

# 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](http://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](http://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](http://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

### 3 . RESULTATS

### 3.1 DISTRIBUCIO SUBCEL·LULAR DE L'ACTIVITAT INHIBITÒRIA DE FETGE DE RATA SOBRE PROTEÏNA FOSFATASA TIPUS 1 I SUBSTRAT HMG-COA REDUCTASA

Tal com s'ha exposat prèviament en la Introducció, en el nostre Laboratori es duïen a terme diferents estudis sobre proteïna fosfatases de citosol de fetge de rata amb activitat sobre l'HMG-CoA reductasa. L'objectiu següent a assolir, que fou l'objecte d'aquesta Memòria, era l'estudi dels inhibidors proteïcs de proteïna fosfatases de citosol de fetge de rata, i la seva posterior identificació amb altres inhibidors ja descrits.

Donat que el treball de la present Memòria va coincidir en les seves primeres etapes de realització amb el treball de purificació i classificació de les quatre HMG-CoA reductasa fosfatases de citosol de fetge de rata, es va creure convenient en aquesta primera fase, la utilització de les subunitats catalítiques de la fosfatasa tipus 1 i tipus 2A de múscul esquelètic de conill (234), ja descrites i classificades, per a la determinació de l'activitat inhibidòria. A més a més, per tal d'evidenciar diferències o similituds entre l'activitat inhibidòria present en citosol de fetge de rata i la descrita en múscul esquelètic de conill, es va utilitzar també el substrat glicogen fosforilasa.

#### 3.1.1 Subfraccionament cel·lular

Un cop sacrificades les rates i extrets els fetges, es preparaven les diferents fraccions tal com s'ha descrit en l'apartat 2.6.

### 3.1.2 Preparació de les mostres i determinació de l'activitat inhibidora

Abans de procedir a la realització de l'assaig per determinar l'activitat inhibidora present en les diferents fraccions subcel·lulars, obtingudes per centrifugació, en l'apartat anterior, fou necessari preparar-les mitjançant un tractament previ. Aquest tractament era imprescindible per poder fer palesa l'activitat inhibidora. En primer lloc es sotmetien a una cromatografia de gel filtració en columna de Sephadex G-50 per a eliminar tots els inhibidors no proteics de les proteïna fosfatases. En segon lloc, a un escalfament a 95 °C durant 5 min per destruir tota l'activitat fosfatasa present en les mostres.

Una fracció de 100 µl de cada una de les mostres en les quals es volia determinar l'activitat inhibidora s'aplicava a una columna de Sephadex G-50 (5,5x0,5 cm) equilibrada amb Bis-tris 40 mM a pH 7. Seguidament es centrifugava a 3.000xg durant 3 min i, 50 µl de l'eluit s'aplicaven sobre 50 µl de solució amortidora Bis-tris 40 mM a pH 7, que es mantenia a una temperatura de 95 °C en un bany-maria. Passats 5 min, la mostra es refredava en un bany de gel i es centrifugava en una centrifugadora de sobretaula tipus "Eppendorf" a 10.000xg durant 50 min. El sobrenedant obtingut era a punt per assajar-lo.

L'assaig es duia a terme incubant 15 µl de la mostra a assajar amb 15 µl (3U) de la subunitat catalítica de la fosfatasa 1 de múscul esquelètic de conill diluïda en la solució amortidora d'assaig composta de: Bis-tris 40 mM a pH 7, DTT 1 mM i albúmina 0,5 mg/ml. La mescla s'incubava durant 15 min a 37 °C. La reacció s'iniciava a l'addicionar 20 µl (0,22 µg) d'HMG-CoA reductasa inactiva i homogenia diluïda en la solució d'assaig. Després de 15 min a 37 °C

es determinava l'activitat reductasa fosfatasa segons s'ha descrit en l'apartat 2.3.3 . L'assaig es realitzava per duplicat i es duien controls en els que s'omitia l'inhibidor, la fosfatasa, o bé ambdós components.

Una unitat d'inhibidor disminuïa l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa 1 en un 50% en les condicions descrites.

En totes les fraccions es determinà l'activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 1 i substrat glicogen fosforilasa. L'assaig es realitzava tal com s'ha descrit en l'apartat 2.3.8.2.

El resultat obtingut fou el que es mostra en la Taula II, on s'observa que l'activitat inhibidora sobre la fosfatasa 1 es localitza en la fracció citosòlica, tant si el substrat utilitzat era l'HMG-CoA reductasa com si era la glicogen fosforilasa.

Fraccions	Act. Inhbt. (%) Rd-Fosfatasa 1	Act. Inhbt. (%) Ph-Fosfatasa 1
SPM	100	100
Citosol	94	93
Primer rentat	2	1,5
Segon rentat	-	-
Microsomes	-	-
Glicogen	-	-

Act. Inhbt. = Activitat Inhibitòria  
 SPM = sobrenedant post mitocondrial  
 Rd = reductasa  
 Ph = fosforilasa

TAULA II. DISTRIBUCIO SUBCEL·LULAR DE L'ACTIVITAT INHIBITÒRIA SOBRE LA PROTEINA FOSFATASA TIPUS 1.

Les determinacions d'activitat inhibitoria es feren en tres lots de 10 g de fetge cadascun. Les mostres s'assajaven segons s'ha descrit anteriorment i en l'apartat 2.3.8.2.

Es va donar el valor de 100 a les unitats d'inhibidor de la fosfatasa tipus 1 per gram de fetge presents en el SPM de fetge de rata.

### 3.2 PURIFICACIÓ D'UN INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 1 A PARTIR DE CITOSOL DE FETGE DE RATA

Un cop determinada la presència d'inhibidors proteics de l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa tipus 1 en el citosol de fetge de rata es va procedir a la seva purificació i classificació.

#### 3.2.1 Obtenció del citosol i escalfament a 95 °C

L'obtenció de citosol es realitzà tal com s'ha descrit en l'apartat 2.6, però en aquest cas la quantitat de teixit utilitzat oscil·lava entre 110 i 120 g de fetge.

Un cop obtingut el citosol, es sotmetia immediatament a un procés d'escalfament a 95 °C durant 10 min. La preparació s'aplicava en fraccions de 10 ml sobre un volum, igual al de la mostra, de solució amortidora d'homogeneïtzació prèviament escalfada a 95 °C en un bany-maria. Aquesta operació requeria una especial atenció, ja que calia mantenir en tot moment la temperatura constant i a 95 °C. De no fer-ho així els rendiments disminuïen considerablement. Finalitzada aquesta operació, es mantenia la mescla 10 min més a 95 °C. A continuació, es refredava mitjançant un bany de gel fins a 4 °C i es centrifugava a 30.000xg durant 15 min per a eliminar tota la proteïna desnaturalitzada per l'escalfament. Es recollia el sobrenedant i es procedia a la precipitació àcida. A partir d'aquest moment tot el procés de purificació era realitzat a 4 °C.



### 3.2.2 Precipitació àcida amb TCA al 15%

La utilització de la precipitació àcida en aquest punt servia fonamentalment per concentrar la mostra i a la vegada afavoria la desnaturalització de proteïnes contaminants no resistents a tractaments àcids.

El sobrenedant que provenia de l'apartat anterior es portava a una concentració final de 15% (v/v) de TCA per addició de TCA 100% (p/v) fred. Calia que el TCA al 100% addicionat estigués a la mateixa temperatura que la mostra (4 °C), ja que en cas contrari les recuperacions d'activitat inhibidora podien disminuir en un 20%. La mescla es deixava en repòs durant 30 min i es centrifugava a 30.000×g durant 15 min. El sobrenedant que era totalment exempt d'activitat inhibidora es llençava i el precipitat es resuspensia en una solució de tris-base 0,5 M en un volum final aproximat de 10 ml. La suspensió es dialitzava tota la nit enfront 100 volums d'una solució amortidora composta de: tris/HCl 20 mM a pH 8,5; EDTA 1 mM, PMSF 1 mM i DTT 0,5 mM. Durant la diàlisi s'efectuaven quatre canvis de la solució amortidora.

### 3.2.3 Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8,5

La preparació dialitzada es sotmetia a una centrifugació a 30.000×g durant 10 min, per eliminar la proteïna desnaturalitzada durant el procés de precipitació àcida i posterior diàlisi. El sobrenedant s'aplicava a una columna de DEAE-cel·lulosa (5x3,5 cm) equilibrada amb la solució amortidora de diàlisi. La columna es rentava amb el mateix amortidor fins que l'absorbància obtinguda a 280 nm del rentat era zero.

A continuació s'elueïa l'activitat inhibidora amb un gradient lineal de 0 a 500 mM NaCl en un volum total d'amortidor de 300 ml. Es recollia en fraccions de 5 ml en un col·lector Redirac-LKB i la velocitat de flux es mantingué constant a 60 ml/h durant tot el desenvolupament de la cromatografia.

El perfil d'elució de la columna s'ha representat en la Figura 1, en la que s'observa que la inhibició produïda sobre la proteïna fosfatasa tipus 1 i substrat HMG-CoA reductasa eluïa en un sol pic entre 140 i 400 mM NaCl. Quan el substrat emprat fou la glicogen fosforilasa el resultat obtingut fou també l'obtenció d'un sol pic d'inhibició que coeluïa en les mateixes fraccions. Per ambdós substrats i en tot el procés de purificació, la fosfatasa utilitzada fou la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 de múscul esquelètic de conill.

L'assaig per determinar l'activitat inhibidora al llarg de tota la purificació i sempre que no es digui el contrari, es realitzava sempre en presència en el medi d'almenys 1 mM  $MnCl_2$  per evitar la mesura d'activitat inhibidora deguda a l'inhibidor-1.

Les fraccions amb activitat inhibidora es barrejaven i precipitaven per addició de TCA al 100% fred fins a una concentració final del 15%. La mescla es deixava en repòs durant 30 min i es centrifugava a  $30.000 \times g$  durant 15 min. El precipitat es resuspensia en 10 ml d'una solució amortidora composta d': acetat sòdic 5 mM a pH 5, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM i DTT 0,5 mM; i es sotmetia a diàlisi enfront 200 volums de la mateixa solució amortidora durant 18 h. En el curs de la diàlisi es van realitzar dos canvis d'amortidor.

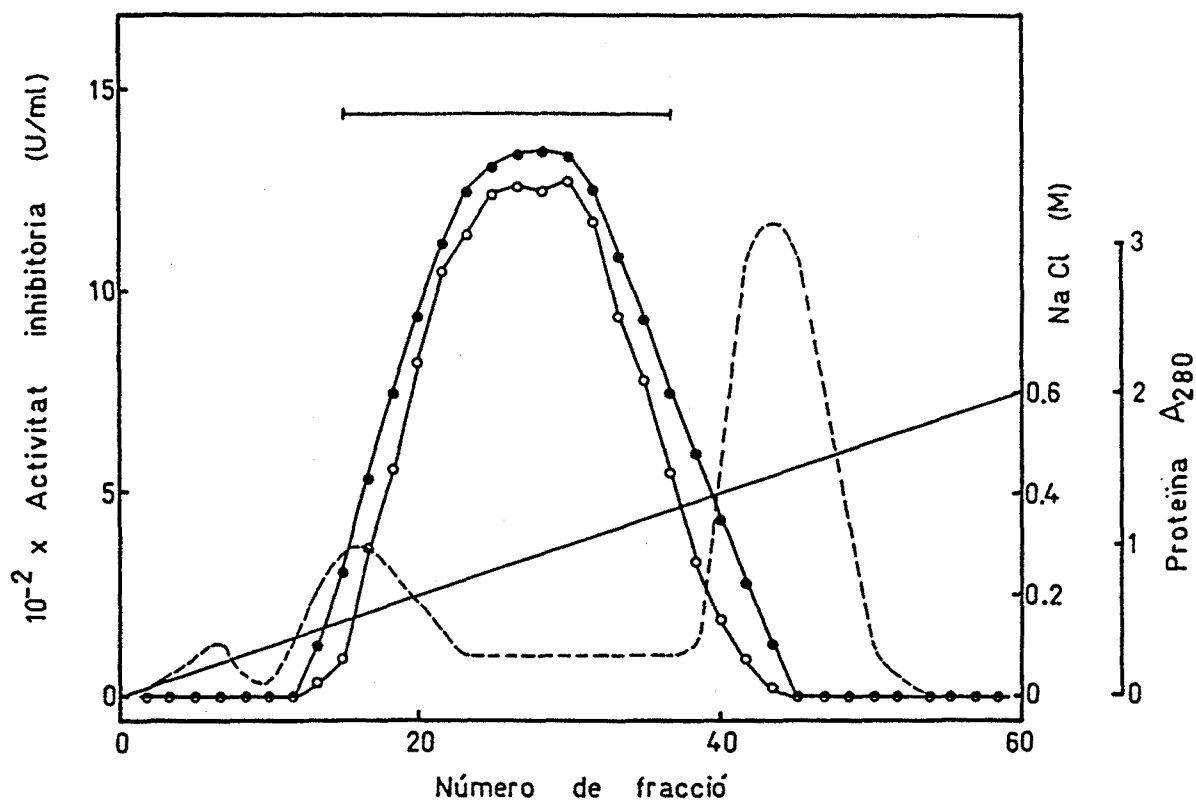


FIGURA 1. CROMATOGRAFIA DE BESCANVI IONIC EN COLUMNA DE DEAE-CEL·LULOSA A pH 8,5 DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidòria obtingut a l'aplicar el gradient de 0-500 mM NaCl en la fracció 1. Activitat inhibidòria sobre la fosfatasa tipus 1 i substrat HMG-CoA reductasa (○). Activitat inhibidòria sobre proteïna fosfatasa tipus 1 i substrat glicogen fosforilasa (●). La proteïna es determinava mesurant l'absorbància a 280 nm (---). Concentració salina (—).

Les fraccions (5 ml) amb activitat inhibidòria, que es recolliren per a la posterior concentració, estan assenyalades amb una barra horitzontal.

### 3.2.4 Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 5

La preparació dialitzada es centrifugava a 30.000×g durant 10 min per eliminar les proteïnes desnaturalitzades i seguidament el sobrenedant s'aplicava a una columna de DEAE-cel·lulosa (8x2,2 cm) equilibrada amb la solució amortidora de la diàlisi. La columna es rentava amb el mateix amortidor fins que l'absorbància a 280 nm del rentat era zero. L'activitat inhibidora s'elua amb un gradient lineal de 0 a 500 mM NaCl en un volum final de 150 ml. Les fraccions, de 3 ml, es recollien a una velocitat de flux de 35 ml/h.

En les fraccions obtingudes es determinava la inhibició produïda sobre l'activitat reductasa fosfatasa i fosforilasa fosfatasa. Tal com s'observa en la Figura 2, dos foren els pics obtinguts amb l'activitat inhibidora. El primer, el qual presentava poca activitat inhibidora, era despreciat. El segon, amb quasi tota l'activitat inhibidora elua a una concentració salina entre 200 i 350 mM NaCl. Les fraccions d'aquest segon pic s'ajuntaven i la preparació obtinguda es concentrava per addició de TCA al 100% fred fins a una concentració final del 15%. La mescla es deixava en repòs durant 30 min, es centrifugava a 30.000×g durant 15 min i el precipitat es resuspensia en un volum mínim de solució amortidora composta d': imidazol 20 mM a pH 7,5; EDTA 0,1 mM, Brij 35 0,01% (p/v), glicerol 5% (v/v), PMSF 1 mM, DTT 0,5 mM i NaCl 100 mM. La suspensió es dialitzava 8 hores enfront la mateixa solució amortidora i s'efectuaven dos canvis d'amortidor durant el transcurs de la diàlisi.

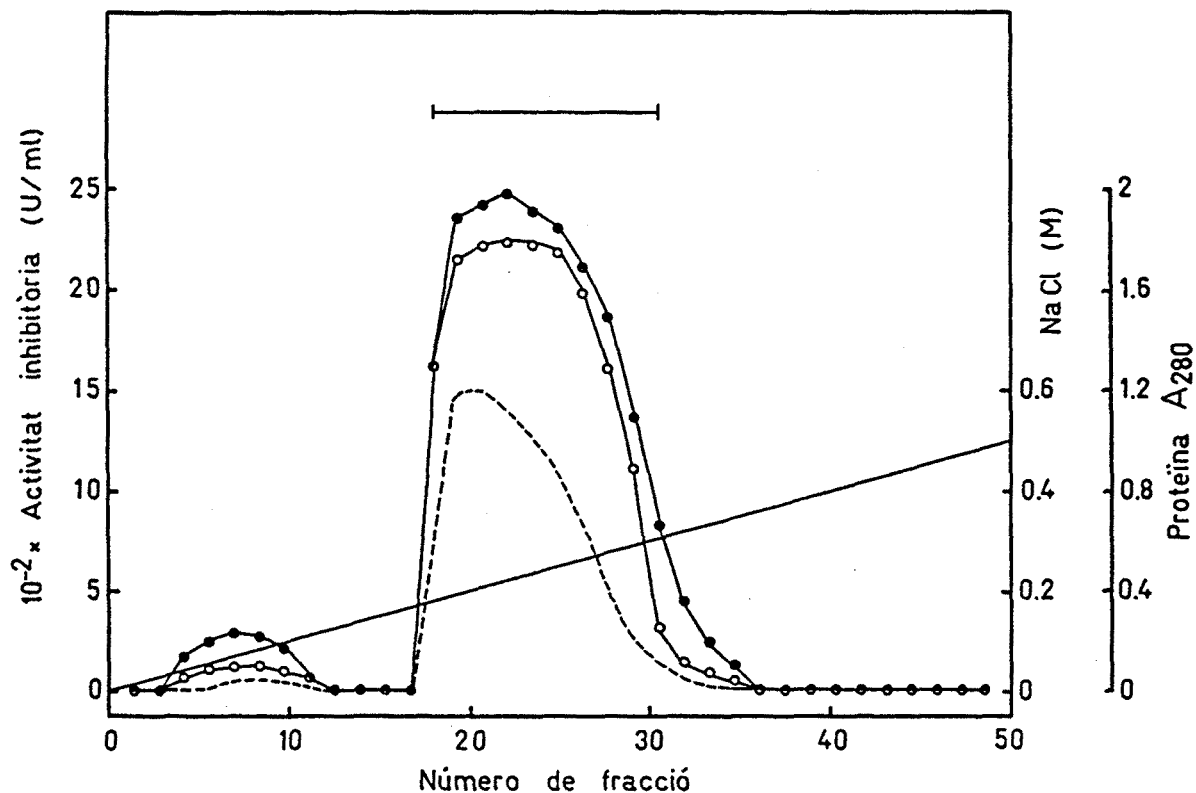


FIGURA 2. CROMATOGRÀFIA DE BESCANVI IONIC EN COLUMNA DE DEAE-CEL·LULOSA A PH 5 DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora a l'aplicar un gradient de 0-500 mM NaCl en la fracció 1. Activitat inhibidora sobre la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 i substrat HMG-CoA reductasa (○). Activitat inhibidora sobre la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 i substrat glicogen fosforilasa (●). Absorbància a 280 nm (---). Concentració salina (—).

Les fraccions (3 ml) amb activitat inhibidora, assenyalades amb una barra horitzontal, foren recollides i concentrades per precipitació.

### 3.2.5 Cromatografia en columna de Bio-Gel A 0.5m

La solució dialitzada s'aplicava a una columna de Bio-Gel A 0.5m (51x2,5 cm) equilibrada prèviament amb la solució amortidora de la diàlisi. Es recollien fraccions de 4 ml a una velocitat de flux de 20 ml/h.

Les fraccions s'assajaven per a determinar quan s'elueïa l'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 1 utilitzant com a substrats HMG-CoA reductasa i glicogen fosforilasa. Tal com s'observa en la Figura 3 aquesta elució es produïa en un pic majoritari per ambdós substrats utilitzats i emergia entre dos pics de proteïnes contaminants situats a més alt i a més baix pes molecular.

El pes molecular aparent de la preparació és aproximadament de 45 Kd (Figura 4, insert). La columna fou calibrada prèviament amb les següents proteïnes marcadores : albúmina bovina (66 Kd), ovoalbúmina (45 Kd), glicerol-dehid-3-fosfat deshidrogenasa (36 Kd), anhidrasa carbònica (29 Kd) inhibidor de tripsina de soja (21 Kd) i mioglobina (17 Kd).

Les fraccions més actives s'unien i la preparació obtinguda es diluïa amb quatre volums d'una solució amortidora composta d': imidazol 20 mM pH 7, EDTA 0,1 mM, Brij 35 0,01% (p/v), PMSF 1 mM, DTT 0,5 mM, per tal de disminuir la concentració salina de la mostra i poder ésser aplicada directament a la següent columna cromatogràfica.

En aquesta etapa de purificació no es concentrava la mostra per addició de TCA al 100% degut a la poca quantitat de proteïna i al gran volum en que anava dissolta. En cas de realitzar una precipitació la proteïna precipitada era pràcticament irrecuperable.

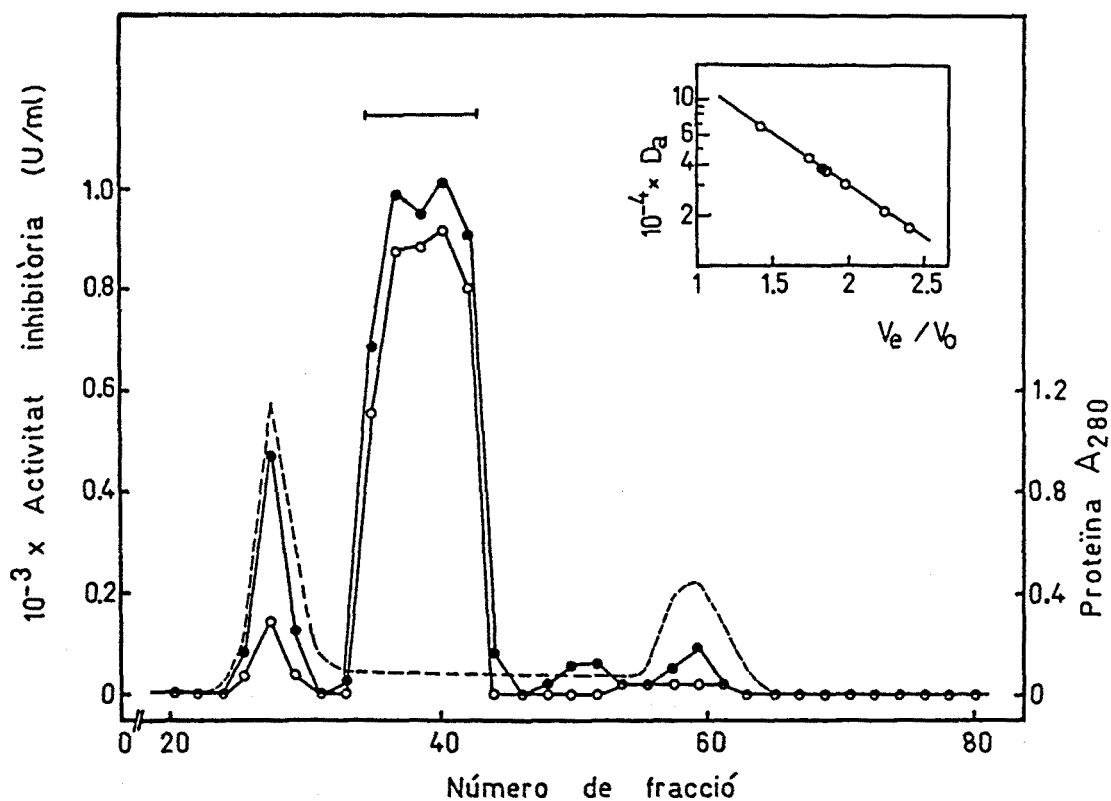


FIGURA 3: CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRACIO EN COLUMNA DE BIO-GEL A 0.5m DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidòria sobre la fosfatasa 1 i substrat HMG-CoA reductasa (○). Activitat inhibidòria sobre la fosfatasa 1 i substrat glicogen fosforilasa (●). Absorbància a 280 nm (---).

Les fraccions (4 ml) amb activitat inhibidòria, assenyalades amb una barra horitzontal, foren recollides i diluïdes.

El pes molecular aparent es va calcular per comparació del volum d'elució de l'inhibidor de la fosfatasa 1 (●) amb els de les proteïnes marcadores, enumerades en el text (○), les quals permetien elaborar la recta de calibració representada en el requadre, on :

$V_e$  = volum d'elució de cada proteïna  
 $V_o$  = volum buit de la columna

### 3.2.6 Cromatografia en columna de Blue Sepharosa CL-6B

La mostra diluïda s'aplicava a una columna de Blue Sepharosa CL-6B (7x2,1 cm) equilibrada amb la solució de dilució. Tot seguit, es rentava la columna amb la solució amortidora d'equilibrat i a continuació es feia un segon rentat amb l'amortidor i 100 mM NaCl. Finalment s'elua l'activitat inhibidora amb una concentració salina de 600 mM NaCl en la solució amortidora descrita.

Es recollien fraccions de 4 ml a una velocitat de flux de 20 ml/h. Les fraccions s'assajaven per determinar l'activitat inhibidora. Tal com s'observa en la Figura 4, el perfil d'inhibició produït sobre la proteïna fosfatasa 1 i substrat HMG-CoA reductasa és completament coincident amb el produït sobre la proteïna fosfatasa 1 i el substrat glicogen fosforilasa. Ambdós elueixen a 600 mM NaCl i en les mateixes fraccions. Cap o molt poca activitat inhibidora s'observava quan l'elució es feia amb 100 mM NaCl.

Les fraccions actives s'ajuntaven, es dialitzaven enfront una solució amortidora de tris 2 mM a pH 7, i es liofilitzaven. Les mostres obtingudes es guardaven seques a -20 °C.

En les Taules III i IV es mostra el resultat global del procés de purificació de l'inhibidor de la fosfatasa 1 amb els substrats emprats: HMG-CoA reductasa i glicogen fosforilasa, respectivament.



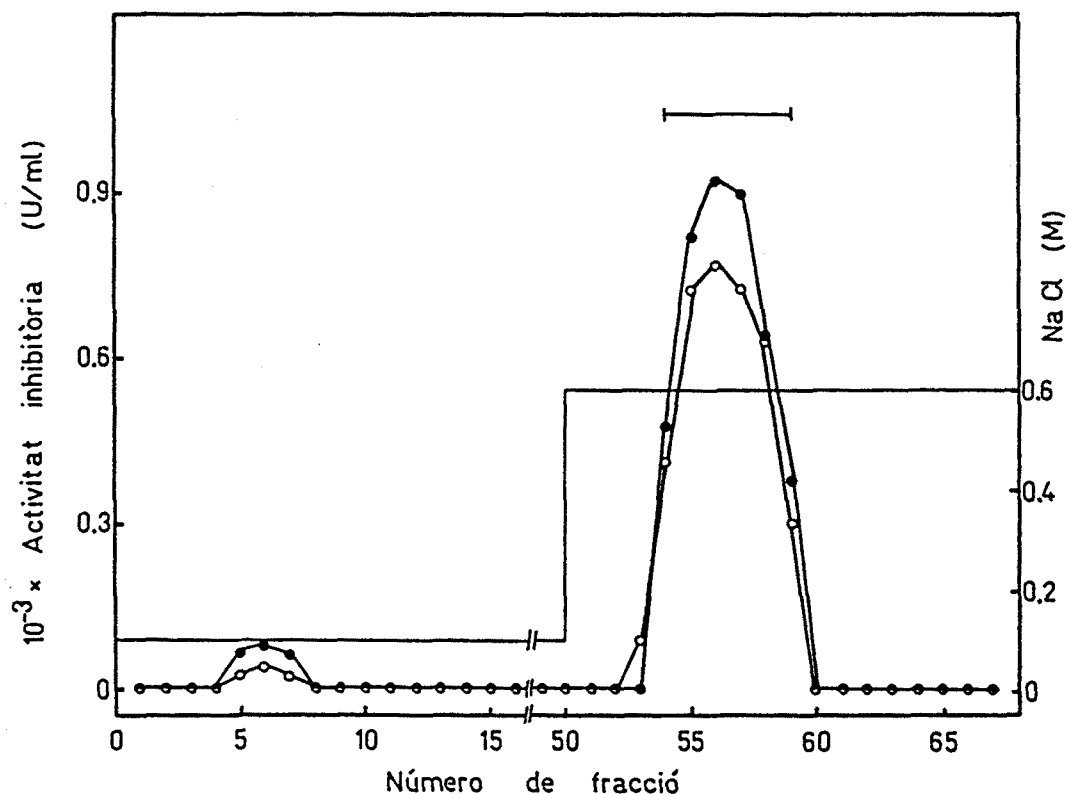


FIGURA 4. CROMATOGRAFIA D'AFINITAT EN COLUMNA DE BLUE SEPHAROSA CL-6B DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora sobre la fosfatasa 1 i substrat HMG-CoA reductasa (○). Activitat inhibidora sobre la fosfatasa 1 i substrat glicogen fosforilasa (●). Concentració salina (—).

Les fraccions (4 ml) amb activitat inhibidora, assenyalades amb una barra horitzontal, es recolliren, es concentraren per liofilització i es guardaren a -20 °C.

FRACCIO	Prot. Total	Act. Total	Act. Especf.	Pur.	Rnd.
unitats	mg	unt.	unt./mg	vg.	%
Citosol	6.900	260,0	37	1	100
Sobrenedant	102	358,0	3.500	94	137
Acid Tricloroacètic 15%	85	300,8	3.580	94	110
DEAE-cel·lulosa pH 8,5	20	128,5	6.400	172	49
DEAE-cel·lulosa pH 5	11,2	80,3	7.140	192	30
Bio Gel A 0.5m	1,8	23,7	2.700	729	8
Blue Sepharosa CL 6B	0,08	12,8	150.000	4.000	4

Prot. Total (mg)	= Proteïna total en mg
Act. Total (unt.)	= Activitat total en unitats
Act. Especf. (unt./mg)	= Activitat específica en unitats per mg
Pur. (vg.)	= Grau de purificació en vegades
Rnd. (%)	= Rendiment en %

TAULA III. RESUM DEL PROCES DE PURIFICACIO DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1 DE CITOSOL DE FETGE DE RATA AMB SUBSTRAT HMG-CoA REDUCTASA

FRACCIO	Prot. Total	Act. Total	Act. Especf.	Pur.	Rnd.
unitats	mq	unt.	unt./mq	vq.	%
Citosol	6.900	286,0	41	1	100
Sobrenedant	102	388,0	3.880	91	135
Acid Tricloroacètic 15%	85	329,6	3.880	93	115
DEAE-cel·lulosa pH 8,5	20	148,4	7.420	179	52
DEAE-cel·lulosa pH 5	11,2	89,4	7.980	192	31
Bio Gel R 0.5m	1,8	26,7	14.838	358	9
Blue Sepharosa CL 6B	0,08	14,8	185.000	4.464	5

Prot. Total (mq)	=	Proteïna total en mq
Act. Total (unt.)	=	Activitat total en unitats
Act. Especf. (unt./mq)	=	Activitat específica en unitats per mq
Pur. (vq.)	=	Grau de purificació en vegades
Rnd. (%)	=	Rendiment en %

TAULA IV. RESUM DEL PROCES DE PURIFICACIO DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1 DE CITOSOL DE FETGE DE RATA AMB SUBSTRAT GLIGOGEN FOSFORILASA

### 3.3 CARACTERITZACIO MOLECULAR DE L'INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 1

#### 3.3.1 Determinació del pes molecular en gels d'acrilamida en SDS

Donat que durant tot el procés de purificació l'activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 1 coelua amb els dos substrats utilitzats, es va analitzar la puresa de la preparació obtinguda de la columna de Blue Sepharosa CL-6B mitjançant una electroforesi en gels d'acrilamida-SDS. Per aixó, s'aplicaren 2 µg de la mostra a un gel d'acrilamida SDS al 10%. L'electroforesi es desenvolupà tal com s'ha descrit en l'apartat 2.5.1. Per a la determinació del pes molecular es van utilitzar proteïnes marcadores de pesos moleculars coneguts.

En la Figura 5 A i B, s'observen els resultats obtinguts. L'única banda de proteïna visible en el carril 2 està situada a un pes molecular de 31 Kd. Els carrils 1 i 3 corresponen a proteïnes marcadores de les que s'indica el pes molecular.

#### 3.3.2 Detecció d'activitat inhibidora en gels d'agarosa

Per determinar si la proteïna visualitzada en els gels d'acrilalmdida-SDS era la causant de l'activitat inhibidora es va procedir a la determinació d'activitat inhibidora en gels d'agarosa utilitzant el mètode emprat per Sakakibara i col. (240) descrit en l'apartat 2.5.2. Aquest mètode permetia la quasi total recuperació de la proteïna aplicada en l'electroforesi, a la vegada que el temps d'execució de tot el procés des que s'aplicava la

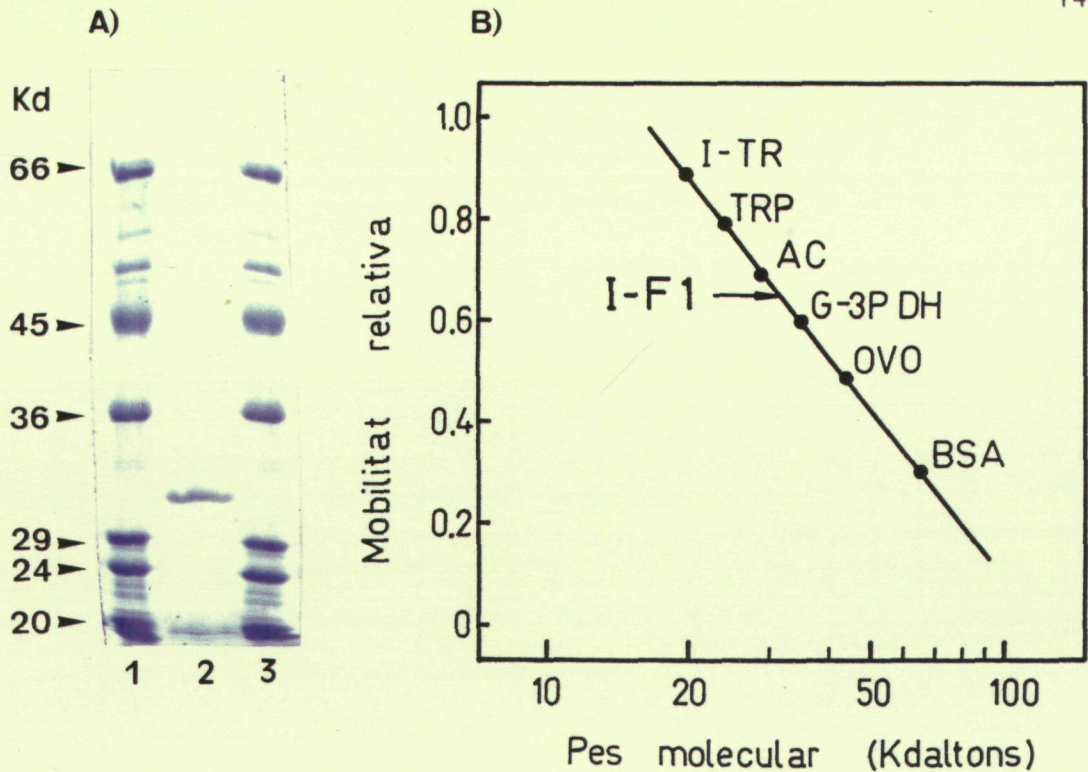


FIGURA 5. DETERMINACIÓ DEL PES MOLECULAR DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1 EN GELS D'ACRILAMIDA EN SDS

A) Una al·liquota que contenia 2  $\mu$ g (carril 2) de la preparació obtinguda en la columna Blue Sepharosa CL-6B, va ésser analitzada en un gel d'acrilamida en SDS al 10%, seguint el mètode descrit en l'apartat 2.5.1.

Les xifres laterals indiquen els pesos moleculars de les proteïnes emprades com a patrons (carrils 1 i 3): Albúmina bovina (66 Kd), ovoalbúmina (45 Kd), gliceraldeid-3-fosfat deshidrogenasa (36 Kd), anhidrasa carbònica (29 Kd), tripsinogen (24 Kd), i inhibidor de la tripsina (20 Kd). El front estava format per blau de bromfenol.

B) Es representen les mobilitats relatives, respecte al front de Blau de bromfenol, de les proteïnes marcadores envers llurs pesos moleculars. Interpolant el valor obtingut per a l'inhibidor de la fosfatasa 1, s'obtingué un pes molecular de 31 Kd.

mostra en el gel fins que s'assajava, era més curt i, per tant, la mostra estava sotmesa a condicions més suaus que en els mètodes en els que l'activitat inhibidora es mesurava en gels d'acrilamida. Per a la determinació del pes molecular s'utilitzaven proteïnes marcadores de pesos moleculars coneguts.

Quan preparacions homogènies d'inhibidor s'apliquen a gels d'agarosa SDS al 4%, els quals, un cop finalitzada l'electroforesi, es dividien en fraccions de 3 mm que posteriorment s'extreïen i s'assajaven per conèixer la seva activitat inhibidora, el resultat obtingut és el que es mostra en la Figura 6. La detecció de l'activitat inhibidora coïncidia plenament amb el lloc on estava situada la proteïna i a la que corresponia un pes molecular de 31 Kd.

### 3.3.3 Sensibilitat a la tripsina

Estudis realitzats sobre l'acció de la tripsina vers els inhibidors de fosfatases aïllats de múscul de conill, demostraven que aquests eren extremadament sensibles a l'acció d'aquesta (34, 188).

En el cas de l'inhibidor de la fosfatasa 1 de fetge de rata, els resultats obtinguts foren els que es mostren en la Figura 7A, quan el substrat utilitzat fou l'HMG-CoA reductasa; i la en Figura 7B, quan es tractava del substrat glicogen fosforilasa. En els dos casos l'activitat inhibidora anava disminuint a mesura que transcorria el temps, quan el procés es realitzava en una relació tripsina/inhibidor de 1/100 (p/p).

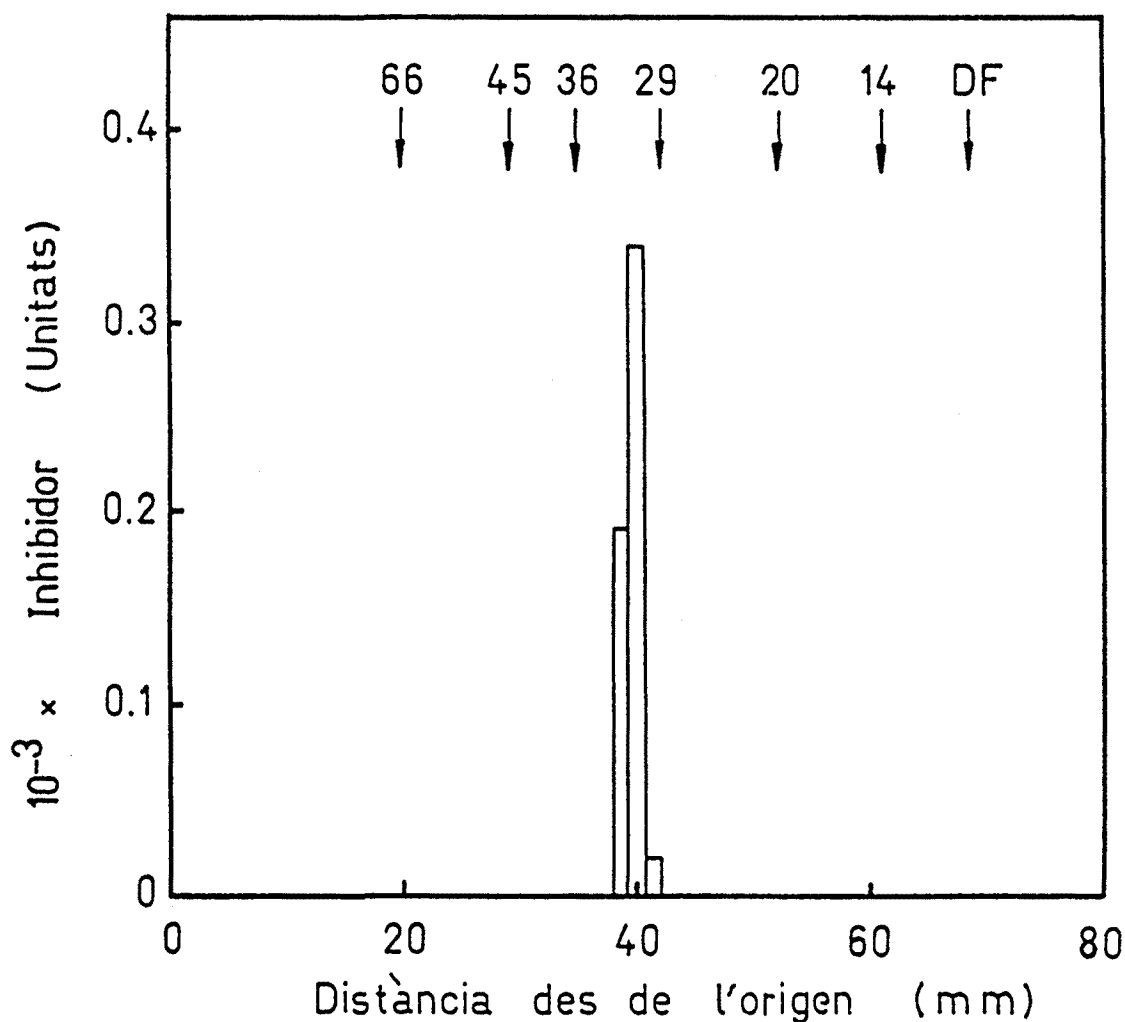


FIGURA 6. MESURA D'ACTIVITAT INHIBITÒRIA DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1 EN GELS D'AGAROSA EN SDS

Una alíquota de 10 µg d'una preparació homogènia d'inhibidor de la fosfatasa 1, era sotmesa a una electroforesi en gels d'agarosa al 4%, segons s'ha descrit en l'apartat 2.5.2. El gel es dividia en fraccions de 3 mm que, un cop extreïdes i dialitzades, eren assajades per a determinar l'activitat inhibidòria, tal com s'ha descrit en l'apartat 2.3.8.2.

Les proteïnes patrons emprades, de les que s'indica el pes molecular, foren les mateixes que s'utilitzaren en la Figura 5.

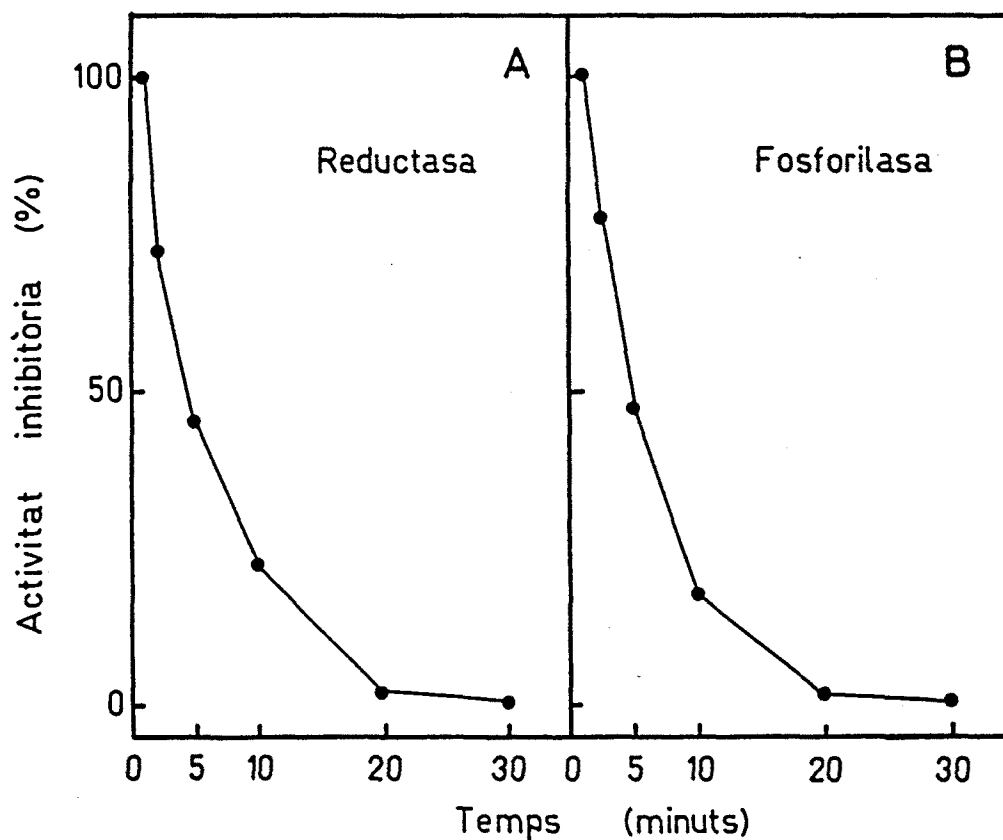


FIGURA 7. DIGESTIÓ AMB TRIPSINA DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA-1

Preparacions obtingudes de la cromatografia per Bio-Gel A 0.5m es van sotmetre a la digestió amb tripsina. El procés es realitzava en una relació tripsina/inhibidor de 1/100 (p/p) i la mescla s'incubava a diferents temps, a una temperatura de 30 °C. Seguidament es calentava 5 min a 95 °C per a destruir la tripsina, i es centrifugava en una centrifugadora tipus "Eppendorf" a 10.000xg durant 5 min. El sobrenedant s'assajava amb ambdós substrats de la fosfatasa tipus 1, HMG-CoA reductasa i glicogen fosforilasa, tal com es descriu en els apartats 3.1.2 i 2.3.8.2, respectivament.



Si les condicions utilitzades eren més fortes; es a dir, la relació tripsina/inhibidor era de 1/30 (p/p), el resultat obtingut era que en menys de 2 min l'activitat inhibidora desapareixia completament.

#### 3.3.4 Tractament amb etanol

Preparacions concentrades de la cromatografia de Bio-Gel A 0.5m eren sotmeses a un tractament amb etanol a una concentració final del 60% (v/v). Tot seguit, es centrifugaven les mescles a 10.000xg durant 5 min en una centrifugadora tipus "Eppendorf". El sobrenedant es dialitzava enfront una solució amortidora d'imidazol 20 mM a pH 7 durant 4 hores a 4 °C. El precipitat resultant s'extreia amb un volum de solució amortidora igual al volum inicial i, es dialitzava en les mateixes condicions que el sobrenedant.

Tant la mostra que provenia del sobrenedant com la del precipitat extret, s'assajaven per determinar l'activitat inhibidora sobre la fosfatasa tipus 1 utilitzant com a substrats HMG-CoA reductasa i glicogen fosforilasa. En cap cas s'obtingueren resultats positius ja que l'activitat inhibidora havia desaparegut totalment.

### 3.4 ESTUDIS CINÈTICS DE L'INHIBIDOR DE PROTEÏNA FOSFATASA 1

Un cop feta la caracterització molecular de l'inhibidor aïllat de citosol de fetge de rata, es va procedir a la realització d'estudis cinètics per tal de poder caracteritzar-lo millor. Tots aquests estudis es varen realitzar amb les subunitats catalítiques de les fosfatases tipus 1 i tipus 2 de múscul esquelètic de conill, i els substrats utilitzats foren HMG-CoA reductasa i glicogen fosforilasa.

Les similituds existents en el comportament cromatogràfic i en algunes propietats moleculars entre l'inhibidor de fosfatasa 1 aïllat de fetge de rata i, l'inhibidor-2 ja descrit de múscul esquelètic de conill (279), foren la causa per la qual aquests estudis es realitzaren amb les dues proteïnes inhibidores.

#### 3.4.1 Estudi de l'activitat inhibidora sobre proteïna fosfatases tipus 1 i 2 amb substrat HMG-CoA reductasa

Per veure l'efecte que produïa l'inhibidor de la fosfatasa 1 sobre diferents fosfatases, quantitats creixents de preparacions homogènies d'inhibidor de la fosfatasa 1, aïllat de citosol de fetge de rata i, de preparacions homogènies d'inhibidor-2 de múscul de conill, s'incubaven amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 o bé, amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 2A utilitzant com a substrat l'HMG-CoA reductasa, durant 15 min a 37 °C, tal com es descriu en l'apartat 3.1.2.

El resultat obtingut, tal com s'observa en la Figura 8, mostra que, quantitats d'inhibidor de 3 ng ja

produeixen inhibició sobre la fosfatasa tipus 1 i amb quantitats de 30 ng la inhibició sobre aquesta proteïna fosfatasa és total. Un resultat semblant és l'obtingut amb l'inhibidor-2 de múscul de conill. Ben al contrari del que succeeix amb la fosfatasa tipus 1, si la fosfatasa emprada és del tipus 2A, s'observa que grans quantitats dels dos inhibidors (100 ng) són necessàries per a obtenir una inhibició del 100% de l'activitat reductasa fosfatasa.

#### 3.4.2 Estudi de l'activitat inhibidòria sobre proteïna fosfatases tipus 1 i 2 amb substrat glicogen fosforilasa

Tal com s'observa en la Figura 9, la incubació de petites quantitats (1-10 ng) d'inhibidor de citosol de fetge de rata amb la fosfatasa tipus 1, tal com està descrit en l'apartat 2.3.8.2, produeixen ja una inhibició de l'activitat fosforilasa fosfatasa; mentre que, per aconseguir semblants inhibicions de l'activitat fosforilasa fosfatasa de la fosfatasa tipus 2A, són necessàries grans quantitats d'inhibidor.

També s'observa que l'efecte de l'inhibidor-2 de múscul de conill sobre la fosfatasa tipus 1 i sobre la fosfatasa tipus 2A enfront el substrat glicogen fosforilasa, és semblant a l'obtingut amb l'inhibidor de fetge.

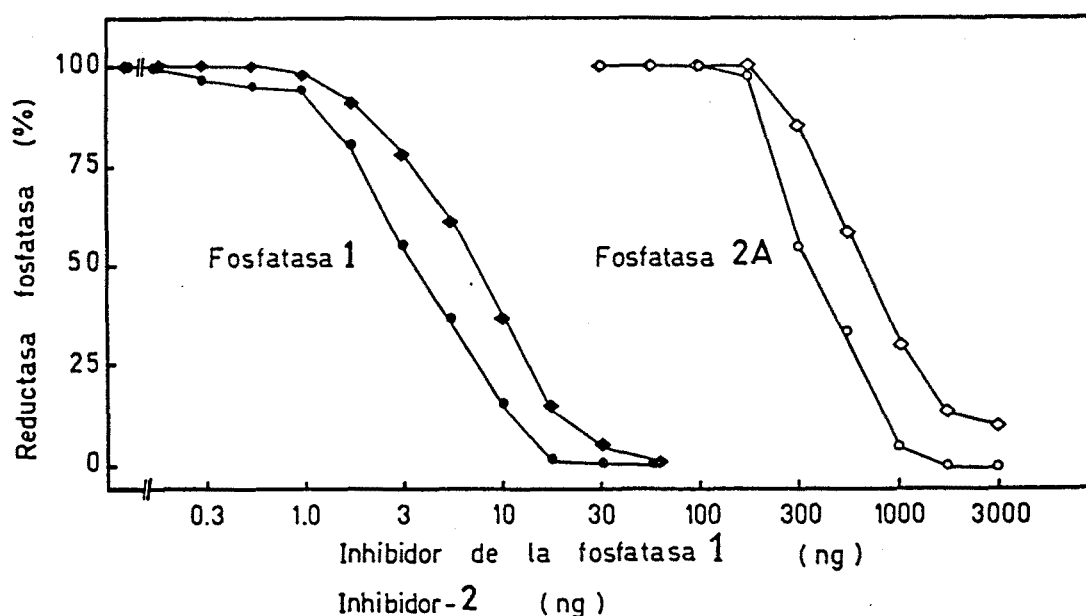


FIGURA 8. INHIBICIO DE LES PROTEINA FOSFATASES 1 I 2A PER L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1 DE FETGE DE RATA I L'INHIBIDOR-2 DE MUSCUL DE CONILL I SUBSTRAT HMG-CoA REDUCTASA

Quantitats creixents de preparacions homogènies d'inhibidor de la fosfatasa 1 de fetge de rata ( $\diamond, \blacklozenge$ ), i de l'inhibidor-2 de múscul de conill ( $\circ, \bullet$ ), s'incubaven amb una quantitat fixa (3 U) de la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 ( $\bullet, \blacklozenge$ ) o bé amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 2A ( $\circ, \diamond$ ). La determinació de l'activitat reductasa fosfatasa es realitzava segons es descriu en l'apartat 3.1.2. L'activitat s'expressa en percentatge referent a l'activitat reductasa fosfatasa sense inhibidor.

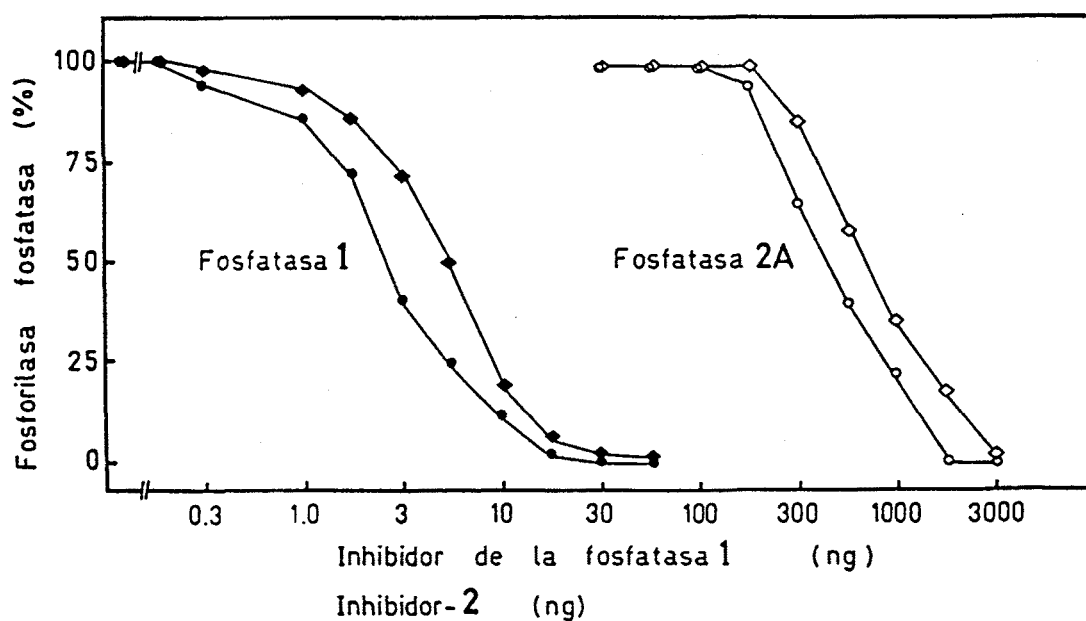


FIGURA 9. INHIBICIO DE LES PROTEINA FOSFATASES 1 I 2A PER L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1 DE FETGE DE RATA I L'INHIBIDOR-2 DE MUSCUL DE CONILL I SUBSTRAT GLICOGEN FOSFORILASA

Quantitats creixents de preparacions homogènies d'inhibidor de la fosfatasa 1 de fetge de rata ( $\diamond, \blacklozenge$ ), i de l'inhibidor-2 de múscul de conill ( $\circ, \bullet$ ), s'incubaven amb una quantitat fixa (15 U) de la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 ( $\bullet, \blacklozenge$ ) o bé amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 2A ( $\circ, \diamond$ ). La determinació de l'activitat fosforilasa fosfatasa es realitzava segons es descriu en l'apartat 2.3.8.2. L'activitat s'expressa en percentatge referent a l'activitat fosforilasa fosfatasa sense inhibidor.

### 3.5 FORMACIO DEL COMPLEX D'ATP-Mg PROTEINA FOSFATASA 1 D'ALT PES MOLECULAR

Una vegada ja demostrat que el comportament cinètic de l'inhibidor de la fosfatasa 1, aïllat de citosol de fetge de rata, era molt similar a l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill. L'objectiu següent fou verificar si l'inhibidor purificat era capaç d'unirse a la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1, i formar un complex inactiu d'alt pes molecular, tal com succeeix amb l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill (138, 263). A més a més, es va comprovar que el complex format era reactivable quan s'incubava en presència de GSK-3 i ATP-Mg.

El resultat obtingut es presenta en la Figura 10, on s'observa que, l'inhibidor de la fosfatasa 1 de fetge de rata forma, amb la subunitat catalítica de la fosfatasa 1, un complex inactiu. El fet de que es conegui que aquest complex es d'alt pes molecular, es perquè alguns autors l'han aïllat i visualitzat mitjançant electroforesi en gels d'acrilamida-SDS (138, 263, 271). En el nostre cas, aixó no fou possible degut a la poca quantitat d'inhibidor homogeni de que es disposava.

Per un altra part, en la mateixa Figura 10, es pot apreciar una reactivació quasi instantània de l'activitat fosforilasa fosfatasa del complex format a l'ésser incubat en presència de GSK-3 i ATP-Mg. Aquesta reactivació del complex d'alt pes molecular, precisa de la fosforilació de l'inhibidor per la GSK-3, i no per altres proteïna quinases (138, 263, 271).

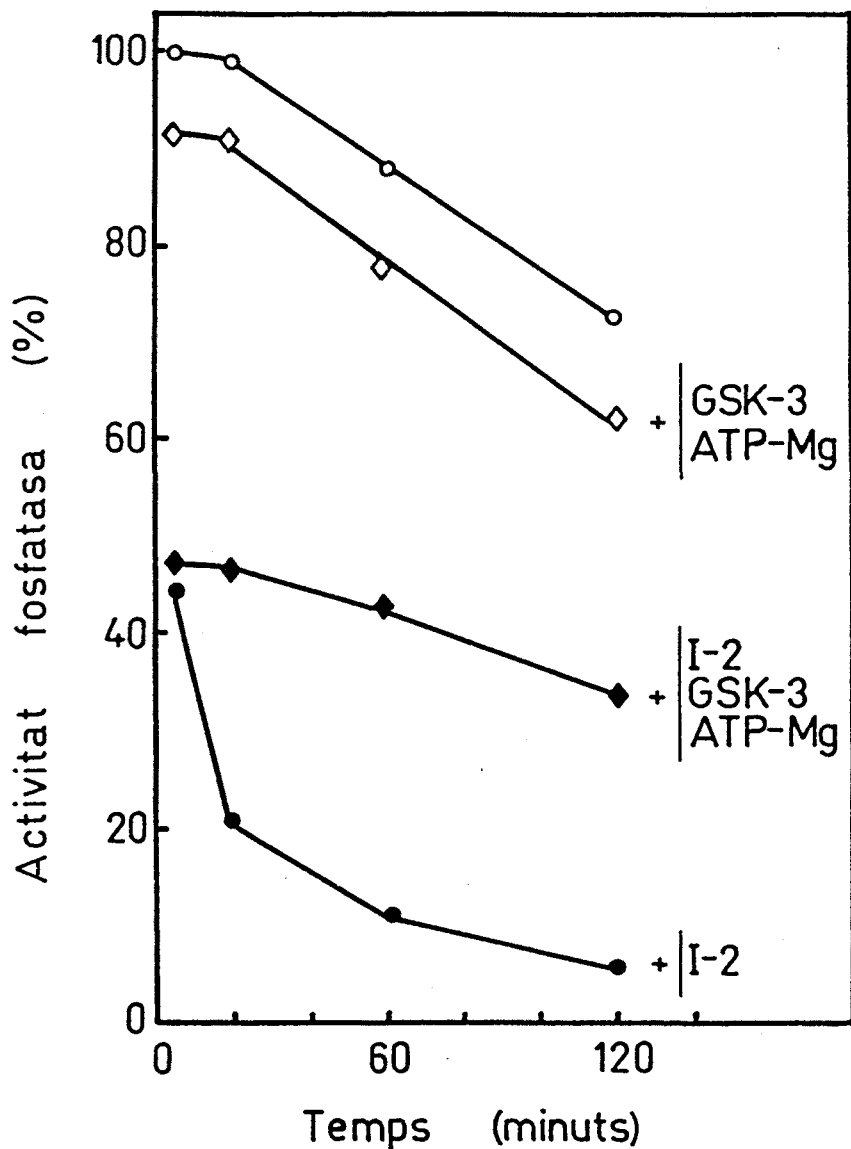


FIGURA 10. FORMACIO DEL COMPLEX ATP-Mg PROTEINA FOSFATASA 1 D'ALT PES MOLECULAR

Una preparació purificada de la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 (1 U/ml) de múscul de conill s'incubava en presència (●, ◆) o no (○, ◇) d'inhibidor de fetge de rata (150 U/ml), ambdós diluïts en una solució composta de : Bis-tris 40 mM a pH 7, PMSF 1 mM, DTT 0,5 mM i albúmina bovina 0,5 mg/ml. A diferents temps, s'extreïen fraccions de 10 µl que s'incubaven amb 20 µl de la mateixa solució amortidora (○, ●) o bé amb 20 µl d'una solució que contenia: acetat magnèsic 1,7 mM, ATP 0,17 mM i GSK-3 0,5 U/ml (◆, ◇). Passats 5 min, s'addicionava a les mescleres de reacció 20 µl de [<sup>32</sup>P]fosforilasa "a" i es continuava l'assaig tal com s'ha descrit en l'apartat 2.3.5. L'activitat s'expressa en percentatge referent a l'activitat obtinguda a l'incubar fosfatasa tipus 1 sola sense inhibidor, GSK-3 ni ATP-Mg.

### 3.6 FOSFORILACIÓ PRODUIDA PER PROTEINA QUINASES

Per tal de poder assabentar-nos si l'inhibidor de la fosfatasa 1 era fosforilable com l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill, al que tant s'assemblava des del punt de vista cinètic i molecular, es va procedir a la seva fosforilació amb diferents quinases i posterior detecció de la proteïna fosforilada per autorradiografia.

#### 3.6.1 Fosforilació produïda per acció de la quinasa dependent d'AMP cíclic i [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP

De Paoli-Roach i col. (72) demostraren que l'inhibidor-2 de múscul de conill era fosforilable per la quinasa dependent d'AMP cíclic; però aquesta fosforilació, ben al contrari del que succeïa amb l'inhibidor-1, no donava lloc a un augment de l'activitat inhibidora.

Per tal de comprovar si l'inhibidor de la fosfatasa 1 era fosforilable per proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, es van dur a terme experiments de fosforilació mitjançant la utilització de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP.

Una preparació homogènia d'inhibidor que contenia 2  $\mu$ g, s'incubava durant 30 min a 30 °C amb proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (120 mU/ml) en presència d'AMP cíclic 0,1 mM, acetat magnèsic 1 mM i [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 50  $\mu$ M d'una activitat específica de 10.000 cpm/pmol en un volum final de 50  $\mu$ l. Tot seguit, es parava la reacció escalfant la mescla durant 10 min a 95 °C, es refredava en un bany de gel durant 10 min i es centrifugava a 10.000 $\times$ g durant 10 min, per eliminar totes les proteïnes desnaturalitzades per escalfament, entre elles la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.



El sobrenedant es cromatografiava per una columna de Sephadex G-50 (0,5x5 cm), obtenint-se una preparació exempta de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, la qual cosa afavoria la visualització posterior per autorradiografia de les bandes fosforilades.

D'aquest sobrenedant, 10  $\mu$ l es preparaven per a ésser analitzats en un gel d'acrilamida-SDS al 10%. Es desenvolupava l'electroforesi tal com s'ha indicat en l'apartat 2.5.1. Un cop secs els gels, es detectava la proteïna marcada amb  $^{32}$ P, per autorradiografia procedint segons l'apartat 2.8.

El resultat obtingut es mostra en la Figura 11 on s'observa, en el carril A, una sola banda fosforilada que es corresponia amb la de l'inhibidor. El carril B era el control de la fosforilació on hi mancava l'inhibidor.

### 3.6.2 Fosforilació produïda per acció de la GSK-3 i [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP

Malgrat que ja s'ha demostrat, de forma indirecta, que l'inhibidor de la fosfatasa 1 era fosforilable per la GSK-3 en l'apartat 3.5, es va voler comprovar si aquesta fosforilació es produïa sobre l'inhibidor.

En aquest cas, 2  $\mu$ g d'una preparació homogènia d'inhibidor s'incubaven amb 5  $\mu$ g de GSK-3, acetat magnèsic 1 mM i [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 50  $\mu$ M (l'activitat específica era de 10.000 cpm/pmol) durant 30 min a 30 °C en un volum final de 50  $\mu$ l. Tot seguit, s'escalfaven les mostres durant 10 min a 95 °C per aturar la reacció i a la vegada per a produir la precipitació de la GSK-3. A continuació es refredava la

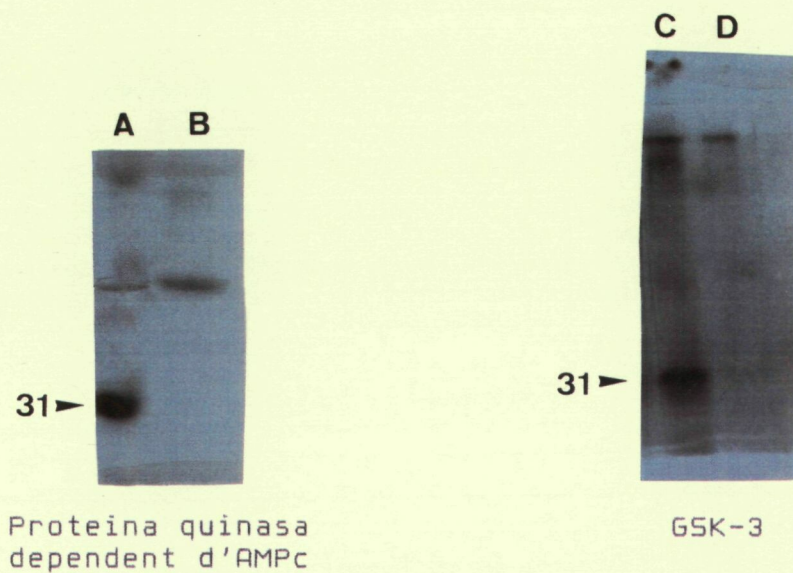


FIGURA 11. FOSFORILACIO DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1 PER PROTEINA QUINASES I [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP

Preparacions homogènies de 2  $\mu$ g d'inhibidor de fosfatasa 1 s'incubaven amb proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (A) o bé amb GSK-3 (C) en les condicions descrites en el text. Els carrils B i D corresponien a controls on hi mancava l'inhibidor de la fosfatasa 1.

mostra en un bany de gel durant 10 min i es centrifugava a 10.000xg durant 10 min.

Del sobrenedant es preparaven 10 µl per a ésser aplicats a un gel d'acrilamida-SDS al 10%, i es realitzava l'electroforesi segons les condicions descrites en l'apartat 2.5.1 . Els gels s'extreien de les plaques d'electroforesi, s'assecaven i es procedia segons l'apartat 2.8 per determinar si l'inhibidor s'havia fosforilat o no.

El resultat obtingut es pot observar en la Figura 11 en la que en el carril C s'observa l'inhibidor fosforilat i en el carril D un control en el que es va ometre l'inhibidor.

### 3.7 COMPARACIO AMB L'INHIBIDOR-1 DE MUSCUL DE CONILL

Per a comprovar que l'inhibidor aïllat de fetge de rata no presentava activitat inhibidora d'inhibidor-1 es va fosforilar en primer lloc amb la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i en segon lloc s'intentà mesurar la seva reactivació pel fet d'estar fosforilat.

Per aixó, s'incubava 40 ng d'inhibidor homogeni amb la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (120 U/ml) i en presència d': AMP cíclic 0,1 mM, acetat magnèsic 2 mM i ATP 0,2 mM, en un volum final de 60 µl, a 30 °C durant 30 min. Seguidament s'aturava la reacció escalfant durant 10 min a 95 °C. Es refredava en un bany d'aigua-gel i es centrifugava a 10.000xg durant 10 min en una centrifugadora tipus "Eppendorf". Del sobrenedant obtingut s'agafaven alíquotes que, diluïdes convenientment, s'assajaven segons està descrit en l'apartat 2.3.8.1 .

Per tal de poder determinar una possible reactivació de l'activitat inhibidora, l'assaig es realitzava amb els corresponents controls on hi mancava l'inhibidor o bé la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. En el resultat obtingut no s'obsevà cap tipus de reactivació de l'activitat inhibidora.

### 3.8 DISTRIBUCIO SUBCEL·LULAR DE L'ACTIVITAT INHIBITÒRIA DE FETGE DE RATA SOBRE PROTEINA FOSFATASA 2A I SUBSTRAT HMG-CoA REDUCTASA

La segona part del treball d'aquesta Memòria va ésser realitzada quan ja les quatre reductasa fosfatases, aïllades en el nostre Laboratori a partir de citosol de fetge de rata, estaven perfectament caracteritzades i classificades. Com a conseqüència d'aquest fet es va realitzar una anàlisi de la distribució de l'activitat inhibidòria utilitzant un conjunt d'enzims (reductasa i fosfatases) procedents del mateix teixit i animal.

A l'igual que s'ha descrit en l'apartat 3.1 es procedia en primer lloc a l'obtenció de les mostres i seguidament al seu posterior anàlisi.

#### 3.8.1 Subfraccionament cel·lular

Un cop sacrificades les rates i extrets els fetges, es preparaven les diferents fraccions tal com s'ha descrit en l'apartat 2.6.

#### 3.8.2 Determinació de l'activitat inhibidòria

Un cop obtingudes les mostres, s'havien d'acondicionar per a poder assajar-les, tal com s'ha descrit en l'apartat 3.1.2. En primer lloc s'havien d'eliminar els inhibidors no proteics presents en les mostres mitjançant una cromatografia en columna de Sephadex G-50. En segon lloc, les mostres cromatografiades s'havien de escalfar a 95 °C durant 5 min, per destruir tota l'activitat fosfatasa i fer palés així l'activitat inhibidòria.

L'assaig es realitzava de forma similar al descrit en l'apartat 3.1.2 però, en aquest cas, les fosfatases utilitzades foren la fosfatasa tipus 1 i tipus 2A d'alt pes molecular obtingudes a partir de citosol de fetge de rata.

El resultat obtingut de l'escrutini de l'activitat inhibidora fou el que es mostra en la Taula V, on s'observa l'existència d'una activitat inhibidora sobre la fosfatasa 2A quan el substrat emprat es l'HMG-CoA reductasa. Aquest resultat tant insòlit ens va suggerir la presència, en citosol de fetge de rata, d'una proteïna termoestable amb activitat inhibidora, diferent a la de l'inhibidor-2, aïllat en la primera part d'aquesta Memòria. Per això, el nostre objectiu immediat fou la purificació d'aquesta proteïna i la seva caracterització.

Fraccions	Act. Inhbt. (%)		Act. Inhbt. (%)	
	Rd-PrP 1	Rd-PrP 2	Ph-PrP 1	Ph-PrP 2
SPM	100	100	100	-
Citosol	95	95	96	-
Primer rentat	2	2	2	-
Segon rentat	-	-	-	-
Microsomes	-	-	-	-
Glicogen	-	-	-	-

Act. Inhbt.	= Activitat Inhibitòria
Rd	= HMG-CoA reductasa
Ph	= glicogen fosforilasa
PrP	= proteïna fosfatasa
SPM	= sobrenedant post mitocondrial

TAULA V. DISTRIBUCIO SUBCEL·LULAR DE L'ACTIVITAT INHIBITÒRIA DE LA PROTEÏNA FOSFATASA 2A.

Les determinacions d'activitat inhibidora es feren en tres lots de 10 g de fetge cadascun. Les mostres s'assajaven segons s'ha descrit anteriorment i en l'apartat 2.3.8.2. i 3.1.2.

Es va donar el valor de 100 a les unitats d'inhibidor de la fosfatasa tipus 2A per gram de fetge presents en el SPM de fetge de rata.

### 3.9 PURIFICACIÓ D'UN INHIBIDOR DE PROTEINA FOSFATASA 2A A PARTIR DE CITOSOL DE FETGE DE RATA

Un cop fet palès la presència en citosol de fetge de rata d'una activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 2A quan el substrat utilitzat era HMG-CoA reductasa, es va procedir a la purificació i caracterització de la proteïna causant d'aquesta activitat.

#### 3.9.1 Obtenció del citosol i escalfament a 95 °C

Per a la purificació de l'inhibidor de la fosfatasa 2A es partia d'una quantitat de teixit de fetge de rata d'aproximadament de 115 g. S'homogeneïtzava i es procedia a l'obtenció del citosol tal com s'ha descrit en l'apartat 2.6.

El citosol obtingut s'escalfava a 95 °C durant 10 min en un bany-maria. L'escalfament es realitzava dipositant fraccions de 10 a 15 ml del citosol sobre un volum de solució amortidora mantingut a 95 °C igual al volum total del citosol, tal com s'ha descrit en l'apartat 3.2.1. El procés d'escalfament es realitzava en petites fraccions per tal de que la temperatura de la mescla (citosol i solució amortidora) es mantingués en tot moment a 95 °C. Si aquest procés no es realitzava a una temperatura elevada s'obtenien rendiments inferiors al 20% d'activitat inhibidora.

#### 3.9.2 Precipitació àcida amb TCA al 15%

A l'igual que en el cas de l'inhibidor de la fosfatasa 1, aïllat en la primera part d'aquesta Memòria,



s'utilitzava la precipitació àcida per concentrar la mostra, i a la vegada, eliminar proteïnes poc resistents a tractaments àcids.

La mostra obtinguda després de l'escalfament, es sotmetia a precipitació àcida per addició de TCA 100% (p/v) fred, fins arribar a una concentració final del 15% (v/v). La precipitació es feia a 4 °C segons s'ha descrit en l'apartat 3.2.2 per a poder obtenir una recuperació majoritària de l'activitat inhibidora. A partir d'aquest moment totes les operacions es feien a 4 °C. El precipitat obtingut per centrifugació a 30.000xg durant 20 min, es resuspensia i es dialitzava durant 8 h. En el transcurs de la diàlisi es realitzaven 4 canvis d'una solució amortidora composta de: tris/HCl 20 mM a pH 8,5; EDTA 1 mM, PMSF 1 mM i DTT 0,5 mM.

### 3.9.3 Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8,5

La mostra dialitzada es centrifugava a 30.000xg durant 10 min per eliminar les proteïnes desnaturalitzades pel tractament àcid i durant el procés de diàlisi; i tot seguit, s'aplicava a una columna de DEAE-cel·lulosa (5x3,5 cm) prèviament equilibrada amb la solució amortidora amb la que s'havia dialitzat. La cromatografia es desenvolupava tal com s'ha indicat en l'apartat 3.2.3. Les fraccions abans d'ésser assajades es dialitzaven durant 4 h enfront la solució amortidora d'equilibrat de la columna, ja que la presència de sals alterava l'activitat reductasa fosfatasa.

L'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 2A de fetge de rata utilitzant HMG-CoA reductasa com a substrat es pot observar clarament en la Figura 12, on s'aprecia un

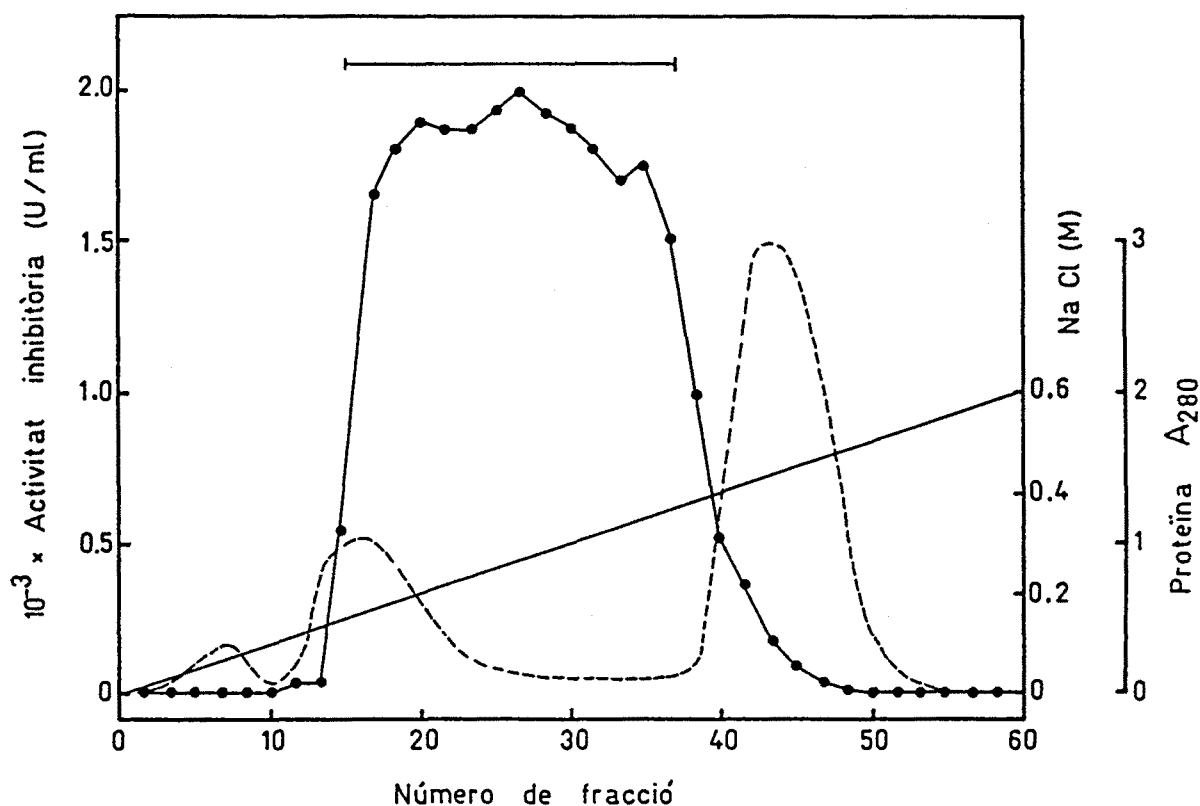


FIGURA 12. CROMATOGRAFIA DE BESCANVI IONIC EN COLUMNA DE DEAE-CEL·LULOSA A pH 8,5 DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora, a l'aplicar un gradient de 0-500 mM NaCl en la fracció 1. Activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 2A d'alt pes molecular de fetge de rata i substrat HMG-CoA reductasa (●). Absorbància a 280 nm (---). Concentració salina (—).

Les fraccions (5 ml) que mostraven activitat inhibidora, mesurada segons es descriu en l'apartat 3.1.2, es concentraven per a la posterior cromatografia.

pic ample que eluïa a una concentració salina entre 140 i 400 mM NaCl. Es reunien les fraccions assenyalades amb la barra horitzontal i es concentraven per precipitació àcida amb TCA al 100% fred, que s'addicionava a la mostra fins a una concentració final del 15% (v/v) i es deixava en repòs durant 30 min.

El precipitat recollit per centrifugació a 30.000xg durant 15 min, es resuspenia amb una solució de tris 0,5 mM. La suspensió es dialitzava enfront una solució amortidora composta de: tris 20 mM a pH 7,5; EDTA 1mM i DTT 0,5 mM durant 8 h. La solució amortidora es canviava dos cops durant la diàlisi.

#### 3.9.4 Etapes cromatogràfiques de baixa resolució

Donat que aquest inhibidor de la fosfatasa 2A mostrava en la primera cromatografia de bescanvi iònic en columna de DEAE-cel·lulosa un comportament cromatogràfic similar al de l'inhibidor de la fosfatasa 1 i, donat el fet de la desconeixença si ambdues activitats inhibidores eren causades per la mateixa proteïna, es va procedir a la búsqueda de nous tipus de cromatografies.

Malgrat que les cromatografies que a continuació es descriuen no mostraren un resultat favorable, hom creu que es fa necessària la seva descripció per a facilitar la realització de nous intents de purificació.

#### 3.9.4.1 Cromatografia en columna de Fosfocel·lulosa Watman P-11

La mostra dialitzada es centrifugava a 30.000xg durant 10 min per eliminar les proteïnes desnaturalitzades durant el procés de diàlisi; i tot seguit, s'aplicava a una columna de Fosfocel·lulosa (5x2,5 cm) prèviament equilibrada amb la solució amortidora amb la que s'havia dialitzat. S'aplicava un gradient linial de 0 a 500 mM NaCl en un volum total de 200 ml. La cromatografia es desenvolupava a una velocitat de flux de 60 ml/h i es recollien fraccions de 4 ml. Les fraccions abans d'ésser assajades es dialitzaven tal com s'ha indicat en l'apartat anterior.

L'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 2A de fetge de rata utilitzant HMG-CoA reductasa com a substrat es pot observar clarament en la Figura 13, on s'aprecia un sol pic d'activitat que elueix durant la fase d'exclusió i rentat de la columna.

Donat que aquest tipus de cromatografia no aportava cap augment en el grau de purificació de l'inhibidor, es va creure convenient desestimar-la en els pròxims intents de purificació. A continuació es va procedir a la utilització de cromatografies d'afinitat.

#### 3.9.4.2 Cromatografia en columna d'Aminohexil- Sepharosa 4 B

Una mostra obtinguda de la cromatografia en DEAE-cel·lulosa a pH 8,5; un cop dialitzada, s'aplicava a una columna d'Aminohexil-Sepharosa 4B (2x2,2 cm) equilibrada amb la solució amortidora que anava la mostra. La columna es rentava amb el mateix amortidor i l'activitat inhibitò-

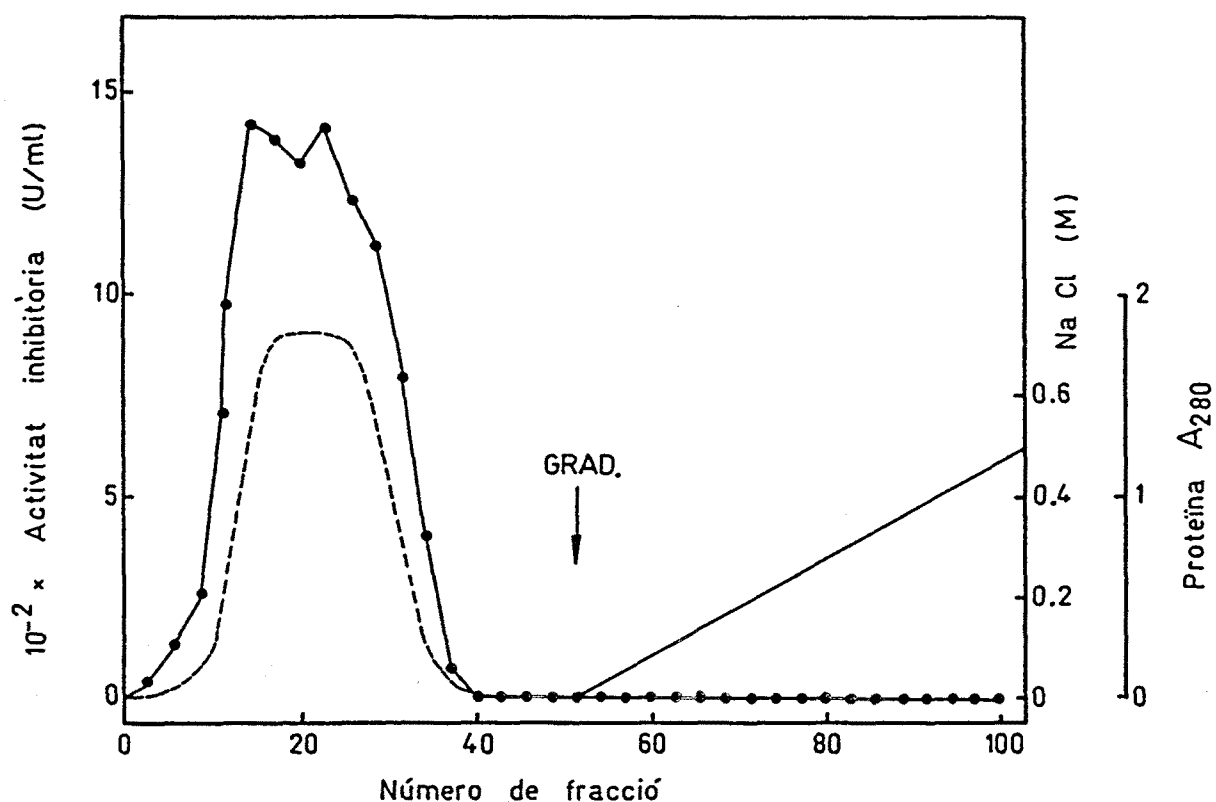


FIGURA 13. CROMATOGRÀFIA DE BESCANVI IÒNIC EN COLUMNA DE FOSFOCEL·LULOSA DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A.

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora sobre la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa (●). Absorbància a 280 nm (---). Concentració salina (—).

ria s'elua amb un gradient salí de 0 a 500 mM NaCl en un volum total d'amortidor de 150 ml. La velocitat de flux fou mantinguda constant a 20 ml/h.

Les fraccions obtingudes (2,5 ml) es dialitzaven enfront la solució d'equilibrat de la columna, i s'assajaven per determinar on elua l'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa. El perfil d'elució és el que es mostra en la Figura 14. L'activitat inhibidora elua fonamentalment en un sol pic a una concentració salina compresa entre 30 i 250 mM NaCl. Si bé el resultat obtingut aparentment semblava correcte, el rendiment era d'un 15% i per tant es considerà que no presentava cap tipus d'avantatge per avançar en el procés de purificació.

#### 3.9.4.3 Cromatografia en columna d'Affi-Gel Blue

Una mostra obtinguda de la cromatografia en DEAE-cel·lulosa a pH 8,5, un cop dialitzada, s'aplicava a una columna d'Affi-Gel Blue (2x2,2 cm) equilibrada amb la solució amortidora que anava la mostra. La columna es rentava amb el mateix amortidor i es desenvolupava en les mateixes condicions descrites en l'apartat anterior.

Les fraccions obtingudes (2,5 ml) es dialitzaven enfront la solució d'equilibrat de la columna, i s'assajaven per determinar on elua l'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa. Tal com s'observa en la Figura 15, l'activitat inhibidora era majoritàriament excluída junt amb tota la proteïna acompanyant, solament s'observa un petit augment d'activitat a una concentració salina de 200 mM NaCl.

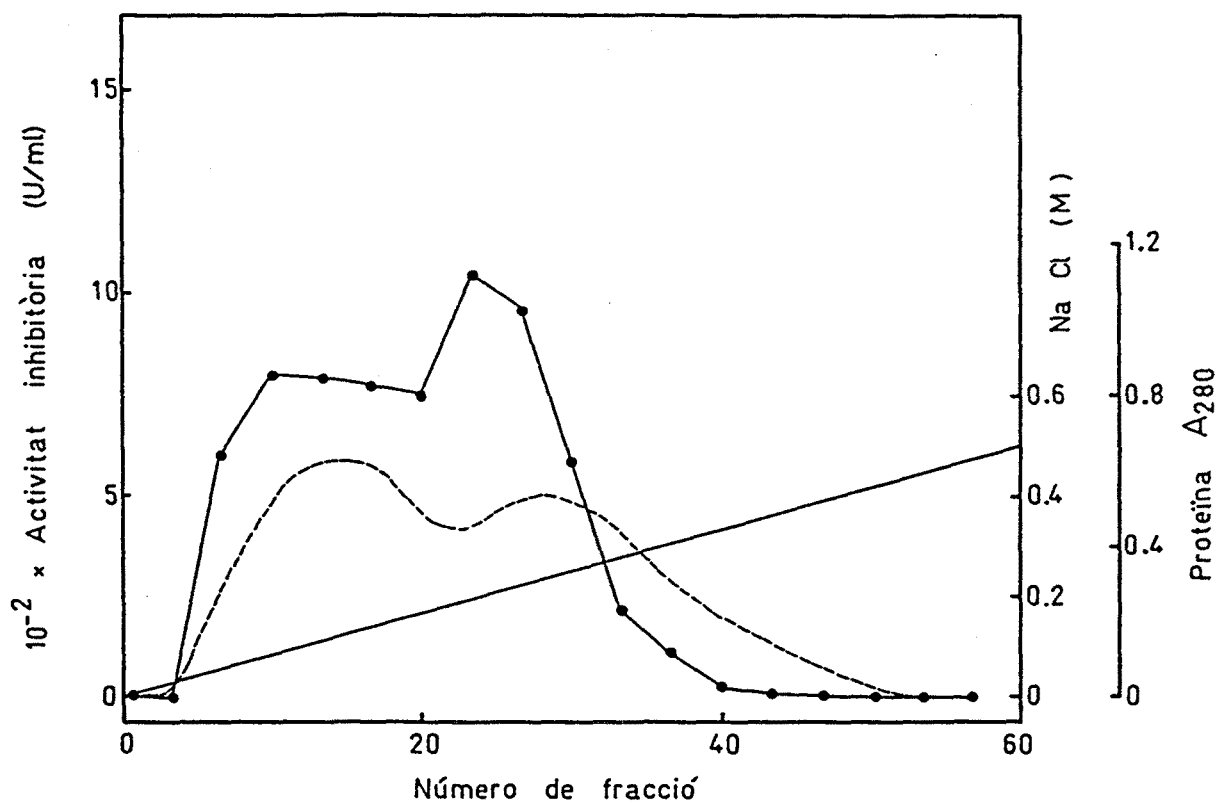


FIGURA 14. CROMATOGRÀFIA D'AFINITAT EN COLUMNA D'AMINO-HEXIL-SEPHAROSA 4B DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A.

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora obtingut a l'aplicar el gradient de 0-500 mM NaCl en la fracció 1. Activitat inhibidora sobre la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa (●). Absorbència a 280 nm (---). Concentració salina (—).

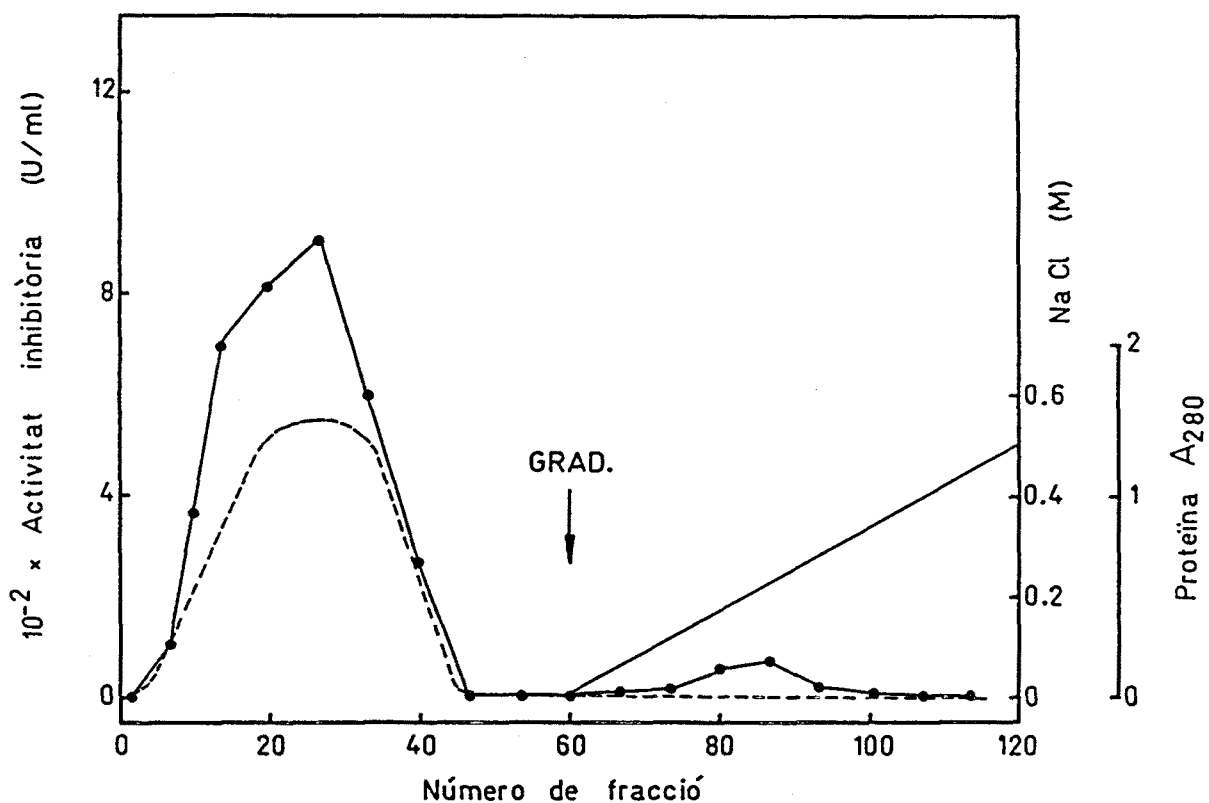


FIGURA 15. CROMATOGRAFIA D'AFINITAT EN COLUMNA D'AFFI-GEL BLUE DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A.

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora sobre la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa (●). Absorbància a 280 nm (---). Concentració salina (—).



Degut a que aquest tipus de columna no presentava cap avantatge alhora d'avançar en el grau de purificació de l'inhibidor no es cregué convenient utilitzar-la per a noves purificacions.

#### 3.9.4.4 Cromatografia en columna de Sephadex G-100

Donat que no s'obtingueren resultats favorables amb les cromatografies anteriorment exposades, es procedí a la utilització d'aquest nou tipus de cromatografia ja descrita per altres autors en la purificació d'inhibidor-2 de múscul de conill.

Una mostra obtinguda de la cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8,5 s'aplicava a una columna de Sephadex G-100 (115x1,6 cm), prèviament equilibrada amb la solució amortidora on anava la mostra en presència de 100 mM NaCl. La cromatografia es desenvolupava a una velocitat de flux de 12 ml/h. La columna fou calibrada prèviament amb proteïnes marcadores patró descrites en l'apartat 3.2.5

Les fraccions de 4 ml, prèviament a l'assaig, es dialitzaven enfront la solució de cromatografia de la columna però, sense NaCl 100 mM. La inhibició produïda sobre l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa tipus 2A mostrava el perfil representat en la Figura 16.

El resultat obtingut fou un gran pic d'activitat al llarg de tota l'elució de la columna, la qual cosa feia pensar que es tractava d'un inhibidor amb múltiples formes moleculars o bé a possibles interaccions entre la proteïna i la resina. En qualsevol cas, la cromatografia fou poc eficient i es rebutjà totalment.

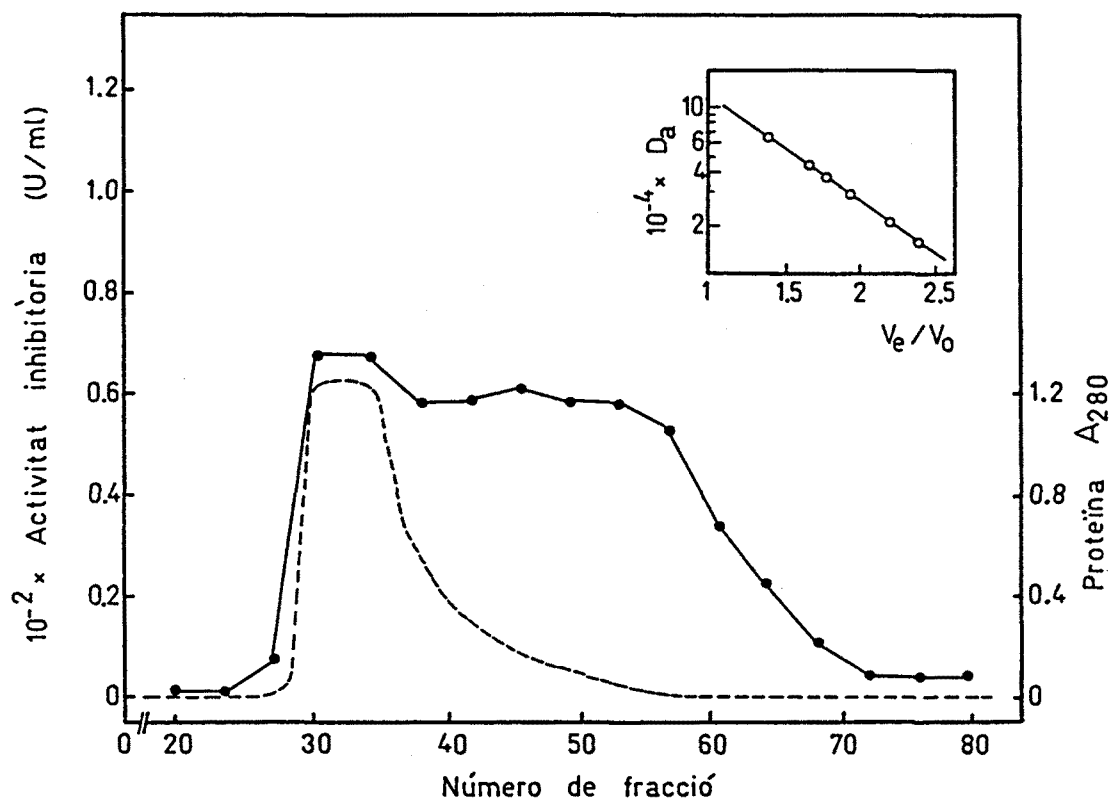


FIGURA 16. CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRACIO EN COLUMNA DE SEPHADEX G-100 DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidòria sobre la fosfatasa 2A i substrat HMG-CoA reductasa (●). Absorbància a 280 nm (---).

La columna es va calibrar amb les proteïnes marcadors, enumerades en l'apartat 3.2.5. (○) i, amb les quals s'elaborà la recta de calibració representada en el requadre, on :

$V_e$  = volum d'elució de cada proteïna  
 $V_0$  = volum buit de la columna

### 3.9.4.5 Cromatografia en columna d'Hidroxiapatita

Una mostra que provenia de la cromatografia en DEAE-cel·lulosa a pH 8,5; un cop dialitzada, s'aplicava a una columna d'Hidroxiapatita (1,5x1 cm) equilibrada amb la solució amortidora en que anava la mostra. La columna es rentava amb el mateix amortidor i 40 mM fosfat salí.- L'activitat inhibidora eluïa amb un gradient linial de 40 a 150 mM fosfat sòdic en un volum total d'amortidor de 30 ml. La velocitat de flux de la columna es mantingué constant a 20 ml/h.

Les fraccions obtingudes (0,5 ml) es dialitzaven enfront la solució d'equilibrat de la columna, ja que el fosfat emprat per a l'elució de l'activitat inhibidora inhibia l'activitat reductasa fosfatasa. A continuació s'assajaven les fraccions per determinar on eluïa l'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa. El perfil d'elució és el que es representa en la Figura 17. L'activitat inhibidora eluïa fonamentalment en un sol pic a una concentració de fosfat sòdic compresa entre 50 i 100 mM.

Si bé aquesta cromatografia implicava un gran avanç en el grau de purificació de l'inhibidor, el rendiment obtingut, d'un 10%, no era gens acceptable ja que implicava una gran pèrdua de l'activitat inhibidora. El fet de que aquesta cromatografia augmentés el grau de puresa de l'inhibidor, feu pensar en una possible utilització en una etapa final on l'inhibidor es trobés altament purificat. Malgrat que es va fer algun intent en aquest sentit, el resultat obtingut no donà lloc en cap moment a l'inhibidor en un estat homogeni.

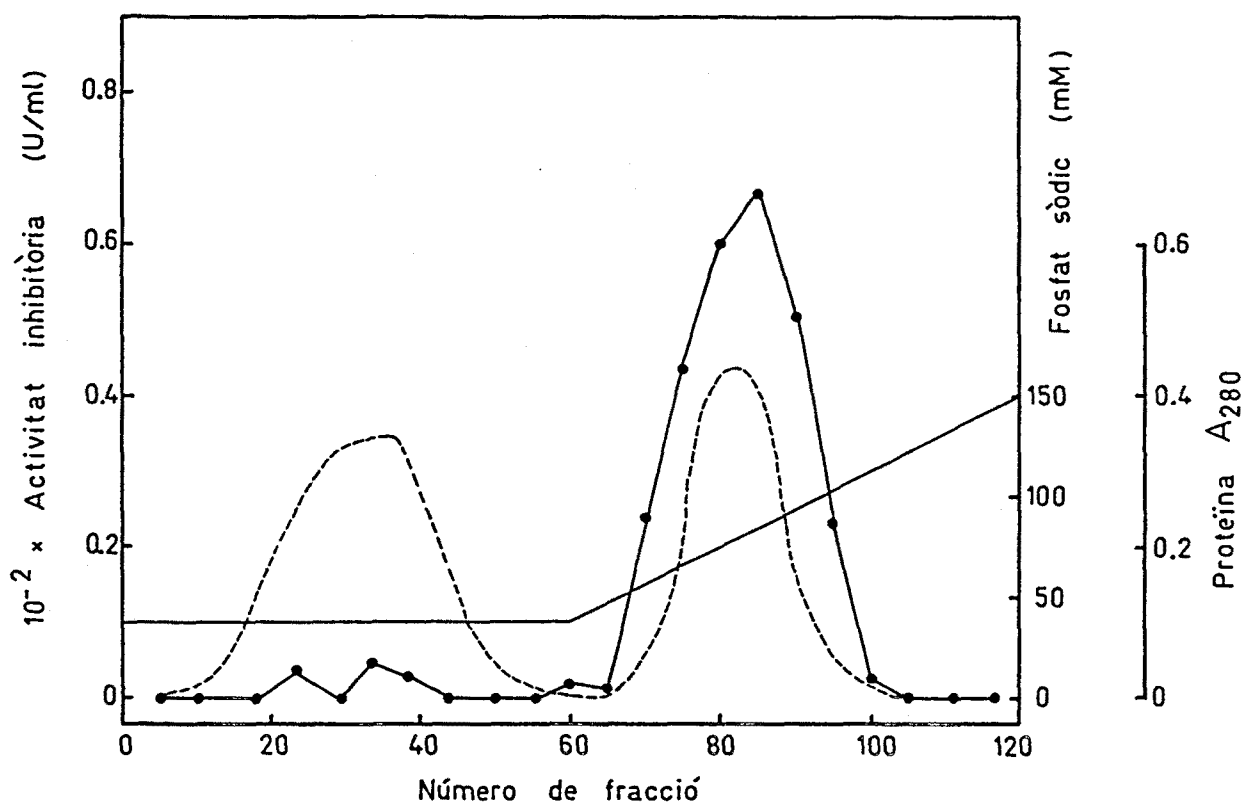


FIGURA 17. CROMATOGRÀFIA EN COLUMNA D'HIDROXIPATITA DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A.

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora obtingut a l'aplicar el gradient de 40-150 mM de fosfat sòdic. Activitat inhibidora sobre la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa (●). Absorbància a 280 nm (—). Concentració salina (—).

Finalment es va poder obtenir l'inhibidor en un estat homogeni quan s'empraren les cromatografies que a continuació es descriuen.

### 3.9.5 Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 5

Un cop concentrades les fraccions actives procedents de la cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8,5 per precipitació amb TCA al 15%, la mostra es dialitzava enfront a una solució amortidora composta d': acetat sòdic 5 mM a pH 5, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM i DTT 0,5 mM; durant 8 hores. La solució amortidora es canviava dos cops durant la diàlisi. Tot seguit, la mostra s'aplicava a una columna de DEAE-cel·lulosa a pH 5 (2x2,2 cm) equilibrada amb la solució amortidora que anava la mostra. La columna es rentava amb el mateix amortidor i l'activitat inhibidora s'elua amb un gradient salí de 0 a 500 mM NaCl en un volum total d'amortidor de 150 ml.

Les fraccions obtingudes (3 ml) es dialitzaven enfront la solució d'equilibrat de la columna, i s'assajaven per determinar on elua l'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa. El perfil d'elució es el que es representa en la Figura 18. L'activitat inhibidora elua fonamentalment en un sol pic a una concentració salina compresa entre 200 i 350 mM NaCl. Una activitat inhibidora, que no representa ni el 5% de l'activitat inhibidora total, elua a molt baixes concentracions salines. Aquesta activitat es va despreciar en totes les purificacions realitzades.

Les fraccions actives es van concentrar afegint TCA al 100% (p/v) fred fins a una concentració final de 15% (v/v). La mescla es deixava en repòs durant 30 min i

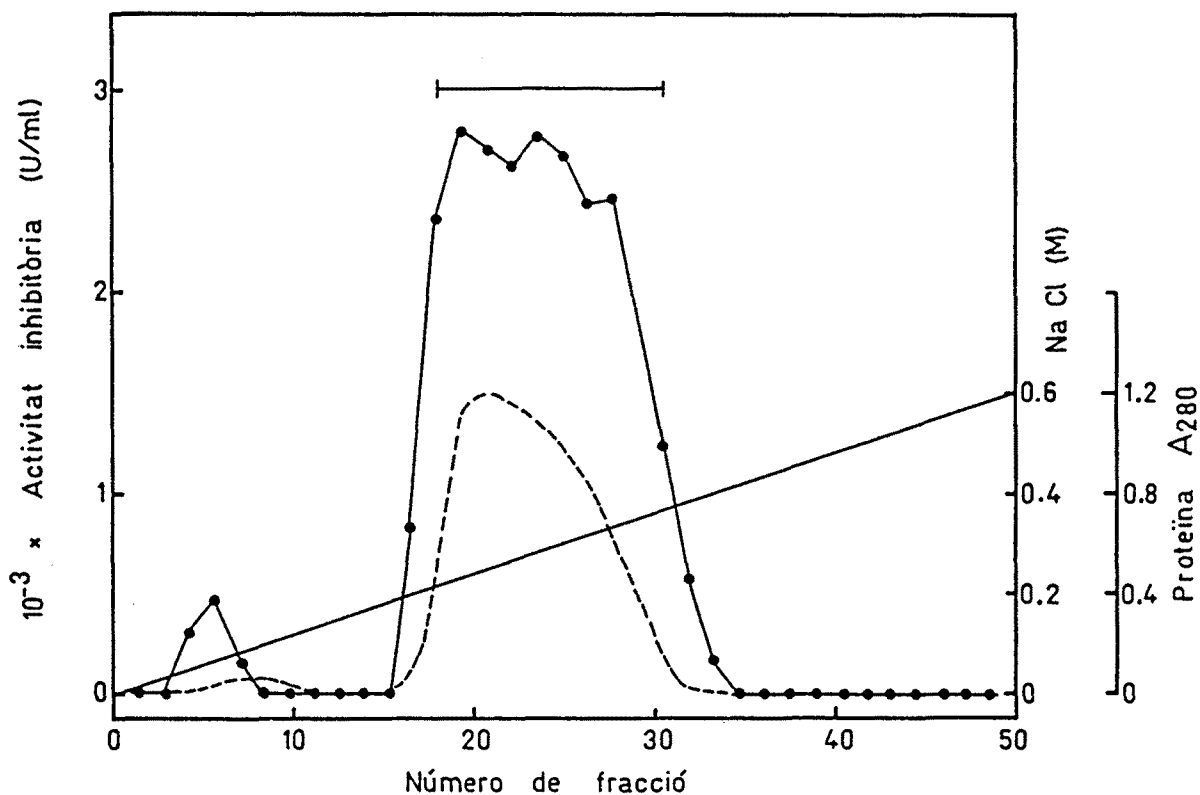


FIGURA 18. CROMATOGRAFIA DE BESCANVI IÒNIC EN COLUMNA DE DEAE-CEL·LULOSA A pH 5 DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora, a l'aplicar un gradient de 0-500 mM NaCl en la fracció 1. Activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 2A d'alt pes molecular de fetge de rata i substrat HMG-CoA reductasa (●). Absorbància a 280 nm (---). Concentració salina (—).

Les fraccions (3 ml) assenyalades amb una barra horitzontal, es recolliren i concentraren per a la posterior cromatografia.

tot seguit, es centrifugava a 30.000xg durant 15 min. El precipitat es resuspensia en una solució amortidora composta d': imidazol 20 mM a pH 7,5; EDTA 0,1 mM, Brij 35 0,01% (p/v), glicerol 5% (v/v), PMSF 1 mM, DTT 0,5 mM i NaCl 100 mM. La suspensió es dialitzava durant 4 hores enfront l'amortidor.

### 3.9.6 Cromatografia en columna de Bio-Gel A 0.5m

La preparació s'aplicava en una columna de Bio-Gel A 0.5m (51x2,5 cm) equilibrada amb la mateixa solució amortidora en que s'havia dialitzat la mostra.

Les fraccions de 4 ml, prèviament a l'assaig, es dialitzaven enfront la solució de cromatografia de la columna però sense glicerol 5% (v/v) ni NaCl 100 mM. La inhibició produïda sobre l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa tipus 2A mostrava el perfil representat en la Figura 19. Es detectaven dos pics amb activitat inhibidòria; el primer, que eluïa amb el conjunt de proteïnes de molt alt pes molecular i que presentava menys activitat inhibidòria, es va guardar per a sotmetre'l a possibles posteriors estudis. El segon pic eluïa amb un pes molecular aparent de 30 Kd (Figura 13, requadre) i, a més a més, presentava molt poca proteïna contaminant i una gran activitat inhibidòria. D'aquest segon pic es reuniren les fraccions assenyalades en la Figura 19, que ja s'havien dialitzat per l'assaig, i s'aplicaven a la següent columna.

La columna s'havia calibrat prèviament amb proteïnes marcadores de pes molecular conegut, tal com són les següents: albúmina bovina (66 Kd), ovoalbúmina (45 Kd), gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (36 Kd), anhidrasa carbònica (29 Kd), inhibidor de tripsina de soja (21 Kd) i

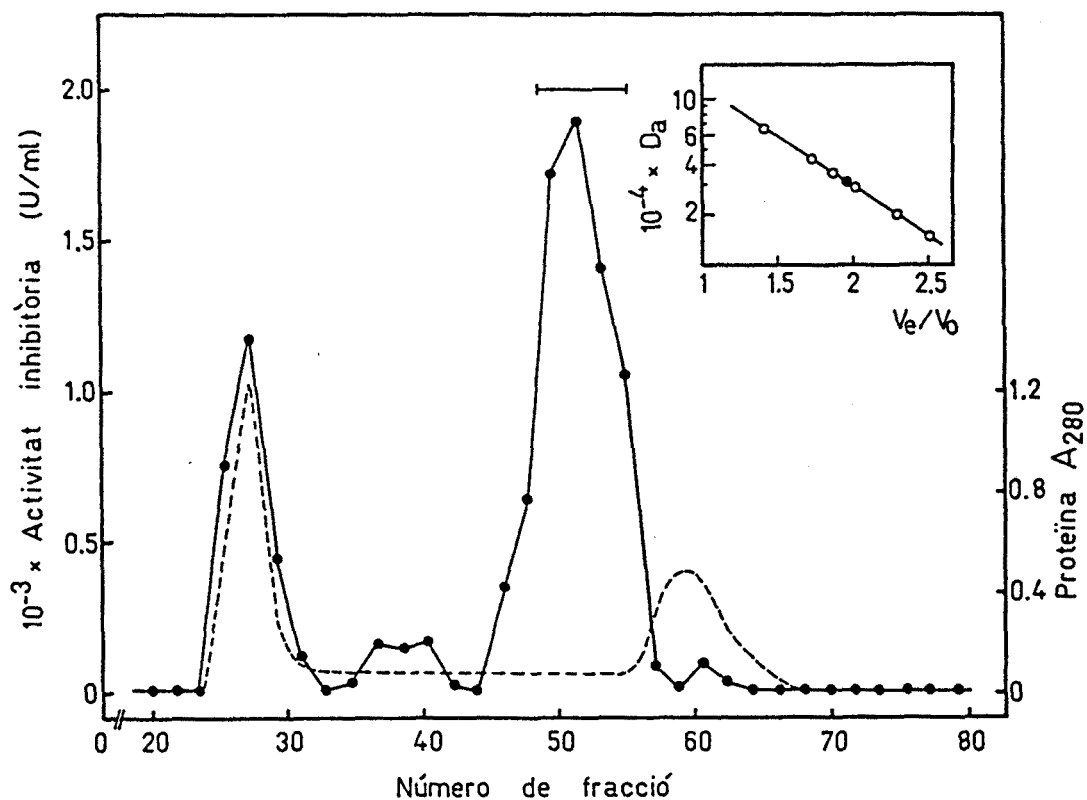


FIGURA 19. CROMATOGRÀFIA DE GEL FILTRACIÓ EN COLUMNA DE BIO-GEL A 0.5m DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA TIPUS 2A

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidòria sobre la fosfatasa 2A i substrat HMG-CoA reductasa (●). Absorbància a 280 nm (—○—).

Les fraccions (4 ml) amb activitat inhibidòria, assenyalades amb una barra horitzontal, foren recollides, diluïdes i aplicades a la següent cromatografia.

El pes molecular aparent es va calcular per comparació del volum d'elució de l'inhibidor de la fosfatasa 2A (●) amb els de les proteïnes marcadores, enumerades en el text (○), les quals permetien elaborar la recta de calibració representada en el requadre, on :

$V_e$  = volum d'elució de cada proteïna  
 $V_0$  = volum buit de la columna



mioglobina (17 Kd). El volum d'elució de les proteïnes marcadores es determinava per mesura de l'absorbància a 280 nm, mentre que el de l'inhibidor es feia per mesura de l'activitat inhibidora.

### 3.9.7 Cromatografia en columna de Blue Sepharosa CL-6B

La mostra s'aplicava a una columna de Blue Sepharosa CL-6B (7x2,1 cm) equilibrada amb la solució amortidora en que anava la mostra. A continuació es rentava la columna amb 100 ml del mateix amortidor i s'elueix l'activitat inhibidora amb una concentració salina de 100 mM NaCl en 200 ml de l'amortidor. Seguidament, s'aplicava una nova concentració salina de 600 mM NaCl en 200 ml de l'amortidor per eluir tota la possible activitat inhibidora retinguda en la columna.

Les fraccions recollides eren de 4 ml i la velocitat de flux es mantenia constant a 25 ml/h. Les fraccions es dialitzaven enfront una solució de Tris/HCl 5 mM a pH 7, i s'assajaven per a determinar l'activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 2A i substrat HMG-CoA reductasa.

En la Figura 20 es mostra el perfil d'elució de la columna, on s'observa en primer lloc, que tota l'activitat inhibidora elueix a una concentració salina de 100 mM NaCl. En segon lloc, que a una concentració de sal de 600 mM NaCl no elueix cap activitat inhibidora de la fosfatasa 2A.

Les fraccions actives s'ajuntaven i es concentraven per liofilització. L'inhibidor es guardava sec a -20 °C.

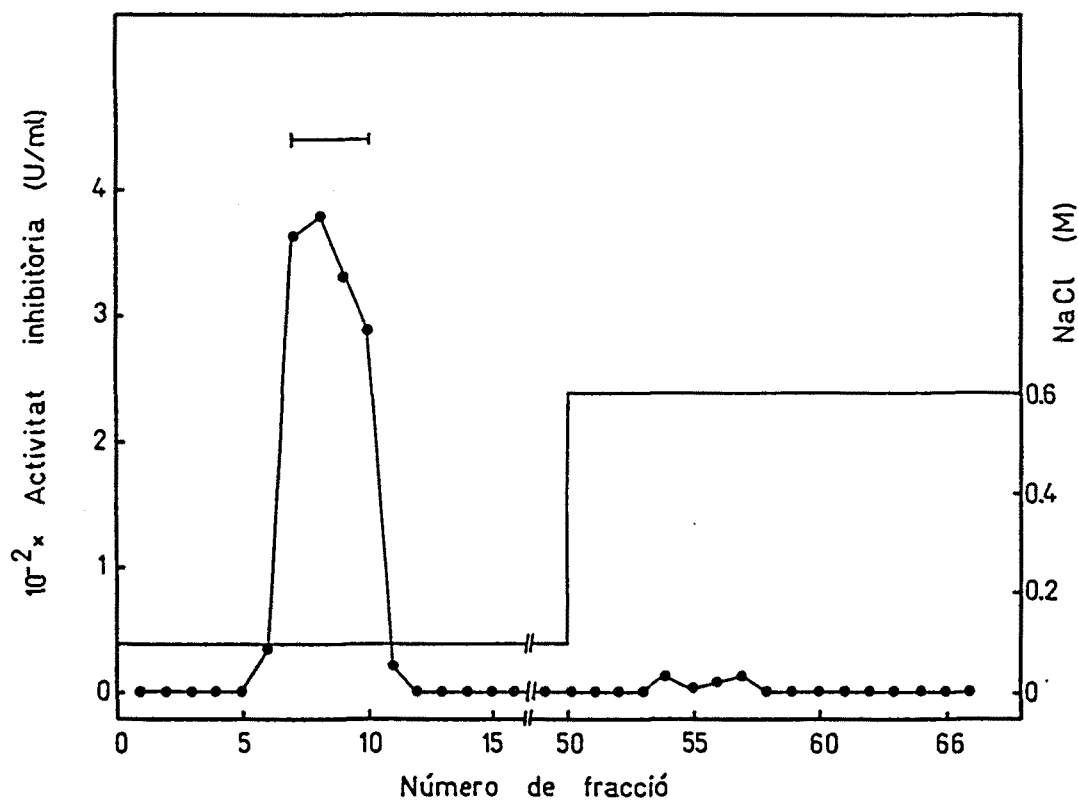


FIGURA 20. CROMATOGRÀFIA D'AFINITAT EN COLUMNA DE BLUE SEPHAROSA CL-6B DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A

La figura mostra el perfil d'elució de l'activitat inhibidora sobre la fosfatasa 2A i substrat HMG-CoA reductasa (●). Concentració salina (—).

Les fraccions (4 ml) amb activitat inhibidora, assenyalades amb una barra horitzontal, foren recollides, dialitzades, concentrades per liofilització i es guardaren a -20 °C.

En la Taula VI es mostra el resultat global del procés de purificació de l'inhibidor de l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa 2A de citosol de fetge de rata.

FRACCIO	Prot. Total	Act. Total	Act. Especf.	Pur.	Rnd.
unitats	mg	unt.	unt./mg	vg.	%
Citosol	6.900	630,0	91	1	100
Sobrenedant	102	620,0	5.166	56	98
Acid Tricloroacetic 15%	85	543,0	6.388	70	86
DEAE-cel·lulosa pH 8,5	20	209,8	10.450	114	33
DEAE-cel·lulosa pH 5	11,2	132,7	11.850	126	20
Bio Gel A 0.5m	1,8	40,4	17.565	192	6
Blue Sepharosa CL 6B	0,08	5,3	52.800	580	1

Prot. Total (mg) = Proteïna total en mg  
 Act. Total (unt.) = Activitat total en unitats  
 Act. Especf. (unt./mg) = Activitat específica en unitats per mg  
 Pur. (vg.) = Grau de purificació en vegades  
 Rnd. (%) = Rendiment en %

TAULA VI. RESUM DEL PROCES DE PURIFICACIO DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A DE CITOSOL DE FETGE DE RATA AMB SUBSTRAT HMg-CoA REDUCTASA

### 3.10 COMPARACIÓ DEL COMPORTAMENT CROMATROGRAFIC DELS DOS INHIBIDORS AILLATS DE CITOSOL DE FETGE DE RATA

Per tal d'esbrinar si ambdós inhibidors tenien un comportament cromatogràfic diferent es va procedir a la realització d'una purificació en la que es mesuraven ambdues activitats inhibidores. El substrat fou sempre l'HMG-CoA reductasa, tant si la fosfatasa emprada era de tipus 1 de múscul de conill o de tipus 2A de fetge de rata.

El procés de purificació es realitzava d'igual forma al descrit per a l'inhibidor de la fosfatasa 2A de fetge de rata, ja que aquest era similar al de l'inhibidor de la fosfatasa 1, i a més a més, presentava l'avantatge de que les fraccions de les diferents columnes cromatogràfiques es dialitzaven i per tant eren excentes de sals.

Un resum dels comportaments cromatogràfics es mostren en la Figura 21 on s'observa que ambdues activitats inhibidores coelueïen en les dos primeres columnes de bescanvi iònic de DEAE-cel·lulosa de pH 8,5 i pH 5. En la cromatografia de gel filtració en columna de Bio-Gel A 0.5m s'observa la separació d'ambdues activitats. La primera, elueix a un pes molecular aparent de 45 Kd i mostra activitat inhibidora sobre la fosfatasa tipus 1. La segona, elueix a un pes molecular aparent de 30 Kd i mostra activitat inhibidora sobre la fosfatasa tipus 2A. Un altra diferència notable és el diferent comportament cromatogràfic vers la columna de Blue Sepharosa CL-6B, on l'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 1 elueix fonamentalment a una concentració salina de 600 mM NaCl, mentre que l'activitat inhibidora de la fosfatasa tipus 2A elueix a una concentració salina de 100 mM NaCl.

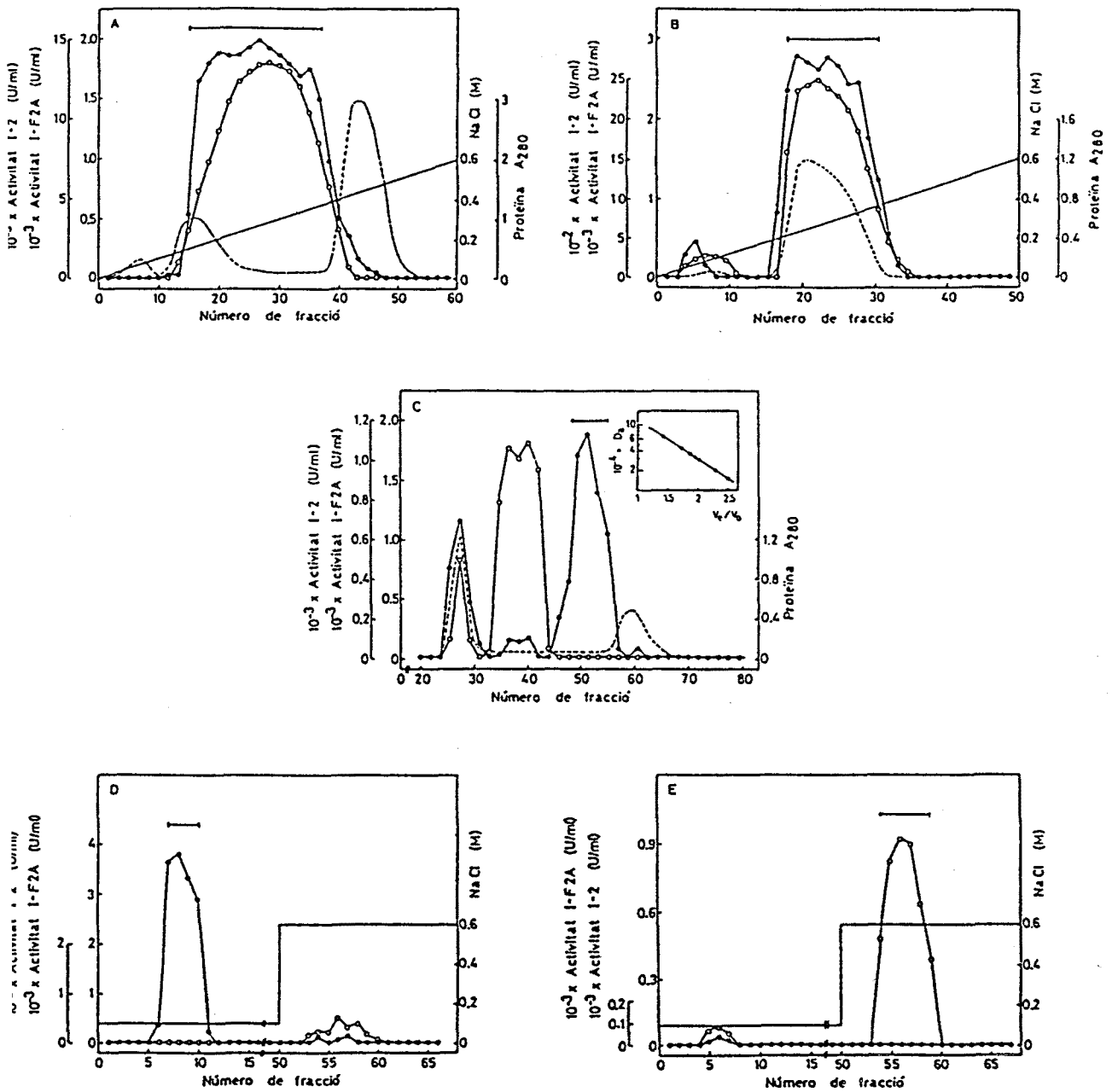


FIGURA 21. COMPARACIO DEL COMPORTAMENT CROMATOGRAFIC DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 1 (INHIBIDOR-2) I L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A

A: Cromatografia en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8,5  
 B: " " " " " " 5  
 C: " " " " Bio-Gel A 0.5m  
 D: " " " " Blue Sepharosa CL-6B  
 E: " " " " " " "

(●) Activitat de L'inhibidor de la fosfatasa 2A  
 (○) Activitat de L'inhibidor de la fosfatasa 1  
 (---) Absorbància a 280 nm  
 (—) Concentració salina

### 3.11 CARACTERITZACIO MOLECULAR DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A

Una vegada demostrat que el comportament cromatogràfic de l'inhibidor de la fosfatasa 2A, diferia del de l'inhibidor de la fosfatasa 1 (inhibidor-2), es va plantejar la necessitat de visualitzar la proteïna causant d'aquesta inhibició i determinar-ne el pes molecular.

#### 3.11.1 Determinació del pes molecular en gels d'acrilamida en SDS

L'inhibidor purificat es sotmetia a una anàlisi de puresa mitjançant gels d'acrilamida en SDS. Aquests gels es realitzaven en placa i tenien una concentració d'acrilamida del 10%. La qual cosa, permetia determinar el pes molecular de la mostra si s'utilitzava proteïnes marcadores de pes molecular conegut. L'electroforesi es desenvolupava en les condicions descrites en l'apartat 2.5.1. El gel es tenyia amb Comassie-Blue.

Quan 10 µg d'inhibidor obtinguts de la cromatografia en columna de Blue Sepharosa CL-6B, es sotmetien a l'electroforesi en gels d'acrilamida en SDS, el resultat fou el que es presenta en la Figura 22. En el carril B s'observa una sola banda a la que correspon un pes molecular de 20 Kd. En el carril A es mostren les proteïnes marcadores utilitzades, de les que s'indica el seu pes molecular.

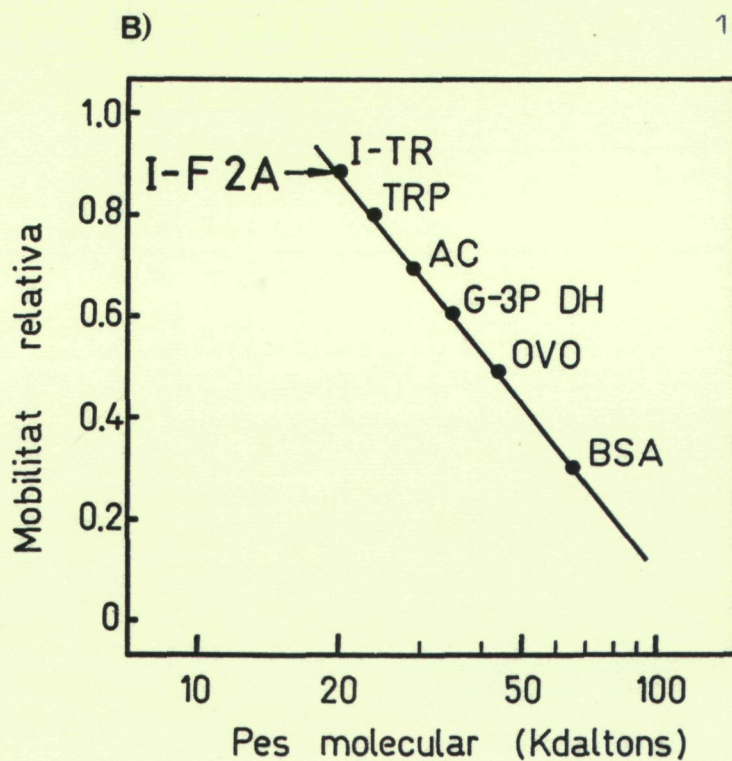


FIGURA 22. DETERMINACIO DEL PES MOLECULAR DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A EN GELS D'ACRILAMIDA EN SDS

A) Una alíquota que contenia 10  $\mu$ g (carril 2) de la preparació obtinguda en la columna Blue Sepharosa CL-6B, va ésser analitzada en un gel d'acrilamida en SDS al 10%, seguint el mètode descrit en l'apartat 2.5.1.

Les xifres laterals indiquen els pesos moleculars de les proteïnes patrons emprades (carril 1): Albúmina bovina (66 Kd), ovoalbúmina (45 Kd), gliceraldeid-3-fosfat deshidrogenasa (36 Kd), anhidrasa carbònica (29 Kd), tripsinogen (24 Kd), i inhibidor de la tripsina (20 Kd). El front estava format per blau de bromfenol.

B) Es representen les movilitats relatives, respecte al front de Blau de bromfenol, de les proteïnes marcadores envers llurs pesos moleculars. Interpolant el valor obtingut per a l'inhibidor de la fosfatasa 2A, s'obtingué un pes molecular de 20 Kd.



### 3.11.2 Detecció d'activitat inhibidòria sobre la proteïna fosfatasa 2A en gels d'agarosa

Tal com ja hem vist en la present Memòria per l'inhibidor de la fosfatasa 1, a l'igual que ja havia estat demostrat per l'inhibidor-2 procedent de múscul esquelètic de conill, el fet d'aplicar-los a gels d'acrilalamida o agarosa (en el cas de l'inhibidor-2 de fetge de rata) en presència de SDS i el posterior desenvolupament de l'electroforesi, no causava pèrdua de l'activitat inhibidòria. En el cas de l'inhibidor de la fosfatasa 2A, si bé es preveia un comportament similar fou necessari verificar-ho.

Els primers intents de detecció d'activitat inhibidòria foren realitzats en gels d'acrilamida però, degut a l'escassa elució de la proteïna d'aquests gels i al llarg temps de durada d'aquesta elució, el resultat obtingut no fou gens satisfactori. En conseqüència, s'optà per la utilització de gels d'agarosa seguint el mètode, lleugerament modificat, de Sakakibara i col. (240) i que s'ha descrit en l'apartat 2.5.2. Aquest mètode oferia el gran avantatge de la quasi total recuperació de la proteïna sotmesa a electroforesi i, per tractar-se d'un procés de més curta durada, també es produïa una gran recuperació de l'activitat inhibidòria.

Dos mostres concentrades de 10 µg cada una que provenien de la columna de Bio-Gel A 0.5 m, es sotmetien a l'electroforesi en gels d'agarosa en SDS al 4%. Seguidament, el gel es dividia en dos parts; una, que contenia una de les mostres, es tenyia amb Comassie-Blue. L'altra part del gel, el carril corresponent a la mostra es dividia en fraccions ordenades de 3 mm. Un cop les fraccions s'havien extret i els extractes s'havien dialitzat, tal com es descriu en l'apartat 2.5.2, s'assajava l'activitat inhibi-

tòria de cada fracció sobre la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa.

La diàlisi de les fraccions extreïdes fou un pas obligat en tots els casos en que es volia medir activitat inhibidora ja que la presència de sals, detergents o d'altres productes utilitzats en l'electroforesi, afectaven greument a l'activitat reductasa fosfatasa.

El resultat obtingut es mostra en la Figura 23, on s'aprecia una gran inhibició just on es situava la banda de proteïna del gel tenyit i que corresponia a un pes molecular de 20 Kd.

### 3.11.3 Digestió amb tripsina

Diversos autors havien demostrat que els inhibidors de fosfatases eren extremadament sensibles al tractament amb tripsina. Per verificar si l'inhibidor de la fosfatasa 2A presentava també aquesta propietat, preparacions obtingudes en la cromatografia de gel filtració en columna de Bio-Gel A 0.5m es van sotmetre a un tractament amb tripsina.

Si les condicions de tripsinització es duïen a terme en una relació tripsina/inhibidor de 1/30, el resultat que s'obtenia era una pèrdua dràstica de l'activitat inhibidora. Si el procediment es realitzava en unes condicions més suaus i per tant, la relació tripsina/inhibidor es rebaixava a 1/100 (p/p), s'obtenia el resultat que es mostra en la Figura 24. En ella s'observa que l'activitat inhibidora disminuïa amb el temps d'incubació.

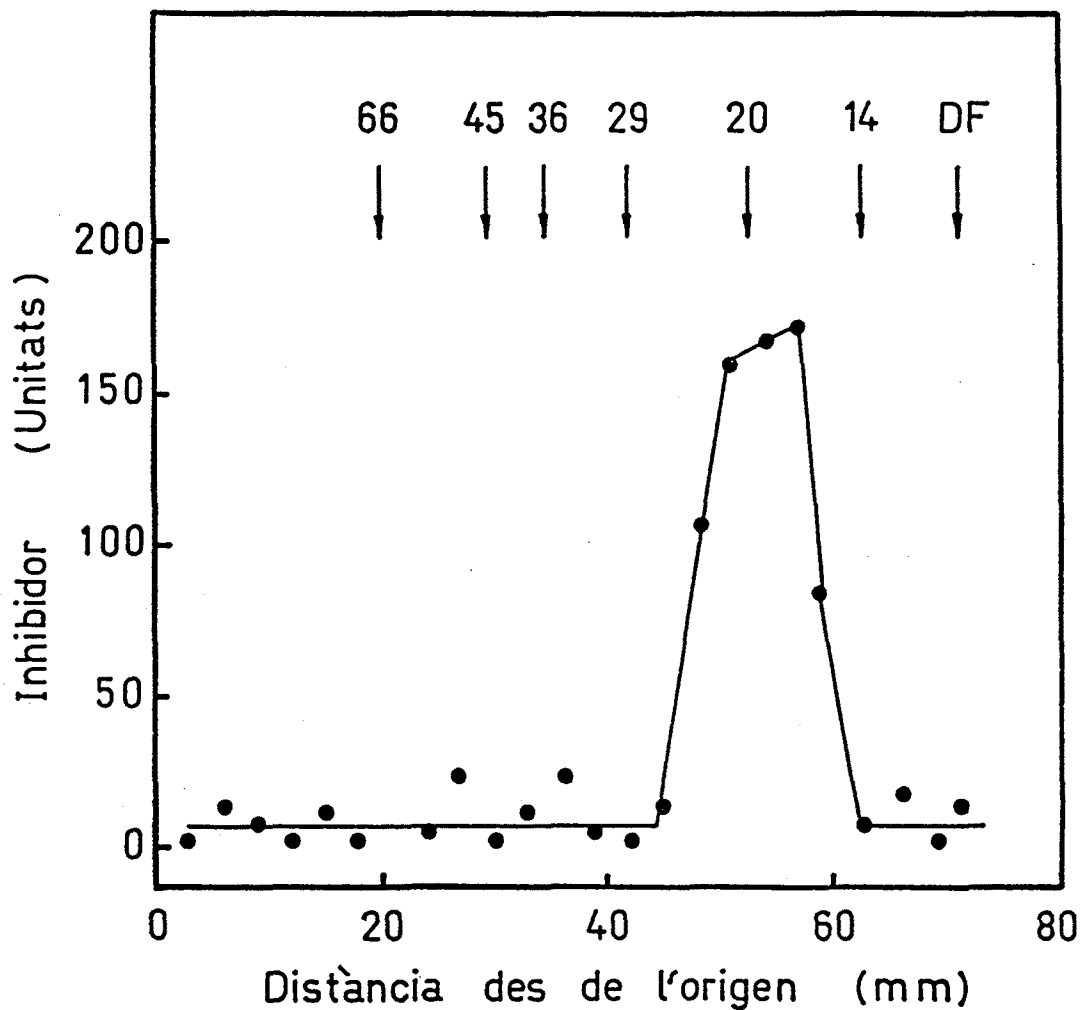


FIGURA 23. MESURA DE L'ACTIVITAT INHIBITÒRIA DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A EN GELS D'AGAROSA EN SDS

Una alíquota de 10  $\mu$ g d'una preparació d'inhibidor de la fosfatasa 2A provinent de la columna de Bio-Gel A 0.5m, era sotmesa a una electroforesi en gels d'agarosa al 4%, segons s'ha descrit en l'apartat 2.5.2. El gel es dividia en fraccions de 3 mm que, un cop extretes i dialitzades, eren assajades per a determinar l'activitat inhibidora, tal com s'ha descrit en l'apartat 3.1.2.

Les proteïnes patrons utilitzades, de les que s'indica el pes molecular, foren les mateixes que s'utilitzaren en la Figura 22.

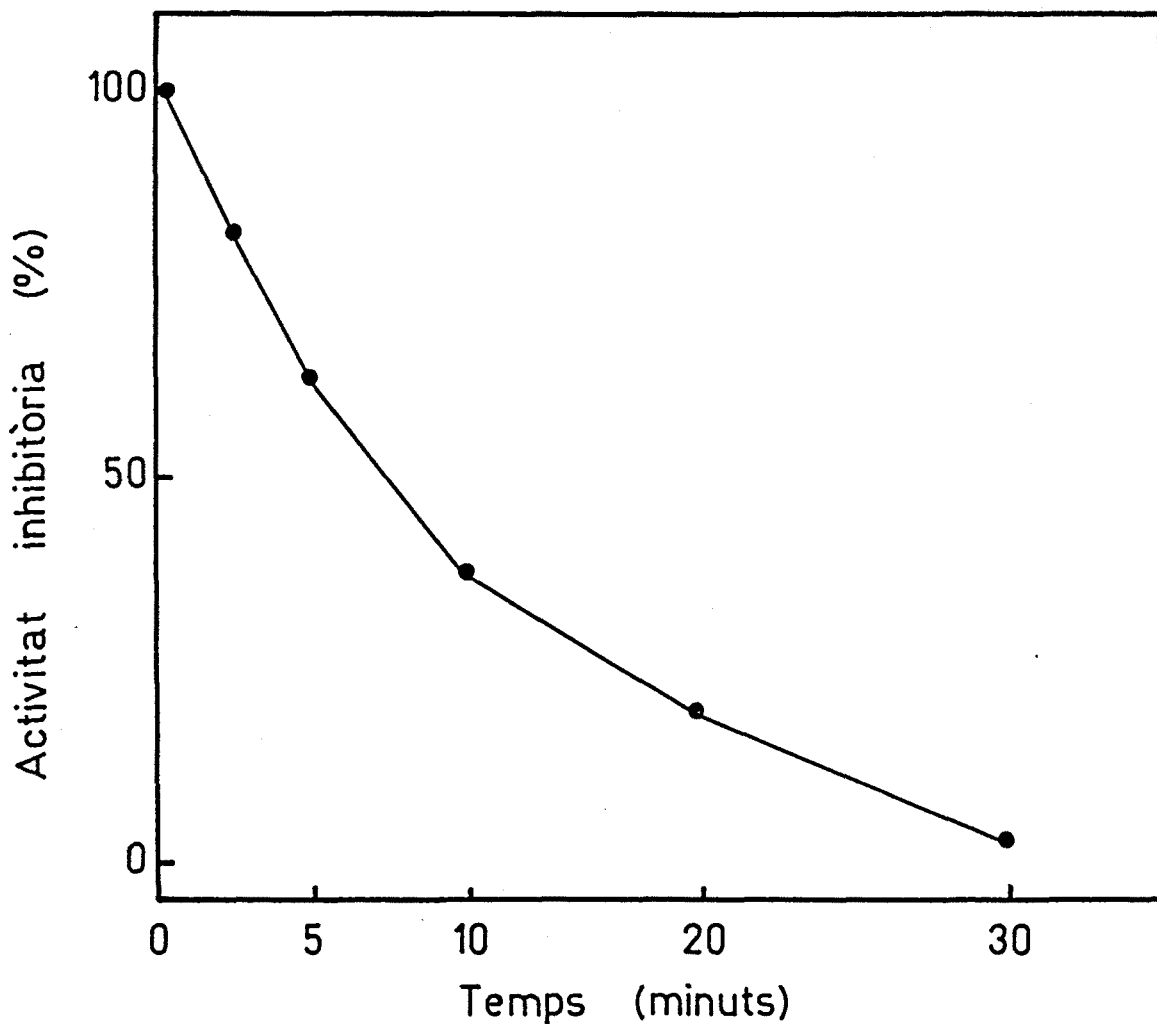


FIGURA 24. DIGESTIO AMB TRIPSINA DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A

Preparacions obtingudes de la cromatografia per Bio-Gel A 0.5m es van sotmetre a la digestió amb tripsina. El procés es realitzava en una relació tripsina/inhibidor de 1/100 (p/p) i la mescla s'incubava a diferents temps, a una temperatura de 30 °C. Seguidament es calentava 5 min a 95 °C per a destruir la tripsina, i es centrifugava en una centrifugadora tipus "Eppendorf" a 10.000xg durant 5 min. El sobrenedant s'assajava per determinar l'activitat inhibidora sobre la fosfatasa 2A i substrat HMG-CoA reductasa segons s'ha descrit en l'apartat 3.1.2.

#### 3.11.4 Tractament amb etanol

Es va voler comprovar també l'efecte que produïa l'etanol sobre l'inhibidor de la fosfatasa 2A. Per aixó, diferents preparacions concentrades de l'inhibidor obtingudes en la cromatografia en Bio-Gel A 0.5 m es sotmetien a un tractament amb etanol.

A 200 µl de l'inhibidor que contenien 10 µg d'aquest, s'addicionaven etanol al 95% fins a una concentració final del 60% (v/v). La mescla es deixava en repòs durant 5 min i tot seguit es centrifugava a 10.000×g durant 5 min. El sobrenedant es dialitzava durant 4 h a 4 °C enfront una solució amortidora d'imidazol 20 mM a pH 7. El precipitat s'extreia 2 vegades amb un volum total de solució amortidora igual al volum inicial de la mostra. L'extracte es dialitzava en les mateixes condicions que el sobrenedant.

En cap d'ambdues mostres, sobrenedant i extracte, s'obtingué activitat inhibidòria quan s'assajaren sobre la fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa.

### 3.12 ESTUDIS CINÈTICS DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A

Atès que l'inhibidor purificat presentava una característica molt especial, que era la d'inhibir la fosfatasa tipus 2A amb substrat HMG-CoA reductasa, es va creure necessari la realització d'estudis cinètics d'inhibició sobre les diferents fosfatases i substrats. Les fosfatases emprades foren les subunitats catalítiques de les proteïna fosfatases tipus 1 i 2A de múscul de conill i les proteïna fosfatases 1 i 2A de fetge de rata d'alt pes molecular o les seves subunitats catalítiques. Com a substrats s'empraren l'HMG-CoA reductasa i la glicogen fosforilasa.

Tots aquests estudis cinètics es compararen amb els obtinguts amb l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill.

#### 3.12.1 Estudi de l'activitat inhibidòria sobre proteïna fosfatases tipus 1 i 2A amb substrat HMG-CoA reductasa

Per a realitzar els estudis cinètics es van utilitzar en tot moment preparacions homogènies de l'inhibidor de la fosfatasa 2A i preparacions altament purificades de totes les fosfatases emprades.

Quantitats creixents d'inhibidor s'incubaven amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 de múscul esquelètic de conill o bé amb la fosfatasa tipus 2A d'alt pes molecular aïllada a partir de fetge de rata durant 15 min a 37 °C, tal com s'ha descrit en l'apartat 3.1.2 . La reacció s'iniciava a l'addicionar 0,22 µg d'HMG-CoA reductasa homogènia i inactiva. Després de 15 min a 37 °C

L'activitat reductasa fosfatasa es determinava segons es descriu en l'apartat 2.3.3 .

Els resultats obtinguts es poden apreciar en la Figura 25, on s'observa que concentracions d'inhibidor de la fosfatasa 2A de 7 nM ja produeixen inhibicions sobre l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa 2A, i a 60 nM la inhibició és total. Per contra, quan l'inhibidor de la fosfatasa 2A s'incubava amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 no es produïa cap efecte inhibitori, la qual cosa el diferencia completament de l'inhibidor de la fosfatasa 1 (inhibidor-2), purificat en la primera part d'aquesta Memòria i també, de l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill.

Quan es va intentar realitzar els mateixos experiments amb les subunitats catalítiques de les fosfatases tipus 1 i 2A de fetge de rata els resultats obtinguts foren similars als que es mostren en la Figura 25.

Si aquests estudis es realitzaven amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 2A de múscul esquelètic de conill, el resultat obtingut enfront a aquesta fosfatasa no fou exactament l'esperat. El principal problema venia arran de que aquesta proteïna fosfatasa presenta poca especificitat per l'HMG-CoA reductasa i, per tant, les quantitats d'aquest enzim necessàries per produir una determinada activitat reductasa fosfatasa eren molt superiors a les utilitzades amb les proteïna fosfatases obtingudes de fetge de rata. Finalment, s'observà que la relació inhibidor de la fosfatasa 2A/fosfatasa 2A es mantenia constant tant si la proteïna fosfatasa emprada provenia de fetge de rata com si s'havia obtingut de múscul de conill.

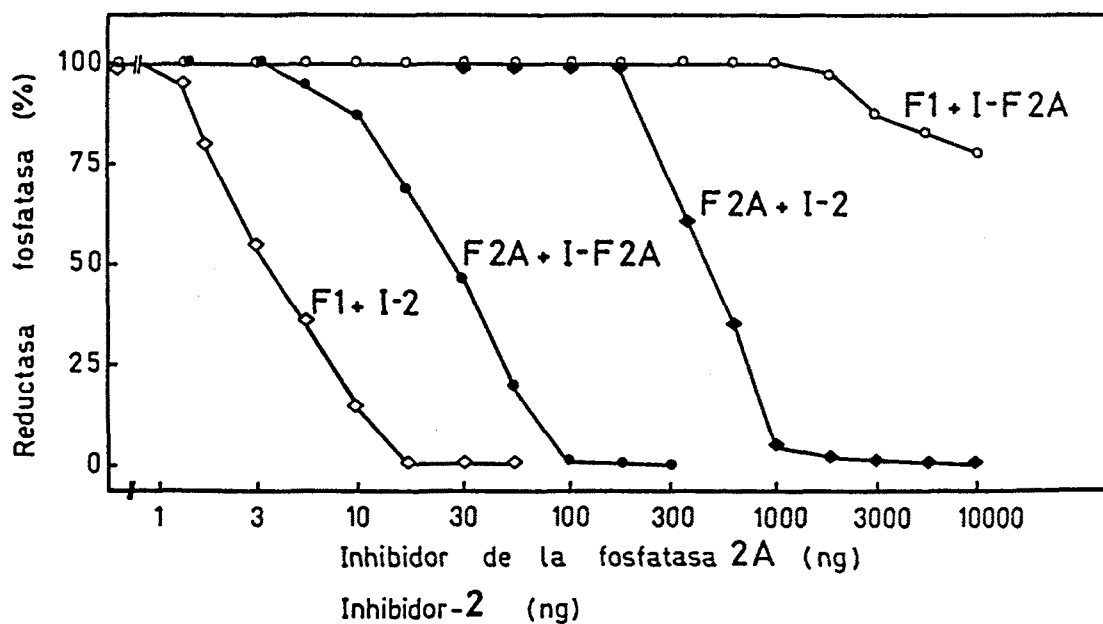


FIGURA 25. INHIBICIO DE LES PROTEINA FOSFATASES 1 I 2A PER L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A DE FETGE DE RATA I L'INHIBIDOR-2 DE MUSCUL DE CONILL I SUBSTRAT HMG-CoA REDUCTASA

Quantitats creixents de preparacions homogènies d'inhibidor de la fosfatasa 2A de fetge de rata ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), i de l'inhibidor-2 de múscul de conill ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ), s'incubaven amb una quantitat fixa (3 U) de la fosfatasa tipus 2A d'alt pes molecular ( $\bullet$ ,  $\blacklozenge$ ) o bé amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 ( $\circ$ ,  $\diamond$ ). La determinació de l'activitat reductasa fosfatasa es realitzava segons es descriu en l'apartat 2.3.3. L'activitat s'expressa en percentatge referent a l'activitat reductasa fosfatasa sense inhibidor.



### 3.12.2 Estudi de l'activitat inhibidora sobre proteïna fosfatases tipus 1 i 2A amb substrat glicogen fosforilasa

Quan quantitats creixents de l'inhibidor purificat s'incubaven amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 de múscul esquelètic de conill, utilitzant com a substrat fosforilasa, el resultat obtingut és el que es mostra en la Figura 26. En ella s'observa que l'activitat fosfatasa no s'inhibeix excepte a molt altes concentracions d'inhibidor. Si la fosfatasa de tipus 1 utilitzada era la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 de fetge de rata els resultats obtinguts eren similars.

En el cas d'incubar l'inhibidor amb la fosfatasa 2A d'alt pes molecular obtinguda de fetge de rata i substrat fosforilasa, contràriament al que es podia esperar, aquest inhibidor no afectava a l'activitat fosfatasa quan el substrat utilitzat fou la glicogen fosforilasa. Si les fosfata-ses utilitzades eren les subunitats catalítiques de la fosfatasa 2A d'ambdós teixits (múscul i fetge), el resultat era similar a l'obtingut amb la fosfatasa 2A d'alt pes molecular aïllada de fetge de rata.

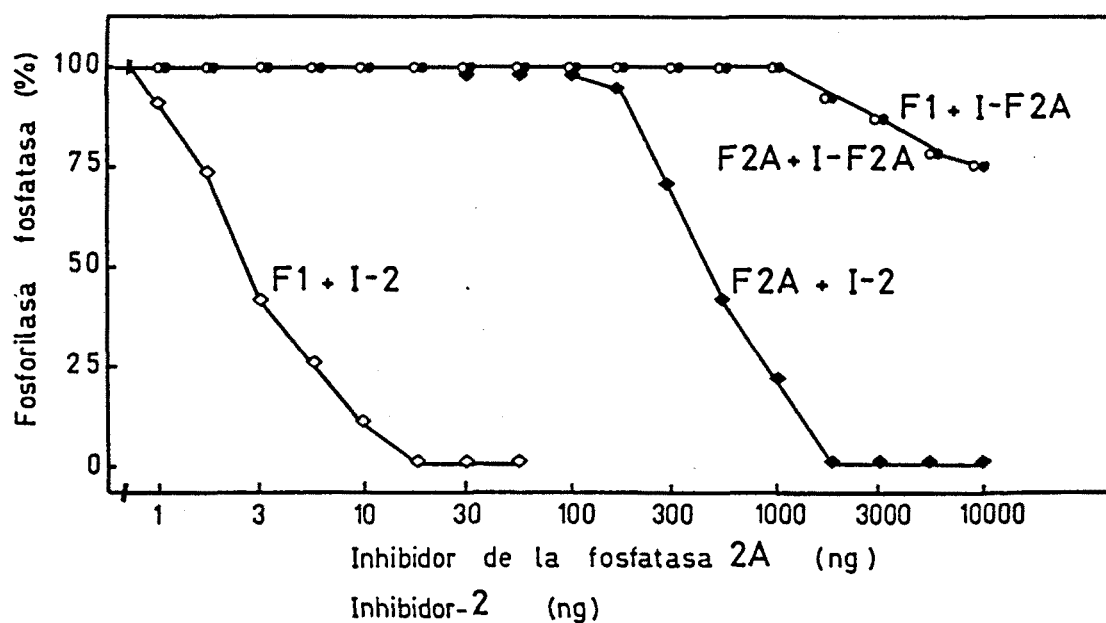


FIGURA 26. INHIBICIO DE LES PROTEINA FOSFATASES 1 I 2A PER L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A DE FETGE DE RATA I L'INHIBIDOR-2 DE MUSCUL DE CONILL I SUBSTRAT GLICOGEN FOSFORILASA

Quantitats creixents de preparacions homogènies d'inhibidor de la fosfatasa 2A de fetge de rata (○, ●), i de l'inhibidor-2 de múscul de conill (◇, ◆), s'incubaven amb una quantitat fixa (15 U) de la proteïna fosfatasa tipus 2A d'alt pes molecular (●, ◆) o bé amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 (○, ◇). La determinació de l'activitat fosforilasa fosfatasa es realitzava segons es descriu en l'apartat 2.3.5. L'activitat s'expressa en percentatge referent a l'activitat fosforilasa fosfatasa sense inhibidor.

### 3.13 DETECCIO D'ACTIVITAT D'INHIBIDOR-1

Donat que aquest inhibidor de l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa 2A, presentava unes característiques moleculars similars a les de l'inhibidor-1 ja descrit de múscul de conill, es van realitzar experiments en els quals l'activitat de l'inhibidor 1 es feia palesa.

Primerament, s'incubaven fraccions de 50 ng d'inhibidor homogeni amb la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (120 U/mL), AMP 0,1 mM, acetat magnèsic 2 mM i ATP 0,2 mM, en un volum final de 60 µl a 30 °C durant 30 min. La reacció s'aturava per escalfament a 95 °C durant 5 min. A continuació, es refredaven les mostres durant 15 min en un bany d'aigua-gel i es centrifugaven a 10.000×g durant 10 min en una centrifugadora tipus "Eppendorf".

Dels sobrenedants obtinguts, 15 µl s'assajaven per a determinar l'activitat inhibidora, tal com s'ha descrit en l'apartat 3.1.2. Per l'assaig s'empraren la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 de múscul de conill i la fosfatasa 2A d'alt pes molecular de fetge de rata. Els substrats foren l'HMG-CoA reductasa i la glicogen fosforilasa. L'assaig es realitzava sempre per duplicat i amb controls on l'inhibidor o bé la quinasa eren exempts.

En el cas de la utilització de la fosfatasa 1 no es va detectar cap efecte inhibitori. Quan s'utilitzà la fosfatasa 2A solament es feia palesa la inhibició amb el substrat HMG-CoA reductasa, però l'efecte inhibitori no s'augmentà en cap moment.

### 3.14 FOSFORILACIO PER ACCIO DE PROTEINA QUINASES

Atès que l'inhibidor de la fosfatasa 2A no es reactivable per fosforilació amb proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, es va provar la seva capacitat d'ésser fosforilat mitjançant la utilització de diferents proteïna quinases i [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP.

#### 3.14.1 Fosforilació produïda per acció de la quinasa dependent d'AMP cíclic i [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP

Una alíquota de 2  $\mu$ g d'inhibidor homogeni s'incubava amb proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i 50  $\mu$ M de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, en substitució de l'ATP no radioactiu durant 30 min a 30 °C. Les condicions a les que es realitzava la fosforilació eren les descrites en l'apartat anterior. Tot seguit es parava la reacció per escalfament i un cop centrifugades les mostres, 10  $\mu$ l dels sobrenedants es preparaven per ser aplicats a una electroforesi en gels d'acrilamida en SDS al 10%.

L'electroforesi es desenvolupava tal com s'ha descrit en l'apartat 2.5.1. Els gels secs s'analitzaven per autorradiografia indirecta, segons el mètode descrit en l'apartat 2.8.

El resultat obtingut fou en aquest cas totalment negatiu. La banda corresponent a l'inhibidor no s'havia fosforilat. Al llarg de tot el procés es dugueren controls on l'inhibidor no hi era present i també controls de fosforilació positiva, com fou la presència d'inhibidor-2 de múscul de conill que era sensible a la fosforilació per aquesta proteïna quinasa.

### 3.14.2 Fosforilació produïda per acció de la GSK-3 i $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

Per fosforilar l'inhibidor de l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa 2A amb la GSK-3, es va procedir de la mateixa forma que en la fosforilació feta en l'apartat 3.6.2 .

Una mostra de 2  $\mu\text{g}$  de l'inhibidor homogèni s'incubava amb 5  $\mu\text{g}$  de GSK-3 purificada i 50  $\mu\text{M}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  i acetat magnèsic 1 mM durant 30 min a 30 °C. Seguidament s'escalfaven les mostres a 95 °C per aturar la reacció, es refredaven i es centrifugaven.

Una alíquota de 25  $\mu\text{l}$  dels sobrenedants s'aplicaven a un gel d'acrilamida en SDS al 10%. Es desenvolupava l'electroforesi en les condicions descrites en l'apartat 2.5.1 i una vegada s'havien assecat els gels; aquests s'analitzaven per autorradiografia tal com està descrit en l'apartat 2.8.

També en aquest cas la fosforilació de l'inhibidor fou nul·la. Com a control positiu de fosforilació es feu servir l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill.

### 3.15 COMPARACIO AMB L'INHIBIDOR DE LA QUINASA DEPENDENT D'AMP cíclic

Després d'haver observat que l'inhibidor de l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa 2A era diferent d'altres inhibidors de proteïna fosfatases ja descrits en la literatura, ens vàrem plantejar la possibilitat de que aquest inhibidor es correspongués amb l'inhibidor ja descrit de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic de múscul de conill. Per aquest motiu es realitzaren en primer lloc estudis d'inhibició sobre proteïna fosfatases i, en segon lloc sobre proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

#### 3.15.1 Estudi comparatiu realitzat sobre proteïna fosfatasa 2A i HMG-CoA reductasa

L'assaig per a dur a terme aquest estudi comparatiu es realitzava incubant quantitats creixents de cada un dels inhibidors homogènis (inhibidor de la fosfatasa 2A, inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic) amb una quantitat fixa (3 U) de fosfatasa 2A de fetge de rata durant 15 min a 37 °C. Es continuava l'assaig tal com s'ha descrit en l'apartat 3.1.2.

Els resultats obtinguts es representen en la Figura 27, on s'observa la necessitat de grans quantitats d'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic per a produir inhibició sobre la fosfatasa 2A i substrat HMG-CoA reductasa.

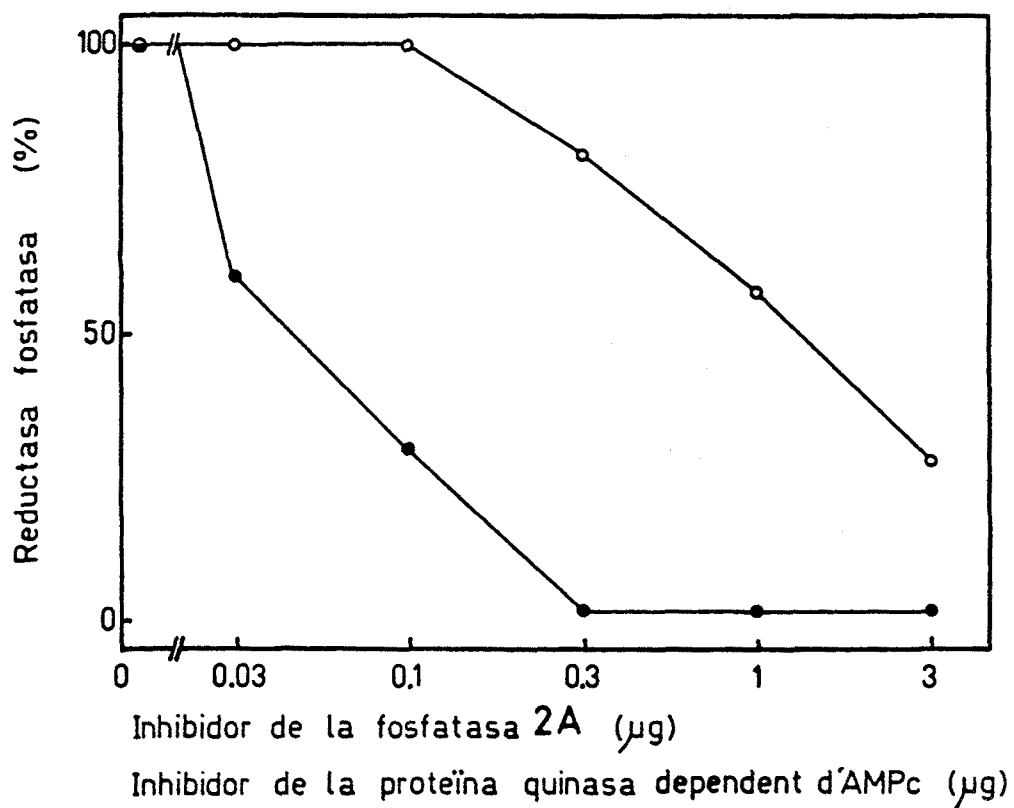


FIGURA 27. COMPARACIO DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A AMB L'INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC, SOBRE PROTEINA FOSFATASA 2A I SUBSTRAT HMG-CoA REDUCTASA

Quantitats creixents de l'inhibidor de la proteïna fosfatasa 2A (●) o bé de l'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (○), s'incubaven amb proteïna fosfatasa 2A d'alt pes molecular de fetge de rata durant 15 min a 37 °C segons s'ha descrit en l'apartat 3.1.2.

### 3.15.2 Estudi comparatiu realitzat sobre la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic

Si bé el resultat anterior feia preveure que ambdós inhibidors eren completament diferents, creïem que era necessari l'execució d'aquesta prova per arribar a resultats concloents.

En aquest cas l'assaig es realitzava incubant quantitats creixents d'inhibidor en un volum de 15  $\mu$ l amb 15  $\mu$ l de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic que contenia 0,4 U/ml diluïa en una solució composta de:  $\beta$  glicerofosfat 25 mM a pH 7,5 i 10  $\mu$ l d'AMP cíclic 0,1 mM, a 30 °C durant 15 min. A continuació, s'addicionava 10  $\mu$ l d'histona 2A (20 mg/ml) i s'incubava la mescla a 30 °C durant 10 min. La reacció de fosforilació de la histona s'iniciava a l'addicionar 10  $\mu$ l d'una solució que contenia  $\beta$ -glicerofosfat 25 mM a pH 7,5; DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, acetat magnèsic 12 mM i [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 125  $\mu$ M (10.000 cpm/pmol). La mescla s'incubava durant 15 min a 30 °C. La reacció s'aturava dipositant 25  $\mu$ l de la mescla en un extrem d'una tira de paper d'ITLC en la que seguidament s'addicionava en el mateix lloc 20  $\mu$ l de TCA al 20% per tal de precipitar les proteïnes fosforilades amb  $^{32}$ P. Tot seguit es procedia com s'ha descrit en l'apartat 2.7. per a determinar la quantitat de  $^{32}$ P lligat a la proteïna.

L'assaig es realitzava sempre per duplicat i es duïen controls en els que l'inhibidor, la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic o ambdós a la vegada no hi eren presents.

El resultat obtingut es mostra en la Figura 28 on s'observa que són necessàries majors quantitats d'inhibidor



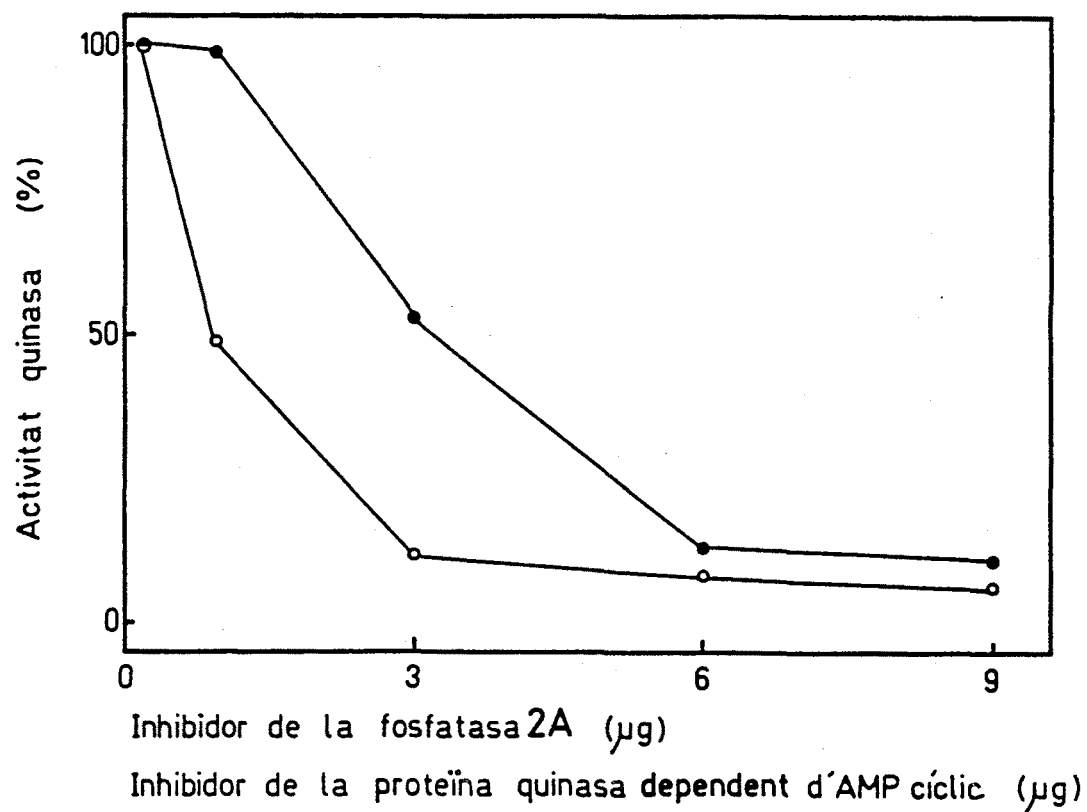


FIGURA 28. COMPARACIO DE L'INHIBIDOR DE LA FOSFATASA 2A AMB L'INHIBIDOR DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC, SOBRE PROTEINA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC I SUBSTRAT HISTONA 2A.

Quantitats creixents de l'inhibidor de la proteïna fosfatasa 2A (●) o bé de l'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (○), s'incubaven amb proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic en les condicions descrites en el text.

de la fosfatasa 2A que d'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic per aconseguir la mateixa inhibició.

#### 4 . DISCUSSIO

#### 4.1 INHIBIDOR DE LA PROTEINA FOSFATASA TIPUS 1

Des que Nordstrom i col. (221) relitzaren la primera purificació parcial de proteïna fosfatases a partir de citosol de fetge de rata, hi han hagut pocs laboratoris que hagin emprat proteïna fosfatases de fetge de rata per a la realització d'experiments de desfosforilació, es a dir, de reactivació de l'HMG-CoA reductasa.

Ingebritsen en cooperació amb Cohen estudiaren l'activitat de diferents proteïna fosfatases de fetge de rata, no solament sobre l'HMG-CoA reductasa, sinó també sobre la reductasa quinasa com a substrats (163). Brown i Rodwell (45) aïllaren formes d'alt pes molecular amb activitat reductasa fosfatasa que podien convertir-se en formes d'un pes molecular de 35 Kd per tractament amb etanol al 80%. Els laboratoris de Gibson (154, 156) i Beg (19, 21) també dugueren a terme diferents estudis sobre les reductasa fosfatases però, en cap d'aquests grups, no es feren estudis referents a l'aïllament i caracterització d'inhibidors específics de les activitats de proteïna fosfatasa tipus 1 o la proteïna fosfatasa tipus 2A, quan el substrat emprat era l'HMG-CoA reductasa.

El fet de que es conegui la gran responsabilitat que tenen les proteïna fosfatases en els sistemes interconvertibles, així com el fet de que s'hagi demostrat que la presència d'inhibidors actuant sobre aquestes proteïna fosfatases jugui un paper important sobre aquests sistemes, fa pensar que en el cas de l'HMG-CoA reductasa podria succeir un tipus de control similar.

Tal com ja s'ha indicat anteriorment els objectius d'aquesta Tesi eren confirmar i aprofundir, el màxim possi-

ble, en el conèixement del control del procés d'activació per desfosforilació covalent de l'HMG-CoA reductasa, mitjançant l'estudi dels inhibidors de proteïna fosfatases i per una altra banda, caracteritzar aquestes proteïnes inhibidores de les proteïna fosfatases que catalitzen l'activació de l'HMG-CoA reductasa. Per assolir aquests objectius fou necessari disposar de preparacions enzimàtiques homogènies, de tots els enzims implicats en aquest sistema tals com ho són l'HMG-CoA reductasa, la glicogen fosforilasa i les proteïna fosfatases emprades en medir l'activitat inhibidora.

Pel que fa a les proteïnes inhibidores, els resultats exposats previament demostren l'existència de dos inhibidors de proteïna fosfatases emprant HMG-CoA reductasa com a substrat. El primer d'ells, que mostrava activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 1, hom creu que se'l pot identificar amb l'inhibidor-2 purificat a partir de múscul esquelètic de conill.

#### 4.1.1 Purificació i caracterització molecular

Des que l'activitat inhibidora de proteïna fosfatases fou detectada per Brandt i col. (33) l'any 1974 en fetge de conill fins el moment de l'inici de la present Memòria, no s'ha descrit cap mètode de purificació de l'inhibidor-2 a partir de fetge de rata que donés lloc a preparacions homogènies.

El primer intent en aquest sentit fou dut a terme per Khandelwal i Zinman (175). Aquest autors purificaren a homogeneïtat una proteïna inhibidora de l'activitat fosforilasa fosfatasa a partir de fetge de conill. El pes molecular de la proteïna purificada era de 15 Kd, que era

conseqüència d'haber sotmés les preparacions a un tractament alcalí el qual afavoria el pas de les formes de més alt pes molecular a una única forma de baix pes molecular. A aquesta proteïna inhibidora la denominaren inhibidor-2.

Goris i col. (121) obtingueren dos formes d'inhibidor-2, denominades  $\alpha$  i  $\beta$ , a partir de fetge de gos. Les formes obtingudes per aquests autors diferien en pes molecular de la forma obtinguda per Khandelwal i Zinman. Recentment, durant la realització d'aquesta Memòria, Chisholm i Cohen (58), emprant un mètode de purificació similar a l'emprat per a purificar l'inhibidor-2 de múscul de conill, han demostrat que el pes molecular de l'inhibidor-2 present en fetge de conill és similar al de l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill. Aquest resultat l'obtingueren després de sotmetre una mostra en gels d'acrilalmidada-SDS i dividint el gel en fraccions, que un cop extretes, eren assajades per determinar-ne l'activitat inhibidora. Aquest procés fou completament necessari ja que les preparacions obtingudes per aquests autors no eren homogènies.

El procés de purificació de l'inhibidor-2 de fetge de rata presentat en aquesta Memòria combina bàsicament el procés emprat per Khandelwal i Zinman (175) que suposa la utilització d'una cromatografia en DEAE-cel·lulosa a pH alcalí (pH 8,5) i el procés emprat per Chisholm i Cohen (58) que inclou una cromatografia en DEAE-cel·lulosa a pH 5 i una cromatografia de gel filtració. Tot i aixó, en el nostre cas s'introduí una nova etapa de purificació, que implicava la utilització d'una cromatografia d'afinitat en columna de Blue Sepharosa CL-6B.

Les dos primeres cromatografies de bescanvi iònic en columna de DEAE-cel·lulosa a pH 8,5 i 5,0 mostraren una sola fracció amb activitat inhibidora enfront la fosfatasa

tipus 1 per ambdós subtrats assajats, HMG-CoA reductasa i glicogen fosforilasa.

Cal remarcar que en la cromatografia de gel filtració, en columna de Bio-Gel A 0.5m, s'obtingueren dos preparacions amb activitat inhibidora enfront la proteïna fosfatasa tipus 1; una, eluïa junt amb les proteïnes excluides de la columna. Aquesta fracció no era la que presentava major activitat i probablement era deguda a una proteolisi limitada de la proteïna fosfatasa d'alt pes molecular dependent d'ATP-Mg o bé a agregacions de l'inhibidor-2. La segona fracció, la més activa, presentava un pes molecular aparent de 45.000 daltons, mentre que l'inhibidor-2 parcialment purificat per Chisholm i Cohen presentava un pes molecular aparent de 60.000 daltons. El fet de que es presentin més d'una fracció amb activitat inhibidora i pesos moleculars aparents diferents, ha estat demostrat per diferents autors (144, 235). D'altra banda, si la cromatografia de gel filtració es realitzava a un pH alcalí (pH 9), tal com proposaven Khandelwal i Zinman, per a convertir totes les formes actives d'alt pes molecular en una única forma de pes molecular inferior, el resultat obtingut en el nostre cas fou totalment nul, aconseguint sempre el mateix perfil d'elució.

Pel que fa a la següent cromatografia en columna de Blue Sepharosa CL-6B, l'inhibidor-2 de fetge de rata eluïa a una concentració salina de 0,6 M NaCl, resultat que estava d'acord amb l'obtingut per Yang i col. (279) en la purificació de l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill. Quan l'elució de l'inhibidor-2 de fetge de rata es va realitzar pel mètode recentment descrit per Gruppuso i col. (129) utilitzant una concentració salina d'elució de 0,1 M NaCl, no es produí cap elució de l'activitat inhibidora enfront la proteïna fosfatasa 1, romanent aquesta en la

columna. El diferent comportament cromatogràfic de l'inhibidor-2 de l'un a l'altre teixit respecte a les dos últimes cromatografies probablement sigui degut a petites diferències entre ambdues proteïnes conseqüència de la seva pertinença a teixits diferents.

Les condicions de purificació han estat cuidadosament estudiades amb l'objecte de millorar els rendiments obtinguts i de tenir la certesa de que durant l'aïllament de la proteïna inhibidora, no es produïssin fenòmens de proteolisi o d'altres tipus. Així, per a l'homogeneïtzació d'aquest inhibidor i fins la finalització dels processos de calentament s'empraren solucions contenant 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, en una proporció de 3 ml de dissolució per gram de fetge. A més a més, es tingué la precaució addicional d'incorporar el DTT i el PMSF a totes les solucions amortidores, de forma extemporània, per a garantir l'efecte desitjat. Les vesícules lisosomals s'eliminaren per centrifugació a 15.000xg durant 20 minuts, amb la finalitat d'evitar tota la possible acció de les proteases dels lisosomes, i els cations divalents foren neutralitzats per addició d'EDTA i EGTA.

L'etapa següent en la purificació, l'escalfament a 95 °C, era imprescindible realitzar-la a una temperatura constant de 95 °C, ja que un descens en la temperatura podia conduir a l'obtenció de baixos rendiments, probablement deguts a l'acció proteolítica de certes proteases que actuarien a temperatures elevades, inferiors a 95 °C o bé al fet de que l'inhibidor no es separés completament de la fosfatasa amb la que formava el complex de 70 Kd. Un altre factor a tenir en compte, era el pH a que es realitzava aquest procés. Cohen i col.(99) demostraren, per a l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill, que l'escalfament



realitzat a pHs àcids o alcalins donava lloc a rendiments inferiors dels obtinguts quan aquest procés es realitzava a pH neutre. En el cas de l'inhibidor-2 de fetge de rata, escalfaments realitzats a pH inferiors a 6,5 o superiors a 7,5 implicaven una pèrdua quasi total de l'activitat inhibidora.

El motiu pel qual els rendiments obtinguts en la purificació de l'inhibidor-2 de fetge de rata són inferiors als obtinguts per diferents autors quan l'inhibidor-2 purificat prové de múscul esquelètic de conill (279), probablement sigui causat per dos fets; un seria la gran quantitat de proteïnes contaminants acompanyants que es troben en el fetge respecte el teixit muscular i que impliquen la utilització d'una major quantitat de cromatografies per poder obtenir l'inhibidor en estat homogeni. El segon fet és el ja demostrat recentment per Gruppusso i col. (129) així com pel grup de De Paoli-Roach (235), mitjançant anticossos específics enfront l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill i a través de tècniques d'immunoblot, demostrant que la quantitat d'inhibidor-2 existent en teixit hepàtic és inferior l'observat en teixit muscular.

D'altra banda, els resultats exposats anteriorment mostren que l'inhibidor-2 aïllat de fetge de rata presenta un pes molecular de 31 Kd quan s'analitza per electroforesi en gels d'acrilamida-SDS i que la proteïna que mostra aquest pes molecular, un cop extreta del gel presenta activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 1 tant si el substrat emprat és l'HMG-CoA reductasa com si es tracta de la glicogen fosforilasa. Resultats, que estan d'acord amb els obtinguts per a l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill.

S'han demostrat també algunes característiques de l'inhibidor-2, la gran sensibilitat d'aquest inhibidor a ésser proteolitzat per acció de la tripsina, perdent fàcilment l'activitat inhibidora; la resistència a tractaments àcids i l'estabilitat al calor, propietats que s'han aprofitat per a la purificació; i, finalment la sensibilitat de l'inhibidor a tractaments dràstics amb etanol al 60%, causant la pèrdua total de l'activitat inhibidora.

#### 4.1.2 Propietats cinètiques de l'inhibidor de la fosfatasa 1

Pel que fa referència al comportament cinètic de l'inhibidor-2 de fetge de rata, els resultats anteriorment exposats demostren un comportament similar al obtingut amb l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill. A l'incubar quantitats creixents d'ambdós inhibidors enfront una quantitat fixa de la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1, els dos inhibidors inhibeixen l'activitat reductasa fosfatasa i fosforilasa fosfatasa a nivells nanomolars. Per contra, si la proteïna fosfatasa emprada era la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa 2A de múscul esquelètic de conill, solament s'obtenia inhibició a concentracions micromolars dels dos inhibidors i amb els dos substrats (HMG-CoA reductasa i glicogen fosforilasa). Tots aquests resultats estan d'acord amb els descrits per Foulkes i col (103) i per Brautigan i col. (38).

El motiu pel qual s'hagin emprat en tot moment les subunitats catalítiques de les fosfatases tipus 1 i 2A de múscul de conill així com la utilització del substrat glicogen fosforilasa i del propi inhibidor-2 de múscul de conill, és degut fonamentalment a l'intent de copsar al màxim les possibles diferències o similituds que l'inhibi-

dor-2 de fetge de rata presentava respecte a l'inhibidor-2, ja tant estudiat, de múscul esquelètic de conill.

El fet de que l'inhibidor-2 de fetge de rata actui inhibint la proteïna fosfatasa 1 emprant com a substrat no solament glicogen fosforilasa, sinó també HMG-CoA reductasa, suggereix que l'efecte regulatori d'aquest inhibidor demostrat en el sistema del glicogen, pugui ser aplicat també al metabolisme del colesterol, a través d'un mecanisme de fosforilació i desfosforilació de l'HMG-CoA reductasa.

#### 4.1.3 Formació del complex de 70 Kd de la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg

Des que el grup de Merlevede i el grup de Cohen arribaren a la conclusió de que la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg descrita per Merlevede (122, 210, 268) tenia una especificitat de substrat i propietats similars a la proteïna fosfatasa 1 descrita per Cohen (138, 234, 263), suggerint que aquests dos enzims compartien la mateixa subunitat catalítica, gran quantitat d'estudis s'han desenvolupat sobre aquest tema.

Tot seguit, es reportà que l'inhibidor-2 estava implicat en la interconversió de la forma activa a la forma inactiva de la proteïna fosfatasa dependent d'ATP-Mg i, a continuació, es demostrà que la incubació de l'inhibidor-2 amb la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 donava lloc a una proteïna fosfatasa de característiques similars a la forma nativa de la fosfatasa dependent d'ATP-Mg descrita per Merlevede i Riley (211). Aquesta forma de proteïna fosfatasa "reconstituïda" no presentava activitat i estava formada per un complex constituït per l'inhibidor-2

(31 Kd) i la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 (38 Kd) en una proporció 1:1. El complex format era reactivat per acció de la GSK-3 a través de la fosforilació de l'inhibidor-2. El conjunt d'evidències obtingudes suggeria que la fosforilació de l'inhibidor-2 per aquesta proteïna quinasa causava un canvi conformacional en la subunitat catalítica, transformant-la a la seva conformació activa. Això unit a la hipòtesi de que l'inhibidor-2 també és necessari per que es doni el pas de la conformació activa a la inactiva de la fosfatasa fa que quedi totalment demostrada la seva funció moduladora de l'activitat fosfatàsica.

En el cas de l'inhibidor-2 de fetge de rata, s'ha demostrat també, pels resultats obtinguts, que és capaç de formar aquest tipus de complex inactiu al ser incubat amb la subunitat catalítica de la proteïna fosfatasa tipus 1 i a més a més que el complex format es reactiva instantàniament si se l'incuba amb la GSK-3 i en presència d'ATP-Mg. Demostrant així que l'inhibidor-2 de fetge de rata presenta també la propietat d'èsser modulador de l'activitat fosfatàsica. Aquest fet unit a la demostració de que l'inhibidor-2 de fetge de rata és fosforilable, es a dir incorpora [<sup>32</sup>P], en condicions similars a les descrites per l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill quan s'incuba en presència de GSK-3, confirma la hipòtesi de que la reactivació de l'activitat fosfatàsica del complex de 70 Kd es produeix també en aquest cas a través de la fosforilació de l'inhibidor.

D'altra banda s'ha demostrat, aquest mateix any, que la fosforilació de l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill per altres proteïna quinases, com poden ser, la caseïna quinasa I o la caseïna quinasa II, en diversos residus de serina podrien provocar un efecte potenciador o no de l'activació de la fosfatasa dependent d'ATP-Mg

(complex de 70 Kd) per acció de la GSK-3. El fet de que aquests estudis realitzats "in vitro" estiguin parcialment confirmats per estudis molt recents realitzats "in vivo" en els que s'observa que l'acció de certes hormones, com la insulina, provoca un augment en la fosforilació de l'inhibidor-2 causada per un efecte sinèrgic per la caseïna quinasa II sobre la GSK-3, fa pensar en un possible mecanisme de control hormonal d'activació de la fosfatasa dependent d'ATP-Mg a través de la fosforilació de l'inhibidor-2 per aquesta proteïna quinasa.

També s'ha demostrat que l'inhibidor-2 de fetge de rata a l'igual que succeeix amb l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill, és fosforilable per acció de la quinasa dependent d'AMP cíclic ja que a l'incubar-lo en presència de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP i  $Mg^{2+}$  incorpora  $^{32}$ P. Malgrat tot, la incorporació de  $^{32}$ P a la proteïna no implica un augment de l'activitat inhibidora, la qual cosa suggereix que no es tracta de l'inhibidor-1. Experiments d'aquest tipus també s'han descrit per a l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill (138, 268-271), però les implicacions que comporta que aquest inhibidor sigui fosforilable per la quinasa dependent d'AMP cíclic com a conseqüència d'una acció hormonal estan per estudiar.

Tenint en compte les poques diferències existents entre l'inhibidor-2 aïllat a partir de fetge de rata i l'inhibidor-2 aïllat a partir de múscul esquelètic de conill, tant en el comportament cromatogràfic, cinètic, electroforètic com en el de la regulació de l'activitat de la proteïna fosfatasa 1 i el seu comportament enfront a anticossos específics obtinguts enfront l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill que immunoprecipiten l'inhibidor-2 present en altres teixits tal com ho demostraren Roach i col. (235) i Grupusso i col. (129); totes aquestes

evidències suggereixen que ambdues proteïnes són similars i solament anàlisis a nivell molecular poden establir si són o no productes de diferents gens.

Tots aquests mecanismes poden traslladar-se a la regulació general del colesterol. Així doncs, podria imaginar-se un efecte de "cascada" en la reductasa fosfatasa, induït per la insulina, que resultaria en l'activació de la fosfatasa al ser fosforilat l'inhibidor-2. Per una altra part, el glucagó actuaria probablement activant l'inhibidor-1 mitjançant l'acció de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

En aquest sistema bicíclic de control de l'enzim HMG-CoA reductasa, tant l'activació de l'enzim com la inactivació dependrien de la fosforilació dels seus inhibidors, inhibidor-1 i inhibidor-2. D'aquesta forma, tant la insulina com el glucagó conduirien a canvis en l'activitat de l'HMG-CoA reductasa, a través de canvis produïts en l'activitat reductasa fosfatasa controlats pels seus inhibidors -1 i -2.

## 4.2 INHIBIDOR DE LA PROTEINA FOSFATASA 2A

### 4.2.1 Purificació i caracterització molecular

En 1974 Brandt i col. (33) foren els primers en observar la presència d'una activitat inhibidora durant la purificació de fosforilasa fosfatases a partir de citosol de fetge de conill. Posteriorment Huang i Glinsman (147) reportaren la presència de dos inhibidors termoestables, inhibidor-1 i inhibidor-2, de l'activitat fosforilasa fosfatasa a partir de múscul esquelètic de conill. Malgrat la gran quantitat d'estudis realitzats sobre aquests dos inhibidors, especialment en teixit muscular, i la seva detecció en altres teixits, solament s'ha observat la presència d'inhibidors termoestables enfront les múltiples formes de proteïna fosfatasa tipus 1, així com són l'inhibidor-1 i -2, el DARPP-32 i el substrat G; en cap moment s'ha descrit l'existència d'una proteïna inhibidora, estable al calor, capaç d'inhibir a la proteïna fosfatasa 2A.

Els primers indicis de l'existència d'una activitat inhibidora de proteïna fosfatasa diferent de les ja descrites anteriorment, s'obtinguè al valorar l'activitat inhibidora de les diverses fraccions subcel·lulars enfront les proteïna fosfatases tipus 1 i 2A obtingudes en el nostre laboratori, aïllades de fetge de rata i, emprant com a substrat l'HMG-CoA reductasa.

Donat que l'objectiu d'aquesta Memòria era aprofundir en el coneixement del control de l'activitat reductasa fosfatasa a través de les proteïnes inhibidores, es feia necessari disposar de preparacions purificades d'aquesta proteïna causant de l'activitat inhibidora sobre la fosfatasa 2A.

Els resultats exposats prèviament demostren que l'activitat inhibidora enfront la fosfatasa 2A quan el substrat emprat era l'HMG-CoA reductasa estava localitzada en el citosol mentre que la fracció microsomal i el sediment de glicogen no presentaven cap tipus d'inhibició. Aquest tipus de distribució subcel·lular era comú a la de l'inhibidor-2 obtingut en la present Memòria a partir del mateix teixit.

El fet de sotmetre les mostres de les diferents fraccions subcel·lulars, abans d'assajar-les, al mateix tipus de tractament previ que l'emprat per a l'inhibidor-2, basat en una cromatografia de gel filtració per eliminar inhibidors no proteics de les proteïna fosfatases i, un escalfament a 95 °C per eliminar l'activitat fosfatàsica; era degut fonamentalment a que si aquestes fraccions s'assajaven directament no s'observava cap tipus d'activitat inhibidora i solament es podia afirmar que l'activitat inhibidora era deguda a una proteïna després d'eliminar l'activitat fosfatàsica i tots els inhibidors no proteics de proteïna fosfatases presents en aquestes subfraccions. Cal remarcar que la cromatografia de gel filtració per eliminar els inhibidors no proteics no suposava cap pèrdua de la quantitat de proteïna.

Un cop localitzada l'activitat inhibidora, la següent etapa de purificació que implicava un escalfament a 95 °C, calia realitzar-lo mantenint la temperatura constant en tot moment, ja que si aquest procés es duia a terme a temperatures inferiors a 80 °C el rendiment obtingut podia ser inferior al 50%.

Al sotmetre la fracció escalfada i concentrada per precipitació amb TCA al 100% a una cromatografia en DEAE-cel·lulosa a pH 8,5; s'obtingué una sola fracció d'activi-



tat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 2A quan el substrat emprat era l'HMG-CoA reductasa. El fet de que aquesta activitat fos pràcticament coincident amb l'activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa 1 utilitzant el mateix substrat suggeria que podia tractar-se de la mateixa proteïna que presentava una activitat especial a l'emprar com a substrat l'HMG-CoA reductasa.

A continuació es provaren diversos tipus de cromatografies que donaren un resultat negatiu. El primer tipus que es provà fou una cromatografia de bescanvi iònic en columna de FosfoCel.lulosa; el resultat obtingut fou una elució completa de l'activitat inhibidora durant la fase d'elució i rentat de la columna junt amb totes les proteïnes contaminants, la qual cosa implicava una pèrdua d'activitat inhibidora inherent al propi ús de la columna i a la vegada no augmentava el grau de puresa de l'inhibidor.

En la següent cromatografia en columna d'Aminohe-xil-Sepharosa 4B el resultat obtingut era, aparentment, interessant però, el rendiment de la cromatografia, no superava en cap cas el 15%. Si bé aquest tipus de cromatografia s'intentà aplicar-lo en una fase més avançada de puresa de l'inhibidor, concretament després d'una cromatografia de gel filtració, el resultat obtingut no fou gens acceptable, ja que els rendiments obtinguts eren inferiors al 2% i l'activitat inhibidora recuperada era pràcticament nul·la. La causa d'aquesta pèrdua massiva d'activitat inhibidora no és coneguda, però cal suposar que seria deguda a algun tipus d'interacció entre la resina i l'inhibidor que implicaria una pèrdua d'activitat inhibidora.

El resultat obtingut de l'aplicació de la mostra a una cromatografia en columna d'afinitat en columna d'Affi-Gel Blue, fou també negatiu. En aquest cas, l'activitat

inhibitòria enfront la fosfatasa 2A i substrat HMG-CoA reductasa eluïa, junt amb totes les proteïnes contaminants, durant la fase d'exclusió i rentat de la columna.

Un altre tipus de cromatografia que es va provar fou la de gel filtració en columna de Sephadex G-100. Aquest tipus de cromatografia donà lloc a un ample pic d'activitat inhibidora. Encara que aquest comportament anòmal podia suggerir un mal funcionament de la columna, ben aviat s'observà que aquest tipus de comportament solament es produïa en el cas de l'inhibidor de la fosfatasa 2A, ja que en el cas d'utilitzar proteïnes marcadores, l'elució d'aquestes era totalment correcta. Per una altra banda, aquest tipus de comportament cromatogràfic suggeria l'existència de múltiples formes moleculars degudes fonamentalment a possibles agregacions de l'inhibidor i, que aniren eluint al llarg del desenvolupament de la cromatografia. Finalment, es va intentar diverses formes d'aplicació de la mostra, variant-ne la concentració i mantenint sempre en la solució amortidora una concentració de 100 mM NaCl que impedia la formació de possibles interaccions entre la resina i l'inhibidor. En tots els intents els resultats obtinguts foren similars i per tant no es cregué convenient la utilització d'aquest tipus de cromatografia per a noves purificacions.

Un altre tipus de cromatografia que es provà fou la cromatografia en columna d'Hidroxiapatita. El resultat obtingut en un primer moment, feu pensar en una possible aplicació en un estat avançat de purificació de l'inhibidor. Malgrat tot, la seva utilització en una etapa final donava lloc a un resultat similar al d'una fase inicial on sempre s'obtenia una preparació de l'inhibidor que contenia dos proteïnes contaminants.

La següent cromatografia que es dugué a terme i ja s'utilitzà d'una forma sistemàtica per a l'obtenció de l'inhibidor fou una segona cromatografia efectuada en columna de DEAE-cel·lulosa, desenvolupada en aquest cas a pH 5. Aquesta cromatografia donava lloc a una fracció que contenia la major part d'activitat inhibidora. A l'igual que la cromatografia anterior, la fracció presentava ambdues activitats inhibidores ensolapades enfront a la fosfatasa tipus 2A i enfront a la fosfatasa tipus 1.

El resultat obtingut en la cromatografia efectuada en Bio Gel A 0.5m (Fig. 21) demostrava que ambdues activitats inhibidores, corresponien almenys a dos proteïnes. Si bé s'observava una primera fracció que eluïa amb les proteïnes de gran pes molecular i que presentava ambdues activitats inhibidores i que probablement era deguda a algun tipus d'agregació, l'activitat inhibidora de la fosfatasa 2A eluïa fonamentalment a un pes molecular aparent de 30 Kd, mentre que l'activitat inhibidora de la fosfatasa 1 eluïa a un pes molecular aparent de 45 Kd, podent ésser la proteolisi la causa de l'expressió d'una nova activitat inhibidora enfront la proteïna fosfatasa 2A.

El fet de que per una banda, s'hagi cuidat extremadament les condicions de les fases d'homogeneïtzació i tractament per calor de les mostres, tal com s'ha descrit anteriorment, mitjançant la utilització d'inhibidors de proteases, tals com el PMSF, TLCK, benzamidina, leupeptina i mantenint una temperatura constant de 95 °C i, per una altra banda, l'existència en la literatura de diferents aportacions en les que es demostra que fraccions proteolitzades de l'inhibidor-2 d'anàleg pes molecular al de l'inhibidor de la fosfatasa 2A, mostren una menor activitat inhibidora enfront a la fosfatasa tipus 1 (58, 144) però

no mostren activitat enfront la fosfatasa tipus 2A; descarta qualsevol possibilitat de que aquesta proteïna pugui ser un fragment proteolític de l'inhibidor-2.

La següent etapa de purificació mitjançant una cromatografia d'afinitat a través d'una columna de Blue Sepharosa CL 6B dona lloc a una preparació homogènia de l'inhibidor de la fosfatasa 2A, eluint l'activitat inhibidòria a una concentració salina de 0,1 M NaCl. Aquest comportament cromatogràfic, difereix completament del comportament cromatogràfic mostrat per l'inhibidor-2 que elueix a una concentració salina de 0,6 M NaCl.

Aquesta és, per tant, la primera vegada que es reporta l'existència d'un inhibidor de la proteïna fosfatasa 2A quan el substrat emprat es l'HMG-CoA reductasa, ja que fins el present, solament s'han reportat inhibidors que actuen sobre la proteïna fosfatasa de tipus 1 (33, 103).

Tal com mostren els resultats anteriorment exposats en les figures 20, 22 i 23; aquesta activitat correspon a una sola proteïna d'un pes molecular de 20 Kd obtingut per electroforesi en gels d'acrilamida-SDS, a la vegada que, i mitjançant la determinació d'activitat inhibidòria en gels d'agarosa, s'ha demostrat, que l'activitat inhibidòria correspon única i exclusivament a aquesta proteïna.

Aquesta proteïna presenta, al igual que els altres inhibidors de proteïna fosfatases una gran sensibilitat a la tripsina i a tractaments dràstics com l'etanol al 60%, perdent ràpidament la seva activitat. A més a més presenta una gran estabilitat al calor i a tractaments àcids, propietats que s'aprofiten per a la seva purificació.

#### 4.2.2 Comportament cinètic

El comportament cinètic d'aquest inhibidor és totalment diferent del comportament fins ara descrit dels inhibidors de la proteïna fosfatasa 1. Tal com s'ha demostrat en els resultats obtinguts aquest inhibidor, actua inhibint l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa 2A a concentracions nanomolars i no presenta inhibició enfront l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa 1. A més a més, aquesta inhibició solament es fa palesa quan el substrat emprat es l'HMG-CoA reductasa, en el cas d'emprar glicogen fosforilasa no s'observa pràcticament cap tipus d'inhibició, tant si es tracta de la proteïna fosfatasa de tipus 1 o de tipus 2A. Aquest fet, ens fa pensar en algun tipus de regulació de l'activitat reductasa fosfatasa enfront la fosfatasa 2A, fins ara desconegut, que implicaria un manteniment de l'HMG-CoA reductasa en el seu estat inactiu o fosforilat.

El fet de que la subunitat catalítica de la fosfatasa 2A obtinguda a partir de múscul esquelètic de conill aparentment no sembli estar tant afectada per aquest inhibidor, és degut a la relativa insensibilitat observada per part d'aquesta fosfatasa enfront l'HMG-CoA reductasa en la seva acció desfosforilant i per tant majors quantitats d'inhibidor són necessàries per a aconseguir el mateix grau d'inhibició que quan s'emprava la fosfatasa procedent de fetge de rata. De fet s'ha observat que la relació inhibidor/proteïna fosfatasa 2A és similar per ambdues proteïna fosfatases independentment del teixit de procedència. Aquesta és la causa per la qual s'emprà la proteïna fosfatasa 2A procedent de fetge de rata per seguir l'activitat inhibidòria durant totes les etapes del procés de purificació.

D'altra banda, les propietats inhibidores de l'inhibidor de la fosfatasa 2A són similars a les de l'inhibidor de la fosfatasa BCKDH ("branched-chain  $\alpha$  keto acid deshidrogenasa) aïllat de mitocondria de ronyó de boví (71). Aquest inhibidor no inhibeix la proteïna fosfatasa tipus 1 ni la proteïna fosfatasa 2A de múscul esquelètic de conill quan el substrat emprat és la glicogen fosforilasa. A més a més, l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill, no inhibeix l'activitat BCKDH fosfatasa, i tampoc l'activitat piruvat deshidrogenasa fosfatasa. Aparentment l'inhibidor de la BCKDH fosfatasa inhibeix a aquesta fosfatasa, que sembla ésser de tipus 2, solament quan el substrat emprat és la BCKDH, aquest efecte seria similar a l'efecte produït per l'inhibidor de la proteïna fosfatasa 2A.

#### 4.2.3 Comparació amb altres inhibidors

El fet de que l'inhibidor de la proteïna fosfatasa 2A presentés un pes molecular de 20 Kd per electroforesi en gels d'acrilalmida-SDS feia pensar que es podia tractar de l'inhibidor-1, ja descrit per diversos autors en múscul esquelètic de conill (219, 220). Quan aquest inhibidor s'intentà fosforilar per acció de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic per tal d'obtenir un augment d'activitat inhibidora, característica essencial en l'inhibidor-1, el resultat obtingut demostrà clarament que no es tractava d'aquest inhibidor o almenys l'activitat inhibidora enfront la fosfatasa 1 i substrat fosforilasa no es feia palesa i en el cas d'utilitzar el sistema fosfatasa 2A i HMG-CoA reductasa no es produïa cap augment de l'activitat inhibidora.

Per una altra banda, aquest inhibidor no és fosforilable per la quinasa dependent d'AMP cíclic, la qual cosa

afavoreix la hipòtesi de que es tracta d'un nou tipus d'inhibidor fins ara desconegut.

Una altra opció seria aquella de considerar que es tractava de DARPP-32 o del substrat G, possibilitats que no semblen factibles ja que ambdues proteïnes són fosforilades per acció de la GSK-3. A més a més, el fet de que aquestes proteïnes inhibidores estiguin localitzades en el teixit cerebral i no s'hagi descrit la seva localització en altres teixits dificulta la creença de que es tracti de proteïnes similars.

Pel que fa referència a la possibilitat de que l'inhibidor de la fosfatasa 2A fos un fragment proteolític de l'inhibidor-2 ja s'han exposat anteriorment dos motius pels quals aquesta suposició no és possible. A més a més s'ha de tenir en compte que aquest inhibidor no és fosforilable per acció de la GSK-3 i ATP-Mg, a diferència de l'inhibidor-2 tant de múscul de conill (6, 72, 268, 271) com de fetge de rata tal com s'ha demostrat en la present Memòria, ja que donada la posició del centre de treonina fosforilable per aquesta proteïna quinasa, no sembla probable que l'eliminació d'aquest centre fos la causa de la pèrdua de la capacitat de fosforilació per altres proteïna quinases com pot ser la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Si estudis posteriors demostrassin que una proteolisi limitada de l'inhibidor-2 conduís a l'inhibidor de la fosfatasa 2A, resultaria, així i tot, de gran valor reportar que aquesta proteolisi implica un canvi d'especificitat d'actuació de l'inhibidor (proteïna fosfatasa 2 vers proteïna fosfatasa 1) i a un canvi d'especificitat de la fosfatasa sobre el substrat (HMG-CoA reductasa vers glicogen fosforilasa).

## 5 . CONCLUSIONS



1.- S'ha purificat a homogeneïtat un inhibidor de l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa tipus 1, a partir de citosol de fetge de rata.

2.- El pes molecular aparent de l'inhibidor de la fosfatasa tipus 1, és de 45 Kd quan es determina per filtració molecular en gel i, de 31 Kd quan es determina per electroforesi en gel d'acrilamida-SDS.

3.- En l'estudi de l'activitat activatòria de l'inhibidor de la fosfatasa 1 en gels d'agarosa-SDS, s'arriba a la conclusió que aquesta activitat correspon totalment a una sola proteïna d'un pes molecular de 31 Kd.

4.- S'ha estudiat la distribució subcel·lular de l'activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa tipus 1 i substrat HMG-CoA reductasa, arribant a la conclusió que més d'un 90% de l'activitat total està localitzada en el citosol i, no està associada ni a microsomes ni al sediment de glicogen.

5.- L'inhibidor de la fosfatasa 1 presenta una gran resistència al calor i a tractaments àcids, a la vegada que mostra una gran sensibilitat a la tripsina i a l'etanol.

6.- L'inhibidor de la fosfatasa 1 de fetge de rata inhibeix a la proteïna fosfatasa 1 a concentracions nanomolars, mentre que inhibeix a la proteïna fosfatasa 2 a concentracions micromolars, tant si el substrat emprat és l'HMG-CoA reductasa com si es tracta de la glicogen fosforilasa. Aquest comportament cinètic és similar al de l'inhibidor-2 de múscul esquelètic de conill.

7.- L'inhibidor de la fosfatasa 1 és capaç de formar complexos inactius en presència de la subunitat catalítica de la fosfatasa tipus 1 i, aquests complexos, són reactivables quan se'ls incuba en presència de GSK-3 i ATP-Mg.

8.- L'inhibidor de la fosfatasa 1 és fosforilable per acció de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . També és fosforilable per acció de la GSK-3 i  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ .

9.- La fosforilació produïda per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic no augmenta l'activitat inhibidora de l'inhibidor de la fosfatasa 1 i per tant, no es tracta de l'inhibidor-1.

10.- L'anàlisi del conjunt de resultats indica l'existència d'una gran similitud en el comportament cromatogràfic, electroforètic, cinètic, etc. entre l'inhibidor de la fosfatasa 1 i l'inhibidor-2 i, ens permet afirmar que ambdós inhibidors són similars.

11.- S'ha purificat a homogeneïtat un inhibidor de l'activitat reductasa fosfatasa de la fosfatasa tipus 2A, a partir de citosol de fetge de rata.

12.- El pes molecular aparent de l'inhibidor de la fosfatasa tipus 2A, és de 30 Kd quan es determina per filtració molecular en gel i, de 20 Kd quan es determina per electroforesi en gel d'acrilamida-SDS.

13.- En l'estudi de l'activitat inhibidora de l'inhibidor de la fosfatasa 2A en gels d'agarosa-SDS, s'arriba a la conclusió que aquesta activitat correspon a una sola proteïna d'un pes molecular de 20 Kd.

14.- S'ha estudiat la distribució subcel·lular de l'activitat inhibidora sobre la proteïna fosfatasa tipus 2A i substrat HMG-CoA reductasa, arribant a la conclusió que més d'un 90% de l'activitat total està localitzada en el citosol i, no està associada ni a microsomes ni al sediment de glicogen.

15.- L'inhibidor de la fosfatasa 2A presenta una gran resistència al calor i a tractaments àcids, a la vegada que mostra una gran sensibilitat a la tripsina i a l'etanol.

16.- L'inhibidor de la fosfatasa 2A de fetge de rata inhibeix a la proteïna fosfatasa 2A a concentracions nanomolars, mentre que inhibeix a la proteïna fosfatasa 1 a concentracions micromolars, quan el substrat emprat és l'HMG-CoA reductasa. Si el substrat és la glicogen fosforilasa no inhibeix a cap d'ambdues proteïna fosfatasas.

17.- L'inhibidor de la fosfatasa 2A no és reactivable quan s'incuba en presència de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, la qual cosa ens permet afirmar que no es tracta de l'inhibidor-1.

18.- L'inhibidor de la fosfatasa 2A no és fosforilable ni per GSK-3, ni per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

19.- El resultat de l'estudi comparatiu d'aquest inhibidor amb l'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, ens permet afirmar que no es tracta del mateix inhibidor.

20.- L'anàlisi del conjunt de resultats indica que l'inhibidor de la fosfatasa 2A, és un inhibidor específic de l'activitat reductasa fosfatasa no descrit fins el present.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ACKERMAN M.E., REDD W.L., SCALLEN T.J. (1974)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 29-35
2. AGOSTINIS P., GORIS J., VANDENHEEDE J.R., WAELKENS E.,  
PINNA L.A., MERLEVEDE W. (1986)  
FEBS Lett., 207, 167-172
3. AGOSTINIS P., VANDENHEEDE J.R., GORIS J., MEGGIO F.,  
PINNA L.A., MERLEVEDE W. (1987)  
FEBS Lett., 224, 385-390
4. AITKEN A., BILHAM T., COHEN P. (1982)  
Eur. J. Biochem., 126, 235-246
5. AITKEN A., COHEN P. (1982)  
FEBS Lett., 147, 54-58
6. AITKEN A., HOLMES C.F.B., CAMPBELL D.C., RESINK T.J.,  
COHEN P., LEUNG C.T.W., WILLIAMS D.H. (1984)  
Biochim. Biophys. Acta, 790, 288-291
7. AITKEN A., KLEE C.B., COHEN P. (1984)  
Eur. J. Biochem., 139, 663-671
8. ALBERTS A.W., CHEN J., KURON G. I COL. (1980)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3957-3961
9. AREBALO R.E., TORMAMEN C.D., HARDGRAVE J.E.,  
NOLAND B.J., SCALLEN T.J. (1982)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 51-55
10. ARIÑO J., WAI WOON CH., BRAUTIGAN D.L., MILLER T.B.,  
JOHNSON G.L. (1988)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4252-4256
11. ASWAD D.W., GREENGARD P. (1981)  
J. Biol. Chem., 256, 3487-3493
12. ASWAD D.W., GREENGARD P. (1981)  
J. Biol. Chem., 256, 3494-3500
13. BALLOU L.M., BRAUTIGAN D.L., FISCHER E.H. (1983)  
Biochemistry, 22, 3393-3399
14. BALLOU L.M., VILLA-MORUZZI E., FISCHER E.H. (1985)  
Curr. Top. Cell. Regul., 27, 183-192
15. BALLOU M.L., VILLA-MORUZZI E., Mc NALL S.J.,  
SCOTT J.D., BLUMENTHAL D.K., KREBS E.G., FISCHER E.H.  
(1985)  
Adv. Protein Phosphatases, 1, 21-37

16. BALLOU M.L., FISCHER E. H. (1986)  
The Enzymes, 17, 311-361 (review)
17. BEG Z.H., ALLMAN D.W., GIBSON D.M. (1973)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1362-1369
18. BEG Z.H., ALLMAN D.W., ANDERSON P.J., PRUDEN E.,  
GIBSON D.M. (1974)  
Fed. Proc., 33, 1428-1432
19. BEG .Z.M., STONIK J.A., BREWER H.B. (1978)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3678-3682
20. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1979)  
Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 76, 4375-4379
21. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 8541-8545
22. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1982)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 1013-1020
23. BEG Z.H., BREWER H.B. (1982)  
Fed. Proc., 41, 2634-2638
24. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. (1984)  
Biochem. Biophys. Res. Commum., 119, 488-498
25. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. (1984)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7293-7297
26. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER Jr H.B. (1987)  
Metabolism, 36, 900-917
27. BEG Z.M., STONIK J.A., BREWER H.B. (1987)  
J. Biol. Chem., 262, 13228-13240
28. BERNDT J., HEGARDT F.G., BOVE J. (1976)  
Hoppe-Seyler's Z. Phisiol. Chem., 357, 1277-1282
29. BERNDT N., CAMPBELL D.G., CAUDWELL F.G., COHEN P.,  
Da CRUZ E SILVA O.B., COHEN P.T.W. (1987)  
FEBS Lett., 223, 340-346
30. BOVE J., HEGARDT F.G. (1978)  
FEBS Lett., 90, 198-202
31. BRADFORD M.M. (1976)  
Anal. Biochem., 72, 248-254
32. BRANDT H., KILLILEA S.D., LEE E.Y.C. (1974)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 598-604

33. BRANDT H., LEE E.Y.C., KILLILEA S.D. (1975)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 950-956
34. BRANDT H., CAPULONG Z. L., LEE E.Y.C. (1975)  
J. Biol. Chem., 250, 8038-8044
35. BRAUTIGAN D.L., PICTON C., FISCHER E.H. (1980)  
Biochemistry, 19, 5787-5794
36. BRAUTIGAN D.L., BALLOU L.M., FISCHER E.H. (1982)  
Biochemistry, 21, 1977-1982
37. BRAUTIGAN D.L., SHRINER C.L., GRUPPUSO P.A., (1985)  
J. Biol. Chem., 260, 4295-4302
38. BRAUTIGAN D.L., GRUPPUSO P.A., MUMBY M., (1986)  
J. Biol. Chem., 261, 14924-14928
39. BROWN M.S., DANA S.E., DIETSCHY J.M., SIPERSTEIN M.D.  
(1973)  
J. Biol. Chem., 248, 4731-4738
40. BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1974)  
J. Biol. Chem., 249, 7306-7314
41. BROWN M.S., BRUNSCHEDI G.Y., GOLDSTEIN J.L. (1975)  
J. Biol. Chem., 250, 2502-2509
42. BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L., DIETSCHY J.M. (1979)  
J. Biol. Chem., 254, 5144-5149
43. BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1980)  
J. Lipid Res., 21, 505-517
44. BROWN M.S., KOVANEN P.T., GOLSDSTEIN J.L. (1981)  
Science, 212, 628-635
45. BROWN W.E., RODWELL V.W. (1983)  
Biochim. Biophys. Acta, 751, 218-229
46. BROWN K.C., HAVEL M., WATSON J.A.. (1983)  
J. Biol. Chem., 258, 8512-8518
47. BROWN D.A., SIMONI R.D. (1984)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1674-1678
48. BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1986)  
Science, 232, 34-47
49. BURCH H.B., BRADLEY M.E., LOWRY O.H. (1967)  
J. Biol. Chem., 242, 4546-4554

50. BUTTERWORTH P.H.W., DRAPER H.H., HEMMING F.W.,  
MORTON R.A. (1966)  
Arch. Biochem. Biophys., 113, 646-653
51. CALVET V.E., GIL G., HEGARDT F.G. (1985)  
Arch. Biochem. Biophys., 236, 753-765
52. CHANG T.Y., LIMANEK J.S. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 7787-7795
53. CHANG T.Y., LIMANEK J.S., CHANG C.C. (1981)  
J. Biol. Chem., 256, 6174-6180
54. CHERNOFF J., SELLS M.A., LI H. (1984)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 121, 141-148
55. CHEUNG W.Y., LYNCH T.J., WALLACE R.W. (1978)  
Adv. Cyclic Nucleotide Res., 9, 233-251
56. CHIN D.J., LUSKEY K.L., FAUST J.R., MACDONALD R.J.,  
BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1982)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7704-7708
57. CHIN D.J., GIL G., RUSSELL D.W., LISCUM L.,  
LUSKEY K.L., BASU S.K., OKAYAMA H., BERG P.,  
GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1984)  
Nature, 308, 613
58. CHISHOLM A.A., COHEN P. (1985)  
Biochim. Biophys. Acta, 847, 155-158
59. CHISHOLM A., COHEN P. (1988)  
Biochim. Biophys. Acta, 968, 392-400
60. CLARKE C.F., EDWARDS P.A., LAN S.F., TANAKA R.D.,  
FOGELMAN A.M. (1983)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3305-3308
61. CLARKE C.F., EDWARDS P.A., LAN S.F. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 10439-10447
62. COHEN P. (1973)  
Eur. J. Biochem., 34, 1-14
63. COHEN P. (1982)  
Nature, 296, 613-620
64. COHEN P., YELLOWLEES D., AITKEN A., DONELLA-DEANA A.,  
HEMMINGS B., A. PARKER P.J. (1982)  
Eur. J. Biochem., 124, 21-35



65. COHEN P. (1983)  
Methods Enzymol., 99, 340-344
66. COHEN P. (1985)  
Eur. J. Biochem., 151, 439-448
67. COHEN P.T.W. (1988)  
FEBS Lett., 232, 17-23
68. CROUCH D., SAFER B. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 7918-7924
69. DA CRUZ E SILVA O.B., ALEMANY S., CAMPBELL D.G.,  
COHEN P.T.W. (1987)  
FEBS Lett., 221, 415-422
70. DA CRUZ E SILVA O.B., COHEN P.T.W. (1987)  
FEBS Lett., 226, 176-178
71. DAMUNI Z., TUNG H.Y.L., REED L.J. (1985)  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 878-883
72. DePAOLI-ROACH A.A., LEE F-T. (1985)  
FEBS Lett., 183, 423-429
73. DePAOLI-ROACH A.A. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 12144-12152
74. DOTAN I., SHECHTER I. (1982)  
Biochim. Biophys. Acta, 713, 427-434
75. DOTAN I., SHECHTER I. (1983)  
Arch. Biochem. Biophys., 226, 401-410
76. DOTAN I., SHECHTER I. (1987)  
J. Biol. Chem., 262, 17058-17064
77. DUGAN R.E., NESS G.C., LAKSHMANA M.R.,  
NEPOKROEFF C.H., PORTER J.W. (1974)  
Arch. Biochem. Biophys, 161, 499-504
78. DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R.,  
APPELMANS F. (1955)  
Biochem. J., 60, 604-617
79. EASOM A., ZAMMIT A. (1984)  
Biochem. J., 220, 733-738
80. EASOM A., ZAMMIT A. (1984)  
Biochem. J., 220, 739-745

81. EASOM A., ZAMMIT A. (1985)  
Biochem. J., 230, 747-752
82. EDWARDS P.A., LEMONGELLO D., FOGELMAN A.N. (1979)  
J. Lipid Res., 20, 2-7
83. EDWARDS R.G., GOULD R.G. (1974)  
J. Biol. Chem., 249, 2891-2896
84. EDWARDS P.A., LEMONGELLO D., FOGELMAN A.N. (1979)  
Biochim. Biophys. Acta, 574, 123-135
85. EDWARDS P.A., LEMONGELLO D., KANE L., SHECTER I.,  
FOGELMAN A.M. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 3715-3725
86. EDWARDS P.A., LAN S-F., TANAKA R.D., FOGELMAN A.M.  
(1983)  
J. Biol. Chem., 258, 7272-7275
87. ENDO A., KURODA M., TANZAWA K. (1976)  
FEBS Lett., 72, 323-326
88. ERICKSON S.K., DAVISON A.M., GOULD R.G. (1975)  
Biochim. Biophys. Acta, 409, 59-63
89. FAUST J.R., GOLDSTEIN J. L., BROWN M.S. (1979)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5018-5022
90. FAUST J.R., LUSKEY K.L., CHIN D.J., GOLDSTEIN J.L.,  
BROWN M.S. (1982)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5205-5209
91. FEINGOLD K.R., WILEY M. H., MOSER A. H., LEAR S.R.,  
SIPERSTEIN M. (1983)  
J. Lipid Res., 24, 290-296
92. FERRER A., HEGARDT F.G. (1984)  
Arch. Biochem. Biophys., 230, 227-237
93. FERRER A., CAELLES C., MASSOT N., HEGARDT F.G. (1985)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 132, 497-504
94. FERRER A., CAELLES C., HEGARDT F.G. (1987)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 148, 1009-1016
95. FERRER A., CAELLES C., MASSOT N., HEGARDT F.G. (1987)  
J. Biol. Chem., 262, 13507-13512
96. FISCHER E.H., KREBS E.G. (1962)  
Methods Enzymol. 5, 369-372

97. FONT E., SITGES M., HEGARDT F.G. (1982)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 105, 705-710
98. FOULKES J.G., COHEN P. (1979)  
Eur. J. Biochem., 97, 251-256
99. FOULKES J.G., COHEN P. (1980)  
Eur. J. Biochem., 105, 195-203
100. FOULKES J.G., JEFFERSON L., COHEN P. (1980)  
FEBS Lett., 112, 21-24
101. FOULKES J.G., COHEN P., STRADA S.J., EVERSON W.V.,  
JEFFERSON L.S. (1982)  
J. Biol. Chem., 257, 12493-12496
102. FOULKES J.G., MALLER J.L. (1982)  
FEBS Lett., 150, 155-160
103. FOULKES J.G., STRADA S.J., HENDERSON P.F., COHEN P.  
(1983)  
Eur. J. Biochem., 132, 309-313
104. FOULKES J.G., ERNST V., LEVIN D.H. (1983)  
J. Biol. Chem., 258, 1439-1443
105. GANAPATHI M.K., SILBERMAN S.R., PARIS H., LEE E.Y.C.  
(1981)  
J. Biol. Chem., 256, 3213-3217
106. GARRISON J.C., JOHNSON D.E., CAMPANILE C.P. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 3283-3292
107. GAYLOR J.L. (1981)  
"Biosynthesis of isoprenoid compounds" (Porter J.W.,  
Spurgeon S.L. eds), 1, 481-543., J. Willey, New York
108. GIBBSONS G.F., BSORNSSON O.G., PULLINGER C.R. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 14399-14405
109. GIBBSONS G.F., PULLINGER C.R. (1985)  
Comunicació 14 al " 4th. International Meeting on  
HMG-CoA Reductase", Breukelen (Holanda)
110. GIBSON D.M., INGEBRITSEN T.S. (1978)  
Life Sci., 23, 2649-2664
111. GIBSON D.M., PARKER R.A., STEWART C.S., EVENSON K.J.  
(1982)  
Adv. Enzyme Regul., 20, 263-283

112. GIL G., SITGES M., HEGARDT F.G. (1981)  
Arch. Biochem. Biophys., 210, 224-229
113. GIL G., SITGES M., HEGARDT F.G. (1981)  
Biochem. Biophys. Acta, 663, 211-221
114. GIL G., SITGES M., BOVE J., HEGARDT F.G. (1981)  
FEBS Lett., 110, 195-199
115. GIL G., CALVET V.E., FERRER A., HEGARDT F.G.  
(1982)  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 363, 1217-1224
116. GIL G., HEGARDT F.G. (1982)  
Arch. Biochem. Biophys., 214, 192-198
117. GIL G., FAUST J.R., CHIN D.J., GOLDSTEIN J.L.,  
BROWN M.S. (1985)  
Cell, 41, 249-258
118. GILBOE D.P., LARSON K.L., NUTTAL F.G. (1972)  
Anal. Biochem., 47, 20-27
119. GOLDFARB S., PITOT H.C. (1971)  
J. Lipid Res., 12, 512-515
120. GONZALEZ R., CARLSON J.P., DEMPSEY M.E. (1979)  
Arch. Biochem. Biophys., 196, 574-580
121. GORIS J., DEFREYN G., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W.  
(1978)  
Eur. J. Biochem. 91, 457-464
122. GORIS J., DOPERE F., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W.  
(1980)  
FEBS Lett., 117, 117-121
123. GORIS J., CAMPS T., DEFREYN G., MERLEVEDE W.  
(1981)  
FEBS Lett., 134, 189-193
124. GORIS J., WAELKENS E., MERLEVEDE W. (1983)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 116, 349-354
125. GORIS J., PARKER P.J., WAELKENS E., MERLEVEDE W.  
(1984)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 120, 405-410
126. GORIS J., WAELKENS E., CAMPS T., MERLEVEDE W.  
(1984)  
Adv. Enzyme Regul., 22, 467-484

127. GORIS J., WAELKENS E., MERLEVEDE W. (1986)  
Biochem. J., 239, 109-114
128. GRATECOS D., DETWILER T.C., HURD S., FISCHER E.H.  
(1977)  
Biochemistry, 16, 4812-4817
129. GRUPPUSO P.A., JOHNSON G.L., CONSTANTINIDES M.,  
BRAUTIGAN D. (1985)  
J. Biol. Chem., 260, 4288-4294
130. GRUPPUSO P.A., SHRINER C.L., BRAUTIGAN D.L. (1987)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 148, 1174-1181
131. HARWOOD H.J., BRANDT K.G., RODWELL V.W. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 2810-2815
132. HEGARDT F.G., GIL G., CALVET E.V. (1983)  
J. Lipid Res., 24, 821-830
133. HEGARDT F.G. (1986)  
Adv. Protein Phosphatases, 3, 1-30
134. HELLER R.A., GOULD R.G. (1973)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 50, 859-865
135. HELLER R.A., GOULD R.G. (1974)  
J. Biol. Chem., 249, 5254-5260
136. HELLER R.A., GOULD R.G. (1975)  
Biochim. Biophys. Acta, 388, 254-259
137. HEMMINGS B.A., YELLOWLEES D., KERNOHAN J.C., COHEN P.  
(1981)  
Eur. J. Biochem., 119, 443-451
138. HEMMINGS B.A., RESINK T.J., COHEN P. (1982)  
FEBS Lett., 150, 319-324
139. HEMMINGS H.C., GREENGARD P., TUNG H.Y.L., COHEN P.,  
(1984)  
Nature, 310, 503-504
140. HEMMINGS H.C., NAIRN A.C., GREENGARD P., (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 14491-14497
141. HIGGINS M., RUDNEY H. (1973)  
Nature, 246, 60-61
142. HIGGINS M., BRADY D., RUDNEY H. (1974)  
Arch. Biochem. Biophys., 163, 271-282

143. HIRAGA A., KIKUCHI K., TAMURA S., TSUIKI S. (1981)  
Eur. J. Biochem., 119, 503-510
144. HOLMES C.F.B., CAMPBELL D.G., CAUDWELL F.B.,  
AITKEN A., COHEN P. (1986)  
Eur. J. Biochem., 155, 173-182
145. HSIAO K-J., SANDBERG A.R., LI H-C. (1978)  
J. Biol. Chem., 253, 6901-6907
146. HUANG F.L., GLINSMANN W.H. (1975)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 72, 3004-3008
147. HUANG F.L., GLINSMANN W. (1976)  
FEBS Lett., 62, 326-329
148. HUANG F.L., GLINSMANN W.H. (1976)  
Eur. J. Biochem., 70, 419-426
149. HUANG K.P., ROBINSON J.C. (1976)  
Anal. Biochem., 72, 593-599
150. HUNTER C.F., RODWELL V.W. (1980)  
J. Lipid Res., 21, 399-405
151. IMAOKA T., IMAZU M., ISHIDA N., TAKEDA M. (1978)  
Biochim. Biophys. Acta, 523, 109-120
152. IMAOKA T., IMAZU M., USUI H., KINOHARA N., TAKEDA M.  
(1983)  
J. Biol. Chem., 258, 1526-1535
153. IMAZU M., IMAOKA T., USUI H., KINOHARA N., TAKEDA M.  
(1981)  
Biochem. J., 90, 851-862
154. INGEBRITSEN T.S., LEE H., PARKER R.A., GIBSON D.M.  
(1978)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 1268-1277
155. INGEBRITSEN T.S., GEELLEN M.J.H., PARKER R.A.,  
EVENSON D. M., GIBSON D.M. (1979)  
J. Biol. Chem., 254, 9986-9989
156. INGEBRITSEN T.S., GIBSON D.M. (1980)  
Mollecular Aspects of Cellular Regulation,  
(Cohen P. ed.) 1, 63-93, Elsevier, Amsterdam
157. INGEBRITSEN T.S., FOULKES J.G., COHEN P. (1980)  
FEBS Lett., 119, 9-15

158. INGEBRITSEN T.S., PARKER R.A., GIBSON D.M. (1981)  
J. Biol. Chem., 256, 1138-1144
159. INGEBRITSEN T.S., COHEN P. (1983)  
Science, 221, 331-338
160. INGEBRITSEN T.S., COHEN P. (1983)  
Eur. J. Biochem. 132, 255-261
161. INGEBRITSEN T.S., FOULKES J.G., COHEN P. (1983)  
Eur. J. Biochem., 132, 263-274
162. INGEBRITSEN T.S., STEWART A.A., COHEN P. (1983)  
Eur. J. Biochem., 132, 297-307
163. INGEBRITSEN T.S., BLAIR J., GUY P., WITTERS L.,  
HARDIE D.G. (1983)  
Eur. J. Biochem., 132, 275-281
164. JENKE H.E., LOWEL M., BERNT J. (1981)  
J. Biol. Chem., 256, 9622-9625
165. JOHNSON G.L., BRAUTIGAN D.L., SHRINER C., JASPERS S.,  
ARIÑO J., MOLE J.E., MILLER T.B., MUMBY M.C. (1987)  
Mol. Endo., 1, 745-748
166. JURGENSEN S., SCHACTER E., HUANG C.Y., CHOCK P.B.,  
YANG S.D., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 5864-5870
167. KANDUTSCH A.A., CHEN H.W., HEINIGER H.J. (1978)  
Science, 201, 485-490
168. KANDUTSCH, A.A. (1982)  
Fed. Proc., 41, 1387-1394
169. KATO K., KOBAYASHI M., SATO S. (1974)  
Biochim. Biophys. Acta, 371, 89-101
170. KAWACHI T., RUDNEY H. (1970)  
Biochemistry, 9, 1700-1705
171. KEITH M.L., RODWELL, V.W., ROGERS D.H., H. RUDNEY  
(1979)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 90, 969-975
172. KEITH M.L., KENNELLY P.J., RODWELL V.W. (1983)  
J. Protein Chem., 2, 209-220
173. KENNELLY P.J., BRANDT K.G., RODWELL V.W. (1983)  
Biochemistry, 22, 2784-2788

174. KHANDELWAL R.L., VANDENHEEDE J.R., KREBS E.G. (1976)  
J. Biol. Chem., 251, 4850-4858
175. KHANDELWAL R.L., ZINMAN S.M. (1978)  
J. Biol. Chem., 253, 560-565
176. KHANDELWAL R.L., ZINMAN S.M., Ng. T.T.S. (1980)  
Biochim. Biophys. Acta, 626, 486-493
177. KHATRA S.B., CHIASSON J.L., SHIKAMA H., EXTON J.H.,  
SODERLING T.R. (1980)  
FEBS. Lett., 114, 253-256
178. KHATRA S.B., SODERLING T.R. (1983)  
Arch. Biochem. Biophys., 227, 39-51
179. KHATRA S.B. (1984)  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 177, 33-41
180. KIKUCHI K., TAMURA S., HIRAGA A., TSUIKI S. (1977)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, 29-37
181. KILLILEA S.D., MELLGREN R.L., AYLWARD J.H.,  
METIEH M.E., LEE E.Y.C. (1979)  
Arch. Biochem. Biophys., 193, 130-139
182. KING M.M., HUANG CH. Y. (1984)  
J. Biol. Biochem., 259, 8847-8856
183. KLEE C.B., KRINKS M.H. (1978)  
Biochemistry, 17, 120-126
184. KLEE C.B., KRINKS M.H., MANALAN A.S., COHEN P.,  
STEWARD A.A. (1983)  
Methods Enzymol., 102, 227-244
185. KLEINSEK D.A., RANGHANATAN S., PORTER J.W. (1977)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1431-1435
186. KLEINSEK D.A., JABALQUINTO A.M., PORTER J.W. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 3918-3923
187. KNAPPE J. (1974)  
Methods Enzymatic Analysis, 4, 2026-2030
188. KNIGHT B.L., TEAL T.K. (1980)  
Eur. J. Biochem., 104, 521-528
189. KOBAYASHI M., KATO K., SATO S. (1975)  
Biochim. Biophys. Acta, 377, 343-355



190. KOIZUMI J.H., MABUCHI H., TAKEDA R. (1982)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 180, 240-246
191. KREBS E.G., BEAVO J.A. (1979)  
Annu. Rev. Biochem., 48, 923-959
192. KRINKS M.H., HAIECH J., RHOADS A., KLEE, C.B. (1984)  
Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.,  
16, 31-47
193. LAEMMLI U.K. (1970)  
Nature, 227, 680-685
194. LAWRENCE J.C., HIKEN J., BURNETTE B.,  
DePAOLI-ROACH A.A. (1988)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 150, 197-203
195. LAWSON D.E.M., THREFOILL D.R., GLOVER J., MORTON R.A.  
(1961)  
Biochem. J., 79, 201-208
196. LEE E.Y.C., MELLGREN R.L., KILLILEA S.D.,  
AYLWARD J.H. (1978)  
FEBS Symp., 42, 327-346
197. LEE E.Y.C., SILBERMAN S.R., GANAPATHI M.K.,  
PETROVIC S., PARIS H. (1980)  
Adv. Cyclic Nucleotide Res., 13, 95-131
198. LI H-CH. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 8801-8807
199. LI H-CH., PRICE D.J., TABARINI D. (1985)  
J. Biol. Chem., 260, 6416-6426
200. LISCUM L., LUSKEY K.L., CHIN D.J., GOLSTEIN J.L.,  
BROWN M.S. (1983)  
J. Biol. Chem., 258, 8450-8455
201. LISCUM L., CUMMINGS R.D., ANDERSON R.G.W.,  
DEMARTINO J.L., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1983)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7165-7169
202. LISCUM L., FIRNER-MOORE J., STROUD R.M., LUSKEY K.L.,  
BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1985)  
J. Biol. Chem., 260, 522-530
203. LUSKEY K.L., FAUST J.R., CHIN D.J., BROWN M.S.,  
GOLDSTEIN J.L. (1983)  
J. Biol. Chem., 258, 8462-8469

204. MACKENZIE C.W., BULBULIAN G.J., BISHOP J. (1980)  
Biochim. Biophys. Acta, 614, 413-424
205. MANALAN A.S., KRINKS M.H., KLEE C.B. (1984)  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 177, 12-16
206. MARRERO P.F., HARO D., HEGARDT F.G. (1986)  
FEBS Lett., 197, 183-186
207. MEANS A.R., DEDMAN J.R. (1980)  
Nature, 285, 73-77
208. MELLGREN R.L., SCHELENDER K.K. (1982)  
J. Cyclic Nucleotide Res., 8, 27-37
209. MELLGREN R.L., SCHLENDER K.K. (1983)  
Biochem. Biophys. Res. Commun, 117, 501-508
210. MENON A.S., DEVI S.U., RAMASARMA T. (1985)  
Archs. Biochem. Biophys., 239, 342-351
211. MERLEVEDE W., RILEY G.A. (1966)  
J. Biol. Chem., 241, 3517-3524
212. MERLEVEDE W., VANDENHEEDE J.R., YANG S.D. (1984)  
Curr. Top. Cell. Regul., 23, 117-215
213. MIESKES G., BRAND I.A., SOLING H-D. (1984)  
Eur. J. Biochem., 140, 375-383
214. MITCHELL E.D., AVIGAN J. (1981)  
J. Biol. Chem., 256, 6170-6173
215. MITROPOULOS K.A., VENKATESAN S., REEVES D.E.A. (1981)  
Biochem. J., 194, 265-271
216. NEMENOFF R.A., BLACKSHEAR P.J. AVRUCH J. (1983)  
J. Biol. Chem., 258, 9437-9443
217. NESS G.C., SPINDLER C., MOFFLER M.H. (1979)  
Arch. Biochem. Biophys., 197, 493-499
218. NESS G.C., WAY S.C., WICKHAM P.S. (1981)  
Biochem. Biophys. Res. Commun, 102, 81-85
219. NIMMO A., COHEN P. (1978)  
Eur. J. Biochem., 87, 353-365
220. NIMMO A., COHEN P. (1978)  
Eur. J. Biochem., 87, 341-351

221. NORDSTROM J.L., RODWELL V.W., MITSCHELEN J.J. (1977)  
J. Biol. Chem., 252, 8924-8934
222. PALLAN C.J., WANG J.H. (1983)  
J. Biol. Chem., 258, 8550-8553
223. PALLAN C.J., WANG J.H. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 6134-6141
224. PALLAN C.J., WANG J.H. (1986)  
J. Biol. Chem., 261, 16115-16120
225. PALMER J.L., AVRUCH J. (1981)  
Anal. Biochem., 116, 372-373
226. PARIS H., GANAPATHI M.K., SILBERMAN S.R.,  
AYLWARD J.H., LEE E.Y.C. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 7510-7518
227. PARKER R.A., EVENSON K.J., GIBSON D.H. (1982)  
Fed. Proc., 41, 881-886
228. PATO M.D., ADELSTEIN R., CROUCH D., SAFER B.,  
INGEBRITSEN T.S., COHEN P. (1983)  
Eur. J. Biochem., 132, 283-287
229. PELECH S., COHEN P. (1985)  
Eur. J. Biochem., 148, 245-251
230. PETROFSKY, A. (1968)  
Biochemistry, 7, 472-482
231. PHILLIP B.W., SHAPIRO D.J. (1979)  
J. Lipid. Res., 20, 588-593
232. PONDAVEN P., COHEN P. (1987)  
Eur. J. Biochem., 167, 135-140
233. RAMASARMA T., PATON B., GOLDFARB S. (1981)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 100, 170-176
234. RESINK T.J., HEMMINGS B.A., TUNG H.Y., COHEN P. (1983)  
Eur. J. Biochem., 133, 455-461
235. ROACH P., ROACH P.J., DePAOLI-ROACH A.A., (1985)  
J. Biol. Chem., 260, 6314-6317
236. RODWELL V.W., NORDSTROM J.L., MITSCHELEN J.J. (1976)  
Ad. Lipid. Res., 14, 1-74
237. ROITELMAN J., SCHECHTER I. (1984)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 125, 902-907

238. ROITELMAN J., SHECTER I. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 870-877
239. ROITELMAN J., SHECTER I. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 14029-14032
240. SAKAKIBARA R., TOMINAGA N., SAKAI A., ISHIGURO M.  
(1987)  
Anal. Biochem., 162, 150-155
241. SAUCIER S.E., KANDUTSCH A.A. (1979)  
Biochim. Biophys. Acta, 572, 541-556
242. SCHENITZER-POLOKOFF R., TORGET R., LOGEL J.,  
SINENSKY M. (1983)  
Arch. Biochem. Biophys., 227, 71-80
243. SEIGELCHIFFER M.A., PASSERON S. (1985)  
Arch. Biochem. Biophys., 238, 353-357
244. SELLERS J.R., PATO M.D. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 7740-7746
245. SHAPIRO D.J., NORDSTROM J.L., MITSCHELEN J.J.,  
RODWELL V.W., SCHIMIKE R.T. (1974)  
Biochim. Biophys. Acta, 370, 369-377
246. SHINITSKY M., BARENHOLZ Y. (1978)  
Biochim. Biophys. Acta, 515, 367-372
247. SILBERMAN S.R., SPETH M., NEMANI R., GANAPATHI M.K.,  
DOMBRADI V., PARIS H., LEE E.Y.C. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 2913-2922
248. SIPAT A.B., SABINE J.R. (1981)  
Biochem. J., 194, 889-893
249. SITGES M., GIL G., HEGARDT F.G. (1984)  
J. Lipid Res., 25, 497-506
250. SIVARAMAKRISNAN S., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W.  
(1983)  
Adv. Enzyme Regul., 21, 321-330
251. SLAKEY L.L., GAIG M.C., BEYTIA E., BRIEDIS A.,  
FELDBRUEGGE D.H., DUGAN R.E., I COL. (1972)  
J. Biol. Chem., 247, 3014-3022
252. SPETH M., ALEJANDRO R., LEE E.Y.C. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 3475-3481

253. SRIKANTAIAM M.V., TORMANEN C.D., REDD W.L.,  
HARDGRAVE J.E., SCALLEN T.J. (1977)  
J. Biol. Chem., 252, 6145-6150
254. STEWART A.A., INGEBRITSEN T.S., MANALAN A., KLEE C.,  
COHEN P. (1982)  
FEBS Lett., 137, 80-84
255. STEWART A.A., INGEBRITSEN T.S., COHEN P. (1983)  
Eur. J. Biochem., 132, 289-295
256. STRALFORS P., HIRAGA A., COHEN P. (1985)  
Eur. J. Biochem., 149, 295-303
257. TALLANT E.A., CHEUNG W.Y. (1984)  
Arch. Biochem. Biophys., 232, 269-279
258. TALLANT E.A., CHEUNG W.Y. (1984)  
Biochemistry, 23, 973-979
259. TAMURA S., KIKUCHI K., HIRAGA A., KIKUCHI H.,  
HOSOKAWAM., TSUIKI S. (1978)  
Biochim. Biophys. Acta, 524, 349-356
260. TAMURA S., TSUIKI S. (1980)  
Eur. J. Biochem., 111, 217-224
261. TAMURA S., KIKUCHI H., KIKUCHI K., HIRAGA A.,  
TSUIKI S. (1980)  
Eur. J. Biochem., 104, 347-355
262. TONKS N.K., COHEN P. (1984)  
Eur. J. Biochem., 145, 65-70
263. TUNG H.Y., COHEN P. (1984)  
Eur. J. Biochem., 145, 57-64
264. TUNG H.Y.L., RESINK T.J., HEMMINGS B.A.,  
SHENOLIKAR S., COHEN P. (1984)  
Eur. J. Biochem., 138, 635-641
265. TUNG H.Y.L., PELECH S., FISCHER M., POGSON C.I.,  
COHEN P. (1985)  
Eur. J. Biochem., 149, 305-313
266. TUNG H.Y.L., ALEMANY S., COHEN P. (1985)  
Eur. J. Biochem., 148, 253-263
267. USUI H., KINOHARA N., YOSHIKAWA K., IMAZU M.,  
IMAOKA T., TAKEDA M. (1983)  
J. Biol. Chem., 259, 7510-7518

268. VANDENHEEDE J.R., YANG S.D., GORIS J., MERLEVEDE W. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 11768-11774
269. VANDENHEEDE J.R., GORIS J., YANG S-D., CAMPS T., MERLEVEDE W. (1981)  
FEBS Lett., 127, 1-3
270. VANDENHEEDE J.R., ABEELE C.V., MERLEVEDE W., (1987)  
FEBS Lett., 216, 291-294
271. VILLA-MORUZZI E., BALLOU L.M., FISCHER E.H. (1984)  
J. Biol. Chem., 259, 5857-5863
272. WALLACE R.W., LYNCH T.S., TALLANT E.A., CHEUNG W.Y. (1979)  
J. Biol. Chem., 254, 377-382
273. WALLACE R.W., TALLANT E.A., CHEUNG W.Y. (1980)  
Biochemistry, 19, 1831-1837
274. WALSETH T.F., JOHNSON R.A. (1979)  
Biochem. Biophys. Acta, 526, 11-31
275. WHITEHOUSE S., WALSH D. (1983)  
Methods Enzymol., 99, 80-93
276. WILLIAMSON D.H., BROSNAN J.T. (1974)  
Methods in Enzymatic Analysis, (Bergmeyer, H. V. ed.),  
4, 2266-2302. Verlag Chemie, Weinheim
277. YAN S.C.B., GRAVES D.J. (1982)  
Moll. Cell. Biochem., 42, 21-29
278. YANG S.D., VANDENHEEDE J.R., GORIS J., MERLEVEDE W. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 11759-11767
279. YANG S.D., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W. (1981)  
FEBS Lett., 132, 293-295
280. YANG S.D., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W. (1981)  
J. Biol. Chem., 256, 10231-10234

Impreso y Encuadernado en:  
**LIBRERIA ESTUDIO**  
Sabino de Arana 42 - 44 - Tel. 330 95 24  
08028 - BARCELONA





