals provoquen un augment intracel·lular de Ca^{2+} (106, 207). Variacions en els nivells intracel·lulars de Ca^{2+} , en determinades situacions fisiològiques, podrien modular l'activitat de la proteïna quinasa dependent de calmodulina i Ca^{2+} , i com a conseqüència la funció de l'HMG-CoA reductasa.

1.5 PROTEINA FOSFATASA

1.5.1 HMG-CoA reductasa fosfatasa

En 1978, Berndt i col. (28) presentaren les primeres observacions sobre el sistema activador de l'HMG-CoA reductasa. Més tard, Nordstron i col. (221) purificaren parcialment una proteïna activadora de l'HMG-CoA reductasa microsomal d'un pes molecular de 30 Kd a partir de citosol de fetge de rata. L'activació produïda per aquesta preparació es bloquejava en presència de NaF 50 mM.

Per una altra banda, Ingebritsen i col. (154) afirmaren que la fosforilasa fosfatasa de baix pes molecular (35 Kd) podia activar a l'HMG-CoA reductasa i inactivar a la reductasa quinasa. L'ús d'inhibidors específics de proteïna fosfatases, com és el NaF, aportà evidències clares de que l'activador de l'HMG-CoA reductasa era una proteïna fosfatasa. Així, s'observà que el NaF inhibia d'una forma similar a la fosforilasa fosfatasa i l'activador de l'HMG-CoA reductasa. Posteriorment, Phillip i Shapiro (231) demostraren que l'HMG-CoA reductasa inactiva, s'activava en presència d'una fosfatasa àcida de patata; mentre que, Brown i col (42) assenyalaren que aquest mateix efecte d'activació de l'HMG-CoA reductasa inactiva, era causat per una fosfatasa alcalina d'E. coli.

Ben aviat es va saber que la reactivació de l'HMG-CoA reductasa era fàcilment inhibible pels substrats de la pròpia HMG-CoA reductasa, l'HMG-CoA i el NADPH. Saucier i Kandustch (241) observaren, tant en cèl·lules L com en cervell fetal, que la reactivació de l'HMG-CoA reductasa per un activador endogen, era inhibida per l'HMG-CoA, éssent la concentració, que produïa un 50% d'inhibició, de 5 a 10 μ M.

També s'observà que el CoA lliure i l'àcid hidroximetilglutàric (HMG) inhibien la reactivació de l'HMG-CoA reductasa; però a concentracions molt més elevades. Tenint en compte que la concentració de l'HMG-CoA en fetge de rata és aproximadament 30 μM (276); depenent de la distribució entre citosol i mitocòndria, aquest compost podria tenir certa influència regulatòria en la desfosforilació i reactivació de l'HMG-CoA reductasa.

Pel que fa referència al NADPH, alguns autors assenyalaren que a una concentració de 20 mM és un potent inhibidor de la reactivació de l'HMG-CoA reductasa (241); per contra, altres estudis demostraren que a concentracions de 2 mM no té cap efecte inhibitori. El fet de que la concentració de NADPH en fetge de rata sigui inferior a 1 mM (49), fa que aquest nucleòtid s'hagi descartat com a regulador de l'activació de l'HMG-CoA reductasa.

Si bé tots aquests treballs foren de gran importància per ésser els primers en el tema; en cap d'ells es demostrava que les preparacions fossin reductasa fosfatases amb capacitat de desfosforilar a l'HMG-CoA reductasa. Gil i col. (113) foren els primers en purificar reductasa fosfatases i en comprovar que aquestes proteïnes desfosforilaven l'HMG-CoA reductasa. Aquests autors aïllaren dos reductasa fosfatases a partir de citosol de fetge de rata. Ambdues reductasa fosfatases, d'alt pes molecular, es convertien en formes de baix pes molecular (35 Kd) tractant-les amb etanol. La incubació de [^{32}P]HMG-CoA reductasa inactiva amb cada una de les quatre reductasa fosfatases, les dos de baix i les dos d'alt pes molecular, donava lloc a una alliberació simultània de ^{32}P de la proteïna a la vegada que produïa una reactivació de l'activitat HMG-CoA reductasa.

Més tard, aquests mateixos autors (115, 116, 132) mostraren que l'efecte inhibitori produït pel fosfat i pirofosfat sobre les quatre proteïna fosfatases (d'alt i baix pes molecular), podia ésser revertit per acció de cations divalents. També mostraren que l'HMG-CoA, el CoA i el NADPH eren inhibidors de les reductasa fosfatases, d'acord amb els estudis que havien estat realitzats per altres autors amb preparacions crues (116). Les quatre reductasa fosfatases s'inactivaven en presència d'àcids policarboxílics (132). Un any més tard, Brown i Rodwell (45) confirmaren el treball realitzat per Gil i col. (132) a l'aïllar dos reductasa fosfatases d'alt pes molecular a partir de citosol de fetge de rata.

Posteriorment, Ingebritsen i col. (163) purificaren tres reductasa fosfatases de citosol de fetge de rata: la 1, la 2A i la 2C. Aquests autors demostraren que la fosfatasa 2C era la més activa enfront de l'HMG-CoA reductasa, la qual cosa feu pensar que desenvolupava un paper important en la regulació de l'activitat HMG-CoA reductasa (162). Malgrat tot, no es va descartar la possibilitat de que la fosfatasa 1 tingués també un paper regulador de l'activitat HMG-CoA reductasa, ja que es creia que un 20% de l'activitat fosfatasa anava unida a microsomes (162).

Des que Berndt i col. (28) comunicaren que l'activitat de l'HMG-CoA reductasa en microsomes en presència d'EDTA, $MgCl_2$ i Na_2SO_3 , era causada possiblement per fosfatases microsomals, molt pocs autors han considerat la fracció microsomal com a font enzimàtica de reductasa fosfatases. Posteriorment a aquest treball, Feingold i col. (91) observaren una activitat reductasa fosfatasa de microsomes, que era capaç d'activar a l'HMG-CoA reductasa microsomal i que aquest efecte activador era bloquejat en presència de NaF i fosfats.

En el nostre Laboratori, Sitges i col. (249) varen comunicar l'aïllament i parcial purificació de tres reductasa fosfatases d'alt pes molecular, a partir de microsomes de fetge de rata. Aquestes tres reductasa fosfatases s'inhibien en presència de KF, pirofosfat i fosfat, i eren capaces d'alliberar el ^{32}P de la [^{32}P]HMG-CoA reductasa, reactivant-la de forma simultània. Aquests autors consideraven poc probable que alguna de les tres reductasa fosfatases fos la de tipus 2C reportada per Ingebritsen i col., ja que aquesta, es trobava tant sols en un 2% en microsomes. Malgrat tot, es fa necessari la realització de nous estudis per esbrinar si aquestes reductasa fosfatases són realment de membrana, o són contaminacions de les proteïna fosfatases que acompanyen al glicogen.

Recentment, en el nostre Laboratori, Calvet i col. (51) han purificat quatre proteïna fosfatases d'alt pes molecular a partir de citosol de fetge de rata. Aquestes quatre proteïna fosfatases, denominades: I_{1a} , I_{2a} , I_{3a} i II_a , mostren activitat fosfatàsica enfront no solament al substrat HMG-CoA reductasa, sinó també a altres substrats fosforilats; com ho són la glicogen fosforilasa i la glicogen sintasa, encara que, amb activitats específiques diferents respecte a cadascun d'aquests tres substrats. Les quatre proteïna fosfatases, per tractament amb etanol, es transformen en quatre formes de baix pes molecular, denominades: I_{1b} , I_{2b} , I_{3b} i II_b , respectivament. La contribució de les quatre fosfatases en la desfosforilació de l'HMG-CoA reductasa és diferent (51). La fosfatasa II_a és la que es troba en major quantitat en el fetge de rata (70%), mentre que la fosfatasa I_{2a} és troba en menys proporció, i a més a més, presenta una major especificitat pel substrat glicogen fosforilasa. Les quatre proteïna fosfatases es veuen activades en presència d'ions metàl·lics, com el Mn^{2+} i el Mg^{2+} . Així, les fosfatases I_2 , I_3 i II són fortament acti-

vades per ambdós ions quan el substrat utilitzat és l'HMG-CoA reductasa; cosa que no succeeix quan el substrat utilitzat és la glicogen fosforilasa. La fosfatasa I₁ és activada per Mg²⁺ i Mn²⁺ de forma similar i amb els tres substrats.

Simultàniament amb els estudis realitzats en el nostre Laboratori, utilitzant com a principal substrat l'HMG-CoA reductasa, diversos grups havien purificat diferents proteïna fosfatases. El grup de Cohen i col. aïllà i purificà proteïna fosfatases de múscul esquelètic de conill (159-162), mentre que el grup de Tsuiki i col. (143, 259-261) estudià les proteïna fosfatases presents en citosol de fetge de rata. Ambdós grups utilitzaren com a substrats la glicogen fosforilasa i la glicogen sintasa.

La idea inicial de que les proteïna fosfatases eren enzims diferents i específics per a cada substrat, va ésser substituïda, ben aviat, per la hipòtesi de que la desfosforilació de fosfoproteïnes implicades en diversos processos metabòlics, podia ser catalitzada per una mateixa proteïna fosfatasa dotada d'una ampla especificitat.

Actualment, els estudis sobre proteïna fosfatases, utilitzant diferents substrats, han mostrat que aquests enzims, de fet, actuen sobre una ampla gamma de substrats encara que amb diferent afinitat per cadascun d'ells.

1.5.2 Especificitat de substrat de les proteïna fosfatases

La hipòtesi inicial de que les proteïna fosfatases mostraven una especificitat pel substrat, va decaure quan es demostrà que la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic mostrava una ampla especificitat de substrat.

Actualment, és ben conegut que les proteïna fosfatases mostren activitat enfront un gran nombre de substrats. Les diverses formes de proteïna fosfatasa existents catalitzen la desfosforilació de nombroses fosfoproteïnes, entre elles cal destacar: la glicogen fosforilasa, la glicogen sintasa, la subunitat α o β de la fosforilasa quinasa, l'inhibidor-1 i l'inhibidor-2, el factor d'iniciació IF-2, l'HMG-CoA reductasa i la reductasa quinasa, la Histona H₁ i H₂, el p-nitrofenilfosfat (16), etc.

L'especificitat enfront a cadascun dels substrats varia sensiblement:

a) en presència o no d'efectors, com són els ions metàl·lics, la cafeïna o proteïnes bàsiques.

b) segons la font d'on s'ha obtingut l'enzim.

c) segons el grau de puresa de la proteïna fosfatasa obtinguda.

1.5.3 Classificació de les proteïna fosfatases

Un gran avanç en el camp de la classificació de les proteïna fosfatases es produí arran del descobriment de Brandt i col. (32), en el que, formes d'alt pes molecular de proteïna fosfatases es convertien a una forma de 35 Kd per tractament amb etanol. Poc després, es demostrà que preparacions de proteïna fosfatases de 35 Kd contenien dos enzims diferents, que es diferenciaven per llur sensibilitat als inhibidors i per la relativa activitat sobre les subunitats α o β de la fosforilasa quinasa (157). Aquestes propietats foren proposades per Ingebritsen i Cohen (159) com un sistema de classificació de les fosfoseril fosfatases, en el qual, es denominaven:

a) Proteïna fosfatases tipus 1 a aquells enzims que eren sensibles a l'inhibidor-1 i a l'inhibidor-2, i des-

fosforilaven preferentment la subunitat β de la fosforilasa quinasa.

b) Proteïna fosfatasa tipus 2 a aquells enzims que no eren sensibles a l'inhibidor-1 ni a l'inhibidor-2, i desfosforilaven preferentment la subunitat α de la fosforilasa quinasa.

La classificació de les proteïna fosfatases suggerida per Cohen es mostra en la Taula I.

Les quatre proteïna fosfatases de citosol de fetge de rata aïllades en el nostre Laboratori, es van classificar en tipus 1 o tipus 2 segons el criteri proposat per Ingebritsen i Cohen. Segons aquest criteri, les fosfatases I_2 , I_3 i II desfosforilaven la subunitat α i no eren inhibides per l'inhibidor-2, mentre que la fosfatasa I_2 desfosforilava la subunitat β de la fosforilasa quinasa, i era sensible a l'acció de l'inhibidor-2 (133).

Tenint en compte tota una sèrie de propietats significatives, els autors van identificar les reductasa fosfatases I_3 i II amb les proteïna fosfatases $2A_1$ i $2A_2$ de Ingebritsen i Cohen (159) i a la fosfatasa I_1 com la fosfatasa 2C, mentre que la fosfatasa I_2 podria identificar-se amb la fosfatasa 1 del grup d'Ingebritsen.

PROTEINA FOSFATASA		SENSIBILITAT A INHIBIDORS -1 i -2	ESPECIFICITAT		REGULADORS	SUBUNITAT CATALITICA (Mr)
TIPUS	NOM		FOSFORILASA QUINASA	SUBSTRAT		
1	Fosfatasa dependent d'AMP-Mg	SI	sub β	ampla	INH-1 INH-2 GSK-3	38.000
2A	-	NO	sub α	ampla	desconeguts	36.000
2B	Calcineurina	NO	sub α	estreta	CALMODULINA Ca ²⁺	61.000
2C	Fosfatasa dependent de Mg ²⁺	NO	sub α	ampla	Mg ²⁺	46.000

TAULA I. CLASSIFICACIO DE LES PROTEINA FOSFATASES

1.5.4 Formes moleculars i estructura de les proteïna fosfatases

1.5.4.1 Proteïna fosfatasa tipus 1

La proteïna fosfatasa tipus 1 és considerada com una clàssica fosforilasa fosfatasa. Han estat purificades a homogeneïtat tres formes de l'enzim: la subunitat catalítica, el complex inactiu dependent d'ATP-Mg, i la forma unida al glicogen (I_a).

La subunitat catalítica s'ha obtingut a partir de múscul esquelètic de conill (234, 247, 263, 280), i de fetge de rata (157, 174), mitjançant la utilització de tractaments desnaturalitzants amb etanol al 80%, produint espècies totalment actives d'un pes molecular comprès entre 32 i 38 Kd, producte segurament d'un procés proteolític.

L'existència, en l'escorsa adrenal, de la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg fou demostrada primerament, per Merlevede i Riley (211) i, posteriorment, ha estat descrita en una gran varietat de teixits de mamífers i en aus (64, 122); però, solament s'ha obtingut de forma homogènia, a partir de múscul esquelètic de conill (13, 263) amb uns rendiments de 60-145 μ g per 100 g de teixit. Aquesta proteïna fosfatasa està constituïda per la subunitat catalítica (38 Kd) i l'inhibidor-2 (31 Kd), formant un complex (1:1) totalment inactiu (138, 263), reactivable per acció de la GSK-3 en presència d'ATP-Mg (138, 263).

Per un altra part, s'ha observat la presència d'una fosfatasa espontàniament activa unida al glicogen que s'allibera per acció de l' α -amilasa (128, 178, 179, 256). L'enzim, denominat I_a , s'ha purificat de múscul esquelètic de conill i és un complex format per la subunitat catalí-

tica i un component G d'un pes molecular de 103 Kd en una relació 1:1. Aquest component G, extremadament sensible a proteolisi, és el causant de la unió al glicogen.

Recentment, Chisholm i Cohen (59) han identificat una altra forma de proteïna fosfatasa tipus 1 associada a la miosina. Aquesta proteïna fosfatasa presenta un pes molecular aparent de 110 Kd i està formada per la subunitat catalítica i una subunitat M, que fa de mitjancera en la unió a la miosina.

1.5.4.2 Proteïna fosfatasa tipus 2A

Diferents estudis realitzats en extractes de teixits de conill, utilitzant glicogen fosforilasa "a" com a substrat, mostren que el fetge és una font important de fosfatasa 2A, seguida del cervell, cor, múscul esquelètic i teixit adipós (162); i que es tracta d'un enzim fonamentalment citosòlic.

S'han purificat a homogeneïtat, procedents de diversos teixits, tres subtipus diferents: 2A₀, 2A₁ i 2A₂. Tots ells presenten una sola subunitat catalítica d'un pes molecular de 36 Kd (266), que s'uneixen a altres components donant lloc als diferents subtipus. Malgrat que en un principi es creia que la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1, era la mateixa que la de la fosfatasa tipus 2, degut a la similar composició aminoacídica (165, 247, 264) i també a immunoreaccions creuades obtingudes amb anticossos monoclonals (247, 252); s'ha demostrat últimament, mitjançant l'utilització de mapes peptídics, que ambdues subunitats són productes de gens diferents (10, 29, 69, 70, 165, 264).

La fosfatasa 2A₀ aïllada de múscul esquelètic de conill (68, 226, 267) està constituïda per 3 subunitats denominades: A (PM = 60 Kd), B' (PM = 54 Kd) i C (PM = 36 Kd); formant un complex en la relació A:B':C₂. Les subunitats A i C són presents també en els subtipus 2A₁ i 2A₂, però s'ha observat, al menys en múscul de conill, que la subunitat B' es diferent (266).

La pèrdua de les subunitats B de la proteïna fosfatasa 2A₀ o de la 2A₁, dona lloc al subtipus 2A₂. Dissociacions parcials d'alguna de les subunitats s'han observat durant processos de gel filtració (260, 261) o en presència de concentracions salines de 0,2 M (176). Es fàcil obtenir la subunitat catalítica mitjançant tractaments amb etanol 40-80% (32), o per congelació i descongelació en presència de 2-mercaptoetanol 0,2 M (189, 260), o també per tractaments amb urea 6 M o en presència de proteases (153, 181).

1.5.4.3 Proteïna fosfatasa 2B (calcineurina)

La fosfatasa 2B fou primerament descoberta en teixit nerviós (55, 273), però per tècniques de radioimmunoassaig o d'"immunoblot", mitjançant la utilització d'anticossos monoclonals, s'ha detectat en diversos teixits (205, 258, 273). Les petites quantitats d'aquest enzim en altres teixits respecte a les observades en el cervell de rata, fa pensar en una possible relació entre la síntesi de calcineurina i la sinaptogènesi (162, 258, 273).

Aquesta proteïna fosfatasa dependent de Ca²⁺ i calmodulina, ha estat purificada a homogeneïtat a partir de cervell (183, 272), múscul esquelètic (255) i cor (192), mitjançant la utilització d'assaigs enzimàtics (255) o per densitometries de gels d'acrilamida o "immunoblots" (184).

Cal observar que totes les formes de proteïna fosfatasa 2B són heterodímers formats per un complex 1:1 entre una llarga cadena polipeptídica, denominada A amb un pes molecular de 61 Kd, i una petita subunitat hidrofòbica, denominada B amb un pes molecular de 19,2 Kd determinats per seqüència d'aminoàcids i de 15-16 Kd en gels d'acrila-mida-SDS. Quan l'enzim purificat prové de múscul esquelètic o de cor, la cadena A presenta un doblet (A + A') constituït per dos cadenes, de 61 i 58 Kd de pes molecular, respectivament, éssent l'últim un producte de proteolisi limitada (205, 254).

La subunitat A constitueix la subunitat catalítica i reguladora de l'enzim, ja que en ella s'ha demostrat que existeixen el centre catalític i el centre d'unió de la subunitat B, de la calmodulina i dels ions de metalls de transició (258).

La subunitat B, de la que recentment se n'ha determinat la seqüència (7), mostra una gran homologia amb la calmodulina i troponina C, especialment les quatre regions per les quals s'uneix al Ca^{2+} (7).

Malgrat que s'ha observat la presència de fosfat unit a la proteïna, sembla que el contingut d'aquest no està relacionat amb l'activació i inactivació de l'enzim (182).

1.5.4.4 Proteïna fosfatasa 2C

La proteïna fosfatasa 2C fou descrita primerament com una proteïna amb activitat glicogen sintasa fosfatasa totalment dependent de Mg^{2+} o Mn^{2+} , degut a la poca activitat fosforilasa fosfatasa que mostrava (143, 204). Aquest

enzim està ampliament distribuït en diversos teixits, éssent el fetge, seguit del cor, cervell, múscul esquelètic i teixit adipós, on es troba de forma més abundant. En els casos dels teixits de fetge i múscul esquelètic, s'ha observat que aquest enzim forma part de la fracció citosòlica i no s'ha detectat la seva presència ni en microsomes ni unit al glicogen (162).

El pes molecular d'aquesta proteïna fosfatasa varia d'unes a altres preparacions, obtenint-se una proteïna de pes molecular de 46 ± 6 Kd, formada per un sol monòmer. Estudis realitzats en fetge de rata han mostrat l'existència d'un dimer, d'un pes molecular de 90 Kd, obtingut per centrifugació en gradient de sacarosa i per gel filtració (213).

Es l'enzim que desfosforila millor l'HMG-CoA reductasa i la reductasa quinasa; però, el fet de no estar present en la fracció microsomal on l'HMG-CoA reductasa està fortament associada, posa en dubte el possible paper d'aquest enzim en la regulació de la biosíntesi de colesterol (162, 163). En canvi, si sembla tenir un important paper en la regulació de la contracció muscular en múscul llis (244).

1.5.5 Regulació de les proteïna fosfatases

Les proteïna fosfatases poden estar regulades a través de dos mecanismes diferents; un, de caràcter extrínsec (realitzat sobre el substrat), i un altre, de caràcter intrínsec (realitzat sobre la fosfatasa) (191, 197). En el primer, la unió de diversos metabolits al substrat proteic provoca una alteració de la susceptibilitat a la desfosfo-

rilació. En el segon, els efectors s'uneixen a la fosfatasa alterant, directament, l'activitat fosfatasa.

1.5.5.1 Proteïna fosfatasa tipus 1 (Complex de 70 Kd)

L'estímul de l'activitat fosforilasa fosfatasa per acció d'ions metàl·lics divalents, particularment, el produït pel Mn^{2+} fa temps que és ben conegut però, la sensibilitat de la proteïna fosfatasa tipus 1 al Mn^{2+} , es confirmà quan es demostrà, que aquesta era fortament activada per un tractament amb tripsina i Mn^{2+} (35, 36). Durant la tripsinolisi, l'inhibidor-2 és destruït ràpidament, mentre que la subunitat catalítica es degrada parcialment pel grup carboxil, donant lloc a espècies inactives de 33 Kd, que s'activen per acció del Mn^{2+} . Aquest actuaria en dues etapes; la primera, produint una activació de l'enzim que es podria revertir amb EDTA, segurament degut a la formació del complex Enzim-Metall. La segona etapa, més lenta, i no reversible amb EDTA, en la que l'ió Mn^{2+} no hi seria present. Malgrat tot, no es coneix com actua el Mn^{2+} ; si induint un canvi conformacional de l'enzim donant lloc a una forma estable, o bé si s'uneix mitjançant una modificació covalent de la proteïna, tal com si es tractés d'una interconversió SH-SS.

La regulació fisiològica de la proteïna fosfatasa tipus 1 (complex de 70 Kd) a través de la GSK-3 i ATP-Mg fou demostrada primerament pel grup de Merlevede (122, 268).

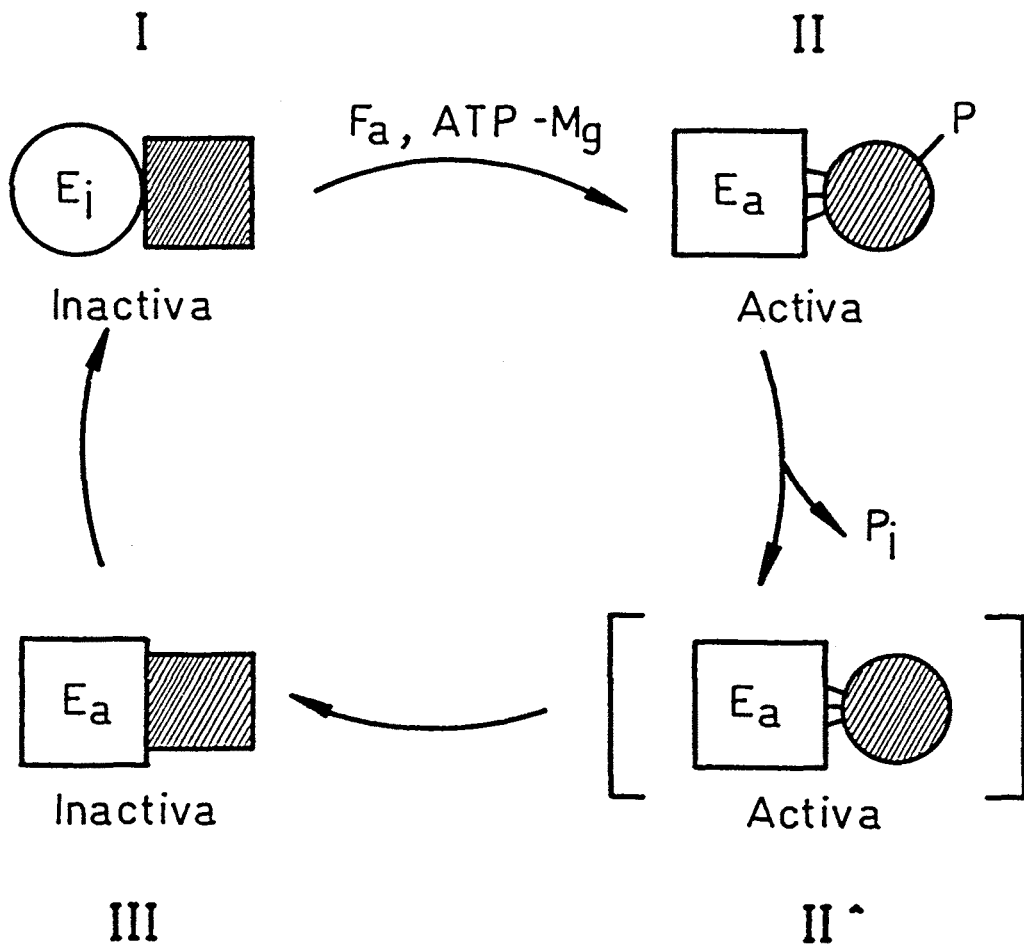
El mecanisme d'activació de la proteïna fosfatasa mitjançant l'acció de la GSK-3 ha estat parcialment clarificat. L'activació de l'enzim va acompanyada d'una fosforilació de l'inhibidor-2 (modulador) (13, 138, 166, 234,

271). El fosfat incorporat és alliberat quan s'addiciona EDTA, que bloqueja l'acció de la quinasa, indicant que la fosfatasa un cop activada, catalitza la seva pròpia desfosforilació (13, 271).

Villa-Moruzzi i col. (271) demostraren que la conversió de l'enzim a la forma activa, anava associada a un cicle de fosforilació i desfosforilació de l'enzim. Per això, van sotmetre la fosfatasa activada per GSK-3 per FPLC i, obtingueren, la subunitat catalítica en forma completament activa, la qual no es reactivava en presència de Mn^{2+} .

S'ha descrit varis models d'activació del complex de fosfatasa dependent d'ATP-Mg (14, 166, 199, 271), malgrat tot, no es coneix quin punt de l'enzim es converteix en catalíticament actiu. Una complicació a aquests models, és que l'activitat fosfatasa no es proporcional a la quantitat de fosfat present en la subunitat reguladora (modulador) (138, 166, 269, 270, 271). Estudis més recents explicarien aquest fet assumint que l'activació es produiria durant el procés de la desfosforilació. Si això fos cert, l'enzim seria capaç de catalitzar la seva pròpia desfosforilació intramolecular, mentre romandria inactiu enfront a altres substrats externs. Altres autors no estan d'acord en aquest punt.

Una forma alternativa d'explicar aquesta falta de correlació entre el fosfat incorporat i l'activitat de l'enzim, és la de considerar que ambdós subunitats, moduladora i catalítica, sofreixen petits canvis de conformació, tal com es mostra en l'Esquema VII (14). Segons aquest, la fosforilació per GSK-3 aniria acompanyada de canvis sincronitzats en ambdós components, modulador i subunitat catalítica; perdent el modulador l'activitat inhibidora, i mantenint-se en la conformació activa la



ESQUEMA VII. MODEL DE REGULACIO DE LA PROTEINA FOSFATASA TIPUS 1 (COMPLEX DE 70 kd)

subunitat catalítica (I \rightarrow II). Quan el modulador, és autodesfosforilat (II \rightarrow II*), roman en un estat no inhibitori durant un temps, abans de passar a la seva forma inhibidora (II* \rightarrow III). Així, el complex III es mostraria inactiu, encara que la subunitat catalítica es mantingués en la seva conformació activa. La forma III podria ésser reactivada per fosforilació o bé retornar al seu estat inicial, inactiu, mitjançant una conversió lenta de la conformació activa de la subunitat catalítica a la conformació inactiva (III \rightarrow I). Si la velocitat d'autodesfosforilació (II \rightarrow II*) fos major que la velocitat en que el modulador es transforma en la seva conformació inhibidora (II* \rightarrow III), la major quantitat de fosfatasa activa existiria en la forma desfosforilada II*. Així doncs, l'activació, en un principi, seria ràpida i estaria determinada pel grau de fosforilació, però l'activitat final seria independent de la quantitat de fosfat incorporat. No existeixen evidències de que el complex arribi a dissociar-se després de la fosforilació (166, 263, 271); tot i amb això, s'ha observat que el complex reconstituït a partir d'una subunitat catalítica de 33 Kd i el modulador, es dissocia amb l'activació (138).

Les formes descrites en l'Esquema VII s'identificarien amb les formes obtingudes amb tripsina i, tripsina i Mn^{2+} . En aquest cas, el tractament amb tripsina i Mn^{2+} , produiria una activació total, mentre que l'acció solament de la tripsina, conduiria a la subunitat catalítica a la seva conformació activa, present en els complexos actius o inactius. Assajos sense cap tractament, mostrarien solament la forma activa de l'enzim II i II* (Esquema VII). Quan s'analitza aquest sistema emprant baixes concentracions de GSK-3, s'observa que en 30 min la subunitat catalítica ha passat a la conformació activa, però solament un 10-15% de

L'enzim és activat (271). En aquestes condicions, la fosfatasa existeix predominantment en la forma inactiva III.

La conversió de la subunitat catalítica de la conformació activa a la inactiva, no es produeix espontàniament, sinó que requereix la presència de la subunitat moduladora (inhibidor-2). S'ha observat diferències en aquest procés d'inactivació, depenent de la naturalesa de l'enzim utilitzat. Si es tracta de la subunitat catalítica reactivada amb GSK-3 (Ea^{F^*}), el procés és més ràpid que si la subunitat catalítica és l'activada amb Mn^{2+} (Ea^{Mn}); mentre que si la subunitat catalítica és l'activada per tripsina i Mn^{2+} (Ea^{TS-Mn}), aquesta no es transforma en la forma inactiva per addició de l'inhibidor-2, encara que s'ha demostrat que aquesta forma s'inhibeix per acció de l'inhibidor-2. Alguns autors creuen que la zona C-terminal destruïda per acció de la tripsina, podria estar involucrada en el procés d'inactivació, afectant tant al lloc catalític, com a la reorganització de l'estructura de la proteïna. Donat que l'inhibidor-2 és necessari per l'activació i la inactivació de l'enzim, i per mostrar algunes funcions més que les d'un simple inhibidor, se'l denomina "modulador" (280).

Estudis recents mostren que varies formes actives de la fosfatasa són diferents, ja que varia l'especificitat pel substrat (15). Això suggereix que l'especificitat de l'enzim està afectada per altres factors, a més a més de la simple seqüència d'aminoàcids que envolten el centre de fosforilació.

S'ha observat també l'existència de dos llocs amb grups SH, els quals difereixen en reactivitat química en l'expressió de l'activitat enzimàtica (15).

L'activitat fosfatasa pot ésser activada per Mn^{2+} , però també s'ha observat, que espècies de fosfatasa són inhibides per Mn^{2+} quan el substrat utilitzat és la glicogen fosforilasa "a" (226). També produeixen activació el Co^{2+} i el Ni^{2+} (199). Inactiven l'enzim el NaF, PPI o l'ATP, etc. (179, 226).

Els components bàsics com la polilisina i la protamina són potents inhibidors, especialment quan el substrat utilitzat és la glicogen fosforilasa "a" (129, 229). També produeixen inhibició la histona H_1 i les poliamines (229, 265).

1.5.5.2 Proteïna fosfatasa tipus 2A

Els canvis d'activitat de la subunitat catalítica al combinar-se amb les subunitats A o B han estat ampliament estudiats (152, 153). El complex AC augmenta l'activitat enfront la histona H_1 , mentre que l'addició de la subunitat B a aquest complex produeix un 50% d'inhibició de la desfosforilació de la glicogen fosforilasa "a" i de la glicogen sintasa. La separació de la subunitat B és el motiu pel qual, preparacions d'alt pes molecular de la proteïna fosfatasa 2A, per dilució (162, 196) o bé per tractaments dràstics, donent lloc a un augment de l'activitat fosforilasa fosfatasa. Cal remarcar però, que l'activació produïda per proteïnes bàsiques no va acompanyada de la dissociació de la subunitat B (229).

Totes les formes de la proteïna fosfatasa 2A són reactivables per Mn^{2+} . La quantitat necessària d'aquest per a la reactivació, varia d'un a un altre substrat utilitzat (151, 226, 266). El Mg^{2+} i el Ca^{2+} poden ésser lleugerament activadors de l'activitat fosfatàsica, o bé inhibidors

depenent del substrat utilitzat (68); mentre que el Zn^{2+} i el Fe^{2+} són potents inhibidors (68, 151).

Les dades obtingudes de diferents estudis (145, 204), demostren que aquesta proteïna fosfatasa és sensible a metalls, però la relació entre els cations divalents i l'activitat fosfatàsica és molt complexa i no gens clara. S'ha descrit que el Mn^{2+} i el Co^{2+} poden induir un canvi conformacional en l'enzim, en el que hi estarien implicats grups de tipus tiol (271, 277). De totes formes, es fa necessari la realització de nous estudis estructurals per dilucidar l'acció dels ions metàl·lics divalents.

Altres activadors de la proteïna fosfatasa 2A són les poliamines, i les proteïnes bàsiques com ho són la histona H_1 , la protamina i la espermina (229, 265, 266, 208).

Agents inactivadors molt efectius són els compostos pirofosforilats; així com PPI, ATP, CTP, GTP, ADP (145, 169, 204, 266). Altres agents són KF i AMP-P(NH)P. Els inhibidors-1 i -2 no afecten l'activitat de l'enzim.

1.5.5.3 Proteïna fosfatasa tipus 2B

Tots els grups d'investigació estan d'acord en que la proteïna fosfatasa 2B manifesta múltiples nivells d'activitat depenent dels múltiples estats conformacionals. La forma dimèrica nativa (AB) és completament inactiva en absència de Ca^{2+} . La saturació de la subunitat B amb Ca^{2+} dona lloc a un enzim parcialment activat, que s'estimula amb Ca^{2+} (-CaH). L'activitat d'aquestes formes pot incrementar-se, per la unió a la subunitat A, d'ions metàl·lics

de transició, principalment el Mn^{2+} , Co^{2+} i Ni^{2+} (182, 198, 222, 224).

Pallen i Wang (224) demostraren que aquests ions divalents podien classificar-se en quatre grups segons l'efecte que produïen a l'enzim. El primer grup (Ni^{2+} i Mn^{2+}) activava l'enzim en absència de calmodulina, encara que aquesta podia activar l'enzim posteriorment. El segon grup, compost pels cations Co^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} i Ba^{2+} , activa-ven l'enzim solament en presència de calmodulina. El tercer grup (Be^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} i Fe^{2+}) era inefectiu en presència o no de calmodulina. El quart grup, format per el Zn^{2+} , inhibia l'acció dels ions del primer i segon grup (54, 224). El Mg^{2+} no afecta l'activitat de l'enzim. L'activació de la proteïna fosfatasa 2B per ions metàl·lics és molt complexa i alguns autors han proposat que aquesta activació es produeix de forma lenta a través de diferents passos relacionats amb canvis conformationals de l'enzim (182, 224).

1.5.5.4 Proteïna fosfatasa tipus 2C

La proteïna fosfatasa 2C és completament dependent d'ions metàl·lics divalents, ja que mostra activitat enfront qualsevol dels substrats d'aquesta proteïna fosfatasa. El màxim activador es el Mg^{2+} , seguit del Mn^{2+} i Co^{2+} ; mentre que el Ca^{2+} no l'afecta (219).

Inhibidors d'aquest enzim ho són NaF, PPI, ATP, ADP i AMP (219). A diferència de les altres proteïna fosfata-ses 1 i 2A, el tractament de la proteïna fosfatasa 2C amb 50 mM NaF i 1 mM EDTA no la transforma en una forma depen-dent de Mn^{2+} , i el Mg^{2+} segueix éssent l'activador de l'enzim (204). A més a més, la precipitació amb 80% d'eta-

nol no transforma, a l'enzim, en una forma de baix pes molecular, encara que s'observa una petita pèrdua d'activitat (143). Els inhibidors -1 i -2 així com la trifluoperacina, no afecten a l'activitat de l'enzim.

1.6 INHIBIDORS TERMOESTABLES I DESINHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASES

L'any 1975 Brandt i col. (33) detectaren per primera vegada, en fetge de conill, la presència d'una activitat inhibidora, estable al calor i sensible a la tripsina, de la fosforilasa fosfatasa. Poc després, Huang i Glinesman (147) separaren dos inhibidors de múscul esquelètic de conill; el primer, denominat inhibidor-1, es mostrava actiu solament per fosforilació amb la quinasa dependent d'AMP cíclic (146); mentre que el segon, denominat inhibidor-2, es mostrava actiu en la forma desfosforilada (147). La inhibició produïda per ambdues proteïnes era pràcticament immediata, excepte en el cas d'utilització d'extractes concentrats, o bé d'utilització de la fosfatasa unida al glicogen Ia, la qual cosa podria estar relacionada amb la presència del desinhibidor o del component G en el cas de tractar-se de la fosfatasa unida al glicogen.

1.6.1 Inhibidor-1

1.6.1.1 Localització i estructura

L'inhibidor-1 fou detectat per primera vegada en fetge de conill (33). Knight i Teal (188) examinaren les proteïnes efectores, estables al calor, procedents d'extractes de múscul i de fetge. Aïllaren a partir de múscul esquelètic de conill dos formes diferents d'inhibidor-1, activables per proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (denominades inhibidor-1 i -1'). En el teixit hepàtic aïllaren una sola forma d'inhibidor-1. Aquests autors arribaren a la conclusió que els inhibidor-1 i -1' aïllats de múscul, i l'aïllat del teixit hepàtic, produïen efectes

similars. Posteriorment, Mellgren i col. (208) purificaren també l'inhibidor-1 de ronyó de conill. Actualment hom creu que aquest inhibidor es troba ampliament distribuït per la majoria de teixits i espècies, encara que Foulkes i col. (104) demostraren que no era present en reticulocits de conill.

L'inhibidor-1 fou purificat a homogeneïtat a partir de múscul esquelètic de conill, on es troba a unes concentracions de 3 a 4 vegades superior a la fosfatasa tipus 1 (162). Es un monòmer de 20 Kd, amb una estructura poc ordenada i, per electroforesi en gel de poliacrilamida revela la coexistència de varies formes, arribant-se a la conclusió de que aquestes són producte d'una desaminació o proteolisi limitada d'una única forma nativa.

La composició en aminoàcids de l'inhibidor-1, presenta varies característiques poc usuals. Una tercera part dels aminoàcids la formen l'àcid glutàmic i la prolina; no conté tirosina, ni triptofan, ni cisteïna, i és molt pobre en aminoàcids aromàtics. Aitken i col. (4) en determinaren la seqüència completa, comprovant, que la proteïna estava constituïda per una única cadena polipeptídica de 165 residus d'aminoàcids, mostrant la metionina N-terminal acetilada i un pes molecular de 18.640 daltons.

Estudis cinètics han mostrat que la inhibició de la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1, és no competitiva respecte a la fosforilasa "a" quan s'empren altes concentracions de fosfatasa ($K_i=1,5-7,5$ nM), però és de tipus creuat a baixes concentracions (103, 148, 220). Fragments proteolítics de la proteïna mostren també plena activitat inhibidora així, Aitken i col. (5) observaren que petits fragments que contien els residus aminoacídics des del 9 al 54 mostraven plena activitat inhibidora.

1.6.1.2 Regulació

L'activació d'aquest inhibidor per fosforilació està catalitzada per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Aitken i col. (4) determinaren que la fosforilació de la treonina de la posició 35, era la causa de l'augment de l'activitat inhibidora. Aquests mateixos autors assenyalaren que la serina-67 experimentava una fosforilació significativa; però, la fosforilació d'aquest residu de serina no estava relacionat amb l'activitat de l'inhibidor-1.

La inhibició produïda per l'inhibidor-1 pot ésser anul·lada per proteolisi amb tripsina, per dilució (220) o bé per desfosforilació del residu treonina-35. En presència de Mn^{2+} , la fosfatasa tipus 1 catalitza la desfosforilació, però aquesta es veu inhibida de forma competitiva per la presència d'inhibidor-2, encara que la K_m (190 nM) de l'inhibidor-1 com a substrat, es major que la K_i (1,5-7,5 nM) com inhibidor (103). Ingebritsen i col. (162) mostraren que tant la fosfatasa 2A com la 2B desfosforilaven d'una forma eficaç l'inhibidor-1, però la presència d'altres concentracions d'una fosfoproteïna, com podia ésser la fosforilasa "a", inhibia la desfosforilació de l'inhibidor per aquestes fosfatases, per contra, no inhibia la catalitzada per la fosfatasa tipus 1. Aquests fets suggereixen que la fosfatasa tipus 1 és la verdadera responsable de la desfosforilació de l'inhibidor-1 "in vivo".

1.6.1.3 Control hormonal

Des que es confirmà que l'activació de l'inhibidor-1 i per tant la seva fosforilació, es duia a terme a través de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic; i,

donat que la proteïna fosfatasa 1 és activa sobre moltes proteïnes fosforilades per aquesta proteïna quinasa, hom creia que l'activació de l'inhibidor-1 podria evitar la desfosforilació d'aquestes proteïnes, amplificant així els efectes de l'AMP cíclic, al mantenir a les proteïnes en el seu estat de major fosforilació. La fosfatasa 1 també pot desfosforilar proteïnes que han sigut prèviament fosforilades per altres proteïna quinases diferents de la quinasa dependent d'AMP cíclic; d'aquesta forma la inhibició de la fosfatasa 1 produïda per l'inhibidor-1 permetria a l'AMP cíclic modular també l'estat de fosforilació d'aquests substrats. Malgrat tot, no hi ha gran quantitat d'estudis realitzats sobre el tema. Aquests estudis (98, 100, 101, 177, 216) demostraren que la fosforilació de l'inhibidor-1 augmenta en presència de isoproterenol o adrenalina, i disminueix en resposta a la insulina, la qual cosa suggereix un important paper d'aquesta proteïna en el control hormonal dels processos cel·lulars en els que la fosfatasa tipus 1 hi estaria implicada .

1.6.2 Inhibidor-2

1.6.2.1 Localització i estructura

De la mateixa forma que l'inhibidor-1, l'inhibidor-2 fou primerament localitzat en citosol de fetge de conill (33). Varis grups (99, 129, 279) l'han purificat a homogeneïtat a partir de múscul esquelètic de conill. Aquest és un monòmer que posseeix una estructura poc ordenada, tal com ho demostra la diferència de pesos moleculars, obtinguts per les distintes tècniques emprades: gel filtració, gel d'acrilamida-SDS i gradient de sacarosa (99, 129, 279).

Per una altra banda, Khandelwal i Zinman (175) purificaren una proteïna inhibidora de 15 Kd, estable al calor, a partir de fetge de conill. L'inhibidor no requeria estar fosforilat per inhibir l'activitat fosfatasa 1 (34 Kd), utilitzant fosforilasa com a substrat. Malgrat que el denominaren inhibidor-2, aquest inhibidor no afectava a l'activitat de la fosfatasa quan el substrat era glicogen sintasa, histona o caseïna. Goris i col. (121) aïllaren dos formes d'inhibidor-2 (denominades α i β) a partir de fetge de gos. Actualment hi ha evidències de la seva existència en nombrosos teixits de mamífers, com poden ser: fetge, teixit adipós, cor, pulmó de mamífers (235) i també hi ha evidències de la seva existència en altres espècies inferiors (102, 232, 243).

De Paoli-Roach i Lee (72) aïllaren l'inhibidor-2 a partir d'extractes de diafragma de ratolí, utilitzant anticossos específics. Comprovaren que l'inhibidor-2 estava associat a la fosfatasa dependent d'ATP-Mg, reforçant així les observacions publicades anteriorment per altres autors (234, 280). L'inhibidor-2 fosforilat "in vivo", immunoprecipitat i sotmés a electroforesi en SDS, presentava una única banda de fosforilació a 32 Kd. Els resultats obtinguts eren molt similars, tant si els extractes del teixit s'havien bullit a 100 °C, com si no, abans de la immunoprecipitació. En els dos casos, la intensitat de la banda radioactiva era similar, la qual cosa suggeria que el tractament a 100 °C, utilitzat en el procés de purificació de l'inhibidor-2, no l'afectava.

Al mateix temps, utilitzant una tècnica similar, Gruppuso i col. (129) observaren que l'inhibidor-2 era una proteïna de 60 Kd, que per escalfament a 100 °C, es convertia en l'inhibidor-2 de 31 Kd. Aquests autors, bulliren extractes crus de ronyó, de teixit adipós, de cor, de pulmó

i de fetge de conill, directament, en la dissolució de les mostres per sotmetre-les a una electroforesi en gel d'acrilalmida i SDS. Després de separar les bandes per electroforesi, detectaren la presència d'inhibidor mitjançant la tècnica de "Western immunoblotting". En tots els extractes, excepte el de fetge, on no es detectà, la banda antigènica mostrava un pes molecular de 60 Kd. Malgrat tot, aquests autors no pogueren convertir la banda de 60 Kd en la de 32 Kd mitjançant proteolisi limitada. Tampoc observaren activitat inhibidòria sobre la proteïna fosfatasa 1 associada a la banda de 60 Kd. Emprant tècniques similars, comprovaren que a mesura que s'anava degradant la banda de 60 Kd, per acció proteolítica de la tripsina, s'anava incrementant l'activitat fosforilasa fosfatasa dels extractes de múscul esquelètic de conill.

Aquests mateixos autors (37) comprovaren que al sotmetre extractes de múscul esquelètic de conill a un procés de filtració molecular en gel, obtenien una fosforilasa fosfatasa de 230 Kd; en la que, tant la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa 1 de 70 Kd, com l'inhibidor-2 de 60 Kd, podien ser detectats per "immunoblotting", utilitzant anticossos específics per a la fosfatasa 1 i per a l'inhibidor-2 de 60 Kd, respectivament. A partir d'aquests resultats, proposaren que la fosfatasa nativa estava composta per dos zones simètriques, contenint una d'elles la subunitat reguladora (inhibidor-2) i l'altra, la subunitat catalítica de la fosfatasa 1 de 70 Kd.

Recentment, el grup de Cohen ha determinat la seqüència aminoacídica de l'inhibidor-2. La proteïna està composta de 203 residus i té un pes molecular de 22.835 daltons (144).

Estudis cinètics amb inhibidor-2 homogeni, realitzats per Foulkes i col. (99, 103), demostraren que la inhibició produïda per l'inhibidor-2 sobre la fosfatasa 1, quan el substrat emprat era la glicogen fosforilasa "a", era de tipus competitiu i exhibia una K_i de 3.1 nM. També observaren que, al igual que l'inhibidor-1, l'inhibidor-2 inhibia la fosfoproteïna fosfatasa tipus 1, enfront a diferents substrats fosforilats i d'una forma similar en tots ells. Les concentracions d'ambdós inhibidors, per a produir un 50% d'inhibició, estaven a nivell nanomolar.

1.6.2.2 Efecte inhibitori i modulador

El grup de Cohen observà que l'activitat inhibidora no s'afectava per preincubació amb la quinasa dependent d'AMP cíclic, ni amb la GSK-3 i ATP-Mg. Aquest resultat eliminava la possibilitat de que l'inhibidor-1 fos una fracció proteolitzada de l'inhibidor-2. També mostraren que l'inhibidor-2 era fosforilable per la GSK-3 en un residu de treonina, i poc després, Aitken i col. (6) determinaren la seqüència del centre de fosforilació (Pro-Ser-Thr(P)-Pro-Tyr). Aquests mateixos autors mostraren que la seqüència determinada era similar a la del centre de fosforilació 3abc de la glicogen sintasa, fosforilada també per la GSK-3, però que en el cas de la glicogen sintasa el residu fosforilat era una serina.

La purificació a homogeneïtat de la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1, així com el coneixement de que el complex inactiu de 70 Kd el formaven l'inhibidor-2 i la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 (137, 234, 269), causà un gran desenvolupament en l'estudi d'aquest inhibidor. Així doncs, l'any 1984, estudis realitzats per diferents grups d'investigació (103, 166, 234,

263, 271) mostraren que la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1, posseïa dos llocs d'unió per a l'inhibidor-2. En el primer lloc, que mostrava una K_d de 0,1 nM, l'inhibidor-2 s'unia de forma que el complex format era activable per GSK-3. A altes concentracions ($K_d \approx 5$ nM) la proteïna s'unia a un segon lloc on produïa la inhibició de la fosfatasa, i les espècies formades no eren reactivables per la GSK-3. El grup de Merlevede demostrà que un cop activat el complex dependent d'ATP-Mg per la GSK-3 (ampliament desenvolupat en l'apartat 1.5.5.1) aquest, era inhibible per l'inhibidor-2 i, la inhibició, era causada per la unió de l'inhibidor a aquest segon lloc (278, 280).

Al mateix temps, De Paoli-Roach (73) comunicà que l'inhibidor-2, a més a més d'ésser fosforilat en el residu de treonina, per acció de la GSK-3, també podia ser-ho "in vivo" en un residu de serina. La proteïna quinasa que, amb tota probabilitat, catalitzava la fosforilació del residu de serina, era la caseïna quinasa II, ja que aquesta era capaç de fosforilar l'inhibidor-2 "in vitro" tant si aquest estava lliure, com si es trobava unit a la fosfatasa dependent d'ATP-Mg. Aquesta fosforilació sobre el residu de serina, per si sola, no produeix cap activació de la fosfatasa; però, l'acció de la caseïna quinasa II combinada amb concentracions subòptimes de GSK-3, provocaria un gran increment de la fosforilació induïda per la GSK-3, amb una activació concomitant de la fosfatasa.

De Paoli-Roach i Lee (72) demostraren que la incorporació de ^{32}P a l'inhibidor-2, aïllat de diafragma, es localitzava en un 90% en residus de serina i un 10% en residus de treonina. Aquest fet indicava que l'inhibidor-2 de diafragma de ratolí experimentava una fosforilació múltiple i que "in vivo", podia existir un sistema de

control de la fosfatasa dependent d'ATP-Mg, a través d'un mecanisme de fosforilació múltiple de l'inhibidor-2.

Tot seguit, el grup de Cohen reportà (6), que la quantitat de Pi incorporat a l'inhibidor-2 al ser incubat amb la GSK-3, durant un temps prolongat, era igual o inferior a 0,5 mol fosfat per mol de proteïna. Aquests mateixos autors demostraren que l'inhibidor-2 era desfosforilat, tant per les fosfatases-2A i -2B, com per la fosfatasa 1; i que aquesta reacció no es bloquejava ni per l'inhibidor-1, ni per l'inhibidor-2. Villa-Moruzzi i col. (271) assenyalaron que l'inhibidor-2 era fosforilable per la quinasa dependent d'AMP cíclic en major quantitat que amb la GSK-3 i que el centre de fosforilació d'ambdues quinases no era el mateix.

Agostinis i col. (2) han observat també que la desfosforilació de l'inhibidor per fosfatases tipus 2 és efectiva en els residus de [32 P]Ser fosforilats per la caseïna quinasa II de l'inhibidor prèviament o no desfosforilat. En canvi, la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg és totalment inefectiva. La presència de protamina estimula l'efecte desfosforilador de l'inhibidor per totes les proteïna fosfatases quan es tracta dels residus fosforilats per la caseïna quinasa.

Vandenheede i col. (269) recentment han demostrat que quan es tracta de la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1, l'inhibidor-1 i l'inhibidor-2 competeixen pel lloc d'inhibició, però aquest lloc no sembla ésser accessible a l'inhibidor-1 quan es tracte de l'enzim nadiu que conté l'inhibidor-2. Per tant, l'activació del complex dependent d'ATP-Mg per la GSK-3, implica un cicle de fosforilació i desfosforilació de l'inhibidor-2, procés que no es veu afectat per la presència de l'inhibidor-1, encara

que l'activitat fosforilasa fosfatasa resultant (de l'enzim autodesfosforilat) si és sensible a l'acció de l'inhibidor-1. Probablement l'autodesfosforilació de l'inhibidor-2, podria deixar lliure el lloc d'inhibició per a l'inhibidor 1. Segons això, la subunitat catalítica conté dos llocs d'unió de l'inhibidor-2 ja descrits anteriorment. El lloc d'inhibició estaria localitzat en el centre actiu de l'enzim, ja que s'ha demostrat, que ambdós inhibidors són desfosforilats per la subunitat catalítica en presència d'ions metàl·lics divalents.

Per una altra banda, si l'autodesfosforilació de l'inhibidor-2 no es impedita per l'inhibidor-1, això implicaria que l'inhibidor-2 s'uneix a la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg d'una forma específica diferent de la que aquesta proteïna fosfatasa s'uneix a altres substrats fosforilats i per tant l'autodesfosforilació de l'inhibidor-2 seria catalitzada per un altre centre actiu de l'enzim. Tots aquests resultats suggereixen controls autònoms i separats de l'activitat de la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg per l'inhibidor-1 i l'inhibidor-2.

El mateix grup de Merlevede (3), aquest mateix any, ha confirmat l'efecte potenciador de la caseïna quinasa II en l'activació de la fosfatasa dependent d'ATP-Mg per la GSK-3, observat anteriorment "in vivo" per De Paoli-Roach (72, 73), i ha reportat també que l'inhibidor-2 pot ésser fosforilat per la caseïna quinasa I. La fosforilació per la caseïna quinasa I impedeix la posterior activació de la fosfatasa per la GSK-3, encara que no afecta a l'activitat de l'enzim un cop activat. Aquests resultats suggereixen que la fosforilació catalitzada per la caseïna quinasa I de l'inhibidor-2 en un dels residus de serina (Ser 86), impedeix el canvi conformacional de la subunitat catalítica induït per la fosforilació de la GSK-3 en residus de

Thr-72. La diferència dels mapes peptídics obtinguts per fosforilacions "in vitro", catalitzades per la caseïna quinasa I i la caseïna quinasa II, indicava que el residu de Ser 86, molt poc fosforilat per la caseïna quinasa II, era ampliament fosforilat per la caseïna quinasa I. Els resultats obtinguts junt amb l'evidència de que "in vivo" (72, 73) el residu de Ser 86 és un dels residus més fosforilats, suggereixen que "in vitro" l'ocupació, és a dir, la fosforilació d'aquest "lloc d'inhibició" (Ser 86) de l'inhibidor-2 podria explicar la causa per la qual es difícil detectar l'activació de la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg per acció de la GSK-3 en extractes crus. A més a més, la fosforilació catalitzada per caseïna quinasa I podria controlar selectivament dos efectes fisiològics, però contraris de la GSK-3, com són l'activació de la fosfatasa i la fosforilació de la sintasa (212, 250).

1.6.2.3 Control hormonal

El fet de que l'activitat inhibidòria de l'inhibidor-2 fos poc afectada per un procés de fosforilació i desfosforilació i, el poc significat fisiològic que alguns autors donaven al baix grau de fosforilació d'aquesta proteïna per GSK-3, fou, segurament, la causa inicial de la poca quantitat de treballs realitzats en aquest camp. Des que es demostrà l'efecte modulador de l'inhibidor-2, junt amb el recent descobriment de que aquest pot ésser fosforilat per caseïna quinases potenciant o no l'activació de la fosfatasa 1 dependent d'ATP-Mg catalitzada per GSK-3, el tema ha adquirit un gran interès.

Estudis realitzats darrerament "in vivo" per Lawrence i col. (194) en cèl·lules del teixit adipós, mitjançant la utilització d'anticossos específics enfront l'inhi-

bidor-2, han mostrat un augment d'un 40% en la fosforilació de l'inhibidor-2 per acció de la insulina. L'increment de fosforilació era causat per un augment de l'activitat caseïna quinasa II. D'altra banda, l'observació "in vivo" de que l'inhibidor-2 és fosforilat de forma sinèrgica per la caseïna quinasa II i la GSK-3, fa pensar en un possible mecanisme de control hormonal d'activació de la fosfatasa 1 a través de la fosforilació de l'inhibidor-2 per aquesta proteïna quinasa.

1.6.3 Altres inhibidors

1.6.3.1 DARPP-32

Hemmings i col. (139, 140) han reportat que el DARPP-32 (fosfoproteïna regulada per dopamina i AMP cíclic) és una proteïna estable al calor i resistent a tractaments àcids, localitzada en les neurones del gangli basal de cervell de mamífers. Es un monòmer que presenta un gran contingut en àcid glutàmic/glutamina, prolina i un baix contingut en àcids hidrofòbics.

Aquesta proteïna és fosforilable per la quinasa dependent d'AMP cíclic i la quinasa dependent de GMP cíclic, que la fosforilen exclusivament en un residu de treonina. Malgrat la gran similitud que presenta aquest inhibidor amb l'inhibidor-1, estudis realitzats sobre la seqüència del centre de fosforilació i sobre les cinètiques d'incorporació de fosfat, demostren certes diferències respecte els estudis realitzats sobre l'inhibidor-1 i el substrat G, la qual cosa suggerieix que aquest inhibidor és diferent dels anteriors esmentats.

1.6.3.2 Substrat G

En cervell de conill, Aswad i Greegard (11, 12) trobaren una proteïna, denominada substrat G, fàcilment fosforilable per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Aquesta proteïna era un monòmer de 23 Kd de pes molecular, i presentava una gran similitud amb l'inhibidor-1 en la composició aminoacídica i en el pes molecular. Ambdues proteïnes eren fosforilades en residus de treonina, millor que en els de serina, i es desfosforilaven per acció de la fosfatasa tipus 1 en presència de Mn^{2+} . També presentaven activitat inhibidòria sobre la fosfatasa 1 enfront a diferents substrats fosforilats.

Posteriorment, Hemmings i col. (139, 140) han observat que la seqüència aminoacídica de l'entorn del centre de fosforilació és molt similar a la de l'inhibidor-1 i a la del DARPP-2, però petits canvis en aminoàcids puntuals d'aquest centre, es tradueixen en un comportament cinètic diferent pel que fa a la incorporació de fosfat catalitzada per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i, de la proteïna quinasa dependent de GMP cíclic, la qual cosa fa pensar que es tracta d'inhibidors diferents.

1.6.4 Desinhibidor

1.6.4.1 Localització i estructura

Aquesta proteïna desinhibidora fou primerament detectada en partícules de glicogen de fetge i descrita pel grup de Merlevede l'any 1977. Aquesta proteïna era estable al calor i sensible a la tripsina i, impedia l'activitat inhibidòria dels inhibidors -1 i -2 enfront la fosfatasa

tipus 1. Aquest mateix grup, l'any 1984 l'obtingué homogènia a partir de fetge de gos, amb un rendiment de 14 µg per 100 g de teixit (124, 126) i, també s'ha observat la seva presència en múscul esquelètic de conill (127). El pes molecular en gels d'acrilamida-SDS és de 8.300 daltons.

Malgrat que aquesta proteïna ha estat poc estudiada, s'ha demostrat que no solament protegeix a la proteïna fosfatasa 1 dependent d'ATP-Mg de l'acció de l'inhibidor-1, sinó que també és capaç de revertir el seu efecte inhibitori (123). Pel que fa a l'inhibidor-2, s'ha observat que és capaç d'impedir l'acció d'aquest, però no reverteix l'acció inhibitoria (126).

Goris i col. (124) observaren que aquesta proteïna desinhibidora potenciava l'acció activadora de la GSK-3 i augmentava l'activitat de la fosfatasa vers l'inhibidor-1, igual que succeeix amb el Mn^{2+} (123).

1.6.4.2 Regulació

Recentment, Goris i col. (125) han demostrat que és una proteïna fosforilable per acció de la quinasa dependent d'AMP cíclic, la qual cosa condueix a una pèrdua d'activitat desinhibidora, recuperable per un altra part, per acció de la fosfatasa 2A. El fet de que la incorporació de grups fosfats (0,02 mol Pi / mol proteïna) estigui a tant baix nivell, posa en dubte la seva significància fisiològica.

La presència de la proteïna desinhibidora o altres proteïnes amb funció similar, per exemple el component G de la proteïna fosfatasa 1 aïllada de les partícules del glicogen, de la qual hi ha evidències que podria ser el precursor del desinhibidor (256), explicarien la causa per

La qual la proteïna fosfatasa 1, purificada del glicogen, mostra una gran insensibilitat als inhibidors-1 i -2 (123, 178, 179, 256).

Cal remarcar que seria necessari la realització de nous estudis sobre la seqüència aminoacídica d'aquestes proteïnes (desinhibidor i component G) per esbrinar si l'una és realment precursora de l'altra. A més a més, un major conèixement de la regulació de llur activitat, acturaria la possible relació de les diferents formes de proteïna fosfatasa 1 existents en un mateix teixit, i que actualment es consideren diferents pel sol fet d'estar localitzades en les distintes subfraccions cel·lulars.

1.7 REGULACIO DEL SISTEMA BICICLIC DE L'HMG-CoA REDUCTASA

Un cop establert l'existència d'un sistema bicíclic, en el que participen una sèrie d'enzims responsables de l'estat d'activitat de l'HMG-CoA reductasa, es fa necessari conèixer quins són els mecanismes de regulació d'aquests enzims i a través de quines senyals metabòliques responen a les diferents necessitats cel·lulars. Una de les principals vies de regulació podria estar relacionada amb l'acció hormonal, com s'exposa a continuació .

1.7.1 Regulació per hormones

Estudis realitzats en hepatòcits, emprant concentracions fisiològiques de glucagó o insulina, posaven en evidència canvis en l'estat d'activació de la reductasa, es a dir, el glucagó estimulava l'expressió de l'activitat reductasa, i la insulina la deprimia (155). En tots els casos els canvis d'activitat de la reductasa es traduïen en canvis en la velocitat de síntesi d'esterols.

Profunditzant més en el tema, Beg i col. (21) demostraren que el glucagó "in vivo" produeix un augment de l'activitat reductasa quinasa; la qual cosa conduïa a un augment del grau de fosforilació de l'HMG-CoA reductasa i de la seva activitat.

Els treballs publicats en relació a l'efecte de la insulina sobre l'estat d'activació de l'HMG-CoA reductasa són bastant escassos i contradictoris. Ultimament, Easom i Zammit (80, 81) assignaren a la insulina la responsabilitat del manteniment dels dos sistemes cíclics que mantenen el ritme circadià de l'HMG-CoA reductasa, afectant tant a la síntesi com a la fosforilació de l'enzim.

Els resultats obtinguts fins ara, interpretats d'acord amb el sistema bicíclíc descrit, indiquen que el glucagó estimula la fosforilació de l'HMG-CoA reductasa i la reductasa quinasa, mentre que la insulina activa la desfosforilació d'ambdós enzims. Per tant, hi ha evidències experimentals del funcionament del sistema bicíclíc de regulació i de la seva resposta a les senyals endocrines.

Pel que fa referència al mecanisme d'acció, representat en l'Esquema V i proposat per Beg i col. (24, 26), s'ha acceptat que el glucagó actua mitjançant l'AMP cíclic (63). Donat que la reductasa quinasa ha sigut descrita com un enzim independent d'AMP cíclic (20, 30, 158, 221), excepte en alguns casos (20); fa pensar que són les proteïna fosfatases les efectores de l'acció hormonal.

Hom creu que el glucagó actua mitjançant la quinasa dependent d'AMP cíclic, la qual catalitza la fosforilació de l'inhibidor-1 (5, 98, 100, 101, 216). Aquest, un cop fosforilat, inhibiria la fosfatasa 1 i, la inhibició d'aquesta fosfatasa produiria una resposta coordinada d'activació de la reductasa quinasa i inactivació de l'HMG-CoA reductasa, que amplificaria la senyal biològica.

El mecanisme d'acció de la insulina sobre el sistema bicíclíc és desconegut. S'ha suggerit però, que en una possible acció mitjançant la proteïna fosfatasa 1, la insulina actuaria activant-la mitjançant la GSK-3, tal com s'ha explicat ampliament en l'apartat 1.5.5.1.

Encara que els mecanismes descrits, no estan plenament demostrats, les evidències existents apunten a que el paper de les proteïna fosfatases i dels seus inhibidors o moduladors en la regulació del sistema bicíclíc és de gran importància.

1.7.2 Regulació per esterols i mevalonat

Des de fa temps es coneix que el colesterol i els seus derivats oxigenats, així com el mevalonat i els seus derivats, exerceixen un control negatiu sobre l'HMG-CoA reductasa modificant la quantitat d'enzim (40, 86, 90); no obstant això, són varis els grups d'investigació que creuen que aquests compostos també tenen un efecte regulador a curt plaç, a través d'una modificació de l'estat de fosforilació de l'HMG-CoA reductasa.

Arebalo i col. (9) observaren en rates alimentades amb una dieta rica en colesterol, que l'activitat HMG-CoA reductasa era inactivada reversiblement durant els primers 60 min de tractament, i de manera no reversible a partir de les dues hores. Aquests mateixos autors demostraren també que l'administració intragàstrica de mevalonat produïa efectes similars, i proposaren que l'efecte reversible provocat pel mevalonat i el colesterol era una primera resposta, que donava lloc a una sèrie de mecanismes reguladors que conduïen a un augment de la degradació de l'enzim.

Beg i Brewer (23) demostraren que la disminució de l'activitat de l'HMG-CoA reductasa en els primers 20 min, després de l'administració de mevalonat a rates per via nasogàstrica era deguda fonamentalment a un increment de la fosforilació de l'HMG-CoA reductasa. L'administració de colesterol per la mateixa via, causava una inactivació reversible de l'HMG-CoA reductasa durant 75 min. Aquests resultats confirmaven i ampliaven els presentats anteriorment.

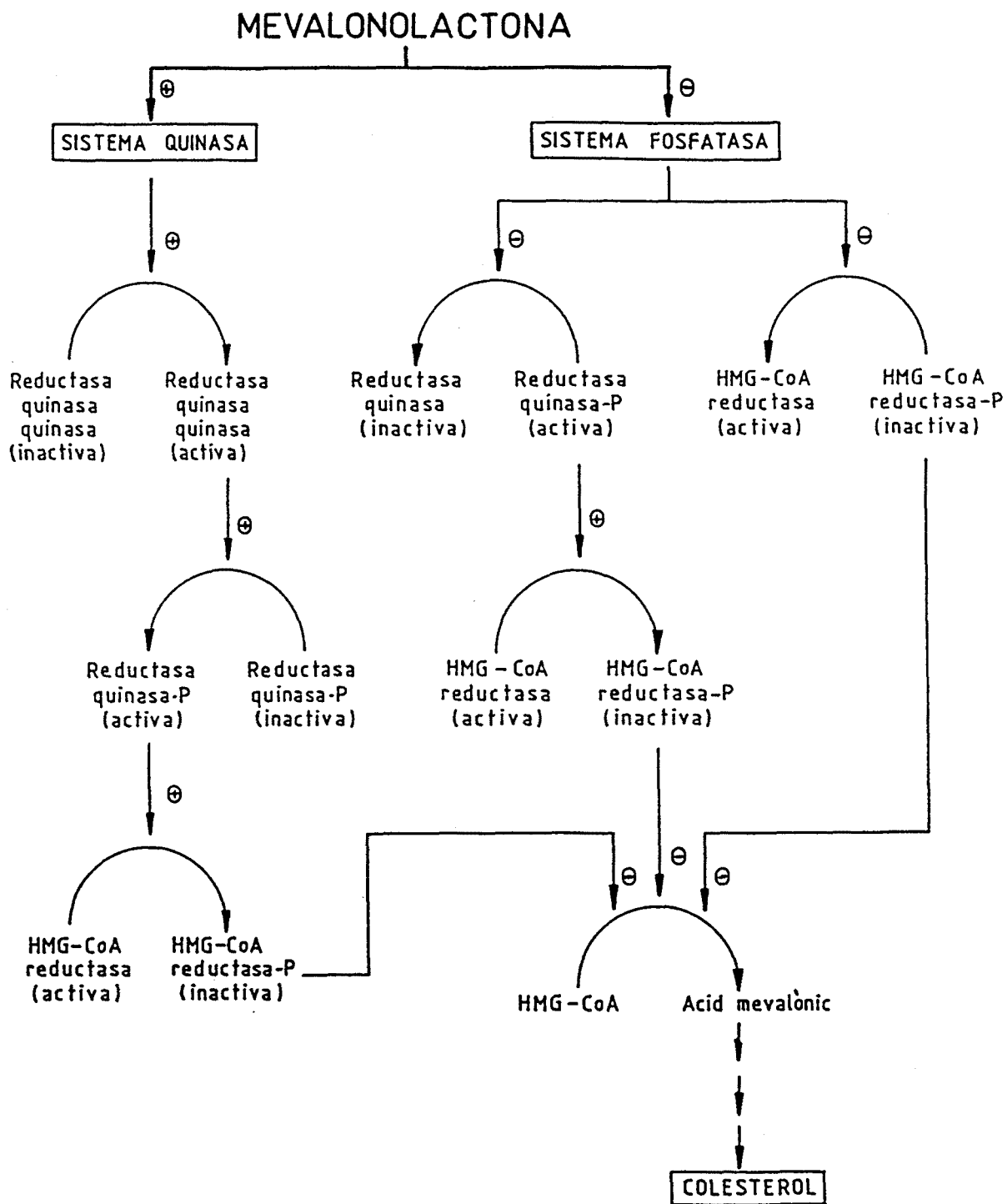
L'efecte del mevalonat s'ha estudiat també en sistemes d'hepatòcits aïllats de rata (111, 227), obser-

vant-se al cap de 15 min, que l'activitat HMG-CoA reductasa estava fortament inhibida; ara bé, de manera reversible. D'altra banda, observacions prèvies mostraven que les activitats reductasa fosfatasa i HMG-CoA reductasa no s'alteraven per acció directa del mevalonat, la qual cosa suggeria que els efectes observats eren causats per algun producte produït durant el metabolisme del mevalonat, entre els quals destaquen els nombrosos compostos pirofosfatats (214).

Estudis sobre l'efecte de mevalonat a curt plaç sobre l'activitat reductasa, indicaven que el component del sistema bicíclic a través del qual s'efectuava l'efecte, era la(s) proteïna(s) fosfatasa(s) que actuava sobre l'HMG-CoA reductasa i reductasa quinasa. Estudis més recents realitzats per Beg i col. (25, 26) (Esquema VIII) impliquen directament en aquest mecanisme a la reductasa quinasa i a la reductasa quinasa quinasa, les quals actuarien per dos mecanismes diferents:

a) Per acció del mevalonat es produiria un augment de l'activitat reductasa quinasa quinasa, que catalitzaria la fosforilació de la reductasa quinasa incrementant-li l'activitat i en conseqüència s'augmentaria la quantitat d'HMG-CoA reductasa inactiva, sense modificar la concentració. Encara que Marrero i col. (206) han demostrat "in vivo" que un increment en la fosforilació de l'enzim induïx un augment de la degradació de la proteïna nativa.

b) D'altra banda, l'acció del mevalonat causaria un efecte inhibitor sobre les proteïna fosfatases, provocant un augment de les formes fosforilades de la reductasa quinasa i de l'HMG-CoA reductasa que conduiria en definitiva a una disminució de l'activitat HMG-CoA reductasa i de formació de mevalonat (173).



ESQUEMA VIII. MODEL DE REGULACIO DEL SISTEMA BICICLIC DE L'HMG-CoA REDUCTASA PER MEVALONOLACTONA

El mecanisme pel qual el mevalonat condueix a una inhibició de l'activitat fosfatàsica no es coneix. Alguns autors especulen que la inhibició estaria causada per derivats metabòlics del mevalonat, o bé, per acció "in vivo" dels inhibidors -1 i -2, que modulen l'activitat fosfatasa, tal com ha estat demostrat en altres sistemes de fosfoproteïnes.

Els estudis anteriors, realitzats pels diferents Laboratoris, indiquen que la regulació de l'activitat de l'HMG-CoA reductasa per fosforilació i desfosforilació, és un mecanisme de control de relevant importància fisiològica. La fosforilació i desfosforilació de la reductasa produeix canvis ràpids de l'activitat, en resposta a estímuls dietaris, hormonals o farmacològics, en temps inferiors a 30 min. Aquestes variacions són habitualment transitòries, donat que al cap d'un temps màxim de 2 h, l'estat d'activació de la reductasa torna als seus valors normals, però permeten a les cèl·lules ajustar ràpidament llur velocitat de síntesi d'esterols, sovint com una preparació a una resposta posterior més lenta i permanent, mitjançant canvis en els nivells de proteïna enzimàtica. Un cop la cèl·lula ha adaptat d'una forma permanent la seva velocitat de síntesi d'esterols a la nova condició fisiològica, l'estat de l'HMG-CoA reductasa torna aparentment als seus nivells normals, esperant l'arribada de nous estímuls.

2. MATERIALS I METODES

2.1 REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS

Els reactius i productes utilitzats en aquest treball i la firma comercial de procedència són els següents.

2.1.1 Reactius generals

"BIO-RAD LABS"

Acrilamida; agarosa; blau de Coomassie R-250; N,N'-dimetil-bisacrilamida; persulfat amònic; SDS; TEMED.

"KOCH-LIGT"

Acetona; bencè; naftalè.

"MERCK"

Acetat magnèsic; àcid acètic; bicarbonat sòdic; n-butanol; carbonat sòdic; citrat trisòdic; clorur càlcic; clorur manganós; clorur magnèsic; clorur potàsic; clorur sòdic; DCCI; deoxicolat sòdic; èter etílic; etanodiol; etanol; fluorur potàsic; fluorur sòdic; fosfat monopotàsic; glicerol-2-fosfat sòdic; glicilglicina; glucosa; hidròxid potàsic; hidròxid sòdic; àcid malic; 2-mercaptoetanol; piruvat sòdic; sacarosa; sulfat amònic; sulfat sòdic; tartrat sòdic-potàsic; trietilamina; trietanolamina.

"PANREAC"

Isopropanol; llana de vidre; metanol; NORIT-A; toluè; àcid tricloroacètic; urea.

"SIGMA CHEMICAL Co."

ADP, sal disòdica; AMP àcid; AMPc; ATP, sal disòdica; blau de bromfenol; Bistris; Brij 35; cafeïna anhidra; coenzim A; DTT; EDTA, sal disòdica; EGTA, sal disòdica; etilenglicolmonometil èter; glicerol; glicerol-1-fosfat

sòdic; glucosa-6-fosfat, sal monosòdica; glucosa-1-6-difosfat; àcid hidroximetil glutàric; histona tipus IIA; àcid malònic; mevalonolactona; NAD^+ ; NADP^+ ; àcid oxalacètic; PPD;

2.1.2 Preparacions enzimàtiques comercials i proteïnes marcadores

"BOEHRINGER"

Citrat sintasa; 3-fosfoglicerat quinasa; gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa; glicerol-3-fosfat deshidrogenasa; triosa fosfat isomerasa.

"SIGMA CHEMICAL Co."

Albúmina bovina, fracció V; glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; lactat deshidrogenasa; mioglobina; ovoalbúmina; pirofosfatasa inorgànica, de llevat; proteïna quinasa dependent d'AMPc, de conill; Inhibidor de proteïna quinasa dependent d'AMPc, de conill.

2.1.3 Reactius per a cromatografia

"BIO-RAD LABS"

Affi-Gel Blue; Bio-Gel A 0.5m; Hidroxiapatita.

"GELMAN INSTRUMENT Co."

Paper de cromatografia ITLC tipus S.G.

"MERCK"

PEI-cel·lulosa F cromatofolio PL; Silica-Gel HF₂₆₄₊₃₆₄ tipus 60.

"PHARMACIA FINE CHEMICALS"

Agarosa-hexano-HMG-CoA; Aminohexil-Sepharosa 4B; Blue sepharosa CL-6B; DEAE-sephadex; Sephadex G-100; Sephadex G-75; Sepharose 4B.

"WHATMAN"

DEAE-cel·lulosa DE-32; Fosfocel·lulosa P-11; paper de cromatografia 3MM.

2.1.4 Productes radioactius

"RADIOCHEMICAL CENTER, AMERSHAM"

3-hidroxi-3-metil[3-¹⁴C]glutàric, àcid; 3-hidroxi-3-metil[3H]glutàric, àcid; [³²P]PO₄H₃.

2.1.5 Productes per a autorradiografia

"AGFA-GEVAERT"

Revelador per a autorradiografia, tipus G 150; fixador per a autorradiografia, tipus G 334.

"VALCA"

Plaques per a autorradiografia, tipus Ràpida 90.

2.1.6 Síntesi d'HMG-CoA

El R,S 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzim A, substracte de l'enzim HMG-CoA reductasa, es sintetitzà en el nostre Laboratori a partir de l'àcid 3-hidroxi-3-metil glutàric i del Coenzim A, seguint una modificació de Goldfarb i Pitot (119). Una descripció detallada del mètode operatiu de la síntesi s'exposa a continuació.

El R,S 3-hidroxi-3-metil[3- 14 C]glutaril Coenzim A i el R,S 3-hidroxi-3-metil[3 H]glutaril Coenzim A es sintetizaren a partir de 500 μ Ci de l'àcid 3-hidroxi-3-metil[3- 14 C]glutàric i de 500 μ Ci de l'àcid 3-hidroxi-3-metil[3 H]glutàric, respectivament. La síntesi d'ambdós substrats es realitzava seguint la mateixa metodologia.

A 500 μ Ci d'àcid 3-hidroxi-3-metil[3- 14 C]glutàric (1,56 mg) s'afegien 31,04 mg del mateix àcid no radioactiu i es dissollien en 2 ml d'acetona anhidra. Tot seguit, s'addicionaven 2 ml d'una solució d'acetona que contenia 82,8 mg de DCCI. La mescla s'incubava durant dos hores a 37 °C i s'agitava de forma intermitent. El DCCI, en aquestes condicions, provoca la pèrdua d'una molècula d'aigua per cada dos molècules d'àcid, transformant-lo en un anhidrit y produint diciclehexilurea com a producte secundari.

Passat el temps d'incubació, la mescla es refredava en un bany de gel i es filtrava per paper de filtre per eliminar el precipitat de la diciclehexilurea. El paper de filtre es rentava varies vegades amb acetona anhidra. Els líquids del filtrat es reunien i s'evaporaven fins a sequetat amb un corrent de nitrogen i a 37 °C de temperatura.

Al residu sec se li adicionaven 4 ml d'una solució de bicarbonat sòdic 0,2 N a pH 8,0; que contenia 200 mg de coenzim A. La mescla es mantenia en un bany de gel durant 30 min i tot seguit es deixava 1 hora a temperatura ambient amb una agitació intermitent. A continuació, es portava el pH de la dissolució fins a 3,5 per addició de HCl 1N.

La separació del producte de reacció, el [3- 14 C]-HMG-CoA, dels demés components de la mescla, es duia a

terme mitjançant una cromatografia descendent sobre un paper Whatman 3 MM. La fase mòvil utilitzada fou una mescla composta de n-butanol: àcid acètic: aigua, en proporcions 5:2:3 (v:v:v). La cromatografia es realitzava en una cubeta de vidre prèviament saturada de dissolvent. La duració de la cromatografia que es desenvolupava a temperatura ambient, era aproximadament de 12 hores.

Acabada la cromatografia, el paper s'assecava y es tallaven dos tires de 2 mm d'amplada que corresponien a ambdós laterals del paper, els quals es dividien en fragments d'1 cm de longitud. Aquests es col·locaven en vials que contenien 5 ml d'una solució d'escentil·lació de toluè amb PPO al 0,5% (p/v) i, se'n mesura la radioactivitat. El producte sintetitzat es localitzava en una posició corresponent a un Rf que està comprès entre 0,23 i 0,40, mentre que l'àcid marcat i que no havia reaccionat es localitzava en un Rf comprès entre 0,84 i 0,93.

Localitzada la zona de paper que contenia el [3-¹⁴C]HMG-CoA, es tallava en tires de 3,5 cm d'amplada que es sotmetien a una cromatografia ascendent amb aigua destil·lada, per concentrar tot el producte en l'extrem superior del paper. Aquests extrems es retallaven i se'n eluïa el producte mitjançant diferents rentats amb aigua destil·lada i posterior centrifugació. D'aquesta forma s'obtenia la quasi totalitat del [3-¹⁴C]HMG-CoA sintetitzat.

El R,5 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A (no marcat radioactivament) es sintetitzava de forma similar, però en aquest cas, l'àcid de partida no estava marcat radioactivament.

Per poder ésser utilitzats aquests substrats en l'assaig enzimàtic, el [3-¹⁴C]HMG-CoA, [³H]HMG-CoA i HMG-

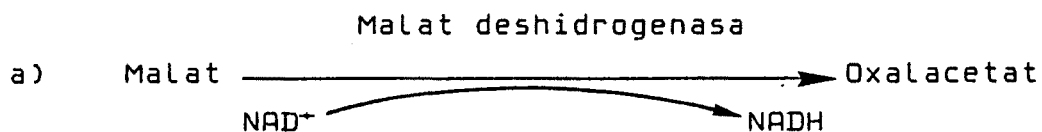
CoA obtinguts en els processos de síntesi, fou necessari realitzar una valoració de la concentració a la que s'obtenien.

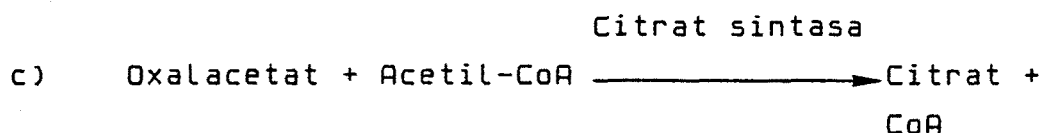
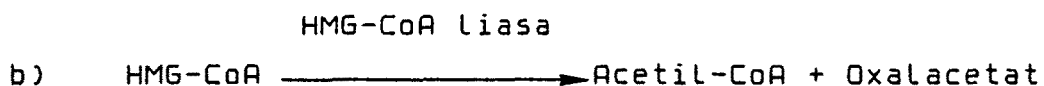
2.1.6.1 Valoració espectrofotomètrica de l'HMG-CoA

La valoració del producte sintetitzat en l'aparat anterior s'efectuava seguint una modificació del mètode de Knappe (187).

Es dipositaven en dos cubetes espectrofotomètriques de 1 cm de pas de llum la següent solució: 0,2 ml de Tris/HCl 1 M pH 8,0; 0,5 ml de $MgCl_2$ 0,2 M; 0,1 ml de malat 0,1 M; 0,05 ml de NAD^+ 0,03 M; 0,02 ml de DTT 0,17 M i 0,48 ml d'aigua destil·lada. Ambdues cubetes s'introduïen en un espectrofotòmetre de doble feix de llum (Beckman DB-6T) i es mesura l'absorbància a 334 nm.

L'aparell s'ajustava a zero i a la cubeta problema se li adicionava 0,01 ml de malat deshidrogenasa que donava lloc a un augment bruscat de l'absorbància. Tot seguit, 0,05 ml d'una preparació d'HMG-CoA liasa, obtinguda tal com es descriu en l'aparat següent, i 0,05 ml de citrat sintasa que produïa un segon augment de l'absorbància causat per la coloració de l'HMG-CoA liasa utilitzada. Quan l'absorbància s'estabilitzava, s'addicionaven 0,03 ml de la dissolució d'HMG-CoA que es volia valorar. A partir d'aquest moment, es produïa un increment lent de l'absorbància causat per la progressiva formació de NADH. La reacció es mostra en l'esquema següent:





Els resultats obtinguts s'aplicaven a l'expressió següent:

$$\text{HMG-CoA (mg/ml)} = \frac{E_2}{3,3} \left(1 + \frac{E_1}{E_1 - E_2} \right) \frac{911}{v}$$

E_1 = augment de l'absorbància produïda a l'addicionar la malat deshidrogenasa.

E_2 = augment de l'absorbància produïda a l'addicionar l'HMG-CoA a valorar.

v = volum de la mostra a valorar que s'assaja, expressada en μl .

El factor 3,3 inclou el coeficient d'extinció molar del NADH i les transformacions necessàries per que el resultat pugui ésser expressat en mg/ml d'HMG-CoA.

El factor 911 corresponent al pes molecular de l'HMG-CoA.

Per a quantificar la radioactivitat del producte sintetitzat, en el cas del $[3\text{-}^{14}\text{C}]\text{HMG-CoA}$, es dipositava una alíquota de 10 μl en un paper de filtre Whatman 31 ET que, un cop sec, s'introduïa en un vial d'escentil·lació que contenia 5 ml de toluè i PPO al 0,8% (p/v). En el cas de tractar-se del $[^3\text{H}]\text{HMG-CoA}$, s'introduïen directament 10 μl de la mostra en un vial d'escentil·lació que contenia 10 ml d'una solució de toluè:tritò 2:1 (v:v) i PPO al 0,8% (p/v). La radioactivitat es mesura en un comptador d'escentil·lació líquid (LKB).

Per a ésser utilitzats en l'assaig enzimàtic, els substrats, [3-¹⁴C]HMG-CoA i [³H]HMG-CoA, s'ajustaven a una concentració aproximada de 2,2 mg/ml i una radioactivitat específica entre 3.500 i 4.000 cpm/nmol.

2.1.6.2 Preparació de l'HMG-CoA liasa

Una rata de 200 g de pes es sacrificava per degollament i se li extreia el fetge. Tot seguit, s'homogeneïtzaven 8 g de fetge amb 80 ml d'una solució d'acetona anhidra freda (-20 °C), en un homogeneïtzador tipus "Potter-Elvehjem" provist d'un pistil de tefló.

L'homogeneïtzat es filtrava ràpidament al buit amb un embut provist d'una placa filtrant i es rentava varies vegades amb acetona anhidra i freda. Tot seguit es rentava amb 10 ml d'èter exent de peròxids i, es prosseguia la filtració fins obtenir un pols sec, que mantenia l'activitat HMG-CoA liasa durant dos mesos si es guardava a 4 °C i en presència d'un dessecador.

En el moment d'utilitzar-la, l'HMG-CoA liasa s'extreia d'1 g de pols cetònic mitjançant 10 ml d'una solució que contenia fosfat sòdic 0,05 M pH 7,5. La suspensió es centrifugava en una centrifugadora tipus "Eppendorf" durant 2 min a 10.000×g i el sobrenedant s'utilitzava per a valorar l'HMG-CoA.

2.1.7 Síntesi de [γ-³²P]ATP

El [γ-³²P]ATP es sintetitzà en el nostre Laboratori seguint el mètode descrit per Walseth i col. (274) modificat per Palmer i Avruch (225), mitjançant [³²P]PO₄H₃ i ADP.

La reacció es duia a terme en el mateix vial on anaven 10 mCi de $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$ dissolts en 1 ml d'aigua. S'hi adicionaven 0,35 ml d'una mescla de substrats que contenia: Tris/HCl 322 mM pH 9,0; NAD^+ 3,4 mM; ADP 0,2 mM; glicerol-1-fosfat 0,6 mM; DTT 28 mM; MgCl_2 50 mM i piruvat sòdic 4,2 mM.

Paral·lelament, es preparava una mescla d'enzims, que contenia 35 μl (12 U) de glicerol-3-fosfat deshidrogenasa, 1 μl (10 U) de triosa fosfat isomerasa, 20 μl (16 U) de gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, 2 μl (9 U) de 3-fosfat glicerat quinasa, 20 μl (45 U) de lactat deshidrogenasa i 32 μl de sulfat amònic 3,2 M. D'aquesta mescla se n'adicionaven 30 μl a un tub d'assaig que contenia 21 μl de Tris/HCl 0,5 M, pH 9; 12 μl de DTT 0,1 M i 147 μl d'aigua destil·lada.

La reacció de síntesi d'ATP s'iniciava quan 150 μl de la mescla preparada s'adicionaven al vial que contenia el $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$ i els 350 μl de solució amortidora ja descrita. El vial s'incubava a temperatura ambient durant 30 min.

La separació del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ del $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$ residual es realitzava mitjançant una cromatografia en carbonat de DEAE-cel·lulosa. Aquesta resina s'havia preparat prèviament, mantenint durant dues hores, en contínua agitació, DEAE-cel·lulosa en una dissolució saturada de bicarbonat sòdic.

La mescla de reacció s'aplicava a la columna de carbonat de DEAE-cel·lulosa de 5 ml, recuperant tot el contingut del vial amb un rentat amb 10 ml d'aigua destil·lada que tot seguit s'aplicaven a la columna. El fosfat eluïa al rentar la columna amb 15 ml de carbonat de trietilenamina

0,1 M i el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ amb 20 ml de carbonat de trietil·lenamina 1,2 M.

El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ obtingut es liofilitzava per a poder-lo utilitzar posteriorment. Acabada la síntesi es comprovava la puresa de l'ATP sintetitzat. Per tant, es sembraven dos alíquotes, una de la preparació obtinguda i una altra del fosfat de partida que a la vegada servia de control, sobre una placa de 4x20 cm de PEI-cel·lulosa F cromatofoli PL de 0,1 mm. Seguidament, es realitzava una cromatografia ascendent utilitzant com a fase líquida una dissolució de LiCl 0,7 M i àcid formic 2 M. La cubeta utilitzada era de vidre i prèviament a la cromatografia s'havia saturat de dissolvent. La cromatografia es desenvolupava a temperatura ambient durant 2 o 3 hores i un cop finalitzada, es deixava assecar el paper a temperatura ambient.

La detecció de la radioactivitat del ^{32}P es realitzava per autorradiografia. El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ es localitzava en un R_f de 0,21 mentre que el fosfat es visualitzava en un R_f de 0,8. El rendiment obtingut oscil·lava entre 80 i 90%.

2.2 ANIMALS UTILITZATS

2.2.1 Rates

Les rates utilitzades foren de la raça Sprague[®] Dawley subministrades desinteressadament pels Laboratoris Ferrer Internacional, S.A.. Els animals tenien una edad entre deu i divuit setmanes i un pes de 200 a 250 grams.

Per tal de mantenir-les en les condicions més adients, es varen instal·lar en el estabulari del Departament de Bioquímica on es mantingueren a una temperatura constant de 22 °C. L'alimentació era amb pinso "Rata-ratolí" i amb accés a aigüa potable "ad libitum".

Les rates utilitzades per a l'obtenció de l'HMG-CoA reductasa es van sotmetre a un cicle artificial de llum on el període lluminós es mantenia des de les 15 hores fins a les 3 hores, i el període d'obscuritat des de les 3 hores fins a les 15 hores. Així, s'obtenia un màxim d'activitat HMG-CoA reductasa sis hores després de l'inici de la fase obscura, moment en el que les rates eren sacrificades. El període previ d'adaptació a aquestes condicions sempre fou de deu o més dies.

Cinc dies abans d'ésser sacrificades les rates, es separaven en gàbies individuals per a evitar el "stress" que produeix la presència d'altres animals dins una mateixa gàbia, obtenint-se així, un percentatge més elevat de solubilització de l'enzim HMG-CoA reductasa. A més a més, durant aquets cinc dies previs al sacrifici, les rates s'alimentaven amb el pinso abans esmentat i un 5% (P/P) de colestiramina, cedida amablement pels Laboratoris Rubió de Barcelona. L'activitat HMG-CoA reductasa de les rates

alimentades amb colestiramina és, aproximadament, cinc vegades superior a la de les rates on aquesta no s'inclou en la dieta.

2.2.2 Conills

Els conills utilitzats per a la purificació d'enzims foren mascles del tipus "New Zeland". Els animals es sacrificaven després d'una setmana d'adaptació a l'establari de la Facultat de Medicina on l'alimentació fou adequada i completa fins el darrer moment.

2.3 DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT DELS DIFERENTS ENZIMS

2.3.1 Determinació de l'activitat HMG-CoA reductasa utilitzant com a substrat [³H]HMG-CoA

La mesura de l'activitat HMG-CoA reductasa es realitzava utilitzant substrats marcats radioactivament, amb triti o amb carboni 14. La principal diferència entre ambdós mètodes està basada en la separació del producte format durant la reacció, tal com es descriu a continuació. En la majoria dels experiments realitzats s'emprava el substrat tritiat, utilitzant el substrat marcat amb carboni 14 per a la confecció de taules de purificació.

L'activitat HMG-CoA reductasa utilitzant [³H]HMG-CoA fou determinada mitjançant una modificació del mètode de "repartiment entre fases" descrit per Philip i Shapiro (231). La reacció enzimàtica en la que es basa aquest mètode, és la conversió de l'HMG-CoA en àcid mevalònic, reacció catalitzada per l'enzim HMG-CoA reductasa, que comporta la cessió de quatre electrons a partir de dos molècules de NADPH. L'activitat HMG-CoA reductasa es determinava per quantificació de la mevalonolactona (MVL) tritiada formada a partir del [³H]HMG-CoA.

Abans de la realització de l'assaig calia incubar l'HMG-CoA reductasa durant 30 min a 37 °C per tal de recuperar la pèrdua d'activitat produïda pel fred. A continuació es seguia l'esquema operatiu següent: s'incubaven quantitats de 0,22 µg en un volum de 50 ml amb 60 µl d'una dissolució que contenia 25 µmols de Tris/HCl a pH 7,2 ; 0,6 U de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; 6 µmols de EDTA; 6 µmols de glucosa-6-fosfat; 0,5 µmols de DTT; 0,3 µmols de NADP i 0,6 µg d'albúmina. Aquesta primera incubació es

realitzava durant 30 min en un bany a 37 °C per a eliminar l'HMG-CoA no marcat lligat a la reductasa purificada, ja que l'enzim s'elueix de l'última columna del procés de purificació amb HMG-CoA.

La reacció enzimàtica començava afegint-hi 10 µl (11,2 µg) de [³H]HMG-CoA (3.500-4.000 cpm/nmol); s'agitava i es deixava incubant a 37 °C durant 15 min. Per aturar la reacció s'hi afegien 40 µl de HCl 2,5 N. Seguidament, la mescla s'incubava a 50 °C durant 10 min per transformar el mevalonat format en la reacció en mevalonolactona (forma lactonitzada del mevalonat) i hidrolitzar l'HMG-CoA en àcid HMG i CoA. Les diferents propietats de la mevalonolactona i l'àcid HMG faciliten la seva posterior separació.

Per a la separació de la mevalonolactona tritiada de l'àcid HMG tritiat no transformat, es va seguir el mètode ja citat de Philip i Shapiro (231). En primer lloc es centrifugaven els tubs de reacció durant 2 min en una centrifugadora tipus "Eppendorf" per desproteïnitzar la mostra. A continuació es transferien 100 µl de la mostra a un vial de vidre per a escentil·lació líquida, al qual s'afegien 5 ml de toluè amb PPD al 0,8%. Aquest vial s'agitava fortament en un agitador de tubs i es deixava en repòs durant una o dues hores per afavorir el repartiment entre ambdues fases.

En aquestes condicions, en el vial coexisteixen l'àcid [³H]HMG i la [³H]MVL. La separació d'ambdós compostos es basa en el diferent coeficient de repartició entre les dos fases, aigua i toluè. La MVL és un compost més hidrofòbic que l'àcid HMG i té tendència a passar a la fase orgànica, mentre que l'àcid HMG romandrà en la fase aquosa. El pas de la MVL al toluè és afavorit per la relació de volums entre toluè i aigua (50 a 1). Les emissions de

[³H]MVL exciten el PPO i permeten mesurar el producte format. Contràriament a la MVL, l'àcid HMG tritiat roman majoritàriament en l'aigua i no és detectat degut a que les radiacions β emeses pel ³H són de baixa energia i queden bloquejades pel medi aquós i no interfereixen en el comptatge. Amb aquest sistema, la radioactivitat mesurada, amb un comptador d'escentil·lació líquid LKB, era deguda exclusivament al producte de reacció de [³H]MVL.

2.3.2 Determinació de l'activitat HMG-CoA reductasa utilitzant com a substrat [¹⁴C]HMG-CoA

La mesura de l'activitat HMG-CoA reductasa utilitzant com a substrat HMG-CoA marcat amb ¹⁴C fou idèntica a la descrita anteriorment, a excepció de les següents modificacions.

El substrat emprat en aquest cas era [¹⁴C]HMG-CoA. La reacció enzimàtica es desenvolupava en les mateixes condicions descrites en l'apartat anterior, però la reacció s'aturava afegint 60 µl d'una barreja de HCl 3,3 N; 1 mg de MVL i 0,2 mg d'àcid HMG. A continuació s'incubava a 50 °C durant 10 min. La lactona i l'àcid sense marcar foren afegits per tal de que actuessin com a portadors i facilitar així la posterior separació cromatogràfica.

La separació de la MVL marcada amb ¹⁴C del [¹⁴C]-HMG-CoA es realitzava, en aquest cas, pel mètode modificat descrit per Shapiro i col. (245). Els tubs de reacció es centrifugaven per a eliminar la proteïna desnaturalitzada i, 100 µl dels sobrenedants obtinguts eren sotmesos a cromatografia en una placa de sílica-gel HF₂₅₄₋₃₆₆ de 20x20 cm dividida en cinc carrils. La placa s'activava prèviament per escalfament en una estufa a 100 °C durant

una hora. La cromatografia es desenvolupava en una cubeta de vidre i el dissolvent emprat estava constituït d'acetona i benzè a parts iguals. Finalitzada la cromatografia, les plaques es deixaven assecar a temperatura ambient.

La visualització de la zona on havia quedat l'àcid HMG i la MVL es feia mitjançant un llum ultraviolat, observant una zona més obscura en el lloc corresponent a la MVL. Un cop localitzada la MVL, es removia l'àrea on es trobava amb una espàtula metàl·lica, i el pols de sílica-gel obtingut s'introduïa en un vial de vidre en el que s'afegien 10 ml de líquid d'escentil·lació format per PPO 7% (p/v); naftalè 7% (p/v); etilenglicolmonometilèter 40% (v/v) i toluè 60% (v/v). Finalment, la radioactivitat era mesurada com en el cas anterior.

Una unitat d'HMG-CoA reductasa es defineix com la quantitat d'enzim que transforma 1 nmol d'HMG-CoA en mevalonat en 1 min, a 37 °C.

2.3.3 Determinació de l'activitat HMG-CoA reductasa fosfatasa

L'activitat HMG-CoA reductasa fosfatasa es determinava emprant com a substrat HMG-CoA reductasa purificada a homogeneïtat i inactiva. L'assaig es basava en mesurar l'increment de l'activitat HMG-CoA reductasa produït per l'acció de les proteïna fosfatases, comparant-lo amb un control de l'activitat HMG-CoA reductasa inicial (sense proteïna fosfatases).

En aquest assaig els enzims (fosfatases i reductasa) es diluïen en una dissolució amortidora de Bis-tris/HCl 40 mM a pH 7, DTT 1 mM i albúmina 0,5 mg/ml.

Les mostres en les que es mesurava l'activitat reductasa fosfatasa es diluïen convenientment i, en un volum de 30 µl, s'hi afegia 20 µl d'HMG-CoA reductasa inactiva i homogènia (0,22 µg), s'agitava i es deixava incubant durant 15 min a 37 °C. A continuació, s'afegien 60 µl de la dissolució descrita per a l'assaig de l'activitat reductasa en l'apartat 2.3.1 ó 2.3.2 segons el substrat emprat, i es continuava l'assaig tal com està descrit en aquests apartats.

A la vegada, s'incubava un tub que contenia 20 µl de la mateixa preparació d'HMG-CoA reductasa i 30 µl de la dissolució amortidora. Aquest tub sense proteïna fosfatasa ens donava l'activitat HMG-CoA reductasa abans d'ésser activada per acció de les proteïna fosfatases.

Una unitat de HMG-CoA reductasa fosfatasa es defineix com la quantitat d'enzim que incrementa l'activitat HMG-CoA reductasa en una miliunitat per minut, a 37 °C.

2.3.4 Determinació de l'activitat glicogen fosforilasa

La mesura de l'activitat glicogen fosforilasa es portà a terme seguint el mètode descrit per Gilboe i col. (118), basat en determinar la radioactivitat incorporada al glicogen per acció de la fosforilasa, a partir de [¹⁴C]-glucosa-1-fosfat.

S'incubaven 30 µl de la mostra enzimàtica a assajar, diluïda convenientment amb Bis-tris/HCl 40 mM pH 7; DTT 1 mM i albúmina 0,5 mg/ml durant 15 min a 30 °C, amb 60 µl d'una mescla de substrats composta de: [¹⁴C]glucosa-1-fosfat 9 µmols (radioactivitat específica 7.500 cpm/µmol); glicògen 1,2 mg; maleat sòdic 15 µmols pH 6,5 i AMP

0,12 nmols. L'activitat de la fosforilasa "a" (forma activa), es determinava sense AMP. Passat el temps d'incubació, es dipositaven 75 µl de la mescla de reacció en un paper (2x2 cm) Whatman 31 ET, que es submergia ràpidament en etanol al 66% (v/v), fred. D'aquesta forma, el glicogen que precipitava en presència d'etanol quedava atrapat en el paper, mentre que la resta de components de la mescla s'eliminaven per successius rentats amb etanol al 66%. Tot seguit, s'extreien els papers de l'etanol i s'assecaven en una estufa. A continuació, s'introduïen en vials que contenien toluè i PPO al 0,8% (p/v) com a líquid d'escentil·lació i es mesurava la radioactivitat incorporada en els papers mitjançant un comptador d'escentil·lació líquid.

Una unitat de glicogen fosforilasa es defineix com la quantitat d'enzim que incorpora 1 µmol de glucosa al glicogen per minut, a 37 °C.

2.3.5 Determinació de l'activitat fosforilasa fosfatasa

L'activitat fosforilasa fosfatasa es determinava a 30 °C mesurant l'alliberació de ^{32}P de la glicogen fosforilasa fosforilada amb [γ - ^{32}P]ATP.

S'incubava 30 µl de la solució enzimàtica a valorar, diluïda amb: Bis-tris/HCl 40 mM a pH 7, clorur manganós 6 mM, DTT 1 mM i albúmina 0,5 mg/ml, amb 20 µl de fosforilasa "a" marcada amb ^{32}P (1 mg/ml) i 15.000 cpm/assaig durant 10 min, a 30 °C. Passat el temps, s'aturava la reacció afegint-hi 50 µl de TCA al 20% i es deixava reposar a 4 °C durant 15 min per afavorir la precipitació de les proteïnes. A continuació es centrifugava a 12.000xg durant 5 min en una centrifugadora tipus "Eppendorf" i es diposi-

taven 75 µl del sobrenedant en un paper "Whatman 31 ET" de 2x2 cm. Els papers es deixaven assecar i seguidament eren introduïts en vials que contenien 10 ml de toluè amb PPO al 5%. La radioactivitat present en els vials es mesurava en un comptador d'escentil·lació líquid.

A la vegada, s'incubaven 2 tubs que contenien 50 µl de la mateixa barreja d'assaig però sense fosfatasa. Passat el temps d'incubació s'afegien a un d'ells, 50 µl de TCA al 20% per precipitar la proteïna i, després de centrifugar, el sobrenedant ens donava el control de ^{32}P lliure existent en la mescla de reacció. A l'altre tub s'hi adicionaven 50 µl d'aigua destil·lada i, la radioactivitat obtinguda, indicava el ^{32}P total present en l'assaig.

Una unitat d'activitat fosforilasa fosfatasa era aquella quantitat d'enzim que alliberava 1 nmol de fosfat per minut, a 30 °C.

2.3.6 Determinació de l'activitat fosforilasa quinasa

La determinació de l'activitat fosforilasa quinasa es va dur a terme seguint el mètode descrit per Cohen (62) que es basa en la capacitat de la fosforilasa quinasa de transformar la fosforilasa "b" o forma desfosforilada en fosforilasa "a" o forma fosforilada.

La mescla de reacció contenia 2,5 µl de fosforilasa "b" de 25 mg/ml; 25 µl de Tris 0,125 M/glicerol-1-fosfat 0,125 M/HCl pH 8,6; 2,5 µl de CaCl_2 3 mM i 20 µl de fosforilasa quinasa. La reacció s'iniciava a l'addicionar-hi 20 µl d'ATP/Mg 30 nM/100 mM pH 7,0. La mescla s'incubava durant 5 min a 30 °C i s'aturava la reacció dipositant 20 µl de la mescla en 150 µl d'una solució freda de maleat

0,1 M, albúmina al 1% i DTT 1 mM a pH 6,5. Tot seguit, s'assajava l'activitat de la fosforilasa "a" formada, tal com s'ha descrit en l'apartat 2.3.4.

Una unitat de fosforilasa quinasa es defineix com la quantitat d'enzim que transforma 1 μmol de fosforilasa "b" monòmer en fosforilasa "a" monòmer per minut, a 30 °C.

2.3.7 Determinació de l'activitat GSK-3

L'activitat GSK-3 fou determinada a 30 °C, mitjançant el mètode descrit per Cohen (65) basat en determinar la transferència del grup ^{32}P del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a la glicogen sintasa.

Una unitat de GSK-3 era la quantitat d'enzim necessari per a l'incorporació a la glicogen sintasa d'1 μmol de ^{32}P per minut.

2.3.8 Determinació de l'activitat inhibidora sobre proteïna fosfatases i substrat glicogen fosforilasa

La mesura de l'activitat inhibidora sobre les proteïna fosfatases es portà a terme seguint el mètode descrit en l'apartat 2.3.5 excepte que l'inhibidor era present en les mescles de reacció.

2.3.8.1 Inhibidor-1

Per a determinar l'activitat de l'inhibidor-1 fou necessari convertir la proteïna inactiva en la seva forma activa abans de l'assaig, tal com ho descriuen Nimmo i

Cohen (220). Les mostres s'incubaven durant 30 min a 30 °C amb proteïna quinasa dependent d'AMPc (120 mU/ml) en presència de: Tris 40 mM a pH 7, AMPc 0,1 mM, acetat magnèsic 2 mM i ATP 2 mM; en un volum final de 50 µl. A continuació, es bullien durant 5 min per eliminar la quinasa. Seguidament, es procedia a la incubació, durant 15 min a 30 °C, de l'inhibidor-1 fosforilat i de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1 de múscul de conill (15.000 mU) en un volum final de 30 µl. L'activitat fosforilasa fosfatasa es determinava tal com s'ha descrit en l'apartat 2.3.5. Sempre es duïen controls de l'activitat fosfatasa on l'inhibidor no hi era present.

Una unitat d'inhibidor-1 era la quantitat necessària per a produir una inhibició del 50% de l'activitat fosfatasa en les condicions descrites.

2.3.8.2 Inhibidor-2

L'activitat de l'inhibidor-2 fou determinada a 30 °C seguint bàsicament el mètode descrit per Foulkes i Cohen (99). L'activitat inhibidora produïda per l'inhibidor-2 sobre la fosfatasa tipus 1 i substrat fosforilasa s'utilitzava com a punt de comparació enfront els inhibidors estudiats en aquesta Memòria.

L'assaig es realitzava incubant 15 µl de l'inhibidor-2 amb 15 µl de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1 de múscul de conill (15.000 mU), ambdós diluïts amb: Bis-Tris 40 mM a pH 7, clorur manganós 6 mM, DTT 1 mM i albúmina 0,5 mg/ml; durant 15 min, a 30 °C. Seguidament s'iniciava la reacció al afegir-hi 20 µl del substrat glicogen fosforilasa. La mescla s'incubava durant 10 min a 30 °C i es procedia a la determinació de l'activi-

tat fosforilasa fosfatasa segons s'ha descrit en l'apartat 2.3.5. L'activitat inhibidora es mesurava respecte a un control de fosfatasa on hi mancava l'inhibidor.

Una unitat d'inhibidor-2 era la quantitat necessària per a produir una inhibició del 50% de l'activitat fosfatasa en les condicions descrites.

2.3.9 Determinació de l'activitat inhibidora sobre proteïna quinasa dependent d'AMPC

La mesura de l'activitat inhibidora en la proteïna quinasa dependent d'AMPC es du a terme seguint el mètode descrit per Whitehouse i Walsh (275), basat en la capacitat de l'inhibidor d'inhibir la fosforilació de la histona IIA produïda per la subunitat catalítica de la proteïna quinasa dependent d'AMPC.

Una unitat d'inhibidor es la quantitat necessària per disminuir en un 50% la incorporació de ^{32}P en el substrat quan s'incuba amb la subunitat catalítica de la proteïna quinasa dependent d'AMPC a una concentració de 50 μM .

2.4 METODEDES D'OBTENCIO I PURIFICACIO DE PROTEINES

2.4.1 Purificació de l'HMG-CoA reductasa

L'HMG-CoA reductasa homogènia i inactiva fou utilitzada com a substrat de les proteïna fosfatases en quasi tots els experiments descrits en aquesta Memòria. L'enzim s'obtenia de forma inactiva per tal de que fos susceptible a l'acció de les fosfatases segons el mètode ja descrit anteriorment.

El mètode emprat per a la preparació d'aquest enzim fou bàsicament el descrit per Ness i col. (217) i modificat per Gil i col. (112). L'enzim s'obtenia de microsomes de fetge de rata.

2.4.1.1 Obtenció dels microsomes

Es degollaven les rates a les 9 hores; hora que coincidia amb el màxim d'activitat HMG-CoA reductasa d'aquests animals. A continuació es desagnava l'animal, se n'extreïa el fetge, i es rentava immediatament amb una solució amortidora per eliminar totes les restes de sang abans de procedir a l'homogeneïtzació.

Els fetges s'homogeneïtzaven en un "Potter-Elvehjem" a 40 °C. La solució amortidora estava composta de: sacarosa 100 mM; fosfat potàsic 40 mM a pH 7,2; EDTA 30 mM; KCl 50 mM i DTT 1 mM; i era utilitzada en una proporció 1:3 (p/v). L'homogeneïtzat obtingut es centrifugava a 4 °C a 15.000xg durant 15 min en una centrifugadora RC-2-B de "Ivan Sorvall Inc."

El sobrenedant es filtrava per llana de vidre per eliminar la part lípida i es tornava a centrifugar durant 90 min a 105.000xg a 4 °C en una ultracentrifugadora marca "Beckman model L5-65".

Els sediments d'on s'obtenien els microsomes eren resuspendos en la mateixa solució amortidora utilitzada en l'homogeneïtzació i es centrifugaven novament a 105.000xg durant 60 min a 4 °C per tal d'eliminar les restes de citosol.

2.4.1.2 Solubilització de l'HMG-CoA reductasa de microsomes

S'han descrit varis mètodes per a la solubilització de la HMG-CoA reductasa microsomal (134, 135,); però, el mètode que ens donà rendiments més elevats i reproduïbles fou el descrit per Brown i col. (39), lleugerament modificat.

El mètode de solubilització emprat està basat en una combinació de congelació-descongelació i incubació amb glicerol. Una vegada obtinguts els microsomes, eren introduïts en nitrogen líquid fins quedar totalment congelats. A continuació, es deixaven descongelar a temperatura ambient i s'homogeneïtzaven en una solució amortidora composta de: sacarosa 100 mM; fosfat potàsic 40 mM a pH 7,2; EDTA 30 mM; KCl 50 mM; DTT 1 mM i glicerol al 50% (v/v). L'homogeneïtzació es realitzava a temperatura ambient, amb 1 ml de solució amortidora per cada 9 grams de fetge inicial, mitjançant un homogeneïtzador de vidre. L'homogeneïtzat obtingut es deixava reposar durant 1 hora, i a continuació s'hi afegia la solució amortidora sense glicerol fins arribar a una relació d'1 ml per gram de fetge inicial. Seguida-

ment, es centrifugava la suspensió a 105.000×g durant 2 h a 20 °C i s'obtenia el primer solubilitzat microsomal, que es conservava congelat a -80 °C fins que s'obtenia el segon solubilitzat. Els microsomes precipitats de la centrifugació anterior eren sotmesos, per segona vegada, al procés de congelació-descongelació i incubació amb glicerol.

Els sobrenedants obtinguts de la primera i segona centrifugació formaven la nomenada "fracció soluble", que contenia aproximadament un 90% de l'HMG-CoA reductasa microsomal. Aquests alts rendiments eren deguts a que l'HMG-CoA reductasa en els microsomes només es manifesta d'una forma parcial i, únicament a l'ésser solubilitzada es mostra totalment (82).

Un cop solubilitzada l'HMG-CoA reductasa, totes les manipulacions posteriors es duen a terme a temperatura ambient i, en aquelles ocasions en que la mostra havia estat congelada, fou necessari incubar-la durant 30 min a 37 °C abans d'ésser utilitzada, per tal de contrarrestar l'efecte inactivador del fred sobre l'enzim solubilitzat, tal com està descrit per Heller i Gould (135).

La fracció soluble es concentrava per precipitació amb sulfat amònic al 50% de saturació i, es deixava 30 min en repós. Es centrifugava i el precipitat es resuspensia en una solució de: sacarosa 100 mM; fosfat potàsic 20 mM a pH 7,2; KF 20 mM; DTT 1 mM i glicerol al 10% (v/v) fins a un volum total d'1/30 del volum de la fracció soluble. Tot seguit, es sotmetia a una diàlisi de 24 hores enfront la mateixa solució amortidora descrita. En sortir de la diàlisi, la mostra es centrifugava a 10.000×g durant 15 min a 4 °C per a retirar la proteïna desnaturalitzada.

2.4.1.3 Inactivació de l'HMG-CoA reductasa

La inactivació es va dur a terme aprofitant la presència de quinases microsomals en el sobrenedant obtingut. Aquest s'incubava durant 20 min a 37 °C amb una concentració final de 4 mM ATP/20 mM Mg^{2+} . La reacció s'aturava afegint EDTA, KF i PPI fins a unes concentracions de 30 mM, 100 mM i 10 mM, respectivament. L'EDTA té un efecte quelant del Mg^{2+} el qual és necessari pel funcionament de la quinasa. El KF i el PPI s'afegien per inactivar les fosfatases que podien actuar desfosforilant l'HMG-CoA reductasa fosforilada. Per aquest motiu, a totes les solucions amortidores emprades fins a finalitzar la purificació s'afegia: KF 100 mM i PPI 10 mM.

2.4.1.4 Escalfament a 64 °C

Un cop obtinguda l'HMG-CoA reductasa fosforilada i inactiva, s'escalfà la solució per eliminar proteïnes contaminants no resistents al calor.

A la mescla d'inactivació s'afegiren glicerol, KCl i KF fins a unes concentracions finals de glicerol 33% (v/v), KF 100 mM i K^+ 1 M. En aquestes condicions, l'enzim era molt estable al calor. Tot seguit, s'escalfava durant 10 min a 64 °C i a continuació es posava en un bany d'aigua-gel per a disminuir ràpidament la temperatura fins a 4 °C. Es centrifugava a 30.000xg durant 30 min i es recollia el sobrenedant.

2.4.1.5 Cromatografia en columna d'Affi-Gel Blue

La fracció escalfada es diluïa 5 vegades amb una solució amortidora que estava composta de: sacarosa 100 mM; fosfat potàsic 20 mM a pH 7,2; EDTA 30 mM; DTT 1 mM i PPI 10 mM per a rebaixar la concentració d'halurs de la mostra fins a 200 mM. S'aplicava a una columna d'Affi-Gel Blue (1,9x6 cm) equilibrada prèviament amb la solució amortidora anterior, a la que s'hi havia addicionat KCl 100 mM i KF 100 mM. La velocitat d'elució era de 60 ml/h i les fraccions recollides de 7 ml. Es rentava la columna i s'aplicava un gradient lineal de 200 ml totals de 200 mM a 2 M KCl.

Les fraccions amb activitat HMG-CoA reductasa es concentraven per ultrafiltració en una cèl·lula d'Amicon emprant un filtre PM-10. El concentrat es dessalava per dilució repetida amb una solució sense KCl i posterior concentració. Finalment, s'afegia glicerol fins al 50% (v/v) i la mostra es guardava congelada a -80 °C.

2.4.1.6 Cromatografia en columna d'Agarosa-hexano-HMG-CoA

La preparació obtinguda en el pas anterior era diluïda amb el seu volum d'aigua destil·lada. Tot seguit, s'aplicava a una columna d'Agarosa-hexano-HMG-CoA (1.4x3 cm) equilibrada amb una solució composta d'una part de glicerol, dos parts d'aigua destil·lada i una part de la solució que contenia la mostra. A aquesta solució s'afegia PPI fins a 10 mM. La velocitat de flux era de 18 ml/h i les fraccions recollides de 2 ml.

A continuació es rentava la columna amb 20 ml de l'amortidor i s'eluïa l'activitat HMG-CoA reductasa amb

20 ml del mateix amortidor al que s'havia addicionat HMG-CoA fins a una concentració de 200 μ M. Les fraccions amb activitat HMG-CoA reductasa es concentraven per ultrafiltració fins a un volum aproximat de 2 ml, on s'afegia albúmina fins a 0,5 mg/ml i es dialitzava durant 12 h enfront d'una solució amortidora composta de: Bis-tris/HCl 40 mM a pH 7 i DTT 1 mM. L'enzim es guardava en alíquotes a -80 °C on es mantenia actiu i fosforilat durant un any.

2.4.2 Purificació de la glicogen fosforilasa de múscul de conill

La glicogen fosforilasa "b" o forma desfosforilada i dependent d'AMP, fou purificada seguint el mètode descrit per Fisher i Krebs (96).

2.4.2.1 Obtenció de l'extracte de múscul i precipitació àcida

Els conills es sacrificaven per desnucament, i seguidament es desagnaven per secció de la jugular. Tot seguit, s'extreia el teixit muscular del dors i de les extremitats anteriors i posteriors. El múscul era introduït immediatament en gel picat per evitar la producció de lactat, operació que permetia treballar amb més comoditat.

Un cop pesat el múscul s'homogeneïtzava en un "Waring Blendor" amb 2 volums d'aigua destil·lada a 22 °C durant 30 seg a baixa velocitat i 45 seg a més alta velocitat. Una vegada centrifugat a $6.000 \times g$ durant 30 min, el sobrenedant es filtrava per llana de vidre per exteure'n la capa lipídica. Els precipitats obtinguts es maceraven amb 2 volums d'aigua destil·lada durant 45 minuts; s'homoge-

neïtzava amb el "Waring-Blendor" i es centrifugaven de nou a 6.000×g durant 30 minuts.

El sobrenedant de la segona centrifugació es filtrava per llana de vidre i s'ajuntava a l'extracte, conservat durant aquest temps a 4 °C. La preparació obtinguda s'ajustava a pH 5,2 amb àcid acètic 1 N, es deixava en repòs durant 5 min a 4 °C i es centrifugava a 8.000×g durant 20 min. El sobrenedant es filtrava per llana de vidre i s'ajustava el pH a 6,8 amb bicarbonat potàsic sòlid.

2.4.2.2 Precipitació amb sulfat amònic

Al sobrenedant ajustat a pH 6,8 se li afegia 700 ml per litre d'extracte d'una solució de sulfat amònic de 476 g/l de saturació a pH 6,8. Es deixava tota la nit en repòs a 4 °C. Les 3/4 parts superiors del sobrenedant es decantaven i el precipitat es recollia per centrifugació. Seguidament, es resuspensia el precipitat en un volum igual a 1/10 del pes de múscul inicial amb una solució amortidora de Tris/HCl 5 mM a pH 7,5 i 2-mercaptoetanol 1 ml/l, i es dialitzava a 4 °C durant 24 hores enfront de 100 volums i quatre canvis d'amortidor.

2.4.2.3 Tractament a pH alcalí

La preparació lliure de sulfat amònic, es centrifugava i el sobrenedant s'ajustava a pH 8,8 amb Tris base 2 M. La mescla alcalinitzada s'incubava durant una hora a 37 °C, es refredava fins a 4 °C i s'ajustava a pH 7 amb àcid acètic 1 N, i novament es centrifugava per eliminar totes les proteïnes desnaturalitzades en el tractament.

2.4.2.4 Cristal·lització i liofilització

La cristal·lització de la fosforilasa s'obtenia afegint a la preparació anterior una solució neutra d'AMP i un altra d'acetat magnèsic fins a una concentració final de 1 i 10 mM respectivament.

La mescla es refredava a 0 °C i es deixava en repòs 8 hores. L'enzim cristal·litzat es recollia per centrifugació a 10.000xg durant 15 min, i es resuspensia amb Tris/HCl 1 mM, a pH 7 i 2-mercaptoetanol 1 ml/l, a 30 °C. S'addicionava novament AMP i acetat magnèsic i es repetia el procés de cristal·lització.

La recristal·lització es repetia tres vegades i els cristalls obtinguts es dessecaven en un liofilitzador "Cryobloc" i es guardaven en fraccions de 100 mg a -20 °C en presència d'un dessecador.

2.4.3 Purificació de la fosforilasa quinasa

La fosforilasa quinasa s'emprà bàsicament per a fosforilar la fosforilasa "b" i fou purificada de múscul de conill seguint el mètode de Cohen (62), modificat per Ganapathi i col. (105).

2.4.3.1 Extracció i precipitació àcida de l'extracte cru

El múscul procedent de dos conills s'homogeneïtzava amb 2,5 volums d'una solució que contenia EDTA 4 mM a pH 7. Per a l'homogeneïtzació s'emprava un aparell tipus "Waring Blendor" durant 45 segons a baixa velocitat. Una vegada

centrifugat a 6.000×g durant 45 minuts, el sobrenedant es filtrava per llana de vidre.

L'extracte cru obtingut, s'ajustava a pH 5,5 amb àcid acètic 1 N. Es deixava en repòs 5 min a 4 °C i es centrifugava a 6.000×g durant 45 min. El precipitat es resuspensia amb 40 ml d'una solució que contenia: glicerol-1-fosfat 100 mM i EDTA 4 mM a pH 8,2 . La preparació obtinguda es diluïa fins un volum de 120 ml amb glicerol-1-fosfat 50 mM a pH 6,8; EDTA 2 mM i 2-mercaptoetanol 30 mM.

A continuació, es centrifugava a 78.000×g durant 100 min a 4 °C i, al sobrenedant, filtrat per llana de vidre, s'hi afegia mig volum d'una solució de sulfat amònic al 90% de saturació i a pH 7. Es deixava en repòs durant 30 min a 4 °C i es centrifugava a 10.000×g durant 10 min. El precipitat es resuspensia en el mínim volum d'amortidor compost per: glicerol-1-fosfat 50 mM a pH 6,8; EDTA 2 mM i DTT 2 mM. Es dialitzava durant una hora a 4 °C amb 100 volums del mateix amortidor. Seguidament, es centrifugava en una centrifugadora "Eppendorf" a 15.000×g durant 2 min.

2.4.3.2 Cromatografia en columna de Sepharosa 4B

La solució concentrada anteriorment s'aplicava a una columna de Sepharosa 4B (2x150 cm) equilibrada amb la solució amortidora de la diàlisi a una velocitat de flux de 12 ml/h. Es recollien fraccions de 3 ml i es barrejaven aquelles amb activitat fosforilasa quinasa i que no contien activitat glicogen fosforilasa. A continuació, s'afegia glicerol fins a una concentració final del 20% (v/v).

D'ara en endavant l'estabilitat de l'enzim era molt fetble; calia evitar agitacions sobtades per tal de no produir precipitació i pèrdua de l'activitat enzimàtica.

2.4.3.3 Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa

La mostra s'aplicava a una columna de DEAE-cel·lulosa (2x8 cm) equilibrada amb el mateix amortidor amb un 20% (v/v) de glicerol. Un cop rentada la columna, s'elueïa l'activitat fosforilasa quinasa amb un gradient de 0-500 mM NaCl (volum final 200 ml) a una velocitat de 50 ml/h. Les fraccions, de 5 ml, més actives es concentraven al buit en un sac de colodió fins a un volum final de 2 ml. El concentrat es guardava en fraccions a -80 °C.

2.4.4 Fosforilació de la glicogen fosforilasa "b"

El mètode seguit per a fosforilar la glicogen fosforilasa "b" fou el descrit per Fischer i Krebs (96).

En primer lloc es redissolien els cristalls de glicogen fosforilasa "b" i s'eliminava l'AMP. A 100 mg de l'enzim liofilitzat s'afegien 2 ml de: glicerofosfat 50 mM a pH 6,8; EDTA 2 mM i DTT 1 mM ; incubant-se 15 min a 30 °C. Es centrifugava 2 min en una centrifugadora "Eppendorf" per eliminar la proteïna desnaturalitzada, i al sobrenedant s'hi afegia NORIT-A (preparada amb un rentat previ de HCl 1 N) en una relació de 1:1 (p/p) respecte al pes inicial de fosforilasa. S'incubava durant una hora a 30 °C agitant-ho continuament. La NORIT-A es separava per centrifugació durant 5 min en una centrifugadora "Eppendorf" i la fosforilasa quedava així lliure d'AMP.

La relació $D.O._{240} / D.O._{280}$ obtinguda de l'examen del sobrenedant no havia d'ésser superior a 0,6, en el cas contrari la mostra era tractada novament per alliberar-la de la presència d'AMP. La concentració de la proteïna s'obtenia per l'absorció produïda a 280 nm corregida per un coeficient igual a 1,3 per a la fosforilasa. $A_{280} \times d / 1,3 = \text{mg/ml de proteïna}$; éssent A_{280} l'absorció llegida i d la dilució de l'enzim.

2.4.4.1 Transformació de la glicogen fosforilasa "b" en "a"

Una vegada la fosforilasa "b" era lliure d'AMP es procedia a la seva fosforilació. La reacció s'iniciava a l'incubar: fosforilasa "b" 5 mg/ml, ATP 5 mM, Cl_2Mg 15 mM, Cl_2Ca 0,4 mM i Tris/HCl 50 mM a pH 8; amb 30 µg/ml de fosforilasa quinasa. El temps d'incubació era de 90 min a una temperatura de 30 °C i amb agitació continua.

La reacció s'aturava per precipitació de la proteïna amb un volum igual de sulfat amònic al 90% de saturació i a pH 7. Es refredava la mostra fins a 4 °C, i es centrifugava a 8.000×g durant 20 min. El precipitat obtingut es rentava amb: Tris/HCl 50 mM a pH 7,8; EDTA 1 mM i sulfat amònic al 45% de saturació. Es tornava a centrifugar a 6.000×g durant 15 min i el precipitat era redissolt amb: Tris/HCl 50 mM a pH 7, EDTA 1 mM i 2-mercaptoetanol 3,4 ml/l; dialitzan-se 12 hores amb 500 volums i dos canvis de la solució amortidora.

Finalment es recollien els cristalls de glicogen fosforilasa "a" formats durant la diàlisi centrifugant a 6.000×g durant 10 min. Els cristalls eren redissolts amb una solució de: Tris/HCl 50 mM a pH 7, $ClNa$ 250 mM, DTT

5 mM i glicerol 50% (v/v) a 25 °C. La glicogen fosforilasa "a" es guardava a una concentració aproximada de 50 mg/ml a 4 °C, i en aquestes condicions es mantenia estable durant un mes. Abans d'ésser utilitzada era necessari escalfar-la durant 5 min a 30 °C per dissoldre els possibles cristalls formats durant l'emmagatzematge.

2.4.4.2 Obtenció de la glicogen fosforilasa "a" marcada amb ^{32}P

Un cop la glicogen fosforilasa "b" era lliure d'AMP, la fosforilació es duia a terme incubant: fosforilasa "b" 5 mg/ml, fosforilasa quinasa 30 µg/ml, MgCl_2 10 mM CaCl_2 0,4 mM, Tris 50 mM a pH 8 i $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 0,2 mM (481 dpm/pmol) durant 90 min a 30 °C i es parava la reacció per precipitació de la proteïna amb un volum igual de sulfat amònic al 90%. Els següents passos s'han descrit en l'apartat anterior.

En aquest cas s'obtenia una fosforilasa "a" amb una radioactivitat específica de 3,55 pmol de fosforilasa "a" tetràmer/pmol de P.

2.4.5 Purificació de la proteïna fosfatasa tipus 2A de citosol de fetge de rata d'alt pes molecular

El mètode utilitzat per a l'obtenció de l'HMG-CoA reductasa fosfatasa 2A d'alt pes molecular fou el descrit per Calvet i col. (51). El substrat utilitzat per a medir l'activitat fosfatasa fou la HMG-CoA reductasa homogènia.

2.4.5.1 Obtenció del citosol

El fetge extret de rates sacrificades per decapitació, s'homogeneïtzava a 4 °C en un homogeneïtzador "Potter-Elvehjem", amb una solució amortidora de: Tris/HCl 40 mM a pH 7,2; sacarosa 500 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM i PMSF 0,5 mM; en una relació pes:volum de 1:3 L'homogeneïtzat es centrifugava a 30.000×g durant 30 min, el sobrenedant obtingut es filtrava per llana de vidre i s'ultracentrifugava a 105.000×g durant 90 min. Es llençava el precipitat i es recollia el sobrenedant que era la font enzimàtica utilitzada. Tot el procés de purificació es feia a 4 °C.

2.4.5.2 Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa

El sobrenedant obtingut s'aplicava a una columna de DEAE-cel·lulosa (4.5x15 cm) equilibrada amb la mateixa solució amortidora en que anava la mostra, excepte que la concentració de sacarosa es rebaixava a 300 mM. Es rentava la columna amb 300 ml de la solució amortidora i seguidament es feia un altre rentat amb la mateixa solució i amb NaCl 60 mM, fins que la proteïna eluïda de la columna estava per sota de 0,05 mg/ml. Finalment, l'activitat fosfatàsica s'eluïa amb un gradient lineal de 70-500 mM ClNa d'un volum total de 1.800 ml. La velocitat de flux era de 100 ml/h i les fraccions recollides de 5 ml.

Dos preparacions eren obtingudes amb activitat fosfatasa, la primera eluïa a una concentració salina entre 0,13 i 0,19 M ClNa, i la segona, entre 0,21 i 0,32 M ClNa. La segona preparació fou la font enzimàtica de la fosfatasa 2A.

Les fraccions de la segona preparació es barrejaven i es duïen a una concentració de saturació de sulfat amònic del 65%. Es deixaven en repòs durant 30 min i es recollien els precipitats per centrifugació a 30.000xg durant 20 min. Es resuspenien en una solució amortidora 1, que contenia: Tris/HCl 40 mM a pH 7,2; sacarosa 300 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM i 2-mercaptoetanol 50 mM; i la suspensió obtinguda es dialitzava exhaustivament tota la nit i amb dos canvis de la solució amortidora 1.

2.4.5.3 Cromatografia en columna d'Aminohexil-Sepharosa 4B

La mostra dialitzada s'aplicava a una columna d'afinitat d'Aminohexil-Sepharosa 4B (1,9x3,5 cm) equilibrada amb la solució amortidora 1. Es rentava la columna i s'el·luïa la fosfatasa amb un gradient lineal de 500 ml entre 0 i 800 mM ClNa. La velocitat de flux era de 35 ml/h i les fraccions recollides de 5 ml. Les fraccions actives es concentraven per precipitació afegint-hi sulfat amònic sòlid fins el 65% de saturació. La preparació es dialitzava extensament enfront la solució amortidora 1.

2.4.5.4 Cromatografia en columna de Bio-Gel 1.5m

S'aplicaven 2 ml de la preparació dialitzada a una cromatografia de gel filtració en columna de Bio-Gel 1.5m (1.5x80 cm) equilibrada amb la solució amortidora 1 i en presència de 100 mM NaCl. Es recollien fraccions de 2 ml i la velocitat de flux era de 18 ml/h. Les fraccions amb activitat fosfatasa es barrejaven i es concentraven per ultrafiltració fins a un volum final de 2 ml utilitzant una cèl·lula d'Amicon amb un filtre tipus PM-10. La preparació

es guardava congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i en presència d': Albúmina bovina 0,5 mg/ml, MnCl_2 5 mM i DTT 5 mM. En aquestes condicions es mantenia estable durant 6 mesos.

2.4.6 Purificació de la proteïna fosfatasa 2A de citosol de fetge de rata de baix pes molecular

Es procedia seguint les mateixes etapes de purificació de la proteïna fosfatasa d'alt pes molecular fins a la cromatografia obtinguda en columna d'Aminohexil-Sephara 4B. El concentrat obtingut en l'apartat 2.4.5.3 es precipitava a temperatura ambient amb 5 volums d'etanol al 96% i es centrifugava a $30.000\times g$ durant 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Els precipitats, que contenien tota la proteïna, es resuspenien en un volum mínim de solució amortidora 1.

La suspensió es centrifugava de nou per a eliminar la proteïna desnaturalitzada produïda per la precipitació amb etanol. Es recollia el sobrenedant, es guardava i es procedia a fer dos extraccions més del precipitat.

Els sobrenedants obtinguts de les tres extraccions s'aplicaven a una columna de Sephadex G-100 (1,5x75 cm) equilibrada amb la solució amortidora 1 que contenia 100 mM NaCl. La velocitat de flux era de 18 ml/h i es recollien fraccions de 2 ml.

Les fraccions amb activitat fosfatasa es concentren per ultrafiltració fins a un volum aproximat de 2 ml, mitjançant una cèl·lula d'Amicon amb una membrana PM-10. La mostra es repartia en fraccions i es guardava congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presència de: serum d'albúmina 0,5 mg/ml, MnCl_2 5 mM i DTT 5 mM. En aquestes condicions es mantenia estable durant 6 mesos.

2.4.7 Purificació de la proteïna fosfatasa tipus 1 de citosol de fetge de rata d'alt pes molecular

La preparació obtinguda en l'apartat 2.4.5.2 que eluïa d'una columna de DEAE-cel·lulosa a una concentració salina entre 0,13 i 3,19 M NaCl era la font enzimàtica per a l'obtenció de la proteïna fosfatasa tipus 1.

Les fraccions actives es concentraven per addició de sulfat amònic sòlid fins a una saturació del 65%. Passats 30 min els precipitats es recollien per centrifugació (30.000xg, 20 min) i es despreciaven els sobrenedants. Els precipitats es resuspenien en la solució amortidora 1 descrita en l'apartat 2.4.5.2 i es dialitzaven tota la nit enfront la mateixa solució. En el transcurs de la diàlisi s'efectuava un canvi d'amortidor.

2.4.7.1 Cromatografia en columna d'Aminohexil-Sepharosa 4B

La preparació dialitzada s'aplicava a una columna d'afinitat d'Aminohexil-Sepharosa 4B (1,9x3,5 cm) equilibrada amb la solució amortidora 1. Es rentava la columna amb 100 ml d'amortidor i s'aplicava un gradient linial de 1600 ml entre 0 i 800 mM NaCl. El flux d'elució de la columna era de 35 ml/h i les fraccions recollides eren de 4 ml. Les fraccions s'assajaven per a determinar l'activitat reductasa fosfatasa.

Dels tres pics amb activitat fosfatàsica que eluïen a les concentracions salines de: 150 mM NaCl (I_1), 225 mM NaCl (I_2) i 300 mM NaCl (I_3); solament es reuniren les fraccions corresponents a la preparació I_2 que presentava totes les característiques d'una proteïna fosfatasa tipus 1. Les fraccions es concentraven per precipitació amb

sulfat amònic sòlid fins a un 65% de saturació. A continuació es recollien els precipitats per centrifugació i es dialitzaven enfront la solució amortidora 1.

2.4.7.2 Cromatografia en columna de Bio-Gel A 1,5m

La preparació I₂ es dividia en dos alíquotes de les quals, una es guardava congelada a -80 °C per a ésser sotmesa posteriorment a un tractament amb etanol i obtenir així la subunitat catalítica. La segona alíquota es cromatografiava en una columna de Bio-Gel A 1,5m (1,5x80 cm) prèviament equilibrada amb la solució amortidora 1 a la que s'havia addicionat NaCl fins a una concentració de 100 mM. La velocitat de flux fou de 18 ml/h i, les fraccions recollides eren de 2 ml.

Les fraccions actives es reunien i es concentra-ven per ultrafiltració fins a un volum de 2 ml, mitjançant una cèl·lula d'Amicón que estava provista d'un filtre tipus PM-10. La preparació final es guardava en fraccions i en presència d'albumina 0,5 mg/ml, MnCl₂ 5 mM i DTT 5 mM a -80 °C. L'activitat es mantenia estable durant 6 mesos.

2.4.8 Purificació de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1 de citosol de fetge de rata

L'alíquota concentrada obtinguda en l'apartat 2.4.7.1 que provenia de la columna d'Aminohe-xil-Sepharosa 4B es precipitava a temperatura ambient amb 5 volums d'etanol al 96% i tot seguit, es centrifugava a 30.000xg durant 10 min a 4 °C. Els precipitats, que contenien tota la proteïna, es resuspenien en un volum mínim de la solució amortidora 1.

Aquesta suspensió es tornava a centrifugar d'igual forma i es recollia el sobrenedant. El precipitat s'extreia dues vegades més i el conjunt dels sobrenedants s'aplicava a una columna de Sephadex G-100 (1,5x75 cm) equilibrada amb la solució 1 i 100 mM NaCl. La velocitat de flux fou constant i de 18 ml/h; les fraccions es recollien de 2 ml.

Les fraccions actives es cocentraven en una cèl·lula d'Amicón amb un filtre tipus PM-10. La preparació es guardava congelada en fraccions a -80 °C i en presència d'albumina 0,5 mg/ml, MnCl₂ 5 mM i DTT 5 mM. En aquestes condicions l'activitat es mantenia durant 6 mesos.

2.4.9 Purificació de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1 de múscul de conill

La subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1 fou purificada seguint el mètode de Silberman i col. (247) i modificat per Resink i col. (234).

El substrat utilitzat per a seguir l'activitat fosfatàsica fou la [³²P]fosforilasa "a".

2.4.9.1 Extracció i concentració de l'extracte cru

El múscul procedent de dos conills s'homogeneïtzava amb 2 volums de la solució amortidora 1 que contenia Tris/HCl 20 mM pH 7, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,1% (v/v) i en presència d'inhibidors de proteases com són PMSF 0,1 mM, TPCK 0,1 mM, benzamidina 1 mM, leupeptina 1 µg/ml i antipaina 1 µg/ml. Per a l'homogeneïtzació s'emprava un aparell tipus "Waring Blendor" durant 45 segons a

baixa velocitat. Una vegada centrifugat, a 6.000×g durant 35 min, el sobrenedant es filtrava per llana de vidre.

L'extracte cru obtingut s'ajustava a pH 7,2 amb 10 mM NH₄OH i, seguidament, es portava a 70% de saturació amb sulfat amònic sòlid; es deixava 30 min en repòs a 4 °C i es centrifugava a 6.000×g durant 35 min. El precipitat es resuspensia amb la solució amortidora 1 fins a un volum final de 1/10 del volum de l'extracte cru.

2.4.9.2 Precipitació amb etanol

A la preparació obtinguda s'afegia 5 volums d'etanol al 95% a temperatura ambient i es centrifugava a 6.000×g durant 5 min. Es llençava el sobrenedant i el precipitat s'extreia amb 800 ml de la solució amortidora 1, i es centrifugava de nou a 10.000×g durant 15 min. Es guardava el sobrenedant i es repetia l'extracció del precipitat amb 400 ml de la solució amortidora 1.

La solució obtinguda de la unió dels sobrenedants s'ajustava a pH 7,2 amb 10 M NH₄OH i, seguidament, es portava a 65% de saturació amb sulfat amònic sòlid; es deixava 30 min en repòs a 4 °C i es centrifugava a 10.000×g durant una hora. El precipitat es resuspensia en 50 ml de la solució amortidora 1 que contenia 10% (v/v) glicerol. La preparació obtinguda es dialitzava durant 5 hores enfront 1.000 ml de la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol. En el transcurs de la diàlisi es canviava l'amortidor al menys 5 vegades.

2.4.9.3 Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa

La solució dialitzada es diluïa amb el seu volum amb la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol i, seguidament, s'aplicava a una columna de DEAE-cel·lulosa (5x5 cm) equilibrada amb la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol. La columna es rentava primer amb 50 ml de la solució d'equilibrat a 240 ml/h i es continuava rentant amb 250 ml de la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol i 80 mM NaCl. Seguidament, s'aplicava un gradient lineal de 0,08 a 0,4 M NaCl d'un volum total de 1.000 ml. Les fraccions actives es barrejaven i la mostra obtinguda es diluïa amb el seu volum amb la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol.

2.4.9.4 Cromatografia en columna de Polilisina-Sepharosa

La preparació s'aplicava a una columna de Polilisina-Sepharosa (5x1.7 cm) equilibrada amb la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol. La columna es rentava amb 30 ml de la solució d'equilibrat a 80 ml/h, i a continuació, s'eluïa la fosfatasa 2A amb 100 ml de la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol i 0,25 M NaCl. Aquesta preparació es guardava ja que era la font enzimàtica de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa 2A. La proteïna fosfatasa 1 s'eluïa amb 100 ml de la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol i 0,5 M NaCl i, l'eluït es concentrava per diàlisi al buit fins a 2 ml.

2.4.9.5 Cromatografia en columna de Sephadex G-75

La mostra concentrada de la subunitat catalítica de fosfatasa tipus 1, s'aplicava a una columna de Sephadex

G-75 (45x2 cm) equilibrada amb: Tris/HCl 50 mM a pH 7, 10% glicerol i 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol. Les fraccions actives es barrejaven i la mostra obtinguda es sotmetia a concentració per diàlisi al buit i es guardava en fraccions en presència de: Tris/HCl 50 mM a pH 7, 0,1% 2-mercaptoetanol i 50% (v/v) glicerol; a -20 °C.

2.4.10 Purificació de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 2A de múscul de conill

La preparació obtinguda en l'apartat 2.4.9.4 per elució de la columna de Polilisina-Sepharosa amb, 0,25 M NaCl en la solució amortidora 1 i 10% (v/v) glicerol, es concentrava per diàlisi al buit fins a 2 ml.

Seguidament, s'aplicava a una columna de Sephadex G-75 (45x2 cm) equilibrada amb: Tris/HCl 50 mM a pH 7, 10% glicerol i 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol. Les fraccions actives s'ajuntaven i la mostra final es concentrava per diàlisi al buit fins a un volum de 1 ml. La mostra es guardava en fraccions a -20 °C i en presència de: Tris/HCl 50 mM a pH 7, 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol i 50% (v/v) glicerol.

2.4.11 Purificació de l'inhibidor-2 de múscul de conill

El mètode emprat per a la preparació de l'inhibidor-2 fou el descrit per Yang i col. (279). L'activitat inhibidòria fou determinada en tot moment per la inhibició produïda sobre la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 de múscul de conill i substrat fosforilasa. La metodologia detallada és la que es descriu a continuació.

2.4.11.1 Obtenció de l'extracte cru

El teixit muscular de dos conills s'homogeneïtzava amb 2 volums de solució amortidora: Tris/HCl 20 mM a pH 7, EDTA 2 mM i benzamidina 0,5 mM. L'homogeneïtzació es feia amb un aparell tipus "Waring Blendor" a baixa velocitat durant 45 segons i a continuació a alta velocitat durant 30 seg. Tot el procés es realitzava a 4 °C. Una vegada centrifugat a 10.000×g durant 20 min, el sobrenedant, es filtrava per llana de vidre per eliminar la capa lipídica.

La preparació s'ultracentrifugava en una ultracentrifugadora Beckman a 100.000×g durant una hora. El sobrenedant era de nou filtrat per llana de vidre i s'ajustava a pH 7 amb Tris 2 M.

2.4.11.2 Cromatografia en columna de DEAE-Sephadex A-50

La solució obtinguda era barrejada amb 1/2 volum de resina de DEAE-Sephadex A-50, equilibrat prèviament amb la solució amortidora 1 que contenia Tris/HCl 20 mM a pH 7 i DTT 1 mM; i es deixava agitant lentament durant 30 min. La mescla es filtrava per un embut de vidre i sense aplicar el buit. Seguidament, la resina es rentava amb 2 l de la solució amortidora 1 (aquesta fracció no retinguda fou la font per a l'obtenció de l'enzim GSK-3). La resina es tornava a rentar amb 2 l de la solució amortidora 1 que contenia NaCl 0,2 M i, s'empaquetava en una columna (60x5 cm) i la mostra s'eluïa amb la solució amortidora 1 i NaCl 0,4 M.

2.4.11.3 Precipitació fraccionada amb sulfat amònic

L'eluït es saturava fins al 30% amb sulfat amònic sòlid i el precipitat obtingut es llençava. Al sobrenedant s'afegia sulfat amònic sòlid fins arribar a una saturació del 50%. El precipitat es recollia per centrifugació a 10.000×g durant 20 min, es resuspensia en 2 ml de la solució amortidora 1 i es dialitzava durant una hora enfront la mateixa solució.

2.4.11.4 Escalfament a 95 °C

La solució dialitzada (5 - 10 ml) es deixava caure gota a gota, en un bany-maria, sobre 5 ml de la solució amortidora 1 a 95 °C. La mescla es mantenia 10 min més, a 95 °C; seguidament, es refredava fins a 4 °C i es centrifugava a 10.000×g durant 10 min. El sobrenedant es guardava i el precipitat s'extreïa dos vegades amb 5 ml de la solució amortidora 1. Els sobrenedants es barrejaven i la mostra es dialitzava extensament enfront la mateixa solució amortidora 1.

2.4.11.5 Cromatografia en columna de Blue Sepharosa CL-6B

La preparació s'aplicava a una columna de Blue Sepharosa CL-6B (10x1 cm) equilibrada amb la solució amortidora 1. La columna es rentava amb 250 ml de la solució amortidora 1 i NaCl 0,1 M. Finalment s'eluïa l'activitat inhibidora amb 50 ml de la solució amortidora 1 i NaCl 0,6 M. L'eluït es concentrava mitjançant un sac de Colodió fins a 1 ml, es dialitzava tota la nit enfront la solució amortidora 1 i es guardava en fraccions a -20 °C.

2.4.12 Purificació de la GSK-3

El mètode emprat per a la preparació d'aquest enzim fou el descrit per Hemmings i col. (137).

La preparació obtinguda dels exclosos de la columna de DEAE-Sephadex A-50 descrita en l'apartat 2.4.11.2, es diluïa amb un volum de la solució amortidora: Tris/HCl 60 mM a pH 7, EDTA 2 mM, 0,2 (v/v) 2-mercaptoetanol i 10% (v/v) glicerol.

2.4.12.1 Cromatografia en columna de Fosfocel·lulosa Watman-P11

La mostra s'aplicava a una columna de Fosfocel·lulosa (4x14 cm) equilibrada amb: Tris/HCl 50 mM a pH 7, EDTA 2 mM, 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol, 5% (v/v) glicerol i NaCl 0,1 M. La columna es rentava amb la mateixa solució d'equilibrat i l'activitat GSK-3 s'eluïa amb la mateixa solució amortidora i NaCl 0,2 M.

2.4.12.2 Cromatografia en columna d'Affi-Gel Blue

L'eluït de la columna de Fosfocel·lulosa s'aplicava directament a una columna d'Affi-Gel Blue (3,5x15 cm) equilibrada amb: Tris/HCl 50 mM a pH 7, EDTA 2 mM, 0,1% (v/v) mercaptoetanol, 5% (v/v) glicerol i NaCl 0,2 M.

La columna es rentava amb el mateix amortidor fins que l'absorbància a 280 nm de l'eluït era zero i, seguidament, se li aplicava un gradient de sal de 0,2 a 1 M NaCl d'un volum final de 100 ml de l'amortidor d'equilibrat. L'activitat quinasa s'eluïa a una concentració 0,4 de NaCl.

Les fraccions actives es barrejaven, es concentraven per diàlisi al buit fins a 1 ml mitjançant una membrana de Colodió i es dialitzaven enfront: Tris/HCl 25 mM a pH 7, EDTA 1 mM, 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol i 5% (v/v) glicerol. La diàlisi durava 12 hores i es realitzaven dos canvis de la solució amortidora. La mostra es guardava congelada a -20 °C.

2.5 TECNIQUES ELECTROFORETIQUES

2.5.1 Electroforesi en gels de poliacríamida en presència de SDS

El sistema utilitzat fou l'electroforesi discontinua descrita per Laemmli (193), en el qual la presència del detergent SDS fa que aquesta tècnica sigui molt més eficaç en la separació de proteïnes segons llur pes molecular.

Els gels es feien en la modalitat de placa i el seu gruix fou, en tots els casos, de 1 mm. Es preparava en primer lloc la solució del gel separador, que estava composta de: Tris/HCl 375 mM a pH 8,9; acrílamida 10%, bisacrílamida 0,2%, SDS 0,1%, persulfat amònic 0,05% i TEMED 0,025%. El TEMED, en presència de persulfat amònic, produïa la polimerització del monòmer acrílamida i del dímer bisacrílamida. Per aquest motiu, un cop incorporat el TEMED, la solució es dipositava entre dos plaques de vidre, prèviament segellades amb agar escalfat al 1,5% (p/v). Seguidament, s'aplicaven 2 o 3 µl d'alcohol isopropílic per tal d'obtenir una superfície recta del gel. Es deixava polimeritzant durant 30 min.

A continuació es preparava la solució del gel apilador, que contenia: Tris/HCl 125 mM a pH 6,8; acrílamida 5%, bisacrílamida 0,08%, SDS 0,1%, persulfat amònic 0,05% i TEMED 0,025%. Aquesta s'aplicava sobre el gel separador, un cop polimeritzat i net d'alcohol isopropílic, en presència d'una matriu formada de pouets. Acabada la polimerització es retirava la matriu i els pouets eren rentats amb aigua hipodèrmica.

Un cop preparat el gel, es procedia a la preparació de les mostres a les que s'addicionava una solució reductora a una concentració final de: Tris/HCl 125 mM a pH 6,8; SDS 5% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v), EDTA 0,33% (p/v), blau de bromfenol 0,0125% (v/v) i sacarosa 0,5% (p/v). Seguidament, les mostres s'escalfaven durant 3 min a 100 °C, es deixaven refredar durant 5 min i s'aplicaven en els pouets del gel.

La solució amortidora utilitzada per desenvolupar l'electroforesi contenia: Tris 25 mM, glicina 129 mM i SDS 0,2% a pH 8,3. El procés es duia a terme a una intensitat de 15 mA fins que el front format per l'indicador de blau bromfenol arribava al limit del gel apilador; i en aquest punt, l'amperatge s'augmentava a 25 mA fins que l'indicador es situava a 0,5 cm del marge inferior del gel separador.

Un cop acabada l'electroforesi, els gels eren separats de les plaques de vidre i es tenyien per visualitzar les bandes de proteïna separades en el transcurs de l'electroforesi. Els gels es submergien durant 30 min en una solució colorant composta de: Blau Brillant de Comassie R-250 al 1% i TCA al 50% (v/v). A continuació es destenyien durant 2 h amb una solució decolorant d'àcid acètic 10% (v/v) i alcohol metílic 35% (v/v). Seguidament es procedia a la reducció de tamany submergint-los en una solució d': alcohol metílic 50% (v/v) i glicerol 3% (v/v); durant 4 hores. Els gels obtinguts s'assecaven en un assecador de gels model GSD-4 de Pharmacia.

2.5.2 Electroforesi en gels d'agarosa en presència de SDS

2.5.2.1 Electroforesi

El sistema utilitzat fou el descrit per Sakakibara i col. (240). Aquest mètode està basat en l'electroforesi horitzontal, tipus submergit, de gels d'agarosa amb SDS per a la separació de proteïnes segons llur pes molecular, i la posterior extracció.

Els gels d'agarosa de baix punt de fusió al 4% (p/v), es preparaven d'un gruix de 4 mm en solució amortidora de: Tris 25 mM, glicina 190 mM i SDS 0,1%. La mescla s'escalfava en un bany-maria a 90 °C durant 30 min fins que la dissolució era total. Seguidament, es dipositava el gel fos (15 ml) en una placa (6x5,2 cm) prèviament segellada amb cinta adhesiva, i on s'havia col·locat una matriu per a la formació dels pouets. Es deixava solidificar el gel durant una hora i es retirava la matriu.

Les mostres de proteïna, prèviament dessecades al buit, es dissolien en 10 µl d'una solució reductora composta de: Tris/HCl 75 mM a pH 6,8; SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 2,5% (v/v), blau bromfenol 0,01% (v/v) i glicerol 5% (v/v); i s'escalfaven durant 3 min a 100 °C. A continuació es col·locava el gel en la cubeta de l'electroforesi (Minigel, Bio-Rad).

La solució amortidora utilitzada en el desenvolupament de l'electroforesi contenia: Tris 25 mM, glicina 190 mM i SDS 0,1%. S'omplia la cubeta de l'electroforesi amb solució amortidora fins a un nivell de 3 a 5 mm de la superfície del gel. Tot seguit es sembraven les mostres en els diferents pouets.

L'electroforesi es portava a terme horitzontalment a un voltatge constant de 50 v a temperatura ambient, fins que l'indicador blau de bromfenol distava 1 cm del limit del gel.

Finalitzada l'electroforesi, els gels es dividien en dos parts. Una, es tenyia submergint-la en una solució colorant d': àcid acètic 10%, alcohol metílic 10% i Blue Comassie R-250 0,1% (p/v); durant 10 min, i a continuació es destenyia amb una solució decolorant d': àcid acètic 10% i metanol 10%. L'altra part de gel s'utilitzava per a l'extracció de proteïnes.

2.5.2.2 Extracció de proteïnes

Un cop finalitzada l'electroforesi, la part tenyida es seccionava en carrills que es trocejaven en fragments de 3 mm. Cada fragment s'homogeneïtzava amb 0,4 ml d'una solució amortidora composta de: clorhidrat de Trietanolamina 40 mM a pH 7 i EDTA 0,1 mM; mitjançant un homogeneïtzador de vidre. L'homogeneïtzat es centrifugava en una centrifugadora "Eppendorf" a 10.000xg durant 10 min. El sobrenedant es guardava i el precipitat s'extreïa de nou amb 0,4 ml de la solució amortidora. Els sobrenedants de cada un dels fragments es dialitzaven durant 8 hores enfront la solució amortidora d'extracció amb un canvi de la solució amortidora. Les mostres així obtingudes eren a punt per a ésser assajades.

2.6 TECNIQUES D'ULTRACENTRIFUGACIO DIFERENCIAL

El mètode seguit per a separar les diferents subfraccions cel·lulars és el descrit per Duve i col. (78).

Les rates eren sacrificades per decapitació. Inmediatament s'els extreia el fetge i s'homogeneïtzava a 4 °C amb un homogeneïtzador tipus "Potter-Elvehjem" proveït d'un pistil de tefló. L'homogeneïtzació es realitzava amb 3 ml/g de teixit de la solució amortidora composta de: Tris/HCl 20 mM a pH 7, sacarosa 500 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, benzamidina 1 mM, TLCK 0,5 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 1 µg/ml i DTT 0,5 mM. Tots els inhibidors de proteases i el DTT s'addicionaven a les solucions amortidores de forma extemporània. L'homogeneïtzat es centrifugava a 15.000xg durant 15 min. El sobrenedant es filtrava per llana de vidre per extreure-li la capa lipídica.

L'ús d'una solució amortidora amb una elevada concentració de sacarosa, 500 mM, en una proporció 1:3 (p/v), proporcionava un medi d'homogeneïtzació hipertònic que impedia la ruptura de les vesícules lisosomals i a la vegada ens permetia la posterior eliminació mitjançant una centrifugació a 15.000xg durant 15 min. D'aquesta forma es prevenia l'alliberació d'enzims proteolítics continguts en aquestes vesícules i la seva possible acció sobre els inhibidors proteics de proteïna fosfatases.

El sobrenedant anterior o també denominat sobrenedant post-mitocondrial (SPM), s'ultracentrifugava a 105.000xg durant 90 min. El sobrenedant obtingut corresponia a la fracció citosòlica. Al precipitat, que estava compost per la fracció microsomal i el sediment de glicogen, se li addicionava de 3 a 5 ml de la solució amortidora

d'homogeneïtzació, però sense sacarosa, separant per decantació la fracció microsomal del sediment de glicogen.

La fracció microsomal es rentava amb la solució d'homogeneïtzació sense sacarosa per extreure les contaminacions citosòliques. Per aixó, se li afegia la solució amortidora fins a un volum igual al del SPM. La suspensió, un cop homogeneïtzada, s'ultracentrifugava de nou a $105.000 \times g$ durant 70 min. El sobrenedant constituïa el primer rentat de la fracció microsomal. El precipitat contenia els microsomes que eren sotmesos a un nou rentat. El precipitat final constituïa la fracció microsomal que es resuspensia en un volum igual al del SPM.

El sediment de glicogen obtingut en la primera ultracentrifugació es resuspensia amb la solució amortidora d'homogeneïtzació sense sacarosa, fins a un volum igual al del SPM. Totes les fraccions i rentats es guardaven a $4^{\circ}C$ fins el moment d'assajar-los.

2.7 DETERMINACIÓ DEL ^{32}P INCORPORAT A PROTEÏNA

En els experiments en els que s'utilitzà GSK-3 o histona 2A com a substrats de les proteïna quinases GSK-3 o quinasa dependent d'AMPc respectivament, la determinació del ^{32}P lligat a la proteïna es realitzava seguint el mètode descrit per Huang i Robinson (149).

Alíquotes de 10 μl de la mostra proteica que contenia el ^{32}P a mesurar, eren aplicades sobre de tires de paper cromatogràfic ITLC (10x1 cm) en les quals, prèviament, s'havien dipositat 10 μl de TCA al 20% (p/v). La cromatografia ascendent es desenvolupava utilitzant com a fase fluida TCA al 5% (p/v) i tenia la finalitat de separar el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ lliure. A continuació s'assecava el paper, es retallava la zona corresponent a la radioactivitat originalment present en la proteïna i s'introduïa en un vial que contenia 5 ml de toluè i PPO al 0,8% com a líquid d'escintil·lació.

2.8 AUTORRADIOGRAFIA INDIRECTA

La tècnica d'autorradiografia indirecta fou la tècnica escollida per a la localització de proteïnes marca-des amb ortofosfat radioactiu, degut a la seva alta sensibilitat.

Els gels secs es col·locaren en un xassís metàl·lic, hermètic a la llum, que contenia dues plaques intensificadores Micron R-O Dupont H-Plus. Entre les dues plaques es posava el gel amb contacte amb una pel·lícula autorradiogràfica, tipus MAFE RP-X1. El xassís es col·locava a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, per tal d'obtenir una resposta lineal. Una vegada passat el temps d'exposició necessari, la pel·lícula impressionada es revelava manualment.

2.9 DETERMINACIO DE LA CONCENTRACIO DE PROTEINA

Per a les determinacions quantitatives de proteïna es seguia el mètode de Bradford (31). Totes les determinacions es comparaven amb solucions de concentració coneguda d'albúmina de serum boví.