

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

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

GUILLERMINA ASINS MUÑOZ

3. RESULTADOS

3.1. EFECTO DE LA DILUCION EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS PROTEIN FOSFATASAS

La determinación de los porcentajes de distribución subcelular de las actividades proteín fosfatasa varían no tan sólo en función del sustrato utilizado, HMG-CoA reductasa o glucógeno fosforilasa, sino también en función de las condiciones del ensayo. Los distintos valores de actividad específica para un mismo sustrato se han explicado por la presencia de potentes inhibidores de fosfatasa en hígado de rata, que se distribuyen desigualmente conforme se procede al subfraccionamiento celular. La presencia de estos inhibidores modifica de forma drástica la actividad específica en función de la dilución de la muestra. Para evitar estas variaciones se recomienda dializar las muestras o bien someterlas a cromatografía en gel filtración para eliminar moléculas de bajo peso molecular.

Para calcular el porcentaje de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en las distintas fracciones subcelulares, se precisa un estudio previo de la variación de la actividad específica en función de la dilución. Para ello se obtuvieron las fracciones siguientes: sobrenadante postmitocondrial (SPM), citosol (C), microsomas (M) y glucógeno (G), como se ha descrito en el apartado 2.6.1.

Las fracciones se diluyen, refiriéndose respecto al homogenizado inicial obtenido al triturar el hígado en relación 1/3 (p/v). Dado un volumen inicial del homogenizado, al que le damos valor 100, cada unas de las sucesivas fracciones se diluyeron para una concentración final equivalente al 10 %, 3,3 %, 1,1 %, y 0,3 % respecto al 100 %, volumen de hígado homogenizado. De cada una de estas diluciones se tomaron 30 μ L y se ensayó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y glucógeno fosforilasa fosfatasa.

3.1.1. Sustrato HMG-CoA reductasa

En la Figura 1, en ordenadas se representa la actividad PrP, en U/g de hígado, para sustrato HMG-CoA reductasa y en abscisas el porcentaje de dilución de las muestras, en escala logarítmica.

En el SPM, la actividad específica aumenta de 550 U/g de hígado para una dilución del 10 %, a 1800 U/g de hígado para el 0,3 %, esto es, multiplica aproximadamente por tres su actividad específica. En citosol pasa de 450 U/g de hígado para una dilución del 10 %, a 900 U/g de hígado para una dilución del 1,1 %. Las actividades específicas en microsomas y glucógeno se ven menos afectadas, aunque también aumentan ligeramente.

Como se observa, la actividad en microsomas y glucógeno aumenta poco al incrementar la dilución, variando mucho la actividad en SPM o citosol. Por ello, si los porcentajes de distribución se calculan respecto al SPM, para una dilución del 10 %, a microsomas y glucógeno se les asignan porcentajes más elevados y a citosol menor. Cuando los porcentajes de distribución se calculan para diluciones del 1 %, a microsomas y glucógeno proporcionalmente les corresponde menor porcentaje y a citosol mayor.

3.1.2. Sustrato glucógeno fosforilasa

En la Figura 2, en ordenadas se representa la actividad PrP, en U/g de hígado, para sustrato glucógeno fosforilasa y en abscisas el porcentaje de dilución de las muestras, en escala logarítmica.

La dilución de las muestras incrementa la actividad específica en las fracciones SPM y citosol, multiplicandose por 3 y por 2,5 respectivamente, para las diluciones del 10 y 0,3 %. Las actividades de microsomas y glucógeno se ven menos afectadas por la dilución.

Los porcentajes de distribución subcelular varían a medida que se incrementan las diluciones, tanto para sustrato glucógeno fosforilasa como para sustrato HMG-CoA reductasa.

En la Figura 3 se muestra el efecto que produce la eliminación de compuestos de bajo peso molecular por gel filtración sobre la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa. Fracciones de SPM y citosol se ensayaron filtradas y sin filtrar. Cuando las muestras se ensayaron diluidas (0,30 %), no se observaron diferencias de actividad específica. En muestras poco diluidas (10 %) en el SPM y en citosol el aumento de actividad en respuesta a la eliminación de sustancias de bajo peso molecular es importante. Ello pone de relieve que si bien la eliminación de compuestos de pequeño peso molecular inhibe la actividad proteín fosfatasa, a medida que aumenta la dilución este factor pierde significación.

Cuando el efecto de la filtración se estudia sobre la actividad PrP y sobre sustrato HMG-CoA reductasa se observa muy poca variación en la actividad específica como respuesta a la eliminación de pequeñas moléculas. La interferencia es menos acusada.

EFFECTO DE LA DILUCION EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA
HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA

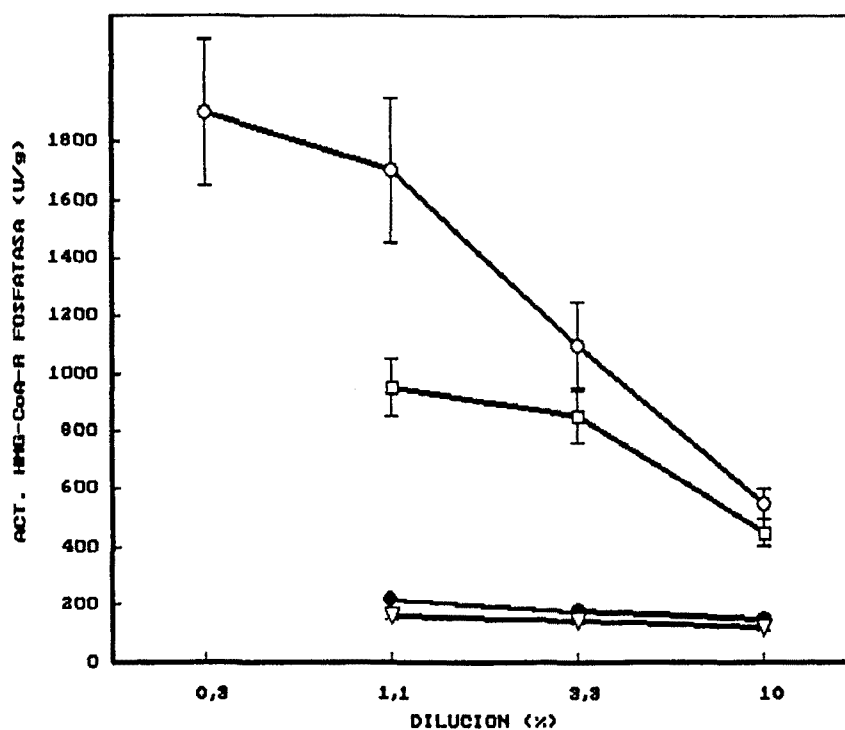


FIGURA 1

Efecto de la dilución en la actividad específica HMG-CoA reductasa fosfatasa, en las fracciones: (o) sobrenadante postmitocondrial, (□) citosol, (●) microsomas, y (∇) glucógeno. En ordenadas se indica actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en U/g de hígado. En abscisas la dilución efectuada en % respecto a un 100 % referido al volumen inicial de hígado después de homogenizar (1/3).

EFFECTO DE LA DILUCION EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA
GLUCOGENO FOSFORILASA FOSFATASA

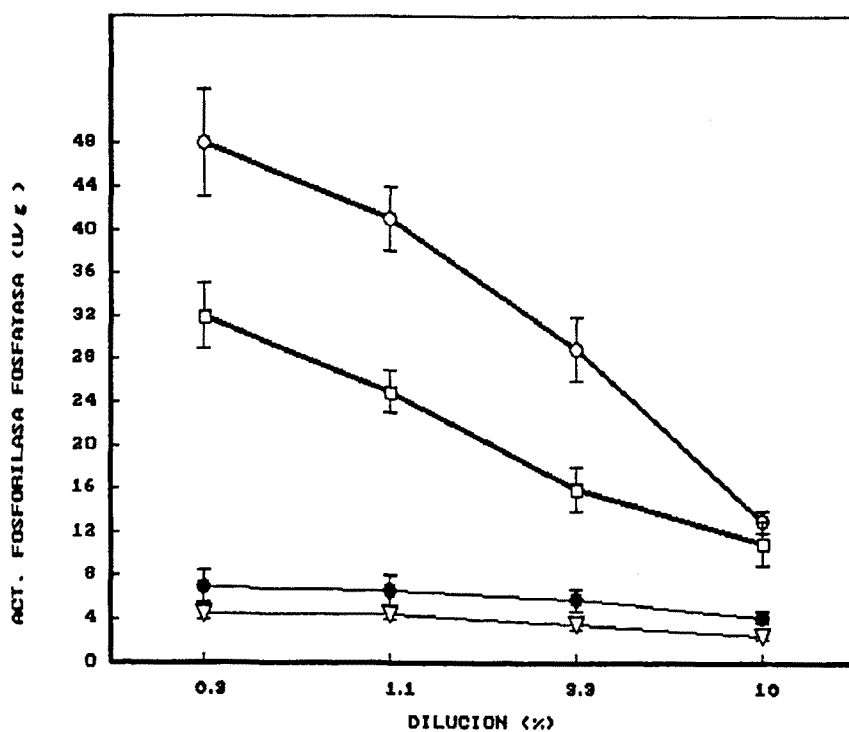


FIGURA 2

Efecto de la dilución en la actividad específica de la glucógeno fosforilasa fosfatasa, en las fracciones: (o) sobrenadante post-mitocondrial, (□) citosol, (●) microsomas, y (▽) glucógeno. En ordenadas se indica actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa como U/g de hígado. En abscisas el tanto por ciento de dilución efectuada respecto a un 100 % referido al volumen inicial de hígado después de homogenizar (1/3).

EFEECTO DE LA FILTRACION DE EXTRACTOS INICIALES SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA GLUCOGENO FOSFORILASA FOSFATASA

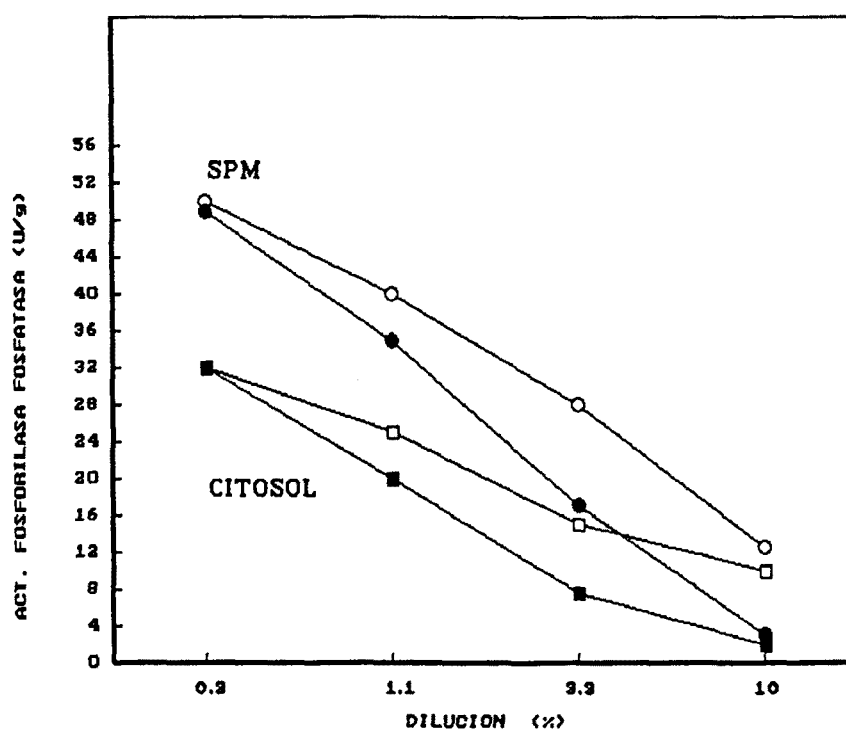


FIGURA 3

Efecto de la filtración en Sephadex G-50 superfino de las fracciones obtenidas a partir de hígado de rata: sobrenadante postmitocondrial y citosol sobre la actividad específica fosforilasa fosfatasa

En ordenadas se indica actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa como U/g de hígado. En abscisas el tanto por ciento de dilución efectuada respecto a un 100 % referido al volumen inicial de hígado después de homogenizar (1/3).

En círculos se representa la actividad del SPM y en cuadrados la actividad en citosol. Las formas llenas se refieren a las muestras sin filtrar y las formas vacías a las formas filtradas.

3.2. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA EN EL SOBRENADANTE POSTMITOCONDRIAL DE HIGADO DE RATA

3.2.1. Animales alimentados

Nos interesaba conocer si la forma de obtención de los hígados, o alteraciones en la dieta de las ratas, modifican la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en el SPM. Para ello se utilizaron tres lotes de cuatro ratas cada uno en las siguientes condiciones:

- a) ratas alimentadas con dieta estándar, que fueron decapitadas y a las que se extrajo el hígado tras el desangrado,
- b) ratas alimentadas con dieta estándar a las que se perfundió el hígado con solución salina para eliminar restos de hematíes; podremos así evaluar si la sangre que baña el hígado obtenido de ratas decapitadas puede modificar la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.
- c) ratas alimentadas con dieta estándar suplementada durante los cinco últimos días previos al sacrificio con 5 % de colestiramina, resina que aumenta la cantidad de HMG-CoA reductasa; comprobaremos si la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa aumenta en correlación con su sustrato.

Tras la obtención del hígado se tomó una muestra de aproximadamente 1 gramo, se pesó y se congeló en nitrógeno líquido, guardándose a -70°C para la determinación de la concentración de glucógeno, tal como indicamos en el apartado 2.4.14. El resto de hígado se homogenizó y se obtuvo el sobrenadante postmitocondrial (SPM) tal como se detalla en el apartado 2.6.1.

En el SPM recién obtenido se determinaron las actividades HMG-CoA reductasa fosfatasa y glucógeno fosforilasa fosfatasa. Para ello se procedió a diluir las muestras hasta dilución infinita, esto es, aquella dilución a la cual es máxima la actividad específica. Parte del SPM obtenido se alicuotó y guardó a -70°C . En estas muestras se determinaron las actividades láctico deshidrogenasa y glucosa 6-fosfatasa, así como la concentración de proteína. Los hígados se manipularon separadamente y

los datos obtenidos se trataron para obtener las medias y las desviaciones estándar.

El resultado se muestra en la Tabla VI. En la primera columna se expresan las actividades obtenidas para las ratas alimentadas con dieta normal y decapitadas. Cuando se comparan estos valores con los obtenidos en los lotes b y c (no mostrados) se observa que estos últimos están dentro de las medias obtenidas expresadas en la columna de dieta normal. En ningún caso se producen cambios en la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en el SPM, lo que indica que la sangre que baña el hígado no está modificando la actividad PrP y que el aumento causado por la colestiramina en la expresión de la actividad HMG-CoA reductasa no está afectado del mismo modo la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.

3.2.2. Animales en ayunas y tratados con glucagon

Para conocer si la disminución del glucógeno hepático altera la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa se trabaja con dos lotes de ratas:

- a) ratas en ayuno de 24 horas; el ayuno disminuye la actividad HMG-CoA reductasa, sustrato de nuestro enzima; comprobaremos si la variación en actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa es paralela a la de su sustrato.
- b) ratas en ayuno de 24 horas a las que se administra glucagon, 0,5 mg/mL 30 minutos antes del sacrificio, tal como se describe en el apartado 2.2.1.

El tratamiento con glucagon de ratas en ayunas durante 24 horas, tiene como objeto eliminar la contaminación de glucógeno en microsomas obtenidos por centrifugación diferencial, cuyo valor es importante en ratas alimentadas e igualmente importante en ratas en ayuno de 24 horas. Esta precaución se hacía necesaria después de la publicación de Mvumbi y col. (246), en las que se cuestiona la procedencia de las proteínas fosfatasas purificadas de microsomas, ya que dada la elevada afinidad de la PrP₁ por el glucógeno, la pequeña cantidad de glucógeno que

contamina los microsomas podría ser suficiente para arrastrar la actividad PrP 1₀.

Se tomaron las mismas precauciones que en el apartado anterior, y se determinaron los mismos parámetros. Los datos obtenidos para las ratas en ayunas de 24 horas están dentro de las medias presentadas en la Tabla VI para ratas alimentadas con dieta estándar, excepto en lo que hace referencia a la concentración de glucógeno que fue de 3,5 mg/g de hígado de rata. Los resultados obtenidos con ratas en ayuno de 24 horas y tratamiento con glucagon se presentan en la misma Tabla VI en la columna de la derecha.

Como queda reflejado en esta tabla, el tratamiento con glucagon disminuye aproximadamente 100 veces la concentración de glucógeno en hígado, sin modificar significativamente la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa ni la glucógeno fosforilasa fosfatasa. Los ligeros aumentos que se observan en las actividades láctico deshidrogenasa y glucosa-6-fosfatasa han sido ya descritos.

Este resultado nos animó a proseguir el subfraccionamiento del SPM de ratas alimentadas y de ratas en ayunas y tratadas con glucagon para averiguar si el tratamiento con glucagon modifica o no la actividad unida a las fracciones obtenidas del SPM: citosol, microsomas y glucógeno.

**ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA EN EL SOBRENADANTE
POSTMITOCONDRIAL DE HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS Y RATAS
EN AYUNAS TRATADAS CON GLUCAGON**

Actividad enzimática	Dieta normal	Ayunas-Glucagon
	Unidades/g de hígado	
HMG-CoA reductasa fosfatasa	1.850 ± 200	1.950 ± 220
Fosforilasa fosfatasa	48 ± 5	46 ± 7
Láctico deshidrogenasa	254 ± 34	280 ± 25
Glucosa-6-fosfatasa	3,4 ± 1,2	3,6 ± 1,3
	mg/g de hígado	
Proteína	89 ± 10	98 ± 9
Glucógeno	45,5 ± 8	0,3 ± 0,2

TABLA VI

Se determinaron las actividades HMG-CoA reductasa fosfatasa, glucógeno fosforilasa fosfatasa y las actividades marcadoras de citosol, láctico deshidrogenasa y de microsomas, glucosa-6-fosfatasa, en el sobrenadante postmitocondrial obtenido a partir de dos lotes de ratas: ratas alimentadas con dieta de mantenimiento (n = 4) y ratas en ayunas de 24 horas y tratadas con glucagon (n = 4). Las actividades se expresan en unidades por gramo de hígado. También se determinaron proteína y glucógeno, que se expresan en mg/g de hígado. Los resultados se presentan como la media ± su desviación estándar (n = 4).

3.3. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA

En el estudio de la distribución subcelular de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa se emplearon la centrifugación diferencial y la centrifugación en gradiente de sacarosa continuo. En ambos casos trabajamos con dos lotes, uno de ratas alimentadas normalmente y otro de ratas en ayuno de 24 horas tratadas con glucagon, de la misma forma que se hizo para el estudio de las actividades en el SPM.

3.3.1. Subfraccionamiento por ultracentrifugación

Del subfraccionamiento del SPM por centrifugación diferencial se obtuvieron las siguientes fracciones: citosol, precipitado microsomal y precipitado de glucógeno, tal como se detalla en el apartado 2.6.1.

De todas las fracciones se congelaron alícuotas a -70°C y se determinaron las actividades marcadoras de citosol, láctico deshidrogenasa; de microsomas, glucosa-6-fosfatasa y las actividades PrP sobre sustratos HMG-CoA reductasa y glucógeno fosforilasa. También se determinó la concentración de proteína.

En la determinación de las actividades PrP, las muestras se diluyeron a lo que llamamos dilución infinita, esto es aquella dilución a la cual es máxima la actividad específica, con la precaución de aplicar la misma dilución a todas las muestras para cada una de las distintas fracciones.

3.3.1.1. Animales alimentados

Los datos obtenidos a partir de ratas alimentadas con dieta normal se muestran en la TABLA VII. De la comparación de los porcentajes de distribución de la actividad marcadora de citosol (LDH) se concluye que la fracción microsomal está poco contaminada de proteínas citosólicas (0,5 %) y que no se puede atribuir a contaminación citosólica la actividad recogida en el precipitado microsomal. Esta baja contaminación se debe a que los

microsomias obtenidos por primera vez, y con elevada contaminación citosólica, se lavaron con solución amortiguadora y se centrifugaron de nuevo, precaución que logra disminuir la contaminación citosólica.

La mayor parte de la actividad se localiza en el citosol, 55 %. Microsomias y glucógeno contienen aproximadamente la misma actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, 7 % y 6 %, respectivamente.

En el subfraccionamiento del SPM (55 + 7 + 6 %) no se recupera el 100 % de la actividad inicial HMG-CoA reductasa fosfatasa, lo que puede deberse esencialmente a las condiciones de dilución del ensayo, tal como hemos demostrado en apartados anteriores. La inestabilidad de la actividad podría también contribuir a esta pérdida de actividad; por ello los porcentajes de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa pueden estar infravalorados.

3.3.1.2. Animales en ayunas tratados con glucagon

Los datos obtenidos a partir de las ratas tratadas con glucagon se muestran en la TABLA VIII. En este caso sólo obtuvimos dos fracciones: citosol y microsomias, ya que disminuyó drásticamente el glucógeno hepático (0,3 mg/gramo de hígado.)

Respecto a los resultados obtenidos con ratas alimentadas, la actividad PrP en microsomias disminuye cuando las ratas se tratan con glucagon, tanto para sustrato HMG-CoA reductasa (del 7 al 2 %) como sustrato glucógeno fosforilasa (del 12 al 4 %). La pérdida de actividad en microsomias, de forma conjunta a la desaparición del glucógeno, hace necesario seguir considerando una posible contaminación de microsomias por glucógeno, tal como indican Mvumbi y col. (246)

En citosol los porcentajes de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y glucógeno fosforilasa fosfatasa están aumentados respecto a los animales control. Ello puede deberse al aporte provocado por la desaparición de la fracción de glucógeno

(como sucede en el caso de la actividad PrP 1_o, para sustrato glucógeno sintasa) y también a un aporte de PrP procedentes de la fracción microsomal, bien por la desaparición del glucógeno contaminante de esta fracción o por una probable acción del glucagon directamente sobre el retículo endoplasmático. Con este ensayo no es posible valorar separadamente el aporte de cada una de las subfracciones ni tampoco cuantificar qué proporción de la actividad microsomal perdida se debe directamente a la desaparición del glucógeno y qué parte corresponde a una acción directa del glucagon sobre las membranas del retículo endoplasmático.

**SUBFRACCIONAMIENTO DEL SOBRENADANTE POSTMITOCONDRIAL OBTENIDO
A PARTIR DEL HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS**

Fracción	Proteína	Láctico DH	Glucosa-6- fosfatasa	Fosforilasa fosfatasa	HMG-CoA-R fosfatasa
	89	263	3,24	50	1.700
	± 10	± 30	± 1,2	± 8	± 250
	%	%	%	%	%
SPM	100	100	100	100	100
citosol	73	90	1,5	82	55
Precipitado microsomal	21	0,5	80	12	7
Precipitado de glucógeno	1,5	0,4	4	7	6

TABLA VII

Distribución de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en hígado de ratas alimentadas. El SPM se sometió a un subfraccionamiento por centrifugación diferencial.

En la primera línea se expresan las actividades enzimáticas en U/g de hígado. La proteína se presenta en mg/g de hígado. En las siguientes líneas los valores se expresan en % sobre la actividad inicial medida en el SPM al que se hace corresponder el 100 %. La concentración de glucógeno en hígado de ratas alimentadas es de 41 ± 10 mg/g de hígado ($n = 3$). Los datos, en %, se expresan como las medias de tres determinaciones.

SUBFRACCIONAMIENTO DEL SOBRENADANTE POSTMITOCONDRIAL OBTENIDO A PARTIR DEL HIGADO DE RATAS EN AYUNAS TRATADAS CON GLUCAGON

Fracción	Proteína	Láctico DH	Glucosa-6- fosfatasa	Fosforilasa fosfatasa	HMG-CoA-R fosfatasa
	97	267	3,54	47	1.900
	± 9	± 25	± 1,3	± 6	± 180
	%	%	%	%	%
SPM	100	100	100	100	100
citosol	72	96	2	89	62
Precipitado microsomal	26	0.6	72	3,9	2,1

TABLA VIII

Distribución de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en hígado de ratas en ayunas de 24 horas a las que se administró 0,5 mg de glucagon antes del sacrificio. El SPM se sometió a un subfraccionamiento por centrifugación diferencial.

En la primera línea se expresan las actividades enzimáticas como U/g de hígado. La proteína se presenta en mg/g de hígado. En las siguientes líneas los valores se expresan en % sobre la actividad inicial medida en el SPM al que se hace corresponde el 100 %. La concentración de glucógeno en ratas en ayunas de 24 horas tratadas con glucagon es de $0,3 \pm 0,2$ mg/gramo de hígado de rata ($n=3$). Los datos, en %, se expresan como la media de tres determinaciones.

3.3.2. Subfraccionamiento en gradiente de sacarosa continuo

Muestras del sobrenadante postmitocondrial se sometieron a centrifugación en gradiente lineal de sacarosa, como se indica en el apartado 2.6.2. El gradiente se realizó en dos condiciones: en presencia de 10 mM EDTA (figuras 4 y 6), y en presencia de 10 mM EDTA + 500 mM KCl (figuras 5 y 7).

En dos tubos de centrífuga, utilizados como control, se depositó solución de homogenización, en lugar de la muestra de SPM. Una vez finalizada la centrifugación se siguió la evolución del gradiente de sacarosa por medida del índice de refracción en cada una de las fracciones. Ello permitió calcular la concentración de sacarosa (paneles A) y la densidad en todas las fracciones (paneles D).

En las condiciones de centrifugación reseñadas, en el fondo del tubo de centrífuga se depositó, firmemente adherido, un precipitado de glucógeno, evidente si las ratas habían sido alimentadas e inapreciable si las ratas estaban en ayunas y tratadas con glucagon. Este precipitado no se recogió tras el fraccionamiento del gradiente.

Se determinaron las actividades marcadoras de citosol: LDH (paneles B, derecha); de retículo endoplasmático: glucosa-6-fosfatasa y HMG-CoA reductasa (paneles B, izquierda); la concentración de proteína y la presencia de RNA (paneles D).

En la determinación de las actividades PrP, para sustrato HMG-CoA reductasa (paneles A), y sustrato glucógeno fosforilasa (paneles C), fue esencial la dilución en el ensayo. Dado el elevado número de fracciones a ensayar se hizo necesario estandarizar las condiciones, perdiendo en ello posiblemente sensibilidad en algunos de los puntos.

Para la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa las fracciones se diluyeron 1/10 con la solución amortiguadora: Tris/HCl 5 mM pH 7, DTT 1 mM y albúmina bovina 0,5 mg/mL, momentos antes del ensayo. Cuando las muestras se ensaya-

ron sin diluir apareció actividad en las fracciones de microsomas y no se manifestó actividad enzimática en las citosólicas.

La presencia de inhibidores de la actividad PrP en las fracciones citosólicas afectó en mayor grado la actividad PrP sobre sustrato glucógeno fosforilasa que sobre sustrato HMG-CoA reductasa. Cuando las fracciones se ensayaron sin diluir o diluídas 1/10, la actividad sólo se mostró en la zona correspondiente a microsomas. Al aumentar la dilución a 1/40 se mostró la actividad PrP en las fracciones citosólicas y desapareció de las microsomales, por lo que decidimos diluir 1/10 las fracciones correspondientes a los marcadores de microsomas y diluir 1/40 las correspondientes al marcador citosólico.

3.3.2.1. Animales alimentados

En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos de la centrifugación en un gradiente de sacarosa del 15-60 %, preparado en Tris/HCl 5 mM pH 7 y EDTA 10 mM, del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas alimentadas. Los resultados se agrupan en cuatro paneles: A, B, C y D. En la Figura 5 se muestran los resultados del gradiente realizado en las mismas condiciones añadiendo a la solución 500 mM KCl.

La elevada concentración de EDTA, por su acción quelante, evita que se formen agregados microsomales, frecuentes en presencia de iones. Si el gradiente se realiza además en presencia de KCl 500 mM, se provoca la separación de los polisomas de la membrana del retículo endoplasmático y de las proteínas periféricas o adheridas. Con ello las fracciones microsomales pierden densidad y aparecen más próximas al citosol, al tiempo que las proteínas que no están fuertemente adheridas se desprenden de los microsomas y quedan retenidas en fracciones de menor densidad, por lo que se recomienda utilizar EDTA + KCl en este tipo de gradientes.

En los paneles A y C se pone de manifiesto que la actividad PrP para los dos sustratos presenta unos máximos comprendidos dentro del perfil de actividad de los marcadores microsomales, glucosa-6-fosfatasa y HMG-CoA reductasa. Cuando el gradiente se realiza en presencia de KCl 500 mM, Figura 5, las actividades marcadoras de microsomas se desplazan a densidades menores, pero en ningún caso la actividad disminuye. No sucede así con las actividades PrP: aun cuando se desplazan a densidades menores, el área comprendida bajo el perfil de actividad para las fracciones microsomales disminuye significativamente. Estos resultados serán confirmados en apartados siguientes, en los que se demuestra que la actividad unida a microsomas se desprende de éstos con gran facilidad.

**SUBFRACCIONAMIENTO EN GRADIENTE DE SACAROSA CONTINUO (15-60 %)
EL SOBRENADANTE POSTMITOCONDRIAL OBTENIDO DE RATAS ALIMENTADAS**

FIGURA 4

Centrifugación en gradiente de sacarosa continuo (15-60 %) preparado en Tris/HCl 5 mM pH 7, EDTA 10 mM, del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas alimentadas. Las condiciones se detallan en los apartados 2.6.2. y 3.3.2.

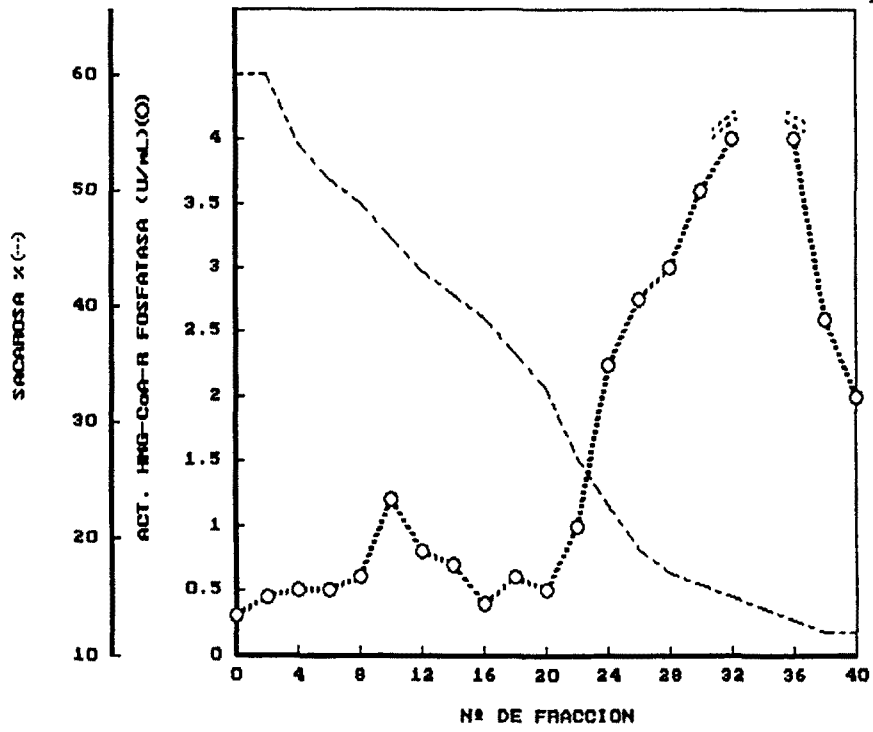
-A- Se representa en línea discontinua el porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones ensayadas (abscisas), calculado a partir del índice de refracción. En círculos abiertos se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.

-B- Se representan las actividades marcadoras de citosol (LDH) en círculos abiertos; de microsomas (G-6-Pasa) cuadrados vacíos; y HMG-CoA reductasa en triángulos vacíos.

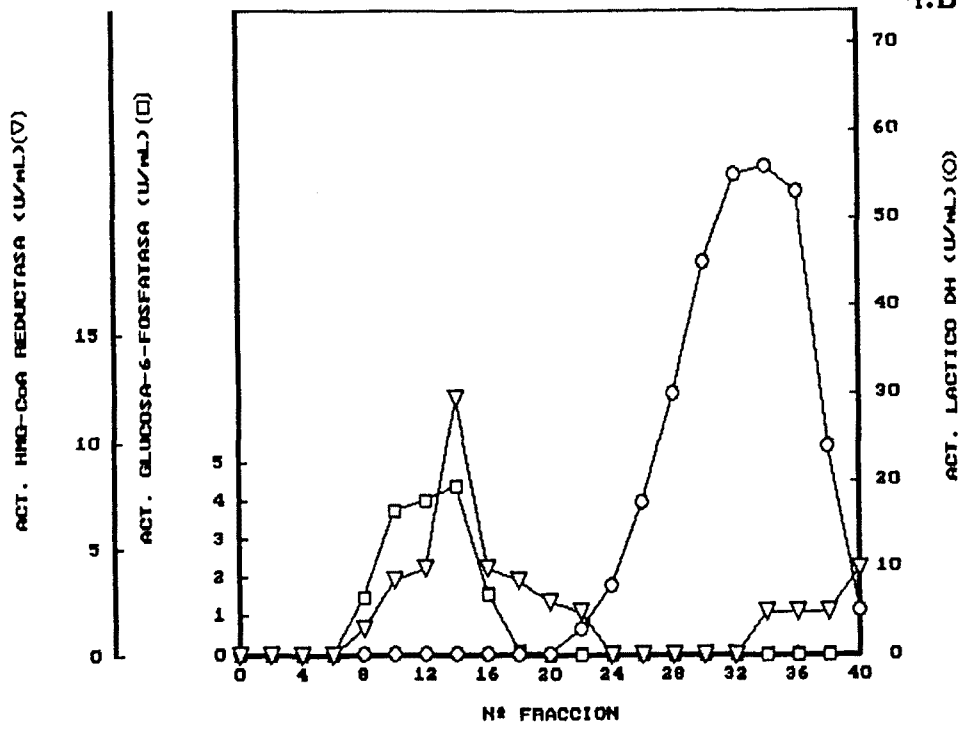
-C- Se representa en línea discontinua el porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones ensayadas (abscisas), calculado a partir del índice de refracción. En círculos llenos se representa la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa.

-D- Se representa en línea de puntos la proteína en mg/mL. En línea continua se representa la distribución de RNA en D.O. a 260 nm.

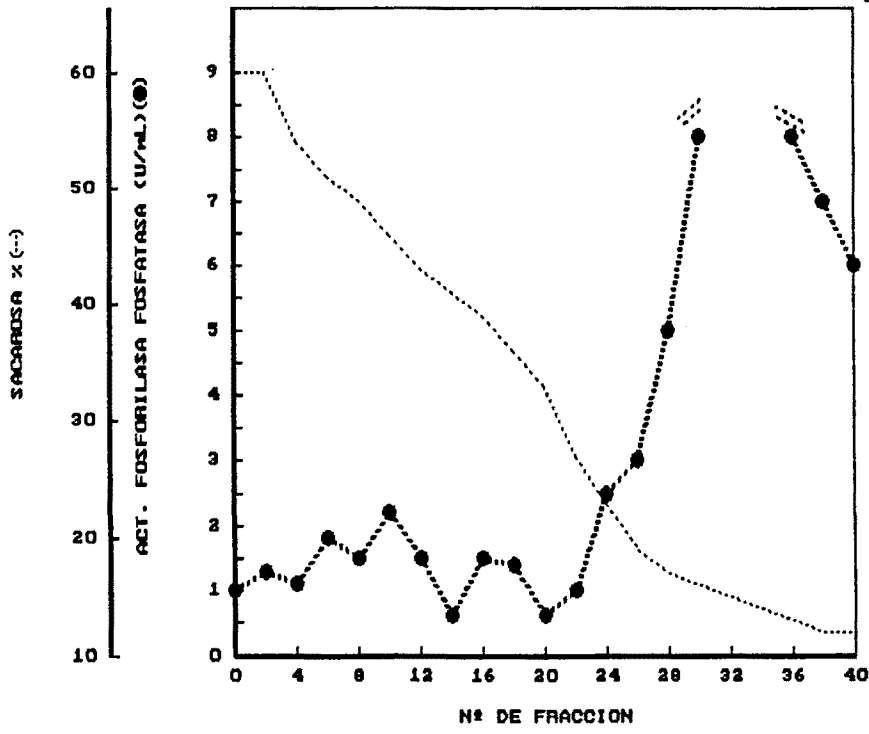
4.A



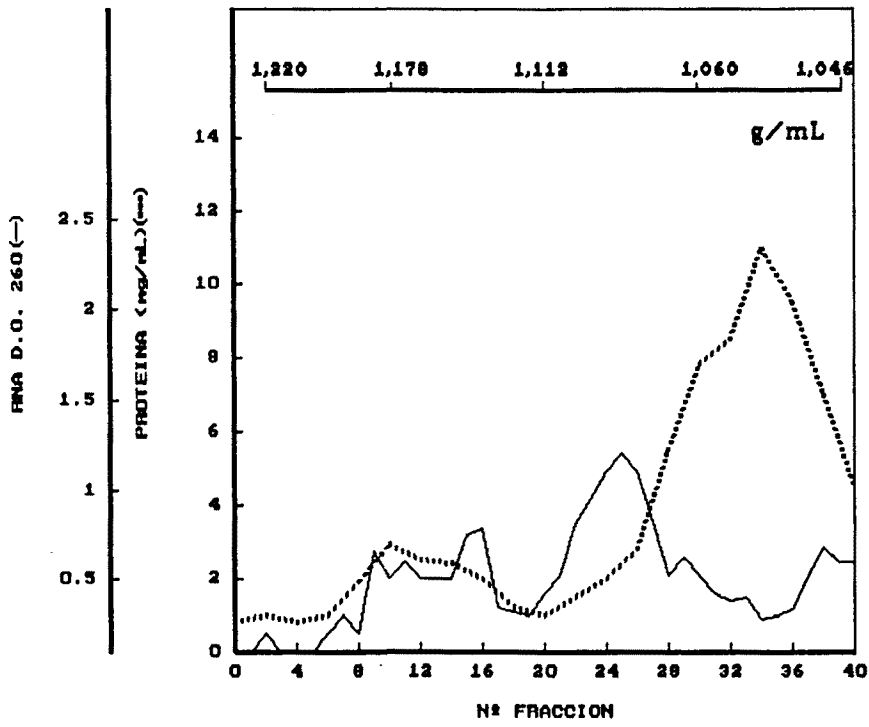
4.B



4.C



4.D



SUBFRACCIONAMIENTO EN GRADIENTE DE SACAROSA CONTINUO (15-60 %) EN PRESENCIA DE 500 mM KCl, DEL SOBRENADANTE POSTMITOCONDRIAL OBTENIDO DE RATAS ALIMENTADAS

FIGURA 5

Centrifugación en gradiente de sacarosa continuo (15-60 %) preparado en Tris/HCl 5 mM pH 7, EDTA 10 mM y 500 mM KCl, del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas alimentadas. Las condiciones vienen detalladas en los apartados 2.6.2. y 3.3.2.

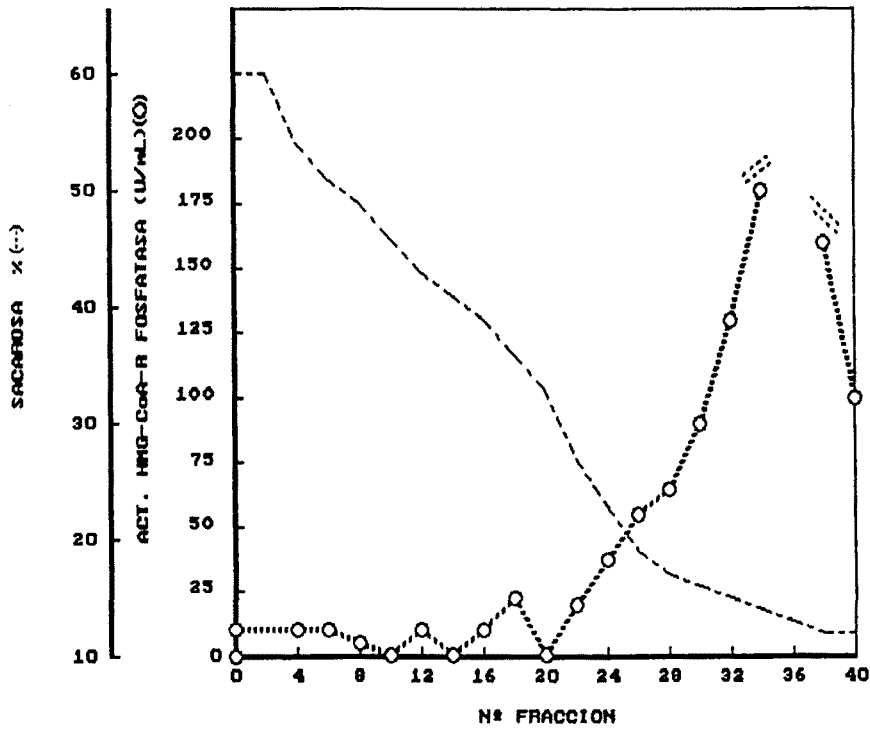
-A- Se representa en línea discontinua puntos el porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones ensayadas (abscisas), calculado a partir del índice de refracción. En círculos abiertos se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.

-B- Se representan las actividades marcadoras de citosol (LDH) en círculos abiertos; de microsomas (G-6-Pasa) cuadrados vacíos; y HMG-CoA reductasa en triángulos vacíos.

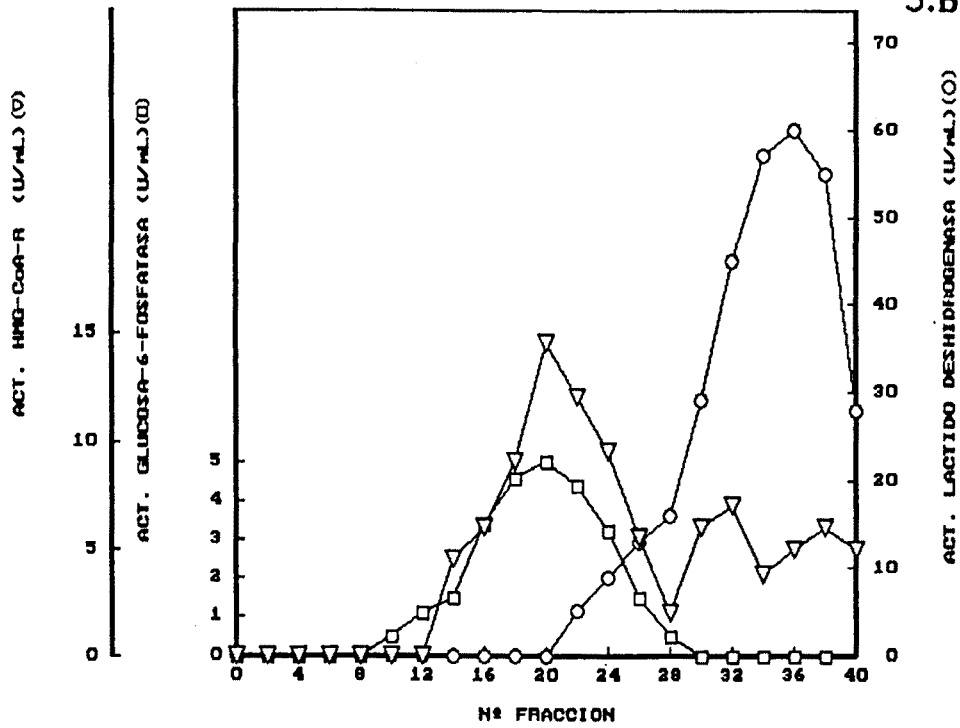
-C- Se representa en línea discontinua el porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones ensayadas (abscisas), calculado a partir del índice de refracción. En círculos llenos se representa la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa.

-D- Se representa en línea de puntos la proteína en mg/mL. En línea continua se representa la distribución de RNA en D.O. a 260 nm.

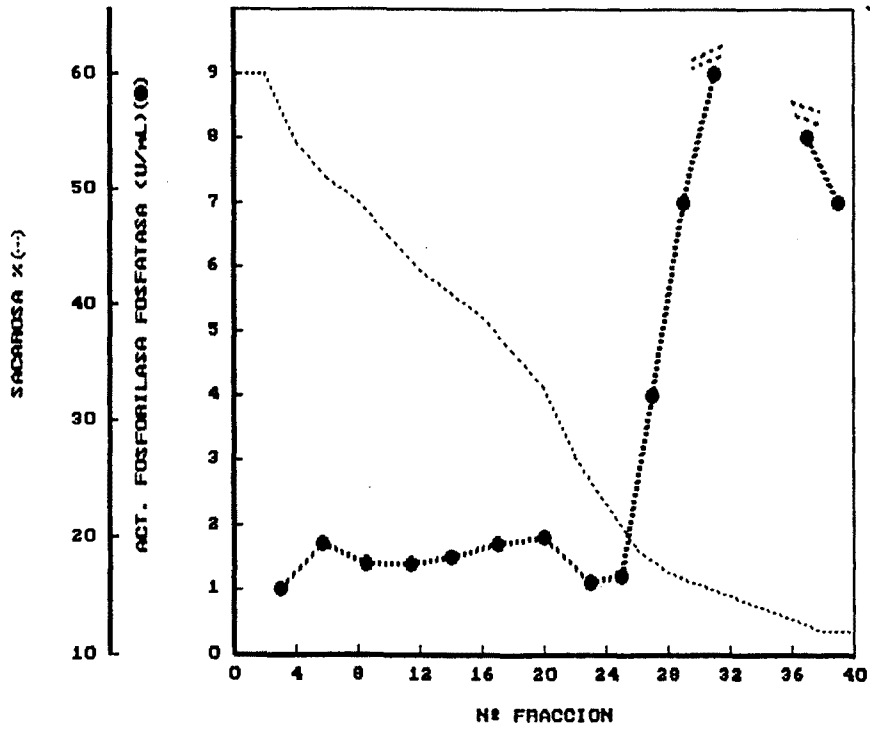
5.A



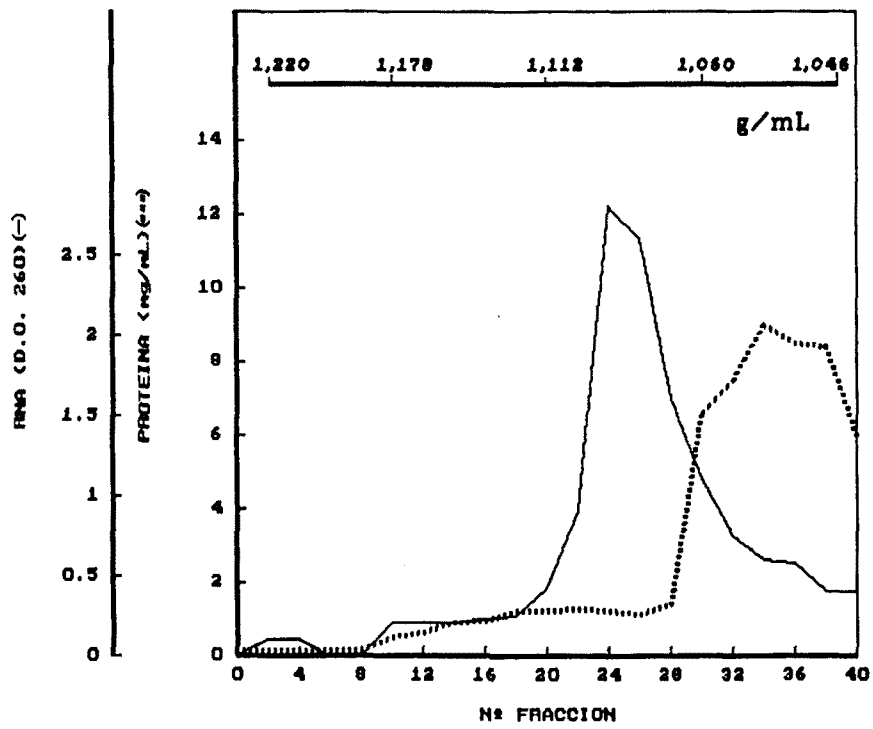
5.B



5.C



5.D



3.3.2.2. Animales en ayunas tratados con glucagon

En la Figura 6 se presentan los resultados de la centrifugación en un gradiente de sacarosa del 15-60 % preparado en Tris/HCl 5 mM pH 7, EDTA 10 mM, del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas en ayunas de 24 horas a las que se administró 0,5 mg de glucagon/animal 30 minutos antes del sacrificio. Los datos se agrupan en cuatro paneles: A, B, C y D. La Figura 7 muestra los mismos datos para gradientes obtenidos en presencia de EDTA 10 mM y KCl 500 mM.

La actividad marcadora de retículo endoplasmático (glucosa-6-fosfatasa) y la marcadora de citosol (LDH), presentan perfiles prácticamente iguales para ratas control que para ratas tratadas con glucagon. Sin embargo, la actividad HMG-CoA reductasa, enzima utilizado como marcador de microsomas, se desplaza a zonas de muy baja densidad, tanto en presencia como en ausencia de KCl. Este dato es de interés ya que demuestra que el glucagon puede modificar la distribución de un enzima localizado inequívocamente en el retículo endoplasmático.

Al igual que sucede en los ensayos graficados en las Figuras 4 y 5, la presencia de KCl desplaza la aparición de los marcadores de microsomas a zonas más próximas al citosol. La distribución de proteína y de RNA (paneles D) se ve modificada por la presencia de KCl y en menor grado por el tratamiento de los animales: se aprecia como en las ratas tratadas con glucagon, la desaparición del precipitado de glucógeno provoca que en las fracciones correspondientes disminuya efectivamente la proteína presente. El tratamiento con glucagon no afecta la distribución de RNA respecto a ratas alimentadas cuando el gradiente se realiza en ausencia de KCl.

La administración de glucagon provoca que las actividades PrP recuperadas en las fracciones microsomales estén por debajo de los controles (ratas alimentadas). Este dato se corresponde con el obtenido en la centrifugación diferencial para ratas tratadas.

La acción de lavado debida a la presencia de KCl contribuye al descenso la actividad PrP en la zona microsomal. La suma de los efectos del glucagon y el KCl es definitiva sobre la actividad PrP sobre sustrato HMG-CoA reductasa. Sobre sustrato glucógeno fosforilasa se aprecian, aún así, actividades en la zona microsomal. Estas diferencias puede deberse únicamente a que el ensayo con sustrato glucógeno fosforilasa permite visualizar mejor la presencia de actividad PrP.

SUBFRACCIONAMIENTO EN GRADIENTE DE SACAROSA CONTINUO (15-60 %)
DEL SOBRENADANTE POSTMITOCONDRIAL OBTENIDO DE RATAS EN AYUNAS
TRATADAS CON GLUCAGON

FIGURA 6

Centrifugación en gradiente de sacarosa continuo (15-60 %) preparado en Tris/HCl 5 mM pH 7, EDTA 10 mM, del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas alimentadas. Las condiciones vienen detalladas los apartados 2.6.2. y 3.3.2.

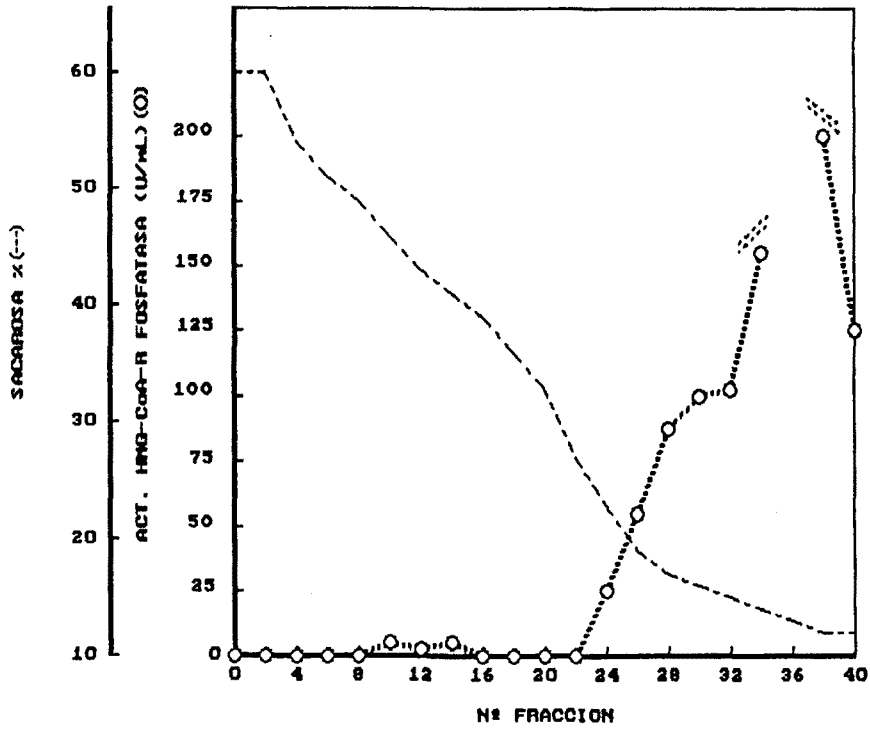
-A- Se representa en línea discontinua el porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones ensayadas (abscisas), calculado a partir del índice de refracción. En círculos abiertos se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.

-B- Se representan las actividades marcadoras de citosol (LDH) en círculos abiertos; de microsomas (G-6-Pasa) en cuadrados vacíos y HMG-CoA reductasa en triángulos vacíos.

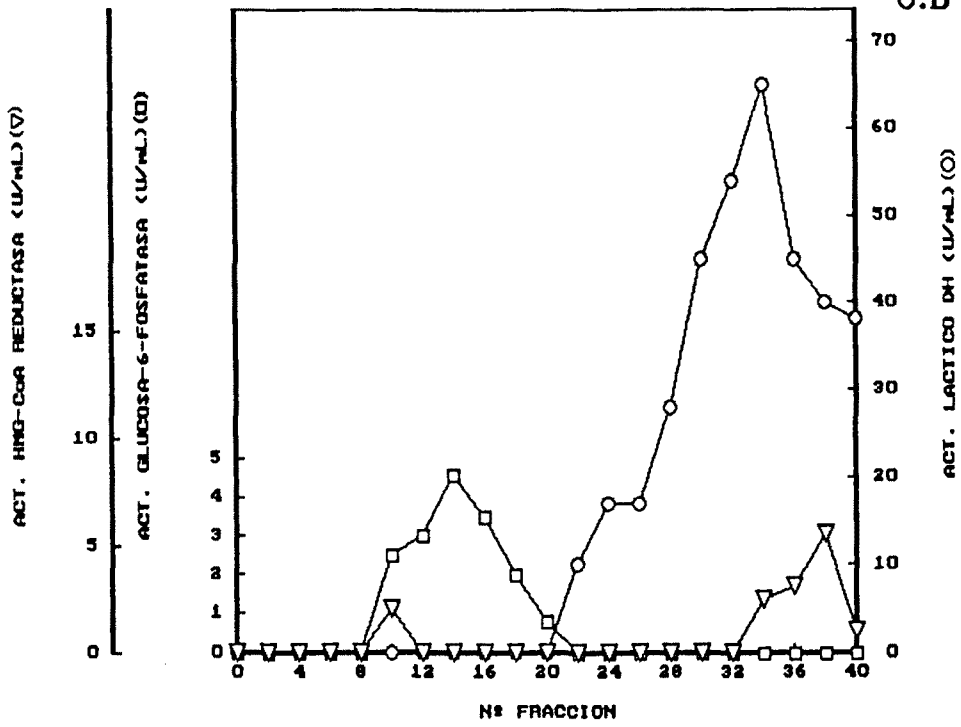
-C- Se representa en línea discontinua el porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones ensayadas (abscisas), calculado a partir del índice de refracción. En círculos llenos se representa la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa.

-D- Se representa en línea de puntos la proteína en mg/mL. En línea continua se representa la distribución de RNA en D.O. a 260 nm.

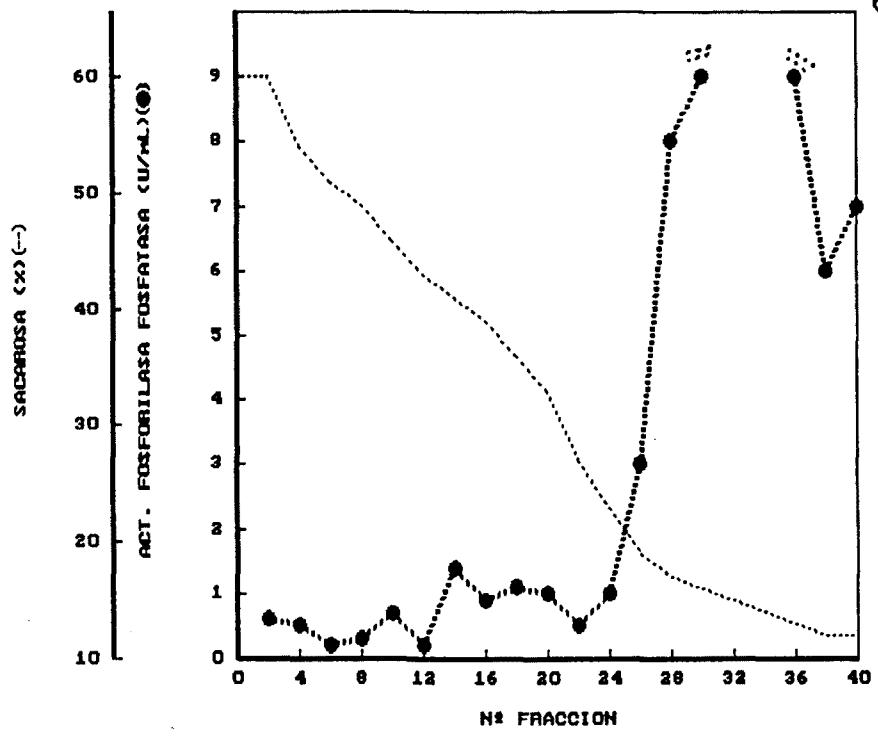
6.A



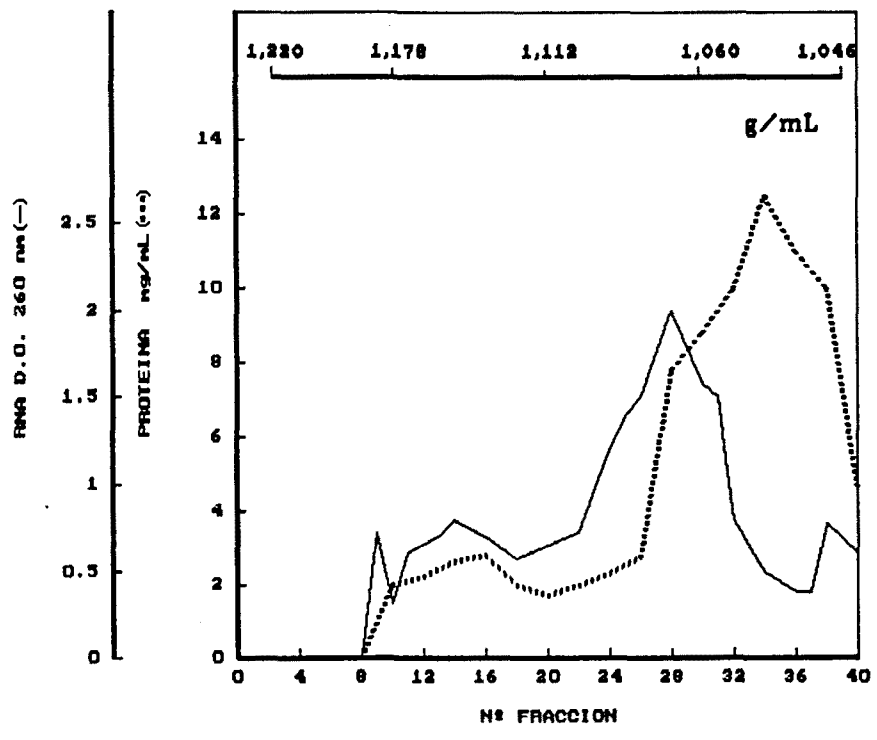
6.B



6.C



6.D



SUBFRACCIONAMIENTO EN GRADIENTE DE SACAROSA CONTINUO (15-60 %) EN PRESENCIA DE 500 mM KCl, DEL SOBRENADANTE POSTMITOCONDRIAL OBTENIDO DE RATAS EN AYUNAS TRATADAS CON GLUCAGON

FIGURA 7

Centrifugación en gradiente de sacarosa continuo (15-60 %) preparado en Tris/HCl 5 mM pH 7, EDTA 10 mM y 500 mM KCl, del sobrenadante postmitocondrial obtenido de ratas en ayunas y tratadas con glucagon. Las condiciones vienen detalladas en los apartados 2.6.2. y 3.3.2.

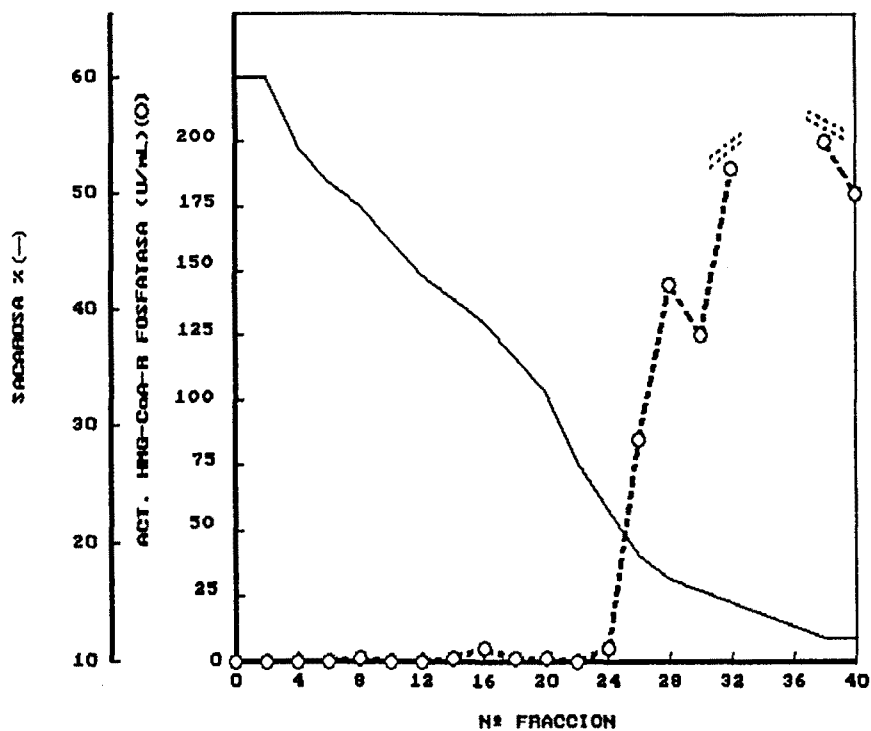
-A- Se representa en línea discontinua el porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones ensayadas (abscisas), calculado a partir del índice de refracción. En círculos abiertos se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.

-B- Se representan las actividades marcadoras de citosol (LDH) en círculos abiertos; de microsomas (G-6-Pasa) cuadrados vacíos y HMG-CoA reductasa en triángulos vacíos.

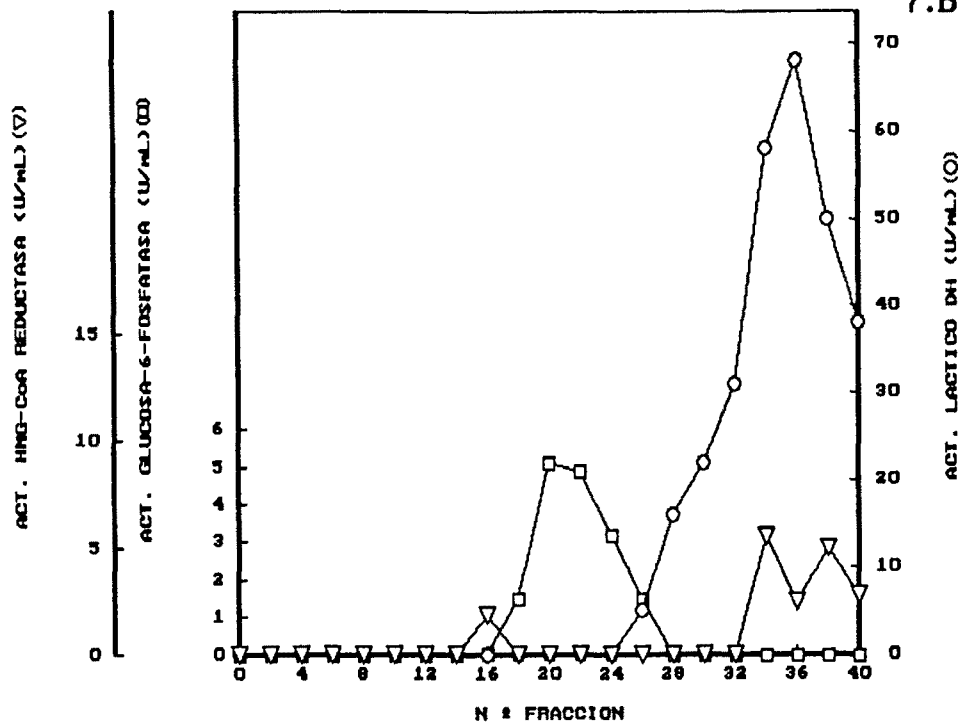
-C- Se representa en línea discontinua el porcentaje de sacarosa en cada una de las fracciones ensayadas (abscisas), calculado a partir del índice de refracción. En círculos llenos se representa la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa.

-D- Se representa en línea de puntos la proteína en mg/mL. En línea continua se representa la distribución de RNA en D.O. a 260 nm.

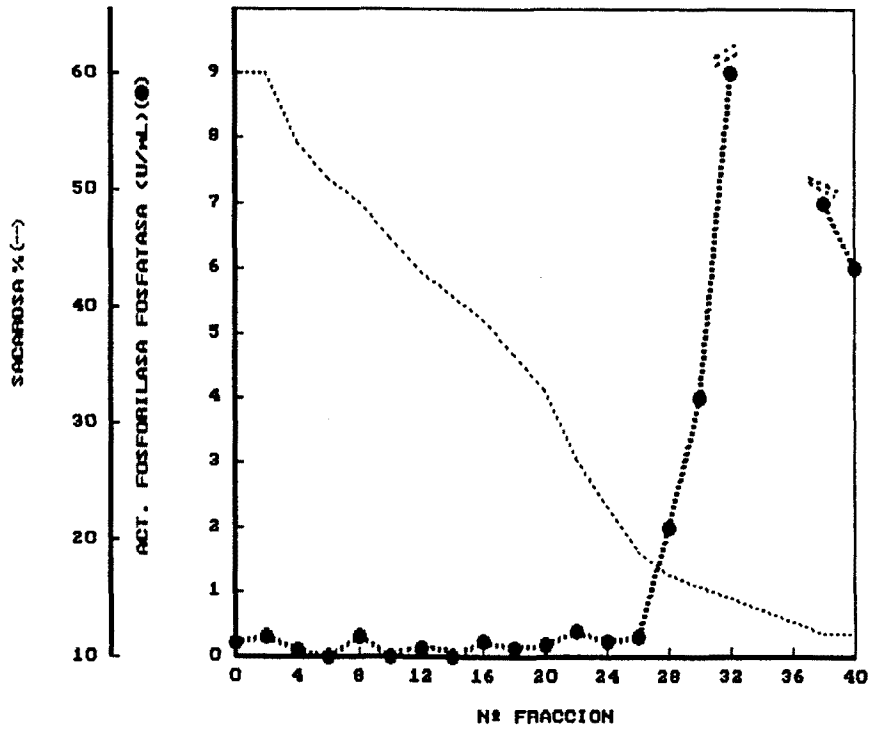
7.A



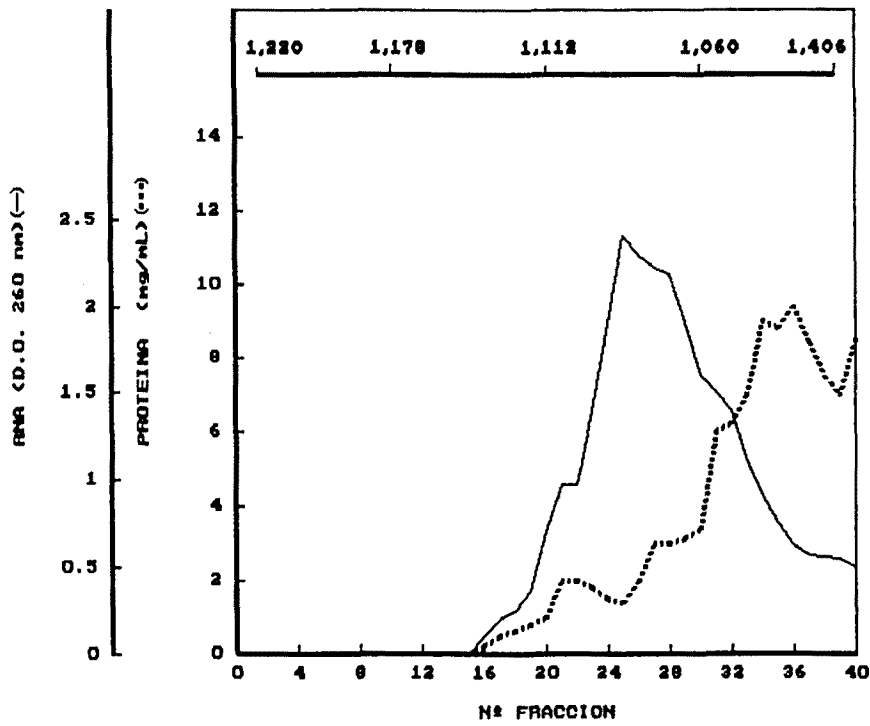
7.B



7.C



7.D



3.4. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

3.4.1. Solubilización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa

3.4.1.1. Animales alimentados

En los microsomas obtenidos a partir de hígado de ratas alimentadas, se solubilizó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa tal como se describe en los apartados 2.7.1. y 2.7.2. En todos los casos las muestras se incubaron dos horas a 4°C en los distintos medios de solubilización.

Los resultados se muestran en la Figura 8 A. En microsomas la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada con lavados sin sal es de 40-50 %, lo que puede considerarse control de las demás solubilizaciones. La solubilización debida al tratamiento amiloglucolítico (50 %) prácticamente no mejora el rendimiento respecto al control. En la solubilización con KCl se han probado concentraciones de 100, 300, 500 y 1000 mM, los porcentajes de solubilización aumentan ligeramente con el aumento salino, siendo prácticamente iguales para 300 y 500 mM y algo superiores para 1000 mM (datos no tabulados). Si se repite tres veces el tratamiento con KCl 500 mM se obtienen unos porcentajes de solubilización medios de $62 + 18 + 7$ %. El tratamiento con Triton X-100 al 0,1 % es algo más eficaz llegando a solubilizar entre 70-80 % en un primer lavado y si se repite la solubilización, el rendimiento total es superior al 90 %.

3.4.1.2. Animales en ayunas tratados con glucagon

Si las ratas se mantienen en ayuno prolongado y se les administra glucagon, disminuye significativamente la actividad HMG-CoA reductasa unida a microsomas, pero queda una actividad unida a esta fracción

Microsomas obtenidos tras ayuno y tratamiento con glucagon fueron solubilizados como en el caso de las ratas alimentadas. Una alicuota se sometió a tratamiento amiloglucolítico "in vitro" con α -amilasa y otra alicuota con Triton X-100 0,1 %.

Los resultados se presentan en la Figura 8 B. Se observa de nuevo que el detergente es el tratamiento más eficaz. La poca cantidad de glucógeno que queda unido a microsomas de ratas en ayuno y tratados con glucagon es totalmente hidrolizado en las condiciones de ensayo con α -amilasa y sin embargo los microsomas mantienen actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.

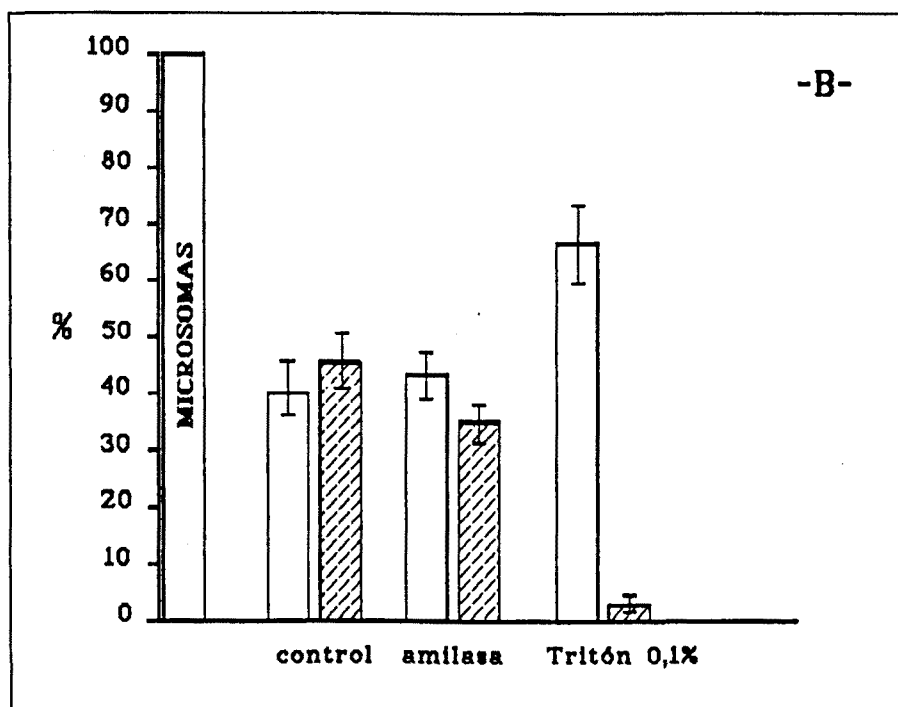
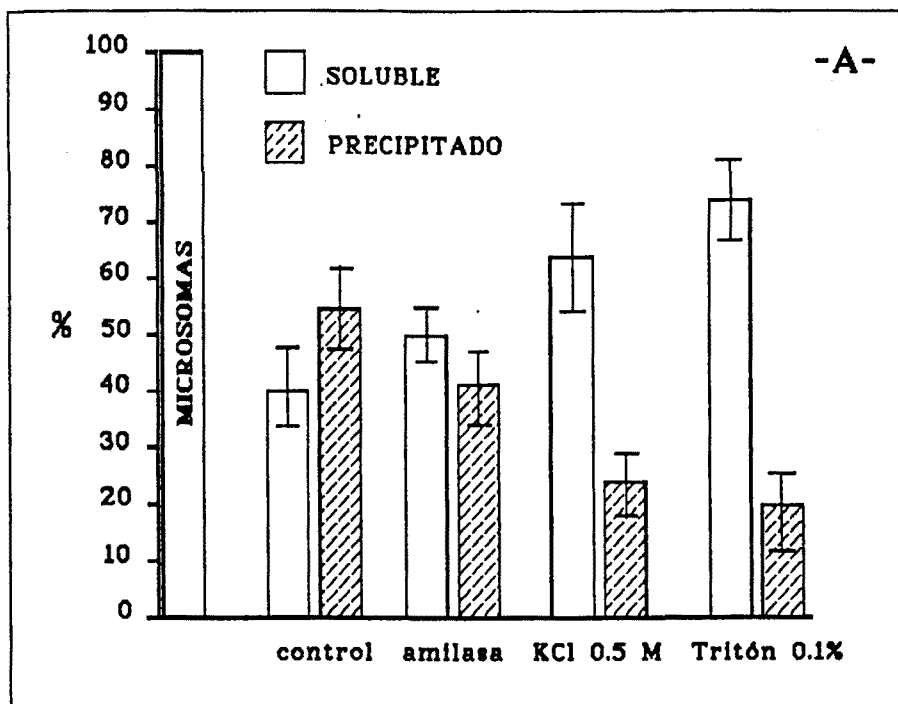
SOLUBILIZACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA A
PARTIR DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

FIGURA 8

Se representa en barras vacías la actividad HMG-CoA reductasa solubilizada en tanto por ciento respecto a un 100 % de actividad en la fracción de partida, microsomas. En barras rayadas se muestra la actividad residual en el precipitado obtenido después de centrifugar a 100.000 xg.

En la parte superior -A- se presentan la solubilización de los microsomas obtenidos a partir de ratas alimentadas.

En la parte inferior -B- se muestra la solubilización de los microsomas obtenidos a partir de ratas en ayunas tratadas con glucagon.



3.4.2. Comprobación de que la actividad solubilizada no es PrP 1_o

Con el fin de saber si la actividad solubilizada de microsomas es recaptada por el glucógeno, tal como se ha descrito para la actividad purificada a partir del precipitado de glucógeno, 4 mL de sobrenadante obtenido de microsomas de ratas alimentadas y otros tantos de ratas en ayunas tratadas con glucagon, se incubaron durante 30 minutos con cantidades crecientes de glucógeno, en las mismas condiciones descritas por Mvumbi y col. (246). A continuación, las muestras fueron centrifugadas, obteniéndose un precipitado y un sobrenadante donde se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Puede observarse que en el muestra control, aproximadamente el 90 % de la actividad inicial permanece en el sobrenadante, oscilando entre 90 y 97 el porcentaje de actividad recuperada en el sobrenadante a pesar del aumento de concentración de glucógeno, tanto en ratas alimentadas como en ratas en ayunas tratadas con glucagon. Mvumbi y col. (246), describen que 0,25 mg/mL de glucógeno es capaz de recaptar el 50 % de la actividad PrP 1_o.

Concluimos que los solubles obtenidos con Triton a partir de microsomas de ratas alimentadas no están contaminados por proteínas fosfatasas relacionadas con glucógeno.

AFINIDAD POR EL GLUCOGENO DE LA ACTIVIDAD SOLUBILIZADA
DE MICROSOMAS

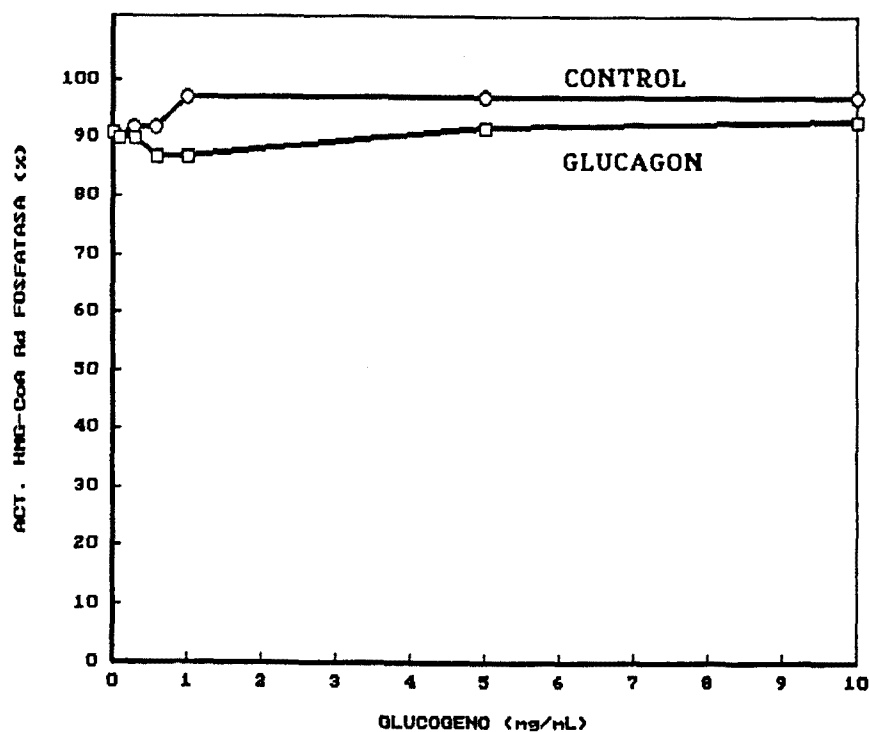


Figura 9

Alícuotas de 4 mL de soluble obtenido de ratas alimentadas (\circ) o de ratas en ayunas y tratadas con glucagon (\square), se añadieron cantidades crecientes de glucógeno para concentraciones finales de 0,1, 0,3, 0,6, 1,5 y 10 mg/mL. Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos, centrifugándose luego a 100.000xg durante 90 minutos. En el sobrenadante se determinó la actividad HMG-CoA reductasa. En la figura se muestran los porcentajes de recuperación de la actividad HMG-CoA reductasa en el sobrenadante respecto a la actividad antes de centrifugar.

3.4.3. Clasificación de las actividades solubilizadas tras su cromatografía en DEAE-celulosa

La actividad PrP presente en microsomas puede clasificarse directamente utilizando alícuotas de microsomas, si bien la presencia de varias PrP en muestras poco purificadas dificulta la detección y cuantificación de las distintas PrP. La clasificación de las actividades PrP puede realizarse igualmente en los solubilizados microsomales obtenidos con Triton X-100, medio muy eficaz que arrastra prácticamente toda la actividad PrP presente en microsomas.

Creemos del mayor interés, a fin de seleccionar la actividad a purificar, separar las actividades solubilizadas en una cromatografía en DEAE-celulosa, ya que en estudios previos a este trabajo, esta resina se había mostrado eficaz para separar distintas PrP, con elevado rendimiento.

El soluble de Triton X-100, obtenido de los microsomas fraccionados del hígado de 5 ratas, se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa, se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y la absorbancia a 280 nm. Los resultados se muestran en la Figura 10 A. Se observa que parte de la actividad es excluida y parte eluye con el lavado; la actividad retenida se eluye con KCl, mostrando tres máximos de actividad PrP.

En alícuotas de las mismas fracciones se realizó la determinación de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa añadiendo protamina hasta una concentración final en el ensayo de 30 µg/mL. Se considera que esta concentración de protamina reactiva las PrP 2A sin afectar la actividad PrP 1, habiéndose propuesto como criterio suficiente para distinguir la PrP 2a de otras PrP. Los resultados se muestran en la Figura 10.B. La actividad que eluye con el lavado se incrementa aproximadamente 5 veces; consideramos que se trata de una actividad PrP 2A. De las actividades eluidas con gradiente salino, el primer máximo de actividad muestra reactivación; consideramos por ello que se debe a una PrP 2A.

En otras alicuotas se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en presencia de $MgCl_2$, 5 mM. La PrP 2C es dependiente de Mg^{2+} , por ello, en las condiciones de ensayo de la Figura 10 A, esta actividad no puede mostrarse ya que no está presente este catión. Los resultados se presentan en la Figura 10 B. Aparece una actividad entre los máximos de los picos 1 y del gradiente salino.

El Mg^{2+} no sólo permite expresar la actividad PrP 2C sino que también afecta de forma desigual otras actividades como la PrP 1, 2A y 2B. Para confirmar la presencia de PrP 2C se realizó un ensayo específico para esta actividad, tal como se detalla en el apartado 2.4.11. Los resultados se muestran en la Figura 10.C. Se confirma que la actividad reactivada en presencia de $MgCl_2$ es actividad PrP 2C.

La actividad PrP 1 es inhibida en presencia de concentraciones nanomolares de inhibidor 2, concentraciones que no modifican la actividad PrP tipo 2. Para determinar selectivamente la actividad PrP 1, alicuotas de 20 μL de las fracciones eluidas de la columna se incubaron durante 15 minutos a 30°C con 10 μL (5 ng) de inhibidor 2 de músculo de conejo. Transcurridos los 15 minutos se prosiguió el ensayo de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. Los resultados obtenidos tras la incubación con inhibidor 2 no modifican el perfil cromatográfico presentado en la Figura 10 A.

Dada la baja probabilidad de encontrar PrP 2B en microsomas, enzima fundamentalmente citosólico, antes de proceder a la determinación de la actividad PrP 2B en las fracciones de la columna de DEAE-celulosa, se ensayaron previamente microsomas resuspendidos y solubles obtenidos con Triton X-100. La actividad PrP 2B se ensayó sobre sustrato pNPP y sustrato HMG-CoA reductasa, tal como se describe en el apartado 2.4.10. En ensayos previos se comprobó que el pNPP y la HMG-CoA reductasa inactiva y homogénea eran sustratos de la PrP 2B ya que con ambos sustratos la actividad aumentó si en el ensayo estaban presentes calmodulina o 1 mM Mn^{2+} . Cuando se ensayó actividad PrP 2B en microsomas y en solubles de Triton X-100, tanto con sustrato HMG-CoA

reductasa como sobre sustrato pNPP, no se detectó su presencia en ningún caso.

Las actividades PrP 2A y 2C se distribuyen tal como se indica en la Figura 10 B y 10 C. La actividad excluida del DEAE-celulosa no es reactivada por protamina y es ligeramente inhibida por la presencia de Mg^{2+} . Cuando esta actividad se purifica y se ensaya frente a inhibidor 2 de músculo de conejo confirma su carácter de PrP 1 (véase apartado 3.6.2.). En el lavado se eluye una pequeña actividad PrP que cuando se ensaya en presencia de protamina se reactiva varias veces; consideramos que esta actividad es del tipo 2A. La actividad retenida y que eluye aproximadamente entre 100 y 250 mM KCl está compuesta esencialmente por dos PrP; la primera en eluir es activada por protamina y muestra un máximo a 125 mM KCl; la segunda en eluir, aproximadamente a 175 mM KCl es reactivada por Mg^{2+} , sin embargo no es sensible a protamina. Cuando en las fracciones se ensaya específicamente la actividad PrP 2C, aparece una actividad con un máximo que coincide con la actividad reactivada por Mg^{2+} . A una concentración de sal aproximadamente 300 mM aparece una actividad que eluye con la mayor parte de la proteína y que no es activada por protamina ni por Mg^{2+} que consideramos PrP 1.

**CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA DE LAS ACTIVIDADES SOLUBILIZADAS
DE MICROSOMAS CON TRITON X-100**

Figura 10.A

Los solubles obtenidos con Triton X-100 0,1 % a partir de microsomas del hígado de 5 ratas se cromatografiaron en una columna de DEAE-Celulosa (2,5 x 6 cm), equilibrada con solución amortiguadora: sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tris/HCl pH 7,2, PMSF 0.1 mM, benzamidina 1 mM, mercaptoetanol 15 mM. En la posición que indica la flecha se inició un gradiente de KCl 0-600 mM (200 + 200 mL). Cada 8 minutos se recogieron fracciones de 8 mL. En las fracciones que se señalan se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, ensayada sin efectores, círculos vacíos. En trazo de guiones se representa la absorbancia leída a 280 nm.

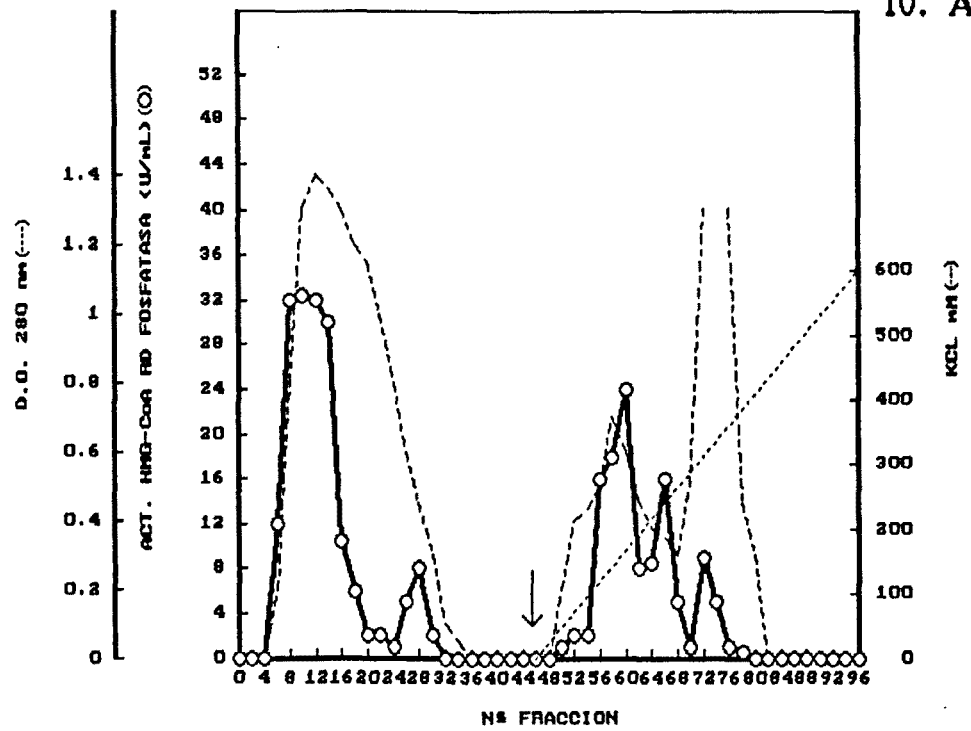
Figura 10.B

En otras alícuotas se ensayó la actividad HMG-CoA reductasa en presencia de 30 µg/mL de protamina, (cuadrados vacíos) o en presencia de MgCl₂, 5 mM (círculos llenos).

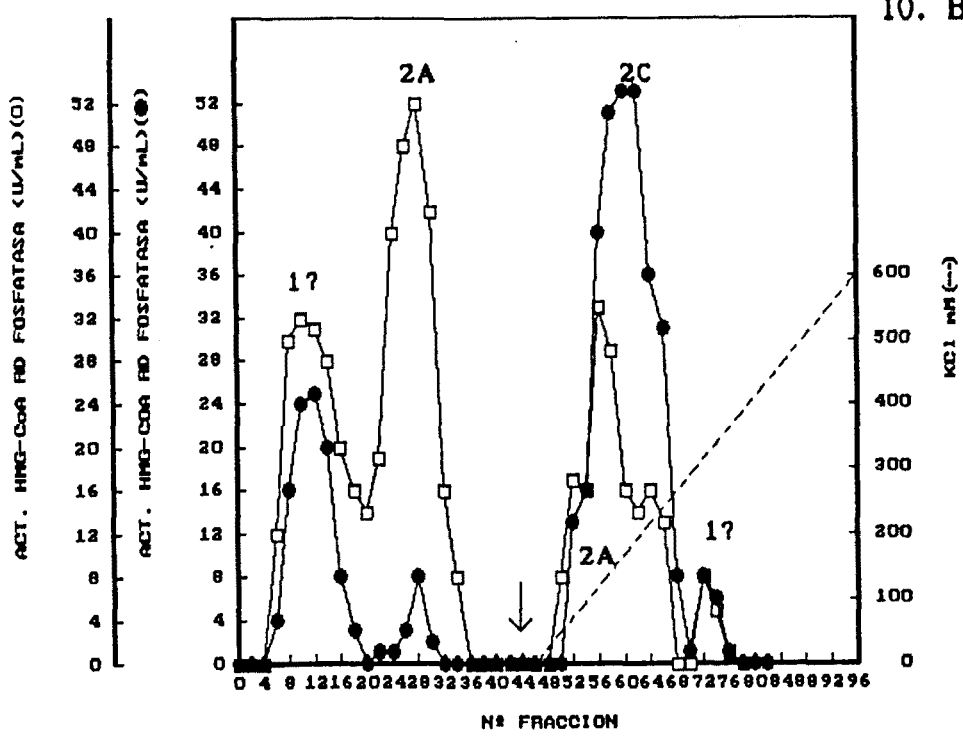
Figura 10.C

En otras alícuotas se ensayó la actividad PrP 2C sobre sustrato HMG-CoA reductasa, tal como se indica en el apartado 2.4.11. Se representa la actividad PrP 2C en trazo grueso y cuadrados llenos. En la misma figura se representa la absorbancia leída a 280 nm en línea continua.

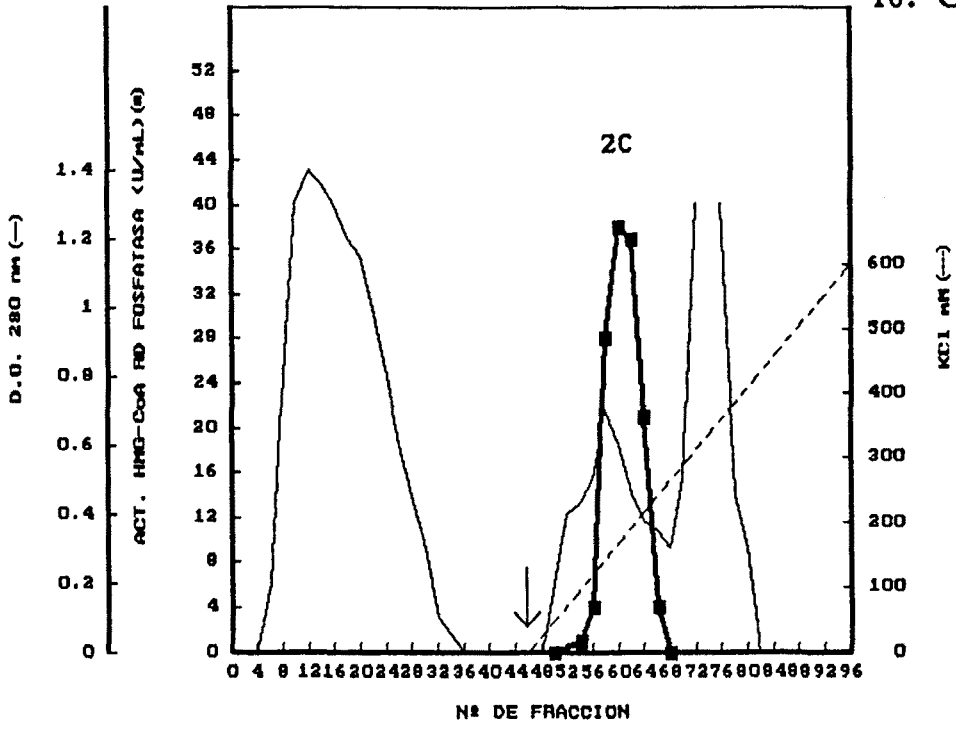
10. A



10. B



10. C



3.5. PURIFICACION DE UNA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA NATIVA (M) A PARTIR DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

De las actividades separadas en el DEAE-celulosa se decide purificar la actividad excluida por ser la principal actividad PrP tipo 1, actividad considerada mayoritaria en microsomas de hígado de rata. Esta actividad además se excluye sin contaminación de otras PrP.

3.5.1. "Batch" en DEAE-celulosa de la actividad solubilizada con Triton X-100

Se obtuvieron microsomas, tal como se indica en el apartado 2.6.1., a partir del hígado de 20 ratas alimentadas. Se reunieron los solubles obtenidos del primer y segundo tratamiento de los microsomas con Triton X-100. Con los solubles se realizó un "batch" en 50 mL de DEAE-celulosa (DE-52), equilibrado con solución amortiguadora A, utilizada a lo largo de toda la purificación. Transcurridos 60 minutos se separaron resina y sobrenadante con la ayuda de una placa filtrante de vidrio poroso. El sobrenadante o excluido del "batch" será utilizado para la purificación del enzima que denominaremos en adelante HMG-CoA reductasa fosfatasa M.

3.5.2. Cromatografía en Fosfocelulosa P-11

El excluido de DEAE-celulosa se cromatografió en una columna de fosfocelulosa P-11 equilibrada con la solución amortiguadora A: sacarosa 250 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, Tris/HCl 40 mM pH 7,2, PMSF 0.1 mM, benzamidina 1 mM y mercaptoetanol 15 mM. Esta solución amortiguadora se mantiene a lo largo de toda la purificación. La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa eluye en un solo pico de actividad a 275 mM KCl, separándose bien de la proteína, que se excluye mayoritariamente entre 150 y 200 mM KCl. No se observa actividad en el excluido ni en el lavado (véase Figura 11).

CROMATOGRAFIA EN FOSFOCELULOSA DE LA ACTIVIDAD
HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M

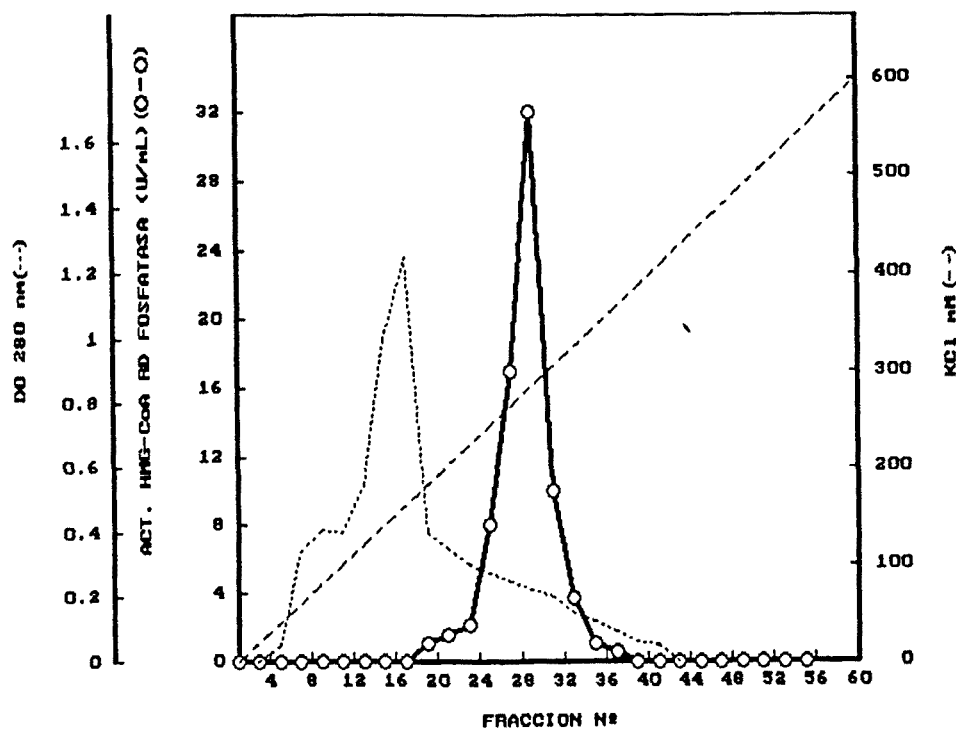


Figura 11

La muestra excluida del "batch" de DEAE-celulosa se cromatografió en una columna de fosfocelulosa P-11 (12 x 2,5 cm), equilibrada previamente con solución amortiguadora A. Una vez entrada la muestra se lavó con la misma solución hasta que la absorbancia leída a 280 nm retornó a línea de base. Se instauró un gradiente entre 0-600 mM KCl de (225 + 225 mL), recolectándose fracciones de 8,5 mL. En círculos se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y en línea de puntos la absorbancia a 280 nm.

3.5.3. Cromatografía en Aminohexil-Sepharosa 4B

Las fracciones activas eluidas de la fosfocelulosa P-11 se reunieron y diluyeron 3 veces con solución A, sometiéndose a una nueva cromatografía en Aminohexil-Sepharosa 4B (véase Figura 12).

La actividad eluye en un solo pico aproximadamente a 200 mM KCl. Las fracciones activas se reunieron y concentraron por presión de nitrógeno en una célula Amicon de 10 mL de capacidad con una membrana P-10. En la misma célula se desaló la muestra por lavados sucesivos con la solución amortiguadora A.

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

La muestra desalada se cromatografió en una columna de poli-L-lisina-Sepharosa 4B equilibrada en la misma solución amortiguadora A. Una parte de actividad HMG-CoA reductasa se excluye, pero la mayor parte es eluida a 125 mM KCl (véase Figura 13). Las fracciones activas se concentraron con un Amicon de 10 mL de capacidad hasta un volumen final de 1,5-2 mL y se cromatografiaron en gel filtración.

CROMATOGRAFIA EN AMINOHEXIL-SEPHAROSA 4B DE LA ACTIVIDAD
HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M

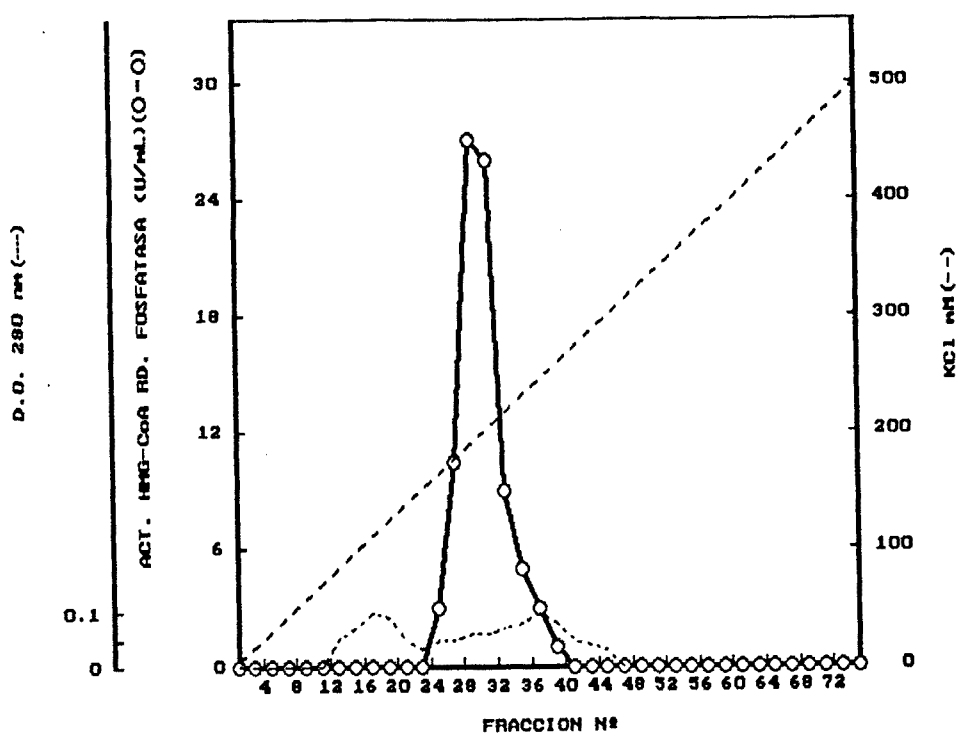


Figura 12

Las fracciones activas procedentes de la cromatografía en fosfo-celulosa se diluyen tres veces con la solución amortiguadora A y se cromatografían en una columna de AminoheXil-Sepharosa 4B (2 x 4 cm) a una velocidad de 40 mL/h. Una vez entrada la muestra y lavada la columna con la misma solución de equilibrado, se instaura un gradiente entre 0-500 mM KCl (200 + 200 mL). Se recogen fracciones de 5,5 mL. En círculos se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, en línea de puntos la absorbancia leída a 280 nm.

**CROMATOGRAFIA EN POLI-L-LISINA-SEPHAROSA 4B DE LA ACTIVIDAD
HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M**

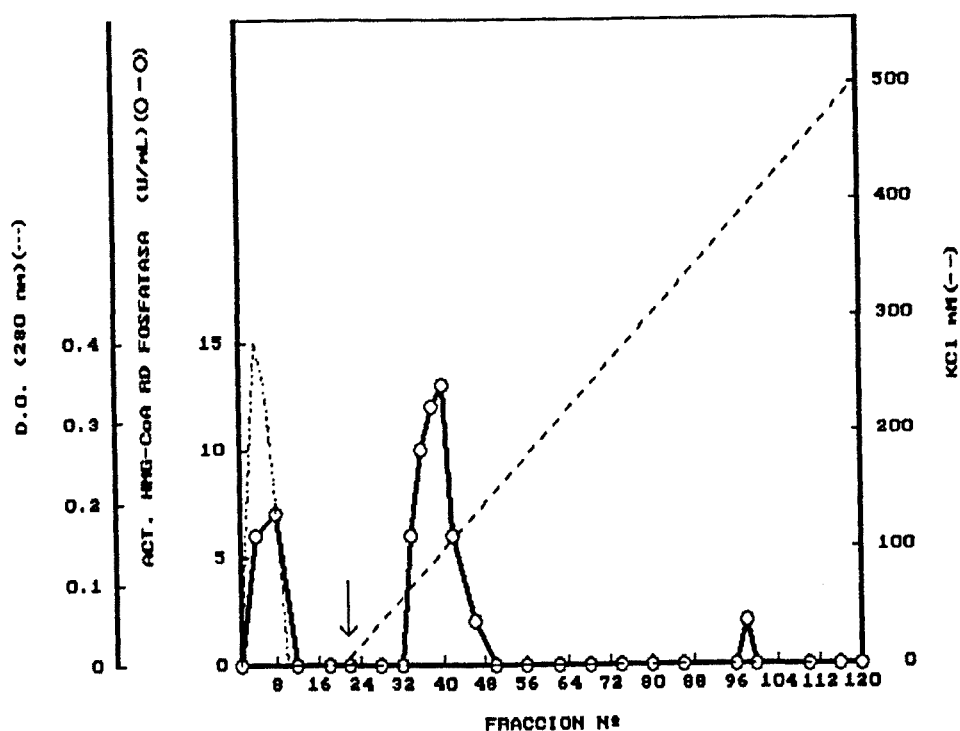


Figura 13

La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa purificada en Amino-hexil-Sepharosa 4B se cromatografió en una columna de poli-L-lisina-Sepharosa 4B (6 x 2 cm) equilibrada con la solución A. Se recogieron fracciones de 2 mL. Una vez entrada la muestra, la columna fué lavada hasta que la absorbancia a 280 nm retornó a la línea de base. Tras el lavado se instauró un gradiente entre 0-500 mM KCl (100 + 100 mL). En círculos se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y en línea de puntos la absorbancia a 280 nm.

3.5.5. Cromatografía en Ultrogel AC4

La columna se equilibró con solución A y 100 mM NaCl. 2 mL de la muestra concentrada de poli-L-lisina-Sepharosa 4B se cromatografiaron en una columna de Ultrogel AC4 (véase Figura 14.A). El volumen de exclusión de los marcadores utilizados permiten calcular el peso molecular en gel filtración de la muestra purificada: 85 kDa. La proteína no puede ser seguida por cambios en la lectura de absorbancia a 280 nm. Cada una de las fracciones con actividad se dializó frente a agua y concentró en una centrífuga conectada a vacío, reduciéndose el volumen a 50-100 μ L.

En la Tabla IX presentamos el cuadro de purificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M.

Interesa destacar que en algunas purificaciones, y sin que se conozcan las causas, la actividad purificada en Ultrogel AC4 presenta pesos moleculares entre 50 y 60 kDa. Esta pérdida de peso puede ser atribuida a procesos proteolíticos incontrolados o bien a la separación por disociación o proteólisis de subunidades no activas de la subunidad con actividad catalítica.

3.5.6. Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones denaturantes de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M

Alícuotas de cada fracción, una vez concentradas, se sometieron a una electroforesis en geles de acrilamida, bis-acrilamida al 7,5 %, tal como se detalla en el apartado 2.5.1. (véase figura 14 B). Como puede observarse las fracciones con mayor actividad, 52, 53 y 54 presentan un doble banda que corresponden a pesos moleculares de 54 y 48 kDa, no apareciendo otras bandas en tinción con Coomassie. En otras purificaciones, en lugar de aparecer un doblete, aparece una única banda de peso molecular 55 kDa. Estos resultados se corresponden con los de gel filtración, en los que en ocasiones la actividad aparece a pesos moleculares entre 50 y 60 kDa.

**CROMATOGRAFIA EN ULTROGEL AC4 DE LA ACTIVIDAD
HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M**

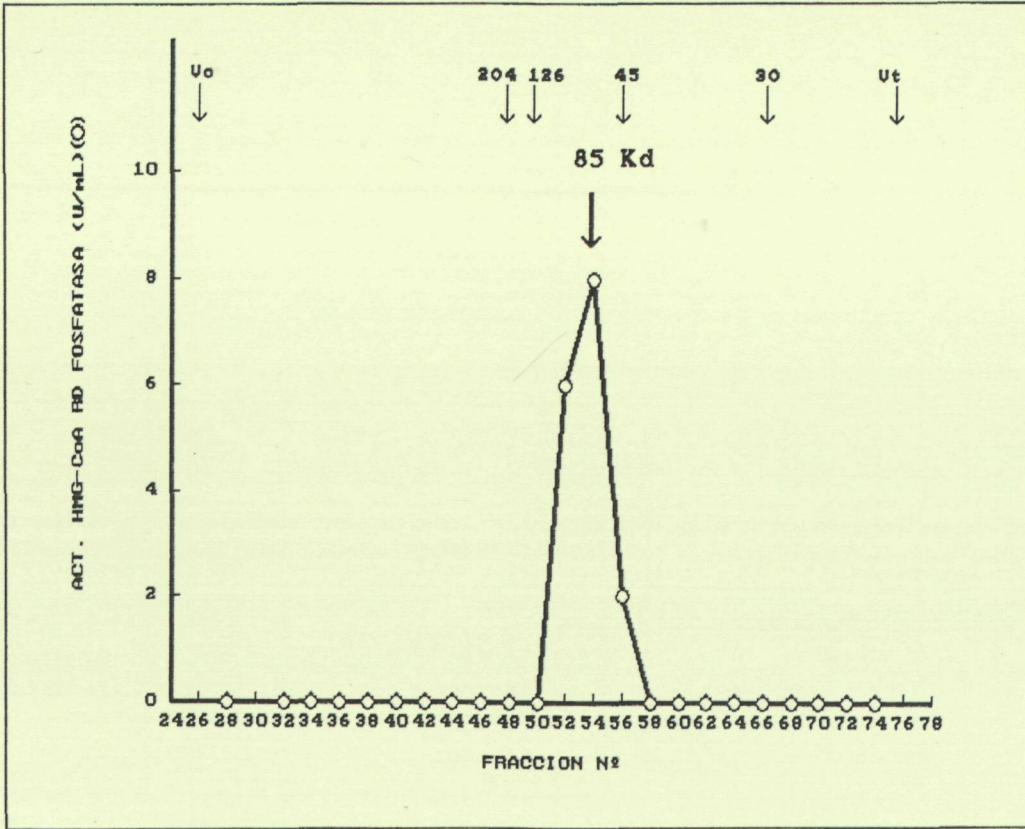
Figura 14.A

Cromatografía en Ultrogel AC4 (80 x 1,5 cm) de la muestra con actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa eluida de la columna de poli-L-lisina-Sepharosa 4B. La columna se equilibró con solución A y NaCl 100 mM a una velocidad de 10 mL/h, recojiéndose alícuotas de 2 mL. En línea gruesa y círculos se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. Las flechas indican las fracciones a que eluyen los marcadores utilizados, catalasa, anhidrasa carbónica, ovoalbúmina, mioglobina y con pesos moleculares en kDa.

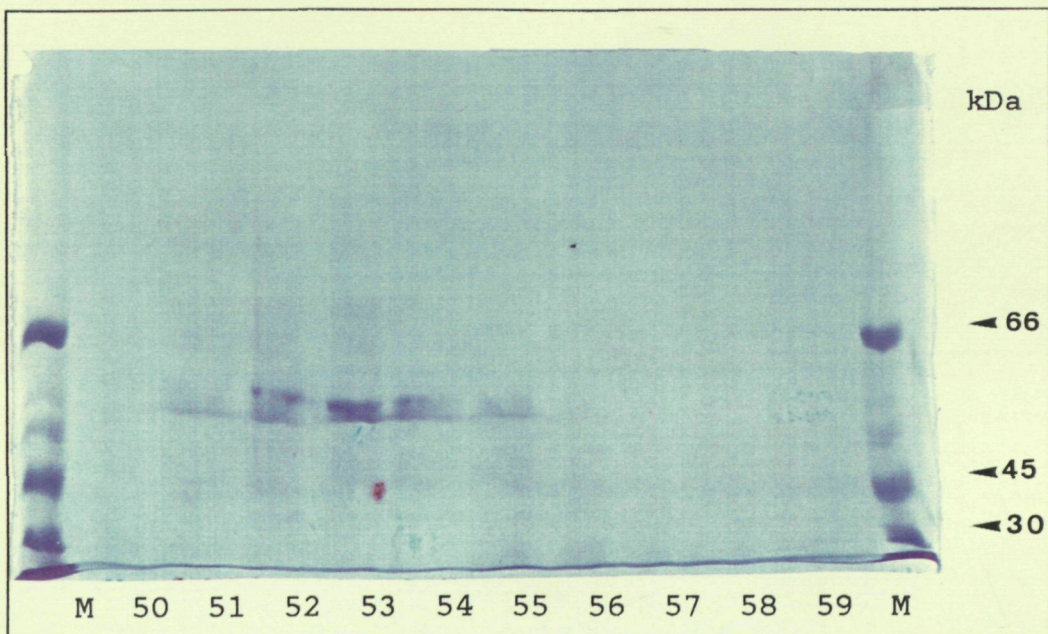
Figura 14.B

Cada una de las fracciones con actividad se concentró en "speed-vacuum" y se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 7,5 % en presencia de SDS. En la parte inferior del gel se indican las fracciones de la cromatografía concentradas. A la izquierda se indican los pesos moleculares de los marcadores utilizados.

-A-



-B-



**CUADRO DE PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD
HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M**

	Proteína ng	Actividad Total Unidades	Actividad Especifica Unidades/ng	Rendimiento %
MICROSOMAS	2.640	15.680	5,9	100
SOLUBLE	353	12.544	35,5	80
EXCLUIDO DEAE- CELULOSA	84	7.025	83,6	45
				100
FOSFOCELULOSA	16	1.475	92,2	20
AMINOHEXIL	2,7	540	200	7,6
POLI-L-LISINA	0,7	125	178,5	1,7
ULTROGEL AC4	0,03	50	1.666	0,7

TABLA IX

Se partió de 140 gramos de hígado de rata. En cada paso de purificación se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y la proteína.

3.5.7. Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones no denaturantes

La determinación de actividad en geles de acrilamida requiere que las muestras utilizadas tengan una actividad elevada ya que se producen importantes pérdidas de actividad en el proceso electroforético y también por la baja recuperación de proteína, por ello se utilizaron alícuotas concentradas de la columna de Aminohehil-Sepharosa 4B. Cuando se utilizaron muestras más purificadas no se detectó actividad en este tipo de geles.

Para la determinación de actividad se procedió como se describe en el apartado 2.5.2, utilizando una alícuota de 25 μ L del eluido de la cromatografía de Aminohehil-Sepharosa 4B concentrada hasta 2 mL, y una muestra de 25 μ L de la subunidad catalítica PrP 1 obtenida de músculo de conejo. Los resultados se muestran en la Figura 15. En la determinación de actividad PrP se utiliza sustrato glucógeno fosforilasa ya que el ensayo con sustrato HMG-CoA reductasa no permite visualizar la actividad en las mismas condiciones. La actividad de la PrP purificada a partir de microsomas presenta un único pico de actividad a un Rf de 0,28 y 0,31 en la electroforesis de dos alícuotas distintas. La actividad PrP 1_c presenta un máximo a un Rf de 0,58. Cuando en carril paralelo al utilizado para la determinación de actividad, se extrae la proteína de los fragmentos obtenidos al cortar el gel en las mismas fracciones y los extractos se vuelven a cromatografiar en un gel del 7,5 % en condiciones denaturantes, la tinción con Coomassie o la tinción con nitrato de plata no permiten visualizar ninguna banda de proteína.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD PROTEIN FOSFATASA EN GELES DE
ACRILAMIDA EN CONDICIONES NO DENATURANTES

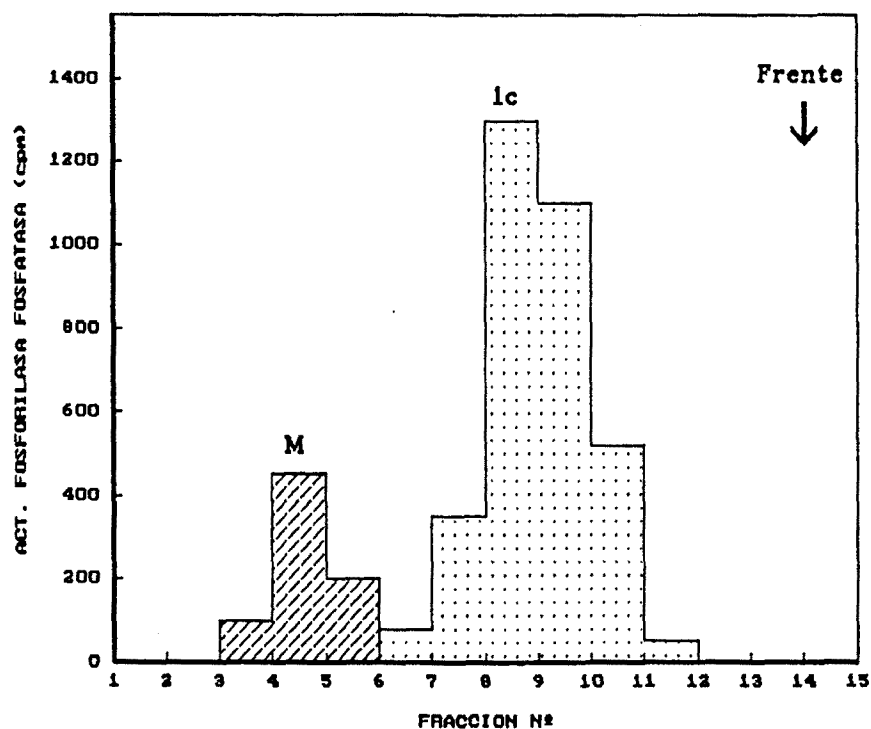


Figura 15

Se determinó la actividad PrP sobre sustrato glucógeno fosforilasa, en las fracciones de gel obtenidas al cortar los carriles en fragmentos de 5 mm. La superficie rayada corresponde a la actividad determinada en el carril de la electroforesis en el que se sembraron 25 μ L de la muestra concentrada que eluye de la cromatografía de Aminohexil-Sepharosa 4B. La superficie de puntos corresponde a la actividad determinada en el carril de la electroforesis en el que se sembraron 25 μ L de la subunidad catalítica de la PrP 1_c de conejo.

3.5.8. Cromatoenfoco de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M

Se han utilizado distintos soportes y eluyentes, obteniéndose los mejores resultados para cromatoenfocos realizados en la resina PBE-94 eluida entre pHs 7 y 4 con el polibuffer 74, siguiendo las especificaciones de la casa suministradora Pharmacia Fine Chemicals. Se utilizó una columna de 28,5 x 1 cm que se eluyó a 20 mL/h, recogiendo fracciones de 2 mL. La solución de elución se preparó con polibuffer 74, que se lleva hasta el volumen de dilución final con la solución: sacarosa 200 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, mercaptoetanol 15 mM, PMSE 0,5 mM. La solución final se ajusta a pH 4 con HCl.

Se partió de 140 gramos de hígado, siguiéndose la purificación ya descrita hasta la cromatografía en Aminohehil-Sepharosa 4B. El eluido con actividad se concentró hasta 2 mL (424 unidades HMG-CoA reductasa fosfatasa), equilibrándose en la misma célula de concentración con la solución amortiguadora utilizada para equilibrar el cromatoenfoco: sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, mercaptoetanol 15 mM, PMSE 0,5 mM, imidazol 25 mM, ajustando el pH a 7,4 con ácido acético.

A pHs inferiores a 6 hay una gran pérdida de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa; por ello, antes de cromatografiar la muestra problema se realiza un cromatoenfoco para conocer los pHs de las distintas fracciones, aquellas con un pH inferior a 6,5 se tamponaron con 400 μ L de glicina 2 M pH 8,5.

Los resultados se muestran en la Figura 16. La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa eluye en un solo pico con un máximo a pH 5,8. Si no se ensaya inmediatamente es preciso añadir albúmina bovina para lograr una concentración final de 0,4 mg/mL, ya que la eliminación de proteínas acompañantes provoca pérdida de actividad. Esta cromatografía no se incluye en el proceso general de purificación, pues tan sólo añadiendo albúmina a las muestras, éstas mantienen la actividad.

CROMATOENFOQUE DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M

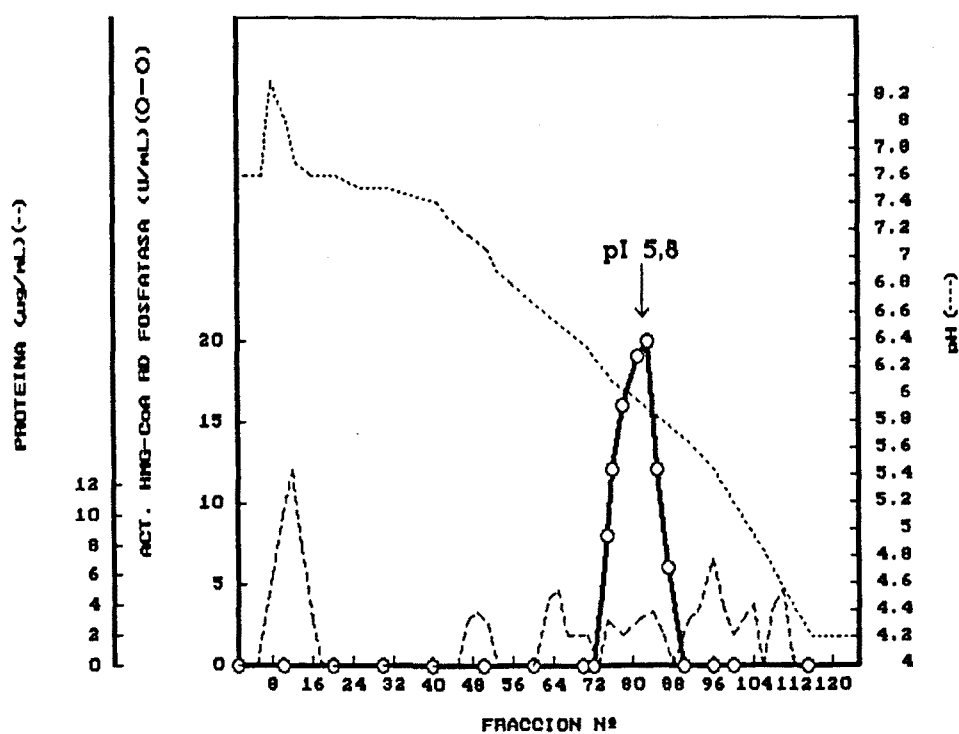


Figura 16

Cromatografía de enfriamiento de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M purificada hasta la cromatografía de Aminohexil-Sepharosa 4B. La actividad HMG-CoA reductasa se representa en línea de trazo grueso y círculos vacíos. La proteína se expresa en µg/mL, línea de guiones. En línea de puntos se indica el pH en cada fracción.

3.6. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M

3.6.1. Ensayos con sustrato Ser (^{32}P) HMG-CoA reductasa

A lo largo de la purificación del enzima HMG-CoA reductasa fosfatasa M se ha utilizado como sustrato HMG-CoA reductasa homogénea e inactiva y los ensayos de actividad proteín fosfatasa se han seguido por el aumento de actividad HMG-CoA reductasa. Se hace preciso demostrar que el aumento de actividad está directamente provocado por la hidrólisis de los fosfatos; para ello utilizamos sustrato HMG-CoA reductasa marcada con ^{32}P que se obtuvo como se describe en el apartado 2.3.3.

A fin de demostrar la defosforilación con pérdida de ^{32}P , alícuotas de 180 μL de HMG-CoA reductasa (6,24 μg , 1,20 $\mu\text{C}/\text{mg}$) se incubaron en un volumen final de 700 μL , con una muestra con actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M, procedente de la cromatografía de Aminohexil-Sepharosa 4B. A intervalos de tiempo de 0, 1, 3, 5, 10, 20 y 30 minutos se extrajeron alícuotas de 5 μL en las que se determinó la actividad HMG-CoA reductasa, tras diluirlas convenientemente en la solución: Tris/HCl 40 mM, pH 7, 1 mM DTT, 5 mM PP, 50 mM KF y albúmina bovina 0,5 mg/mL, tal como se indica en el apartado 2.4.2. En otras alícuotas de 35 μL procedentes de la misma mezcla de reacción, y a los mismos tiempos se determinó el ^{32}P unido a proteína (161). Alícuotas de 45 μL de la misma mezcla de reacción extraídas a los mismos tiempos se sometieron a una electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 7,5 %. Una vez teñido y seco el gel, este se contactó con una película Valca para autorradiografía, a -70°C durante 24 horas, con la ayuda de una placa intensificadora Micron R-O Dupont H-Plus.

La liberación de ^{32}P se produce simultáneamente a la reactivación del enzima HMG-CoA reductasa; puede observarse una sola banda que corresponde a la HMG-CoA reductasa homogénea y como dicha banda pierde intensidad a medida que aumenta el tiempo de incubación y disminuye el fosforo unido a proteína, (véase Figura 17).

DESFOSFORILACION DE LA SER(³²P)HMG-CoA REDUCTASA POR
HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M

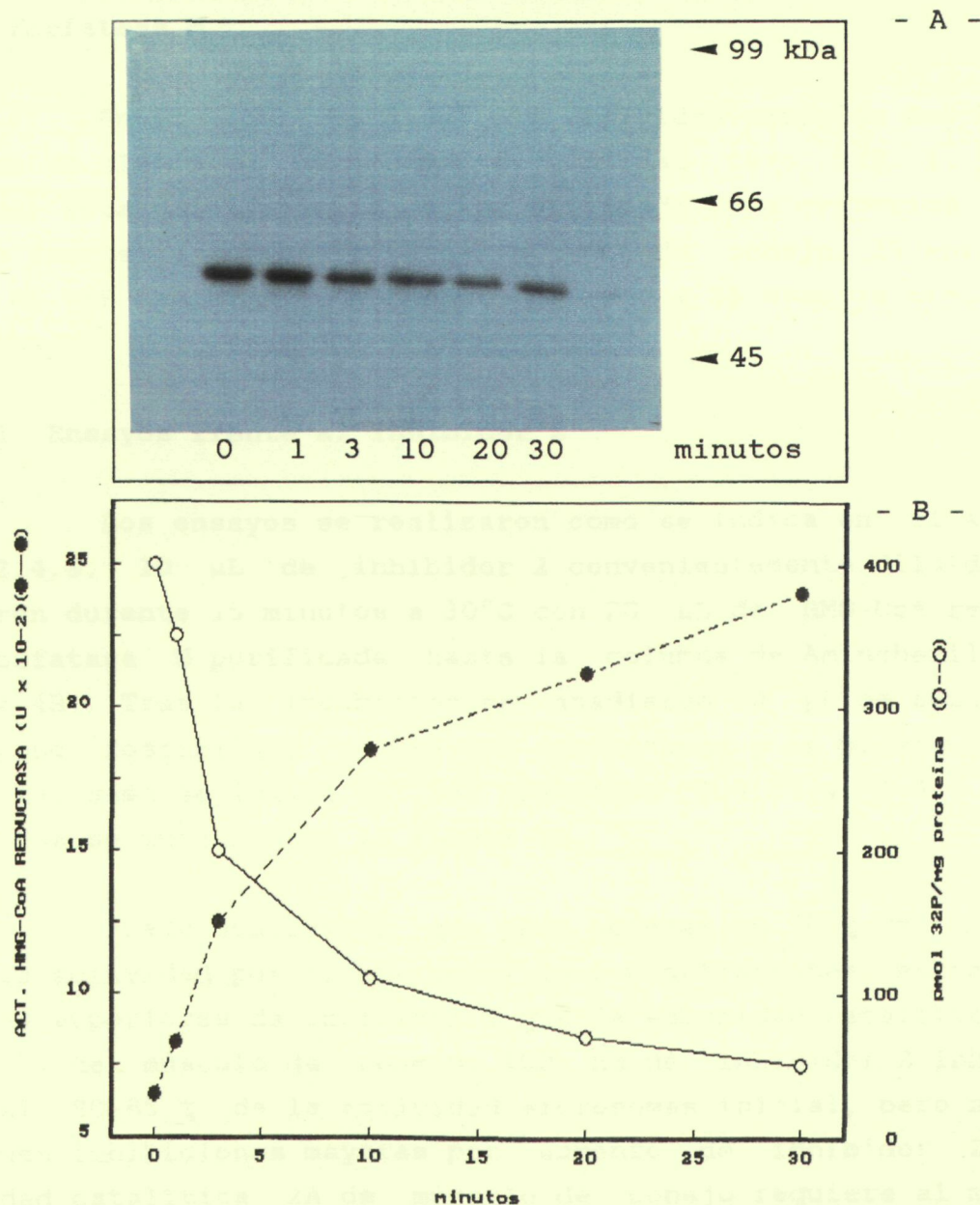


Figura 17

-A- Alicuotas de 45 μ L de la mezcla de incubación formada por HMG-CoA reductasa homogénea (1,20 μ C/mg) y HMG-CoA reductasa fosfatasa M, convenientemente diluida se extrajeron a los tiempos indicados. Las muestras se sometieron a una electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 7,5%, de la que se se obtuvo la autoradiografía que se muestra. Se indican los pesos moleculares en kDa de los marcadores utilizados, glucógeno fosforilasa (98 kDa), albúmina bovina (66 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa)

-B- En otras alicuotas de la misma mezcla de incubación extraídas a los mismos tiempos se determinaron la actividad HMG-CoA reductasa y el ³²P unido a proteínas tal como se indica en el apartado 3.6.1.

3.6.2. Clasificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M

En el apartado 3.4.3. la actividad excluida del DEAE celulosa se clasificó de forma provisional como PrP 1. Para confirmar esta clasificación se han utilizado tres criterios : 1) ensayos frente a inhibidor 2 de músculo de conejo, 2) ensayos frente al RP inhibidor de hígado de rata y 3) ensayos frente a protamina.

3.6.2.1. Ensayos frente al inhibidor 2

Los ensayos se realizaron como se indica en el apartado 2.4.8. 10 μ L de inhibidor 2 convenientemente diluido se incubaron durante 15 minutos a 30°C con 20 μ L de HMG-CoA reductasa fosfatasa M purificada hasta la columna de Aminohexil-Sepharaosa 4B. Tras la incubación se añadieron 20 μ L de sustrato (glucógeno fosforilasa o HMG-CoA reductasa) y se prosiguió el ensayo tal como se indica en los apartados 2.4.3. y 2.4.4. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Puede observarse que para obtener un 50 % de inhibición, la actividad purificada requiere concentraciones entre 6 y 10 veces superiores de inhibidor 2 que la subunidad catalítica de la PrP 1 de músculo de conejo; 100 ng de inhibidor 2 inhiben entre el 80-85 % de la actividad microsomas inicial, pero no se consiguen inhibiciones mayores por aumento de inhibidor 2. La subunidad catalítica 2A de músculo de conejo requiere al menos concentraciones cien veces superiores para ser inhibida en las mismas condiciones.

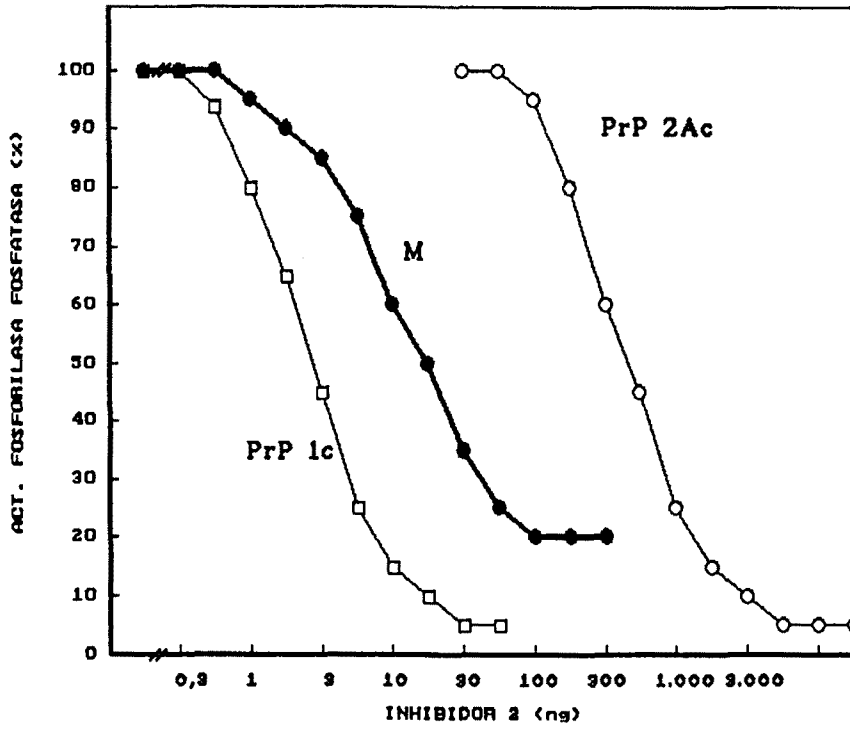
Los resultados obtenidos frente a glucógeno fosforilasa como sustrato, que utilizamos como control, no se distinguen de los resultados obtenidos cuando el sustrato de las PrP es HMG-CoA reductasa.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M
FRENTE AL INHIBIDOR 2 DE MUSCULO DE CONEJO

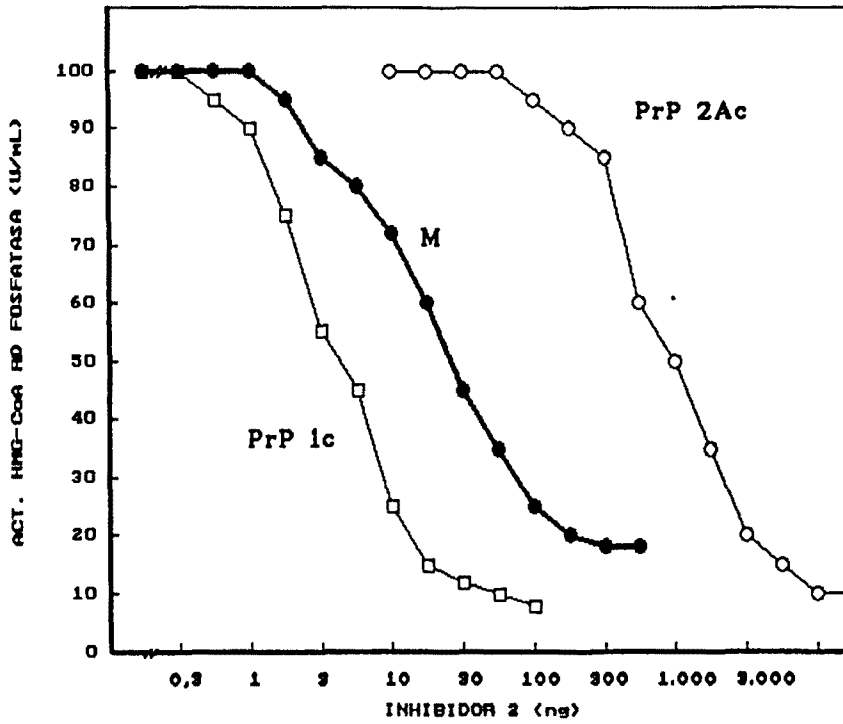
Figura 18

Cantidades crecientes de inhibidor 2 purificado a homogeneidad a partir de músculo de conejo (abscisas) se incubó con cantidades fijas (3 unidades, valoradas frente a glucógeno fosforilasa como sustrato) de la subunidad catalítica tipo 1 de músculo de conejo, PrP 1. (□) o de la subunidad catalítica tipo 2 también de músculo de conejo (○). El comportamiento de estas dos PrP sirve de control de la inhibición del inhibidor 2 sobre la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M (●). En ordenadas se representa el % de actividad residual PrP tras la incubación con cantidades crecientes de inhibidor. En ensayo se realiza utilizando como sustrato glucógeno fosforilasa, panel A, y HMG-CoA reductasa, panel B.

18.A



18.B



3.6.2.2. Ensayos frente al RP inhibidor

El RP inhibidor se muestra capaz de inhibir la actividad PrP 2A, únicamente cuando el sustrato utilizado es la HMG-CoA reductasa, sin afectar la actividad PrP 1 (295).

Muestras de RP-inhibidor purificado de hígado de rata, cedidas amablemente por la Dra. Dolors Serra, se utilizaron para caracterizar nuestra proteína microsomal. Los ensayos se realizaron tal como se ha descrito en el apartado 3.6.2.1. sustituyendo el inhibidor 2 por 10 μ L de RP-inhibidor, y utilizando como sustrato HMG-CoA reductasa. Los resultados se muestran en la Figura 19.

Puede observarse que la actividad purificada es poco afectada por el RP inhibidor, comportándose de nuevo como una proteína asimilable a la PrP 1 catalítica de músculo de conejo.

3.6.2.3. Ensayos frente a protamina

Se vió en el apartado 3.4.3. que la actividad excluída del DEAE celulosa no era reactivable por protamina. La reactivación frente a este tipo de poliaminas, cuando se utiliza glucógeno fosforilasa como sustrato, se considera criterio suficiente para clasificar a una PrP como tipo 2A (274)(331).

El ensayo se realizó tal como se indica en el apartado 2.4.9. utilizando glucógeno fosforilasa como sustrato y como fuente de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M la que eluye de la columna de Aminohehil-Sepharosa 4B, una vez concentrada. En presencia de 25 μ g/mL de protamina, la actividad purificada de microsomas de hígado de rata, no tan solo no es reactivada sino que queda inhibida entre el 64 y 70 % según los ensayos. Este resultado confirma que no arrastramos contaminación por PrP 2A.

De estos resultados podemos concluir que la proteína microsomal purificada puede ser clasificada con mayor acierto como PrP 1 que como PrP 2, si bien su sensibilidad frente al inhibidor 2 es menor que la de la PrP 1_c de citosol de músculo de

conejo, lo que explica los resultados obtenidos en el apartado 3.4.1. La falta de reactivación frente a protamina indica que no está contaminada por PrP 2A. La necesidad de mayores concentraciones de inhibidor 2 que las requeridas para la subunidad catalítica tipo 1 de conejo, así como la inicial sensibilidad al RP inhibidor consideramos que son características de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M.

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M
FRENTE AL RP INHIBIDOR DE HIGADO DE RATA

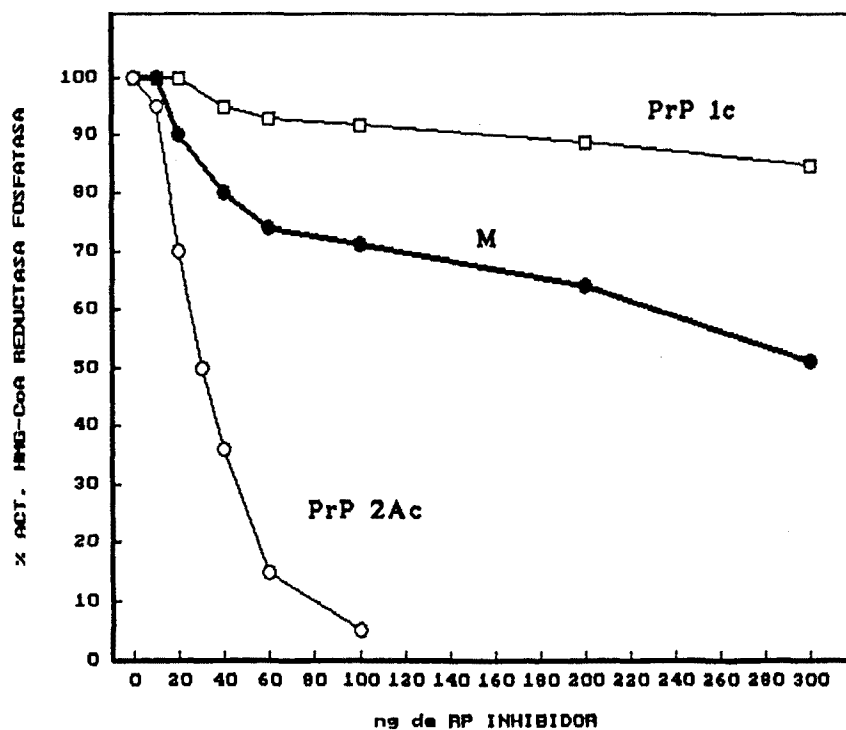


Figura 19

Cantidades crecientes de RP inhibidor purificado a homogeneidad a partir de hígado de rata (abscisas) se incubaron con cantidades fijas (3 unidades, valoradas frente a glucógeno fosforilasa como sustrato) de la subunidad catalítica tipo 1 de músculo de conejo, PrP 1_c (□) o de la subunidad catalítica tipo 2 también de músculo de conejo (○). El comportamiento de estas dos PrP sirve de control de la inhibición del RP inhibidor sobre la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M (●). En ordenadas se representa el % de actividad residual PrP tras la incubación con cantidades crecientes de inhibidor. En ensayo se realiza utilizando como sustrato HMG-CoA reductasa.

3.6.3. Tripsinización controlada

Una muestra con la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M, purificada parcialmente hasta la cromatografía de Aminohexil-Sepharosa 4B se tripsinizó como se indica en el apartado 2.7.4. Los resultados se muestran en la Figura 20. La actividad PrP con sustrato HMG-CoA reductasa disminuye significativamente al ser tripsinizada, manteniendo una actividad residual de aproximadamente el 40 % de la actividad inicial aun cuando se incubaba a tiempos relativamente prolongados. La presencia de 5 mM Mn^{2+} no modifica el comportamiento frente a este sustrato, y en todo caso favorece la pérdida de actividad a tiempos cortos.

Cuando en lugar del concentrado de la salida de la columna cromatográfica de Aminohexil-Sepharosa 4B utilizamos muestras menos purificadas, como son los solubilizados de microsomas obtenidos con Triton X-100, los resultados no varían significativamente.

TRIPSINIZACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA

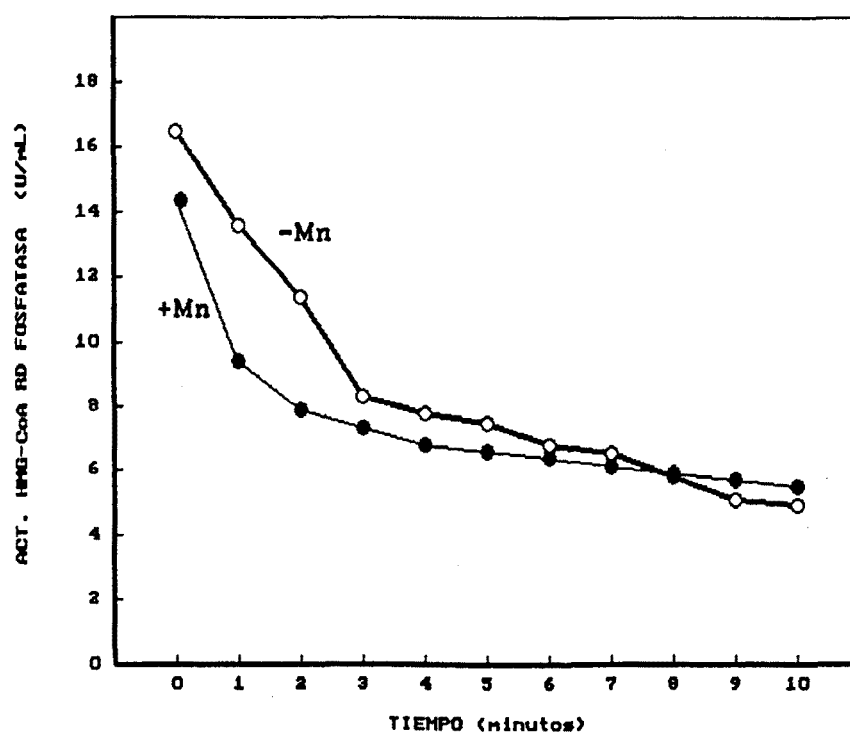


Figura 20

Una muestra parcialmente purificada a partir de microsomas de hígado de rata, se tripsiniza en ausencia (○) y presencia (●) de 5 mM Mn^{2+} . La relación tripsina/proteína es de 1/90. La incubación transcurre durante los tiempos señalados en abscisas y se finaliza por adición de inhibidor de tripsina de soja en relación 1/10 tripsina/inhibidor.

3.6.4. Fosforilación con GSQ-3 y calentamiento a 100°C

La actividad PrP 1 de origen citosólico puede estar presente en formas activa o inactiva. La forma inactiva requiere ser fosforilada con GSQ-3 en presencia de ATP-Mg²⁺ para obtener la máxima activación. Para conocer si la PrP microsomal es sensible a reactivación por esta proteína quinasa procedemos a incubar la muestra con GSQ-3 y ATP-Mg²⁺. Una muestra purificada y concentrada procedente de la cromatografía de Aminohehil-Sepharosa 4B, 20 µL, se incubó con 20 µL de una solución que contenía acetato magnésico, 1,7 mM, ATP 0,17 mM y GSQ-3 0,5 U/mL. Tras incubar durante 5 minutos a 30°C, se añadían 20 µL de [³²P] fosforilasa a, prosiguiendo el ensayo de actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa. En ninguna de las muestras aparece reactivación de la actividad PrP. Cuando el ensayo se realiza sobre sustrato HMG-CoA reductasa tampoco se modifica la actividad PrP.

Para saber si la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M, contiene como subunidad el inhibidor 2, una muestra procedente de la cromatografía de Aminohehil-Sepharosa 4B se calentó durante 10 minutos a 100°C. En estas condiciones se destruye la actividad PrP y la actividad inhibidora del inhibidor 2 puede expresarse utilizando como sustrato otras PrP. La actividad inhibidora se mide sobre la subunidad catalítica de la PrP 1 obtenida de músculo de conejo, los ensayos se realizan con sustratos glucógeno fosforilasa y HMG-CoA reductasa. No se detecta la presencia de inhibidor 2 en la muestra de HMG-CoA reductasa fosfatasa M. Cuando el calentamiento se realiza directamente sobre microsomas resuspendidos 5 mg/mL, y en éstas muestras calentadas se investiga la presencia de inhibidor 2 tampoco se obtienen resultados positivos.

Tanto los resultados obtenidos con GSQ-3 como los de calentamiento a 100°C confirman que la PrP 1 microsomal no incluye el inhibidor 2, y que el modelo citosólico de PrP 1 no puede extrapolarse a la PrP 1 microsomal. Al mismo tiempo, confirmamos que la actividad purificada en microsomas no se debe a una contaminación por PrP 1 citosólica.

3.6.5. Rotura por precipitación con acetona

Como se ha visto, la tripsinización controlada provoca al menos la pérdida del 60 % de actividad. Ensayos previos en nuestro Laboratorio habían concluido que las HMG-CoA reductasa fosfatasas microsomales sufren importantes pérdidas de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en el proceso de tratamiento con etanol, manteniendo tan solo el 7 % de la actividad inicial, hecho que contrasta con el aumento provocado cuando se utilizan proteínas fosfatasas citosólicas, tanto con glucógeno fosforilasa o HMG-CoA reductasa como sustratos. Esta pérdida de actividad dificulta el proceso de purificación de la subunidad de 37 kDa.

Por tanto creímos de interés determinar si otros tratamientos, como la precipitación con acetona, provocaban el mismo efecto. La precipitación con acetona se realizó tal como se indica en el apartado de material y métodos 2.7.3. Para ello el eluido y el retenido de DEAE-celulosa, resultantes de cromatografiar los solubles obtenidos con Triton X-100 0,1 %, se trataron a temperatura ambiente con el mismo volumen de acetona que de muestra inicial en presencia de 1 mM Mg^{2+} . Los resultados se muestran en la Tabla X.

Puede observarse que las pérdidas son importantes cuando el sustrato es HMG-CoA reductasa (entre el 85-90 %) y que sobre sustrato glucógeno fosforilasa las pérdidas son menores (60-45 %). Las diferencias en función de sustrato pueden deberse a que durante el proceso de precipitación se obtienen distintos polipéptidos, de peso molecular próximo, cada uno de ellos con distinto grado de actividad para cada uno de los sustratos. Ello vendrá confirmado por los datos de purificación de la subunidad de 37 kDa.

**EFECTO DE LA PRECIPITACION CON ACETONA SOBRE LA ACTIVIDAD
PROTEIN FOSFATASA SOLUBILIZADA DE MICROSOMAS**

	Sustrato	
	HMG-CoA reductasa	glucógeno fosforilasa
	%	%
Excluído del DEAE-celulosa	15	55
Retenido del DEAE-celulosa	10	43

TABLA X

Las fracciones excluidas y retenidas del DEAE-celulosa se trataron con acetona tal como se indica en el apartado 2.7.3. En los solubles obtenidos tras el tratamiento se determinó la actividad PrP sobre sustratos HMG-CoA reductasa y glucógeno fosforilasa. En la tabla se expresan los porcentajes de actividad recuperados respecto al 100 % de la actividad en la muestra antes del tratamiento.

3.6.6. Especificidad de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M

En el proceso de purificación de la actividad solubilizada de microsomas y excluída del DEAE-celulosa se ha mostrado la actividad PrP sobre sustrato HMG-CoA reductasa. También se ha utilizado glucógeno fosforilasa como sustrato con el fin de conocer si en algún momento de la purificación se separaban ambas actividades. Sin embargo, los perfiles cromatográficos han sido iguales para ambos sustratos, coincidiendo siempre los máximos de actividad en todas las cromatografías. De ello se concluye que no existe una actividad que tenga únicamente como sustrato el enzimas HMG-CoA reductasa.

3.6.7. Diferencias entre la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M y la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa unida al precipitado de glucógeno

Los ensayos de fraccionamiento han puesto de manifiesto que existen dos actividades HMG-CoA reductasa fosfatasa, una en microsomas y otra en glucógeno. A fin de discernir las similitudes y diferencias cromatográficas de las dos actividades y apoyar nuestra tesis, se procedió a solubilizar la actividad para luego purificarla, siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado para la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M de origen microsomal, ya que no se persigue purificar la actividad unida al glucógeno sino observar como se comporta esta actividad expuesta a las mismas condiciones que la unida a microsomas.

3.6.7.1. Solubilización de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa de precipitado de glucógeno

Del precipitado de glucógeno, obtenido a partir de hígado de ratas alimentadas, se solubilizó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa tal como se describe en los apartados 2.7.1. y 2.7.2. En todos los casos las muestras se incubaron dos horas a 4°C en los distintos medios de solubilización. Los resultados se muestran en la Figura 21.

El patrón de solubilización a partir de glucógeno presenta un comportamiento diferenciado respecto al de microsomas. Para el precipitado de glucógeno el tratamiento que se muestra más eficaz es el amiloglucolítico y si el rendimiento no es mayor se debe únicamente a que todas las muestras se han incubado dos horas a 4°C (como en el caso de la Figura 8), y estas condiciones y la concentración de α -amilasa, no son suficientes para eliminar todo el glucógeno de esta fracción, pudiéndose visualizar un "pellet" tras la centrifugación. También se observa que las actividades solubilizadas con Triton o KCl son superiores a la de control, lo cual puede indicar una posible contaminación de precipitado de glucógeno con membranas microsomales o con proteínas de otro origen.

SOLUBILIZACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA A
PARTIR DEL PRECIPITADO DE GLUCOGENO

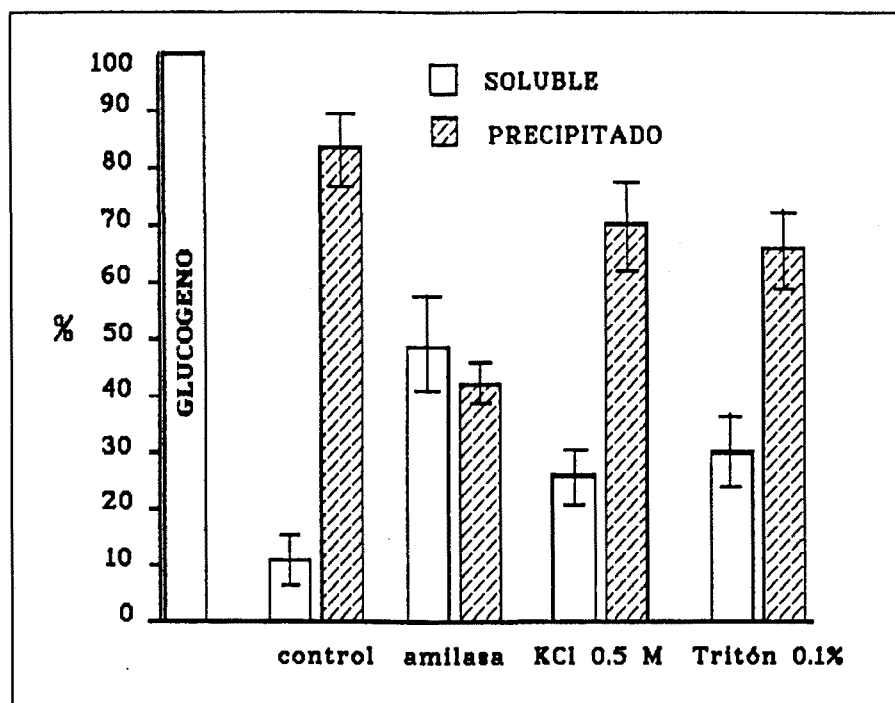


FIGURA 21

Se representa en barras vacías la actividad HMG-CoA reductasa solubilizada en tanto por ciento respecto a un 100 % de actividad en la fracción de partida. En barras rayadas se muestra la actividad residual en el precipitado obtenido después de centrifugar a 100.000 xg.

3.6.7.2. Cromatografía en DEAE-celulosa

Se partió de los hígados de 12 de ratas alimentadas, obteniéndose el precipitado de glucógeno como se detalla en el apartado 2.6.1. El precipitado de glucógeno se trató con α -amilasa salival, 1 mg/mL, durante 24 horas a 4°C, manteniéndose en diálisis frente a la solución amortiguadora A, utilizada para la purificación de las PrP de origen microsomal a la que se añadió leupeptina para una concentración de 2 μ g/mL. La actividad solubilizada se sometió a una cromatografía en DEAE-celulosa (véase Figura 22). Parte de la actividad es excluida y parte es retenida, presentando un perfil similar a los solubles de Triton de origen microsomal.

La actividad excluida centra nuestro interés dado su comportamiento similar al de la HMG-CoA reductasa fosfatasa M. Se prosiguió la purificación con el excluido del DEAE-celulosa y se cromatografió en una columna de fosfocelulosa P-11. En esta resina la muestra pierde completamente la actividad no recuperándose actividad en ninguna de las fracciones (excluido, lavado o eluido con sal). Ha sido descrito que cuando se intenta purificar el enzima a través de fosfocelulosa, este pierde la actividad, (244).

CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA SOLUBILIZADA DEL PRECIPITADO DE GLUCOGENO

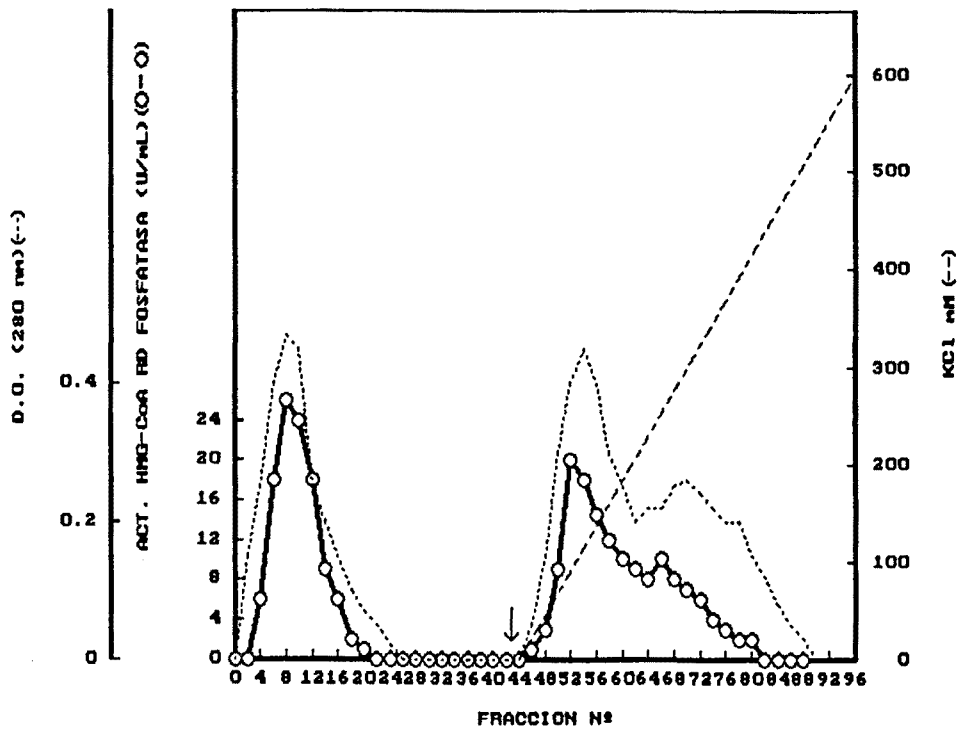


Figura 22

El soluble del precipitado de glucógeno, obtenido con tratamiento amiloglucolítico, se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa (2,5 x 6 cm) equilibrada con solución amortiguadora sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tris/HCl pH 7,2, PMSF 0,1 mM, benzamidina 1 mM y mercaptoetanol 15 mM. Tras el lavado se eluyó con un gradiente de 0-600 mM KCl (200 + 200). Cada 8 minutos se recogieron fracciones de 8 mL; en ellas se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa (o). La absorbancia a 280 nm se representa en línea de puntos.

3.6.7.3. Cromatografía en Aminohexil-Sepharosa 4B

Se inició una nueva purificación a partir de los hígados de 12 ratas alimentadas y se obtuvo el eluido del DEAE-celulosa, que fue cromatografiado en una columna de Aminohexil-Sepharosa 4B (véase Figura 23). Se sigue la purificación sin congelar las muestras ya que en este proceso pierden la actividad.

Parte de la actividad eluye en el eluido y parte en el gradiente de KCl a unas concentraciones de 125 y 175 mM KCl. No fue posible proseguir la purificación pues hay una completa pérdida de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. La inestabilidad de las preparaciones de PrP procedentes de glucógeno está bien documentada Tsuiki y col. (327), Mvumbi y col. (244); estos autores recomiendan utilizar soluciones con 1 mM $MnCl_2$, catión ausente en nuestras soluciones amortiguadoras ya que tiene un efecto ligeramente inhibitor sobre la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M. También está descrita una elevada inestabilidad de la PrP 1G de músculo esquelético, variando los valores de recuperación de actividad de preparación a preparación, el enzima purificado es muy lábil y pierde su actividad en el almacenamiento Khatra y col. (192). Las muestras no pueden ser congeladas ya que pierden totalmente la actividad.

En la Tabla XI presentamos el cuadro de la purificación parcial de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa de origen microsomal.

Tras los resultados de purificación podemos concluir que nos encontramos ante una proteína que tiene un comportamiento distinto a la HMG-CoA reductasa fosfatasa M de origen microsomal y que por tanto la contaminación de glucógeno no afecta el porcentaje de distribución calculado para esta subfracción, con respecto a la fracción microsomal.

CROMATOGRAFIA EN AMINOHEXIL-SEPHAROSA 4B DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA SOLUBILIZADA DEL PRECIPITADO DE GLUCOGENO

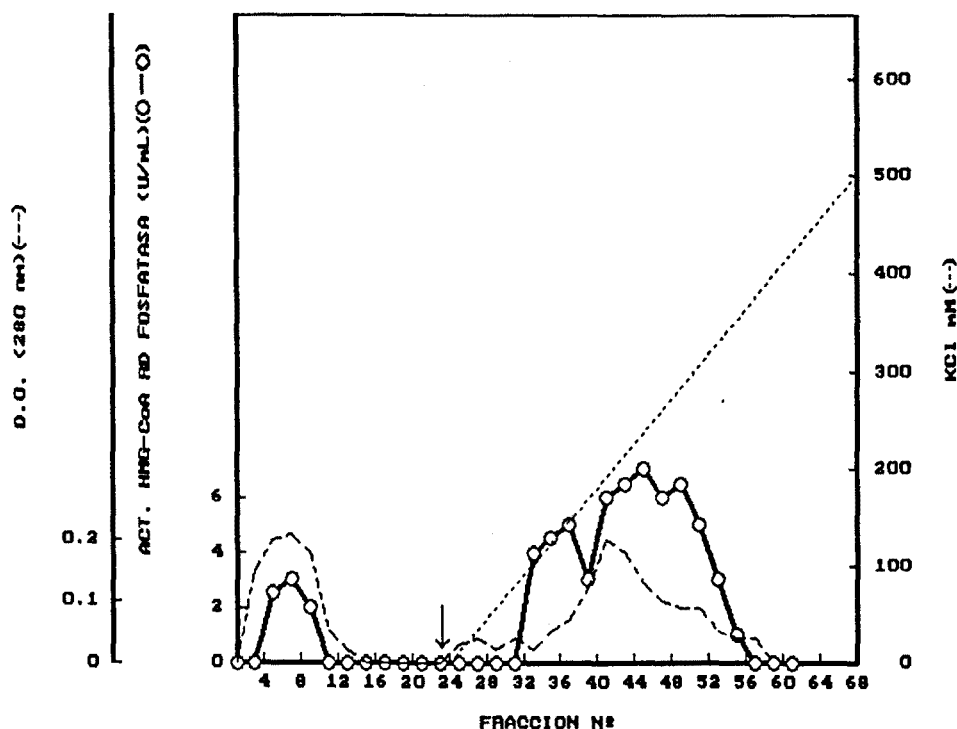


Figura 23

La muestra excluida del DEAE-celulosa se cromatografió en una columna de Aminohexil-Sepharosa 4B (2 x 4 cm) equilibrada con la solución amortiguadora A. Una vez entrada la muestra y lavada hasta que la absorbancia retornó a la línea de base, se instauró un gradiente entre 0-500 mM KCl (100 + 100 mL), recogándose fracciones de 4,5 mL cada 9 minutos. En línea gruesa y círculos vacíos (o) se representa la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. (---). En línea de puntos la absorbancia a 280 nm. La flecha indica el inicio del gradiente.

**CUADRO DE PURIFICACION PARCIAL DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA
FOSEATASA OBTENIDA A PARTIR DEL PRECIPITADO DE GLUCOGENO**

	Proteína mg	Actividad Total Unidades	Actividad Especifica Unidades/mg	Rendimiento %	Veces de purificación
GLUCOGENO	40	6040	151	100	1
SOLUBLE α-AMILASA	25	3744	149	62	1
EXCLUIDO DEAE-CELULOSA	4,5	1234	274	20	1,8
AMINOHEXIL SEPHAROSA 4B	0,1	279	2.790	4,6	18,5

TABLA XI

Se partió de 78 gramos de hígado de rata. En cada paso de purificación se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y la proteína.

3.7. PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA de 37 kDa DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M

3.7.1. Obtención de la subunidad catalítica

En la purificación de las subunidades catalíticas de las PrP se han utilizado distintos tratamientos proteolíticos, como son tripsinización, precipitación con acetona, con etanol y rotura por congelación descongelación bruscas (18)(337)(350). Dados los bajos rendimientos obtenidos en la precipitación con etanol se intenta la purificación a partir de extractos tratados con tripsina y con acetona.

Se obtuvo el excluído del DEAE-celulosa como en el apartado 3.5.1, a partir del hígado de 16 ratas alimentadas. El excluído se dividió en dos partes que fueron tratadas una con tripsina y otra con acetona, como se indica en los apartados 2.7.4. y 2.7.3. La muestra tripsinizada se concentró en un Amicon hasta 10 mL y la muestra precipitada con acetona se resuspendió en el mismo volumen.

3.7.2. Cromatografía en Bio Gel A 0.5m

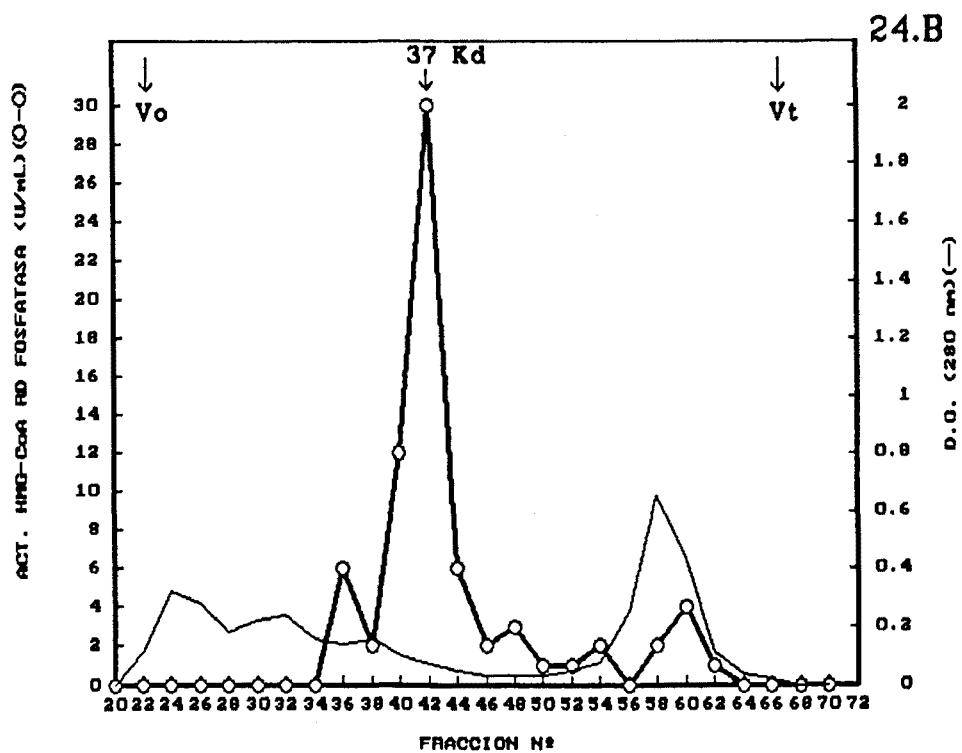
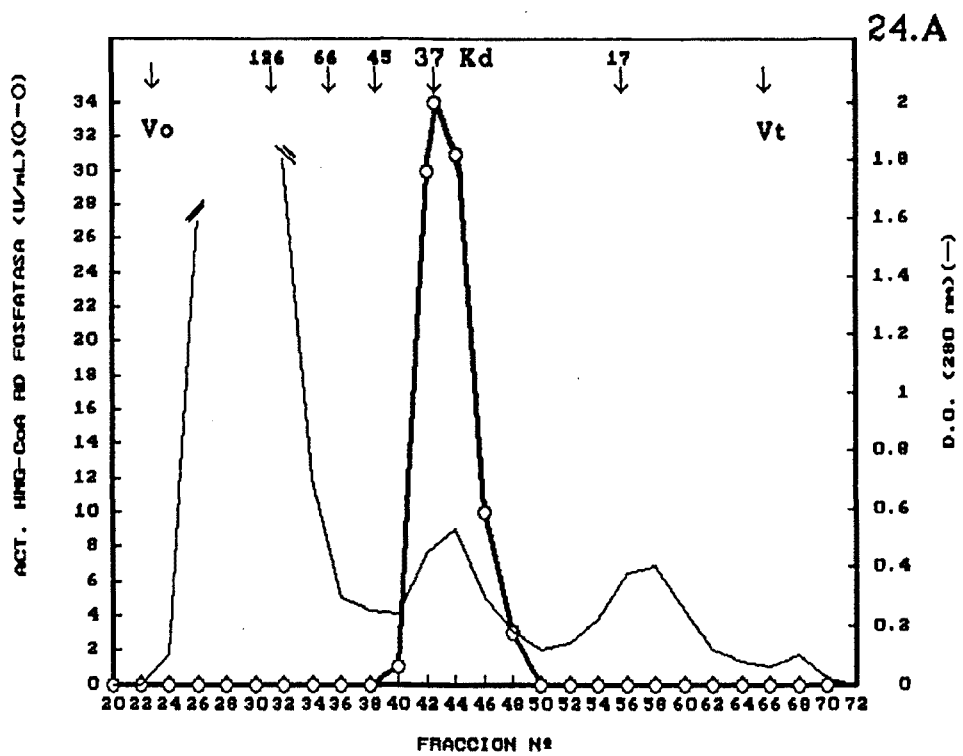
Las muestras tripsinizada y la precipitada con acetona y dializada se cromatografiaron en una columna de Bio-Gel A 0.5m. Los resultados se muestran en la figura 24. Puede observarse que en ambos casos se obtiene una subunidad catalítica de 35-37 kDa.

La tripsinización presenta dos inconvenientes: por un lado tanto la tripsina (24 kDa) como el inhibidor de tripsina de soja (20 kDa) contaminan la muestra, arrastrándose a lo largo de toda la purificación; puede observarse también que el pico de actividad coincide con un pico de absorbancia a 280 nm lo que implica que la muestra arrastra más contaminación proteica. La precipitación con acetona conlleva la eliminación de un gran número de proteínas y las muestras se presentan inicialmente menos contaminadas, por ello se prefiere proseguir la purificación con la muestra procedente de la precipitación con acetona.

**CROMATOGRAFIA EN BIO GEL A 0.5m DE LAS ACTIVIDADES HMG-CoA
REDUCTASA FOSFATASA PROTEOLIZADAS CON TRIPSINA Y ACETONA**

Figura 24

10 mL de Las muestras procedentes de la tripsinización controlada, panel A, y la precipitación con acetona, panel B, se cromatografiaron en una columna de Bio-Gel A 0.5m (55 x 2,5) equilibrada con la solución A y NaCl 100 mM. Se recogieron fracciones de 4 mL cada 10 minutos y en ellas se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa (o). Se siguió el aumento de absorbancia a 280 nm, línea de puntos. Los marcadores utilizados son Blue-Dextran (Vo), aldehído deshidrogenasa (126 kDa), albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y mioglobina (17 kDa), indicándose mediante flechas las fracciones que corresponden a sus volúmenes de elución.



3.7.3. Cromatografía en Aminohehil-Sepharosa 4B

La muestra, previamente precipitada con acetona, eluida de la cromatografía de Bio-Gel A.05 (60 mL), se cromatografió en una columna de Aminohehil-Sepharosa 4B. La mayor parte de la actividad PrP fué retenida y para su elución se aplicó un gradiente de NaCl entre 0 y 500 mM (150 + 150 mL). La absorbancia leída a 280 nm no muestra cambios a lo largo de todo el gradiente respecto a la línea de base (véase Figura 25).

La actividad PrP se ha medido en todas las ocasiones y a lo largo de la purificación de la HMG-CoA reductasa fosfatasa M y de la subunidad catalítica sobre sustrato HMG-CoA reductasa, así como sobre sustrato glucógeno fosforilasa (resultados que no han sido graficados). En todas las ocasiones los cromatogramas han sido coincidentes. Sin embargo, en la cromatografía aquí presentada la actividad se desdobra en dos picos, uno exclusivamente activo sobre sustrato glucógeno fosforilasa, que aparece a una conductancia de 11 mS y otro activo sobre ambos sustratos y que tiene el máximo a 13,5 mS. Una vez pooleadas y concentradas las fracciones separadamente, se determinó la proporción de proteína: al pico I le correspondieron 200 μ g y al pico II 100 μ g. Este desdoblamiento de la actividad PrP sobre sustrato glucógeno fosforilasa, que no se produce sobre sustrato HMG-CoA reductasa, puede indicar, junto a los resultados obtenidos en la precipitación con acetona, que se producen distintos polipéptidos, no separables en la cromatografía de Bio Gel A 0.5m, uno o varios de los cuales sólo tiene actividad sobre el sustrato glucógeno fosforilasa, posiblemente por requerir un fragmento proteolizado para reconocer el sustrato HMG-CoA reductasa.

CROMATOGRAFIA EN AMINOHEXIL-SEPHAROSA 4B DE LA SUBUNIDAD
DE 37 kDa DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M

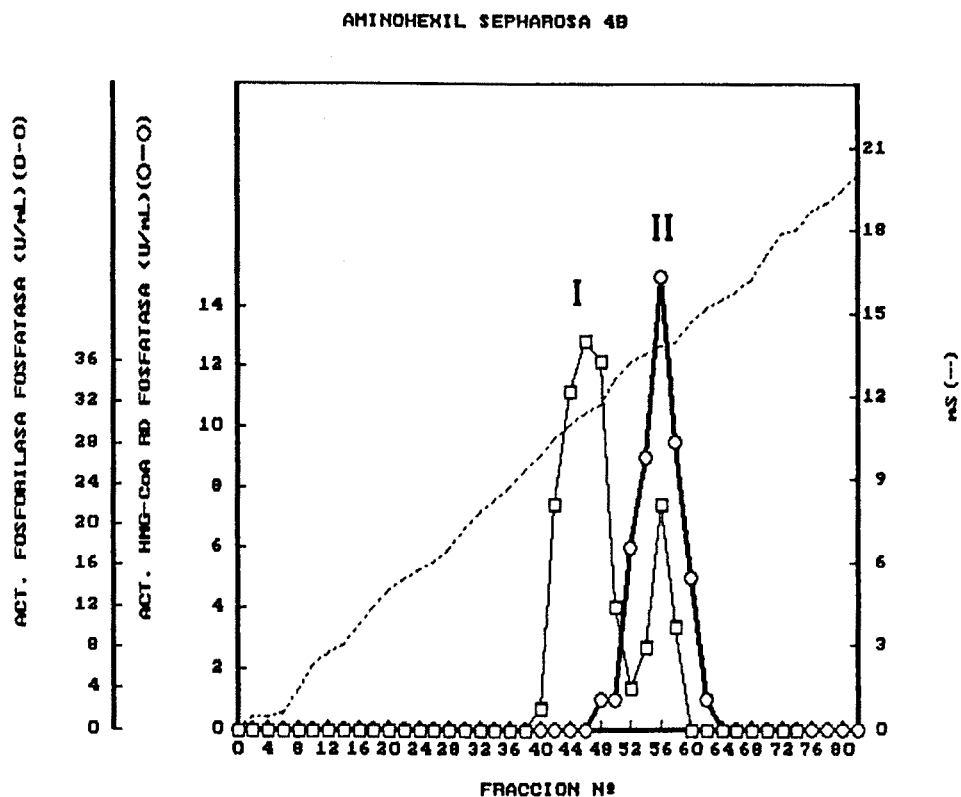


Figura 25

La muestra procedente de la cromatografía en Bio-Gel A 0.5m fue cromatografiada en una columna de Aminohexil-Sepharosa 4B (2,5 x 1,5 cm). Una vez lavada, se instauró un gradiente de 0-500 mM NaCl (150 + 150 mL). Se recogieron fracciones de 3,5 mL. En línea punteada se muestra el incremento de conductancia en mS. En línea gruesa y círculos vacíos la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa (○). En línea fina y cuadrados vacíos la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa (□).

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

La muestra eluida del Aminohehil-Sepharosa 4B con actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa se dializó frente a solución amortiguadora A hasta que la conductancia disminuyó por debajo de 2 mS, cromatografiándose en una columna de poli-L-lisina-Sepharosa 4B (véase Figura 26). Para eluir la actividad retenida por la columna se instauró un gradiente de NaCl entre 0 y 500 mM. Las actividades HMG-CoA reductasa fosfatasa y glucógeno fosforilasa fosfatasa eluyen en un solo pico con un máximo a 14,2 mS. Después de concentrar la muestra, la proteína asociada se calcula entre 25 y 35 μ g. En la Tabla XII se presenta el cuadro de purificación de la actividad de 37 kDa.

3.7.5. Electroforesis en geles de acrilamida

Las muestras procedentes de la purificación se corren en una electroforesis y se tiñen con nitrato de plata (véase Figura 27). Se observan 3 bandas con mayor intensidad que corresponden a pesos moleculares de 31, 34 y 40 kDa. De ellas, las dos primeras podrían deberse a fragmentos proteolíticos de la subunidad catalítica y la tercera podría obedecer a una contaminación.

CROMATOGRAFIA EN POLI-L-LISINA-SEPHAROSA 4B DE LA ACTIVIDAD CATALITICA DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA DE 37 kDa

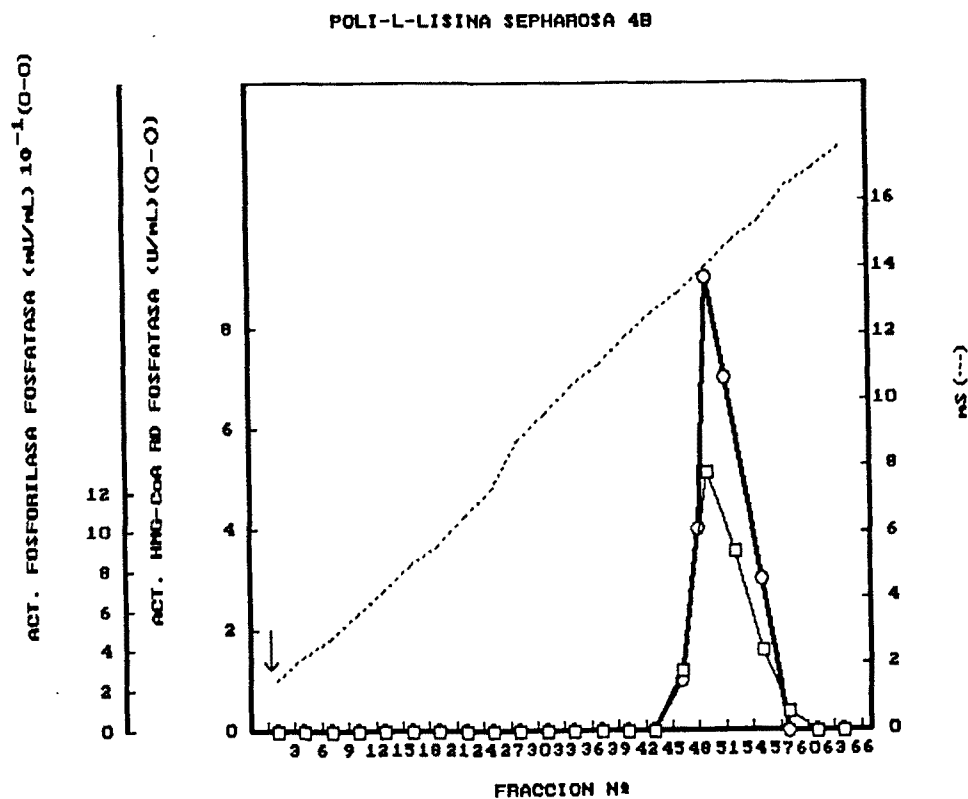


Figura 26

La muestra procedente de la cromatografía de Aminohexil-Sepharosa 4B, pico II, una vez dializada se vuelve a cromatografiar en una columna de poli-L-lisina-Sepharosa 4B (4 x 1,5 cm) equilibrada con solución amortiguadora A. Una vez entrada la muestra y lavada, se instaura un gradiente (150 + 150 mL) entre 0-500 mM NaCl. Cada 10 minutos se recogen fracciones de 4,5 mL. En línea de puntos se representa la conductancia medida en mS, en línea gruesa y círculos vacíos (o) la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y en línea fina y cuadrados vacíos (□) la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa.

ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA-SDS DE LA ACTIVIDAD
CATALITICA PURIFICADA

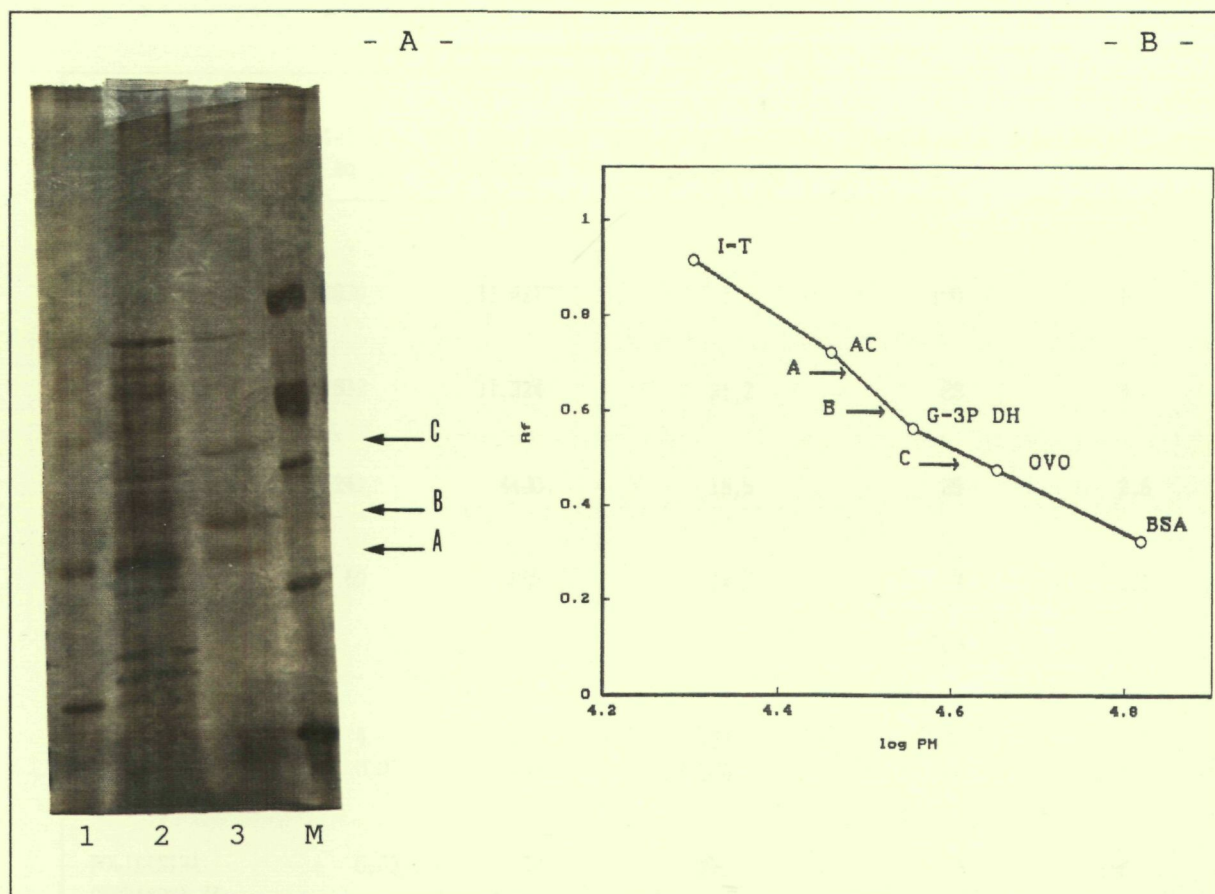


Figura 27

- A - Muestras procedentes de la cromatografía de Aminohexil-Sepharos 4B, picos I y II de la Figura 25, y de la cromatografía en poli-L-lisina-Sepharosa 4B, Figura 26, se sometieron a una electroforesis en geles de acrilamida-SDS del 10 %, carriles 1, 2 y 3 respectivamente. Fueron utilizados los marcadores de peso molecular: albúmina bovina 66 (kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), e inhibidor de tripsina (20 kDa), carril M. La electroforesis se tiñó con nitrato de plata.

- B - Se muestran las movilizadas relativas de las proteínas marcadoras. Las flechas A, B y C corresponden a las proteínas mayoritarias del carril 3, a las que corresponden unos pesos moleculares de 31, 34 y 41 kDa respectivamente.

CUADRO DE PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD CATALITICA OBTENIDA POR PRECIPITACION CON ACETONA DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M

	Proteína mg	Actividad Total Unidades	Actividad Especifica Unidades/mg	Rendimiento %	Veces de purificacion
MICROSOMAS	1.830	12.821	7	100	1
SOLUBLE	532	11.324	21,2	88	3
EXCLUIDO DEAE	241	4480	18,5	35	2,6
PRECIPITACION CON ACETONA	60	885	14,7	7	2,1
				100	1
BIOGEL A 0.5m	4	536	134	60	9,1
AMINOHEXIL SEPHAROSA 4B	0,01	230	2.300	26	156
POLILISINA SEPHAROSA 4B	0,03	70	2.330	8	158

TABLA XII

Se parte de 105 gramos de hígado de rata. En cada paso de purificación se determina la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa y la concentración de proteína.

3.8. PROPUESTA DE UN MODELO DE UNION DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M (85 kDa) A LAS MEMBRANAS MICROSOMALES

3.8.1. Cromatografía en DEAE-celulosa de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada con KCl

El soluble de KCl 0,5 M obtenido a partir de microsomas de 5 ratas alimentadas, se dializó frente a solución A, sometiéndose a una cromatografía en DEAE-celulosa en las mismas condiciones que en el apartado 3.4.3. El resultado se muestra en la Figura 28.A. Paralelamente se realiza otra cromatografía en las mismas condiciones descritas, añadiendo a la muestra solubilizada con KCl, Triton X-100 para una concentración del 0,1 % con el objeto de averiguar si la presencia de Triton puede modificar el comportamiento cromatográfico en la columna de intercambio iónico. El perfil cromatográfico es idéntico al obtenido sin Triton (gráfica no mostrada). La cromatografía en presencia de Triton, permite concluir que este detergente no está condicionando el comportamiento en esta resina.

Como en el caso del soluble obtenido con Triton (vease Figura 10.A), en la cromatografía del soluble obtenido con KCl, una parte de la actividad es excluida del DEAE-celulosa y otra parte es retenida, pudiendo ser eluida con KCl. La similitud entre el comportamiento de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada con detergente o solubilizada con KCl se pone de manifiesto al comparar ambas figuras.

Tan sólo la actividad PrP 2A solubilizada con Triton X-100 y que aparece en los lavados (véase Figura 10 A), podría deberse a una PrP que requiere detergentes para ser solubilizada. Ello concuerda con los datos de solubilización presentados en el apartado 3.4.1. en los que siempre se obtiene más actividad con Triton que con KCl. Para confirmar este extremo, los microsomas que habían sido solubilizados tres veces con KCl 500 mM, y en los que la actividad residual era pequeña, se solubilizaron una vez más con Triton X-100 0,1 %, recuperándose aproximadamente el 10 % de la actividad inicial. Este cuarto soluble se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa (5 x 1,5 cm) una vez lavada la

columna se instauró un gradiente entre 0-600 mM KCl (véase Figura 28.B). Se observa que la actividad excluida del DEAE-celulosa desaparece y sin embargo en el lavado aparece una actividad que coincide con la clasificada como PrP 2A en la figura 10.B.

Las actividades eluidas con el gradiente aparecen a 150 mM KCl presentando un perfil similar tanto a la Figura 10.A como a la Figura 28.A.

CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA DE LAS ACTIVIDADES SOLUBILIZADAS
DE MICROSOMAS CON KCl 500 mM

En la parte superior reproducimos exactamente la Figura 10.A anteriormente presentada con objeto de facilitar su comparación con el perfil obtenido de los solubles de KCl 500 mM.

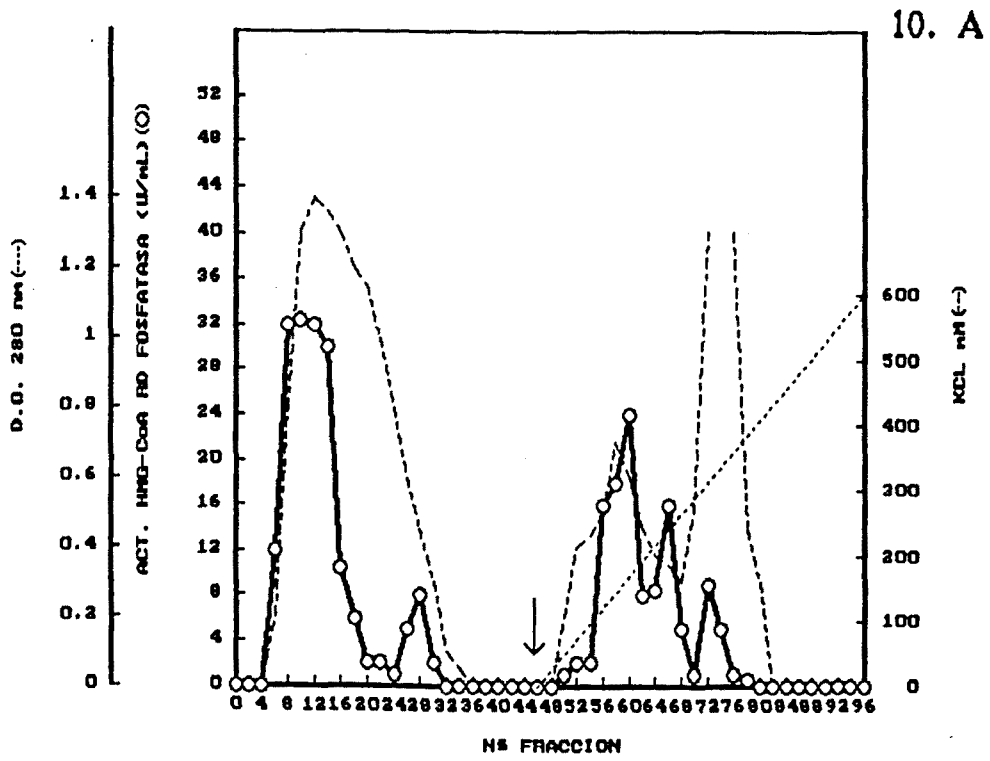
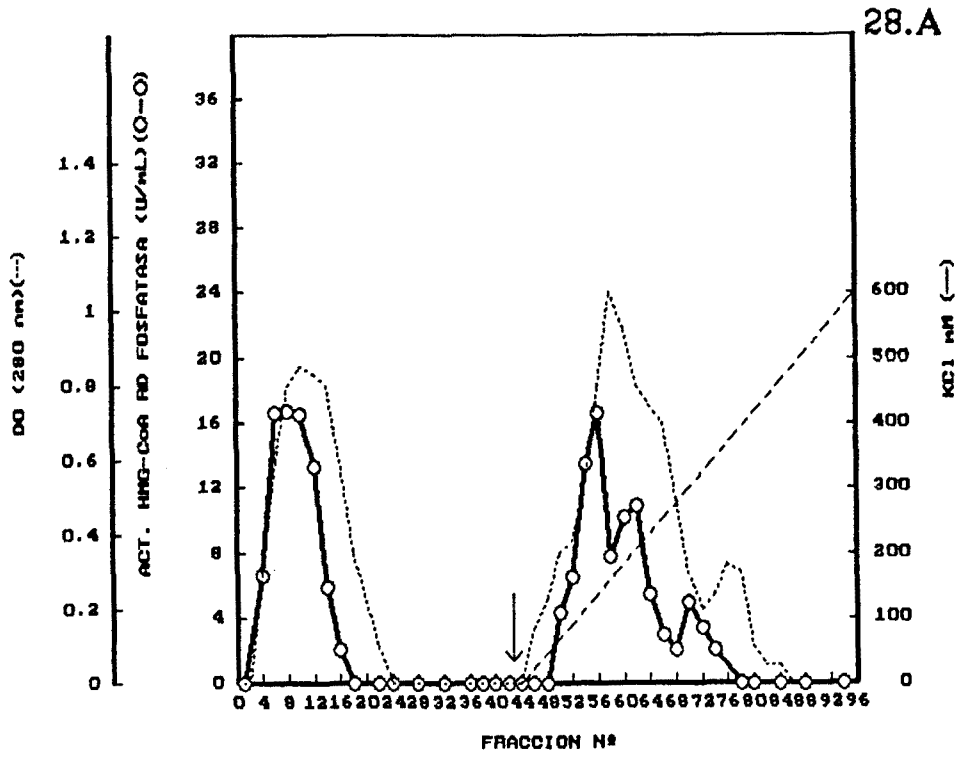
Figura 28

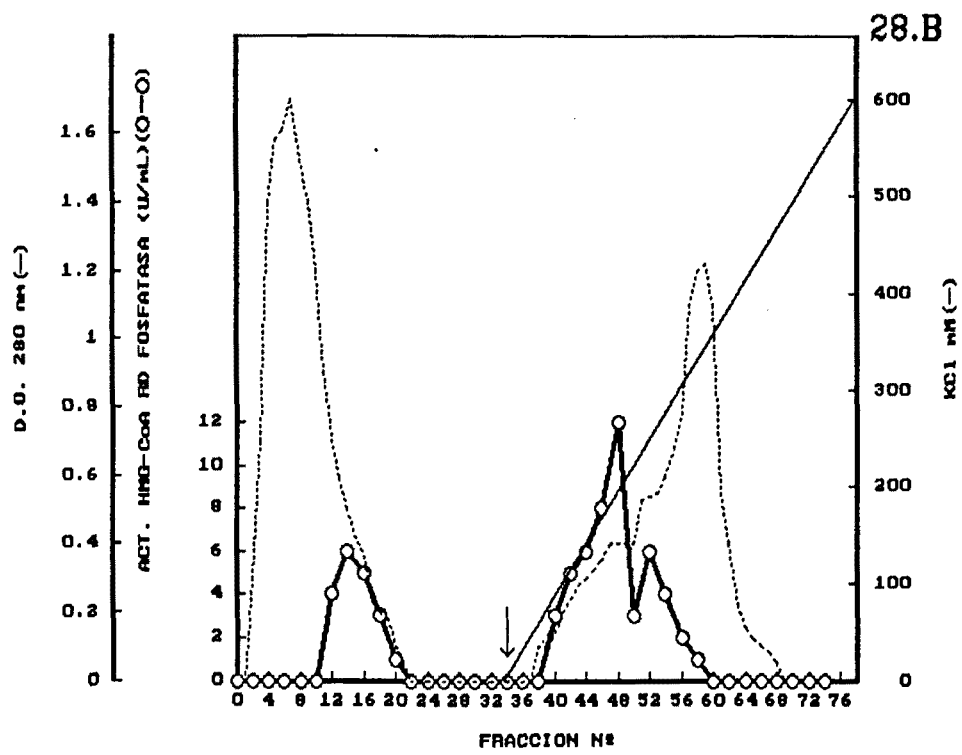
-A-

Los solubles obtenidos con KCl 500 mM, a partir de microsomas del hígado de 5 ratas, se cromatografiaron en una columna de DEAE-celulosa (2,5 x 6 cm), panel A, equilibrada con solución amortiguadora: sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tris/HCl pH 7,2, PMSF 0.1 mM, benzamidina 1 mM y mercaptoetanol 15 mM. En la posición que indica la flecha se inició un gradiente de KCl 0-600 mM (200 + 200 mL). Cada 8 minutos se recogieron fracciones de 8 mL, en éstas se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. En trazo discontinuo se representa la absorbancia leída a 280 nm.

-B-

Los microsomas solubilizados tres veces con KCl, se sometieron a un cuarto solubilizado en presencia de Triton X-100 0,1 %. El soluble obtenido se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa (5 x 1,5 cm). Se instauró un gradiente de (100 + 100 mL) entre 0 y 600 mM KCl, recogiendo fracciones de 4 mL cada 7 minutos. Se determinó la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, línea gruesa y círculos abiertos, y la absorbancia a 280 nm, representada en línea de puntos.





3.8.2 Cromatografía en Bio Gel A 0.5m de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada con KCl 0,5 M

La actividad solubilizada con KCl 0,5 M y excluida del DEAE-celulosa se cromatografió en Bio Gel A 0.5m (véase Figura 29.A.) El peso molecular aparente de esta actividad en gel filtración es de 55 kDa. No se observa ninguna otra actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en toda la cromatografía.

3.8.3. Disociación de la HMG-CoA reductasa fosfatasa M (85 kDa) con KCl. Cromatografía en Bio Gel A 0.5m

A una muestra obtenida de la solubilización de microsomas con Triton X-100 y excluida del DEAE-celulosa, como en el apartado 3.4.3, se añadió KCl sólido hasta una concentración final de 0,5 M. Se mantuvo durante 30 minutos a 4°C y se cromatografió en Bio-Gel A 0.5m en las mismas condiciones que en el apartado 3.8.2. El resultado se muestra en la Figura 29 B.

Puede observarse, por comparación de los paneles A y B, que los máximos de actividad PrP coinciden cuando la actividad ha estado en contacto con KCl 500 mM, ya sea como medida de solubilización, o una vez solubilizada con otro tratamiento. Interpretamos que la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M de 85 kDa se disocia en una subunidad de 55 kDa que coincide con la actividad solubilizada con KCl.

CROMATOGRAFIA EN BIO GEL A 0.5 m DE LAS ACTIVIDADES
HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA TRATADAS CON KCl 0.5 M

Figura 29

Se realizó una cromatografía de gel filtración en columna Biogel A 0.5 (82 x 5,5 cm), equilibrada con solución A, a la que se añadió NaCl hasta una concentración final de 100 mM. Se recogieron fracciones de 4,5 mL cada 10 minutos. Los marcadores utilizados fueron Blue-Dextran, aldehído deshidrogenasa, albúmina bovina, ovoalbúmina, inhibidor de tripsina de soja, mioglobina y dicromato potásico. La elución de los marcadores y sus pesos moleculares en kDa se indican con flechas en los volúmenes correspondientes de elución.

-A-

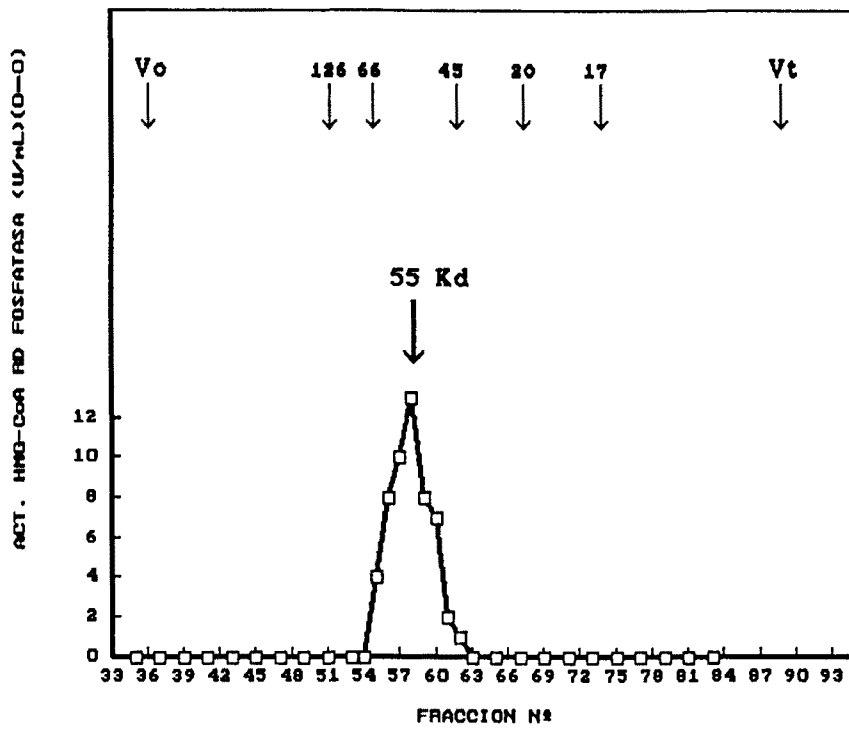
15 mL de la muestra excluida del DEAE-celulosa, del soluble de KCl 0,5 M, obtenida como se detalla en el apartado 3.6.7.1. se cromatografiaron en las condiciones descritas. La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa se representa en cuadrados vacíos.

-B-

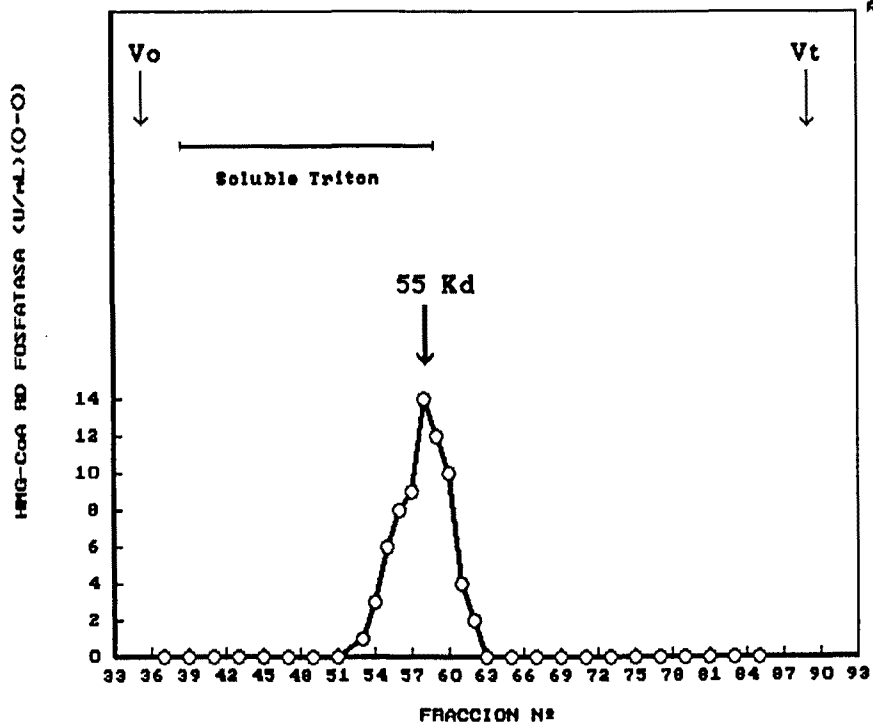
15 mL de la muestra excluida de la cromatografía en DEAE-celulosa, solubilizada con Triton X-100 y posteriormente tratada con KCl 0,5 M (véase apartado 3.4.2) se cromatografiaron en las mismas condiciones que en -A-, eluyendo en un solo pico de actividad con un máximo que coincide con el de la Figura 29.A y corresponde a un peso molecular aproximado de 55 kDa.

Si la muestra solubilizada con Triton y excluida del DEAE-celulosa era cromatografiada directamente, sin ser previamente disociada con KCl, la actividad eluida se repartía en un amplia zona próxima al volumen vacío, que se representa en -A- bajo el nombre "soluble de Triton".

29.A



29.B



3.8.4. Tripsinización de la subunidad disociada

Cuando las muestras procedentes del Bio-Gel A.05m, Figuras 29.A y 29.B son tratadas, bien con tripsina o precipitación acetónica, y de nuevo se someten a una cromatografía en gel filtración, en una columna de Biogel A 0.5m, tal como se indica en el apartado 3.7.2., en todos los casos se obtiene una actividad que eluye en un solo pico, al que corresponde un peso molecular aproximado de 35-37 kDa (gráfica no mostrada). Los perfiles de actividad son coincidentes con los presentados en la Figura 24.

4.- DISCUSSION

4.1. ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA EN EXTRACTOS INICIALES

Los dispares porcentajes recogidos en la bibliografía respecto a la distribución subcelular de las PrP (37)(174)(338) se deben, fundamentalmente, a los distintos tipos de ensayo, a la dilución de las muestras en el ensayo -lo que altera la actividad específica- y al tratamiento de los animales antes del sacrificio.

La variación de la actividad específica en extractos iniciales como efecto de la dilución se ha explicado por la presencia de metabolitos que inhiben específicamente a las PrP, o a su sustrato, cuando la actividad PrP se estudia indirectamente a través de variaciones de actividad del enzima sustrato Yang y col. (346), Ingebritsen y col. (174), Mvumbi y col. (244) (245). Por ello, en muchos trabajos se propone el eliminar estos metabolitos por diálisis o gel filtración de las muestras. Las variaciones de actividad específica también se han explicado como resultado de la disociación de la subunidad catalítica de subunidades moduladoras ó inhibidoras; una vez libre, la subunidad catalítica podría mostrar plenamente su capacidad enzimática. Un ejemplo bien documentado es la PrP 1_0 : al aumentar la dilución 25 veces (del 10% al 0,4%) la actividad se multiplica por tres, Bollen y col. (37). La presencia de metabolitos y/o subunidades moduladoras provocaría la ausencia de actividad PrP observada en extractos concentrados.

Los resultados presentados en el apartado 3.1. evidencian la importancia que tiene la dilución de las muestras en el ensayo para el cálculo de la actividad específica. Si las muestras se ensayan poco diluidas no se observa actividad PrP y a medida que aumenta la dilución aumenta la actividad específica. En las fracciones SPM y citosol es muy patente; en microsomas y glucógeno aunque de forma menos espectacular, la actividad también se incrementa al aumentar la dilución. Estos hechos han sido ya observados por Bollen y col. (37) para los sustratos glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa. La variación de actividad específica en función de la dilución se produce igualmente cuando las muestras se someten a desalado en columnas de gel filtración,

esto es, se eliminan los metabolitos que puedan incidir inhibiendo la actividad PrP. A altas diluciones el filtrado de las muestras no modifica la actividad ya que la incidencia de los metabolitos no es significativa.

En el diseño de los ensayos se plantean dos alternativas:

- a) llevar las muestras a diluciones que no se vean afectadas por los inhibidores de fosfatasa, o
- b) calcular los porcentajes para una dilución prefijada.

La primera opción tiene el inconveniente de que no se alcanza en las distintas fracciones una razonable meseta en la cual podamos asegurar que se estabiliza la actividad específica. En la segunda opción, el cálculo para una dilución prefijada plantea el dilema de elegir uno u otro porcentaje. De los resultados obtenidos para sustrato HMG-CoA reductasa, se concluye que la actividad PrP debe ensayarse diluída ya que muestras mas concentradas que a una dilución del 30% no muestran actividad PrP.

Tanto si se elige una u otra opción, la suma de porcentajes de actividad PrP en las fracciones citosol, microsomas y precipitado de glucógeno puede no ajustarse al 100% de la actividad en el SPM, pudiendo ser tanto superior (para diluciones altas) como inferior (para diluciones bajas). Otra alternativa en el cálculo de porcentajes de distribución es dar valor 100% a la suma de las fracciones C, M y G, y sobre este valor calcular el porcentaje para cada uno de los sumandos, propuesta que plantea el mismo inconveniente que la opción a) ya que la actividad específica en citosol aumenta al igual en el sobrenadante postmitocondrial.

Una razón más debe evaluarse cuando se diseñan los ensayos de HMG-CoA reductasa fosfatasa: la localización microsomal del sustrato. Una elevada concentración de HMG-CoA reductasa en el ensayo inhibe la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. Cuando la actividad PrP se mide en microsomas interesa que la aportación de sustrato endógeno sea mínima, y controlar la concentración de HMG-CoA reductasa presente en el ensayo.

En este trabajo hemos decidido llevar las muestras a dilución infinita, esto es, la máxima dilución de la muestra que permite el ensayo, manteniendo para cada subfracción la misma dilución. De esta forma, si el aumento de actividad se debe a la disociación de una actividad catalítica responsable de la acción fosfohidrolasa, la disociación será mayor cuanto más enzima esté presente. Si hay más actividad, ésta sólo puede producirse si hay subunidades catalíticas capaces de disociarse. Esta elección presenta el inconveniente, como ya hemos dicho, de que la suma de actividades puede no coincidir con el 100 % inicial, y también la limitación de que la contribución de otras subunidades reguladoras no puede ser valorada si la dilución provoca su separación. Al diluir las muestras nos alejamos de las condiciones fisiológicas, pero si las muestras no son diluidas no se puede determinar actividad PrP.

4.2. LOCALIZACION SUBCELULAR DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA

Una de las principales dificultades que plantea la localización de proteínas en el retículo endoplasmático, es el hecho de que cuando se aíslan microsomas, además de retículo endoplasmático, éstos contienen también fragmentos de aparato de Golgi, membranas plasmáticas, pequeñas vesículas y cantidades variables de glucógeno, dependiendo de las condiciones de los animales y de la técnica utilizada en la homogeneización de los tejidos. Si la proteína en estudio presenta una distribución múltiple: citosol, microsomas y glucógeno, la obtención de fracciones no contaminadas es esencial, y con mayor relieve si la actividad en una de estas fracciones es varias veces superior a las demás. En estudios previos a este trabajo la contaminación por proteínas procedentes de membranas plasmáticas había sido desechada ya que el seguimiento del marcador de membranas plasmáticas, 5-nucleotidasa, evidenciaba que los microsomas no contenían cantidades apreciables de este enzima. Nos propusimos desear la posibilidad de contaminación por proteínas de origen citosólico o del precipitado glucógeno-proteico.

4.2.1. Contaminación de los microsomas con proteínas citosólicas y proteínas adheridas

Las membranas microsomales poseen una elevada densidad de carga asociada a la superficie y durante el proceso de aislamiento una cantidad significativa de proteínas básicas citosólicas se liga a la superficie, contribuyendo a la cantidad de proteína microsomal total. En el proceso de aislamiento, un 30% de la proteína total se debe a proteínas adsorbidas y un 15 % a proteína luminal Daller (80). Uno de los tratamientos propuestos para eliminar proteínas adheridas y evitar agregados microsomales es tratar los microsomas con quelantes como el EDTA y/o con sales como el KCl, (85)(155).

En nuestro caso, la eliminación de proteínas citosólicas y adheridas a los microsomas con lavados salinos ha puesto de manifiesto que la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa

se solubiliza fácilmente, lo que permite concebir dudas sobre si se trata de una proteínas microsomal. El seguimiento de una actividad marcadora de citosol, LDH, en el subfraccionamiento celular, evidencia que tras el primer lavado, el porcentaje de distribución en microsomas de la LDH es significativamente menor que la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa. Con anterioridad a este trabajo, el seguimiento de otra actividad marcadora de citosol, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, había conducido al mismo resultado. La distribución de actividades en el gradiente lineal de sacarosa incide en la misma conclusión, la actividad presente en microsomas no se debe a contaminación por proteínas citosólicas.

4.2.2. Contaminación de los microsomas por glucógeno

Los trabajos de Mvumbi y Stalmans (246) muestran que la actividad procedente del glucógeno endógeno tiene elevada afinidad por el glucógeno exógeno, uniéndose a él de forma poco usual, ya que concentraciones de 0,25 mg/mL unen fuertemente el 50% de la actividad PrP cuando se ensaya sobre sustrato glucógeno sintasa, siendo necesarias concentraciones 10 veces superiores para otros enzimas unidos a glucógeno, como glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa. Hay evidencias indirectas de que la unión al glucógeno es aún más eficaz en caso del llamado glucógeno beta, constituido por pequeñas partículas, que son las que contaminan preferentemente a los microsomas (54)(55). Por ello se hace necesario considerar la presencia de glucógeno en las preparaciones utilizadas.

Para lograr microsomas libres de glucógeno se han seguido distintas estrategias:

- 1.- Trabajar con hígado de rata depleccionado de glucógeno "in vivo", de forma que las reservas de glucógeno disminuyan de forma sustancial, ya sea por ayuno prolongado de 24 horas: Tan y Nutall (321); Margolis (223); Schelling y col. (294) o por un ayuno de 12 ó 24 horas más administración de glucagon media hora antes del sacrificio, Mvumbi y Stalmans (246).

2.- La disminución de glucógeno se inicia "in vivo" por ayuno de 24 horas y se prosigue "in vitro" con un tratamiento amiloglucolítico Mvumbi y Stalmans (246).

3.- Dado que las anteriores propuestas modifican el estado nutricional y/o hormonal del animal, en tejidos como músculo esquelético, con baja concentración de glucógeno, otros autores prefieren obtener microsomas de animal alimentado y proceder a la eliminación de glucógeno exclusivamente "in vitro" por la acción de la α -amilasa, Villa-Moruzzi y col. (339).

En este trabajo hemos estudiado las distintas opciones:

1. Cuando se disminuye la concentración de glucógeno por ayuno de 24 horas, no se ve afectada ni la actividad en el sobredanante postmitocondrial ni la distribución subcelular, si bien los microsomas contienen una cantidad de glucógeno superior al 0,5 mg/mL, lo que no permite excluir la contaminación por proteínas con alta afinidad por el glucógeno, como es el caso de la PrP 1₀.

2.- Si se opta por tratar las ratas con glucagon tras ayuno de 24 horas, se constata que en el SPM la actividad total no varía, datos que coinciden para la distribución de actividad de glucógeno sintasa fosfatasa y glucógeno fosforilasa fosfatasa descritos por Mvumbi y Stalmans (246), pero sin embargo se ve alterada la distribución subcelular. Si el glucógeno que aún acompaña al precipitado microsomal es eliminado "in vitro" con α -amilasa, la actividad que aún permanece asociada a las microsomas disminuye en más del 50%, si bien parte de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa permanece unida a los microsomas.

3.- Si se elige disminuir la concentración de glucógeno únicamente por tratamientos amiloglucolíticos "in vitro", hay una pérdida de aproximadamente el 50% de la actividad

unida a microsomas, que podría considerarse consecuencia de la eliminación de glucógeno.

El descenso de la actividad unida a microsomas de forma conjunta a la eficaz disminución de glucógeno plantea la duda de saber si nos encontramos realmente ante una proteína microsomal o de una contaminación por proteínas unidas al glucógeno. Cuando la separación del precipitado microsomal y del glucógeno se realiza por centrifugación en gradiente continuo o discontinuo de sacarosa, otro tipo de dificultad técnica se suma al estudio de la localización de las PrP: las proteínas unidas o acomplejadas con el glucógeno se disocian de éste cuando se someten a un gradiente de sacarosa. Ello provoca la distribución a lo largo del gradiente de las proteínas acomplejadas por el glucógeno. Estas observaciones están descritas tanto para tejido muscular como hepático, Wanson y Drochmans (344).

El dilucidar si la actividad es intrínseca a microsomas o se debe a glucógeno ha sido resuelto esencialmente a través de técnicas de centrifugación en gradiente de sacarosa y de la solubilización de las actividades a partir de microsomas y de glucógeno como detallamos a continuación.

4.3. LA ACTIVIDAD ASOCIADA A MICROSOMAS ES DISTINTA DE LA ASOCIADA A GLUCOGENO

La primera aproximación a la supuesta identidad de las actividades PrP relacionadas con microsomas y glucógeno es la comparación de los porcentajes de distribución subcelular; los resultados orientan a una doble localización: la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en microsomas es ligeramente superior a la del precipitado de glucógeno, siendo por ello difícil argumentar que la presencia de actividad en microsomas se deba únicamente a una contaminación por glucógeno y viceversa, ya que la contaminación (una parte) sería tan importante como el todo. También debe considerarse que aunque el ayuno de 24 horas no elimina totalmente el glucógeno hepático, sí lo disminuye eficazmente y sin embargo no se modifican los porcentajes de distribución subcelular, lo que de nuevo indica un doble origen.

4.3.1. Centrifugación en gradiente lineal de sacarosa

La utilización de técnicas de centrifugación en gradiente lineal de sacarosa, en presencia de 10 mM EDTA y KCl 500 mM con el fin de evitar agregados y eliminar las proteínas adheridas, provoca desprendimiento de los ribosomas, pérdida de densidad y con ello un acercamiento de la fracción microsomal al citosol.

En nuestro caso la presencia de KCl favorece la pérdida de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en microsomas, hecho consecuente con los resultados obtenidos en la solubilización.

Cuando los gradientes se realizan únicamente en presencia de 10 mM EDTA, la utilización de marcadores de microsomas (glucosa-6-fosfatasa, HMG-CoA reductasa) y la determinación de RNA, nos ha permitido evidenciar que la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa se localiza y presenta unos máximos en las fracciones microsomales, que no pueden atribuirse a un arrastre de proteínas unidas a glucógeno ni tampoco a proteínas contaminantes de citosol. La presencia de actividad HMG-CoA reductasa

fosfatasa, tanto a densidades correspondientes a retículo endoplasmático liso como rugoso, que coinciden con la distribución de RNA, permiten deducir una localización doble de la HMG-CoA reductasa fosfatasa, REL/RER.

4.3.2. Pautas de solubilización

Las proteínas que están relacionadas con el retículo endoplasmático se clasifican, en función de los requerimientos de solubilización, en proteínas periféricas y proteínas integrales DePierre y Dallner (85). Las proteínas intrínsecas o integrales (citocromo b_5 , NADH-citocromo b_5 reductasa, glucosa-6-fosfatasa, HMG-CoA reductasa y otras) precisan de elevada concentración de detergentes o de métodos drásticos para ser solubilizadas. Las proteínas periféricas (β -glucuronidasa, nucleósido difosfatasa) se solubilizan por métodos menos drásticos como son baja concentración de detergente, sonicación o tratamiento con hidróxido amónico.

Cuando procedemos a solubilizar la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, ésta se solubiliza eficazmente con Triton X-100 a baja concentración, si bien su uso no es imprescindible, ya que el lavado con solución de baja molaridad en sal es suficiente para solubilizar la mayor parte de la actividad. Otros autores han descrito que lavados sucesivos con 0,1 M KCl (339) ó 0.5 M KCl (10) son suficientes para obtener más del 90% de la actividad glucógeno fosforilasa fosfatasa unida a la fracción microsomal. La facilidad con que se solubiliza la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa indica que no se trata de un enzima integral de membrana.

Si microsomas obtenidos a partir de ratas tratadas con glucagon se someten a solubilización, de nuevo el tratamiento con detergentes se muestra mejor método que el tratamiento amiloglucolítico. El tratamiento con α -amilasa permite solubilizar sólo el 50% de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, quedando unido a los microsomas otro 50%, tanto en las muestras tratadas con α -amilasa como en los controles, lo que demuestra que la

actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa no se solubiliza por acción de la desaparición de glucógeno sino simplemente por un proceso de disociación o proteólisis causada por la dilución y el lavado de los microsomas, ya sea en presencia o ausencia de α -amilasa. Los mismos resultados se obtienen con ratas alimentadas.

Los solubilización del precipitado de glucógeno obtenido en este trabajo concuerdan con los obtenidos por otros grupos: el mejor método para solubilizar la actividad del glucógeno es el tratamiento amiloglucolítico. Ingebritsen y col. (174) describen que la actividad fosforilasa fosfatasa unida al glucógeno es solubilizada entre 80-90% con α -amilasa mientras los controles producen una solubilización del 20%. Solubilizaciones con α -amilasa del pellet de glucógeno realizadas a 40C durante 60 minutos por Alemany y col. (10) producen una total solubilización de la actividad, siendo del 30-50% cuando se extrae con 500 mM KCl. Los mismos datos son aportados por Schelling y col. (294).

Con estos resultados se evidencia que los requerimientos de solubilización de la actividad PrP en ambas localizaciones son distintos y con ello se concluye que deben tratarse de proteínas de origen distinto.

4.3.3. Otras evidencias

Los distintos comportamientos cromatográficos de las actividades excluidas del DEAE-celulosa de origen microsomal y de glucógeno favorecen la conclusión de que estas actividades se deben a proteínas distintas.

La falta de afinidad por el glucógeno de las proteínas solubilizadas de microsomas contribuye a argumentar que las proteínas no se deben a contaminación por glucógeno, ya que pequeñas cantidades de glucógeno exógeno se unen fuertemente a la actividad PrP 1, procedente del glucógeno inicial posteriormente solubilizado.

De los distintos argumentos presentados concluimos que como resultado de las razones siguientes:

- a.- Las distintas pautas de solubilización en microsomas y glucógeno
- b.- La aparición de máximos de actividad coincidentes con marcadores microsomales en gradientes de sacarosa
- c.- La falta de afinidad por el glucógeno de la actividad de origen microsomal
- d.- El distinto comportamiento cromatográfico de la actividad procedente de microsomas o de glucógeno

es necesario distinguir dos actividades HMG-CoA reductasa fosfatasa, una unida a microsomas y otra unida a glucógeno. Recientemente Schelling y col. (294), han llegado a las mismas conclusiones.

Nos encontramos ante una proteína relacionada con microsomas, que no es contaminación citosólica ni del complejo glucógeno proteico, cuya facilidad en desprenderse de los microsomas puede explicarse por disociación de una subunidad catalítica de otra de anclaje a los microsomas, esta última sin actividad PrP.

4.4. PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD MICROSOMAL

4.4.1. Elección de la actividad excluida del DEAE-celulosa

Con anterioridad a este trabajo, en nuestro Laboratorio se puso a punto un proceso de purificación de las actividades HMG-CoA reductasa fosfatasa excluida y retenida del DEAE-celulosa, procedente de microsomas, Sitges y col. (303). Estas actividades no habían sido clasificadas. Al iniciar los trabajos de esta memoria, clasificamos, por criterios de sensibilidad al inhibidor 2 y a proteínas básicas, las actividades parcialmente purificadas (ensayos que no se muestran). La actividad excluida del DEAE-celulosa y parcialmente purificada por Sitges y col. (303) ha sido clasificada como tipo 1. La actividad retenida por el DEAE-celulosa da lugar, en sucesivos pasos de purificación, a dos actividades I_m y II_m clasificadas como PrP tipos 1 y 2. Estos resultados se han visto confirmados por los datos obtenidos en la clasificación de las actividades en el DEAE-celulosa, que se muestran en el correspondiente apartado de esta Tesis.

La actividad PrP unida a microsomas ha sido considerada esencialmente como actividad tipo 1, cuando se han utilizado glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa como sustratos Alemany y col. (10), Mieskes y col. (238). Cuando se utiliza HMG-CoA reductasa como sustrato, hemos demostrado que tanto las actividades PrP 1 como las 2A y 2C microsomales pueden contribuir significativamente a la desfosforilación del sustrato HMG-CoA reductasa. Otros autores proponen que las PrP 2A y PrP 2B pueden contribuir de forma importante en la actividad PrP localizada en microsomas obtenidos de linfocitos T (11). Aunque no se ha detectado la presencia de PrP 2B en microsomas de hígado de rata, se ha demostrado que la HMG-CoA reductasa homogénea es sustrato de esta PrP (con anterioridad siempre se había utilizado el sustrato unido a microsomas). Además de la ya descrita PrP 1, la presencia en microsomas de hígado de rata de PrP 2A y 2C con elevada actividad sobre el sustrato HMG-CoA reductasa, es de gran interés, ya que esta proteína es fosforilada por varias proteínas quinasas (proteína quinasa activable por AMP, proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina y proteína quinasa C) (la proteína quinasa dependiente de AMPc no fosforila la HMG-CoA reductasa). La pre-

sencia de varias fosfatasa permitiría revertir selectivamente la acción de estas quinasas.

La actividad tipo 2A que aparece en el lavado del DEAE-celulosa se pierde en el proceso de purificación, y la actividad PrP 2C no copurifica con la actividad PrP 2A, ya que no puede ser detectada en los ensayos por falta de cationes divalentes.

De las actividades cromatografiadas en DEAE-celulosa, se elige la actividad excluida, por ser tipo 1, considerada como la principal actividad asociada a microsomas. La actividad tipo 1 retenida en el DEAE-celulosa es cuantitativamente menor y de inferior peso molecular (ensayos no presentados en esta memoria), por lo que cabe la posibilidad de que se trate de un fragmento de la actividad PrP 1 excluida. La elección del excluido tiene la ventaja adicional de que la actividad parece estar constituida por un solo tipo de PrP, ya que no hay actividad PrP 2A, 2B ni 2C.

4.4.2. Purificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M

El primer objetivo fue purificar a homogeneidad la actividad excluida del DEAE-celulosa. Para ello se siguió un proceso de purificación basado esencialmente en el puesto a punto en nuestro Laboratorio, introduciendo las siguientes modificaciones:

- a) Se elimina la tercera solubilización con Triton X-100, manteniendo únicamente dos solubilizaciones. La tercera solubilización se realizaba durante 12 horas, lo cual retrasaba el proceso de purificación y el aporte de actividad era insignificante respecto a la pérdida de actividad específica.
- b) La cromatografía en DEAE-celulosa se sustituye por un "batch", lo que junto a la eliminación del tercer paso de solubilización permite ahorrar un día en el proceso de purificación.

- c) Se introduce una cromatografía en poli-L-lisina-Sepharosa 4B, lo que permite llegar purificar a aparente homogeneidad la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M.

Otros soportes cromatográficos utilizados no han permitido mejorar la purificación, entre ellos: hidroxapatita, protamina-Sepharosa, carboximetilcelulosa, Blue-Sepharosa, DEAE-Sephadex A-50. El cromatoenfoque se ha mostrado eficaz, pero tan sólo si se utiliza en pasos iniciales, ya que en los últimos pasos no es posible proseguir por la poca actividad recuperada.

A medida que avanza la purificación y se eliminan proteínas acompañantes, se provoca pérdida de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, posiblemente por aumento de la inestabilidad del enzima. Los intentos por mejorar la estabilidad con glicerol no han sido positivos, sin embargo sí lo es la inclusión de albúmina bovina en concentraciones de 0,3-0,5 mg/mL, lo que evidentemente no puede ser utilizado si pretendemos llegar a una muestra homogénea.

La purificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M conduce a la obtención de una preparación aparentemente homogénea. Cuando la actividad cromatografiada en gel filtración, de peso molecular de 85 kDa, es analizada en geles de acrilamida en presencia de SDS y teñida por Coomasie Blue, aparecen dos proteínas de pesos moleculares de 48 y 54 kDa. La subunidad de 54 kDa corresponde a la subunidad con actividad catalítica, ya que aun cuando en el proceso de purificación a causa de factores incontrolados (posiblemente una excesiva salinización de las muestras) se obtiene una actividad en gel filtración de 60 kDa, en geles de SDS aparece únicamente una banda de aproximadamente 54 kDa. Por ello, la proteína que aparece en 48 kDa consideramos es la subunidad de anclaje. A la subunidad de anclaje debería corresponder, por diferencia de 55 a 85 kDa, un peso de 30 kDa. El mayor peso aparente en geles de SDS indica que puede tratarse de una proteína muy asimétrica.

No deja de ser sorprendente la falta de una banda de peso molecular de 35-37 kDa, correspondiente a la subunidad catalítica de la PrP 1. Caben dos opciones: aceptar que las bandas que aparecen cercanas a 50 kDa son proteínas contaminantes y que las proteínas con actividad, por minoritarias, no se visualizan con la tinción con Coomasie, o bien que la actividad presente en microsomas no tiene por qué comportarse y tener las mismas subunidades que la PrP 1 purificada de citosol y glucógeno.

No es posible excluir taxativamente el primer planteamiento. Debido a la escasa actividad de la muestra final, la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M no puede ser detectada en geles en condiciones no denaturantes. En apoyo del segundo planteamiento -no se trata de una contaminación- cabe aducir que si durante el proceso de purificación se pierde una de las subunidades sin actividad y en consecuencia la actividad en gel filtración se presenta en una proteína con un peso molecular de 55-60 kDa, en el análisis electroforético se advierte una sola banda de 54 kDa.

La actividad catalítica podría corresponder a una subunidad de peso molecular elevado, que por rotura (tripsina, etanol o precipitación con acetona) produce un fragmento proteolítico de 35-37 kDa con menor de actividad catalítica. La unión de este fragmento con actividad catalítica a otra cadena polipeptídica, de mayor o menor tamaño, sin actividad catalítica por sí misma, permitiría expresar la actividad PrP sobre sustrato HMG-CoA reductasa. La unión debería ser covalente ya que no se separan en geles en presencia de SDS. Existen antecedentes de actividades catalíticas de mayor peso molecular como la PrP 2C, cuyos isoenzimas tienen 42 y 44 kDa respectivamente, donde los intentos de fragmentación conducen a la pérdida de actividad PrP. También Goris y Merlevede (139) purifican una proteína fosfatasa que presenta dos bandas en geles de acrilamida/SDS, una de ellas de 75 kDa, que puede tener actividad proteína fosfatasa. Existe consenso en que la subunidad catalítica no se encuentra libre "in vivo" y siempre está unida a una o más subunidades. En esta línea está el trabajo de Brautigan y col. (43), en el que se propone que la actividad catalítica puede proceder de una subunidad de 70

kDa. Las diferencias de criterio residen fundamentalmente en si la unión de la subunidad catalítica a otras subunidades es suficientemente fuerte para superar las condiciones denaturantes de los geles de acrilamida/SDS.

Los estudios de biología molecular coinciden en que hay diversas subunidades catalíticas tipo 1 (1 α y 1 β) y 2A (2A α y 2A β) de 35 y 37 kDa. Recientemente Alexandre y col. (11) aprecian en geles de acrilamida-SDS una proteína de 40 kDa reconocible por anticuerpos específicos frente a PrP 2A, distinta de las subunidades 2A α y 2A β , que podría ser uno de los productos de la familia de genes relacionados con la subunidad descrita por Stone y col. (317). El reciente descubrimiento de una nueva subunidad catalítica X, con homología tanto con las catalíticas tipo 1 como tipo 2 permite aventurar que en un futuro puedan describirse otras nuevas.

4.5. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M UNIDA A MICROSOMAS

4.5.1. Clasificación

La utilización del inhibidor 2 como herramienta de clasificación de las PrP en dos grandes grupos, 1 y 2, en función de su alta o baja sensibilidad a esta proteína, ha permitido avanzar en el conocimiento de las PrP, si bien la limitación que supone cualquier clasificación ha debido relajarse a medida que se han ampliado los conocimientos, sucediéndose subclasificaciones que han permitido recalificar actividades ya descritas que no se comportan de forma estricta, en especial en lo que hace referencia al inhibidor 2. Por otro lado, los estudios de biología molecular han permitido evidenciar las similitudes y las diferencias entre las PrP 1 y 2.

Podemos concluir que la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa solubilizada a partir de microsomas y excluida del DEAE-celulosa, que denominamos HMG-CoA reductasa fosfatasa M, no está contaminada por PrP 2B o PrP 2C. El comportamiento de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa frente al inhibidor 2 la distingue de la PrP 2A y descarta esta opción, aunque tampoco muestra la elevada sensibilidad de las PrP 1 citosólicas. La falta de sensibilidad de la proteína purificada al inhibidor 2 puede considerarse como una característica propia de la PrP 1 microsomal, pero cabe la posibilidad de que nos hallemos frente a una actividad PrP 1 contaminada por PrP 2A. Los ensayos con protamina, proteína que reactiva las PrP 2A, confirman que la falta de sensibilidad frente al inhibidor 2 no se debe a contaminación por PrP 2A, puesto que no se produce reactivación alguna en presencia de dicha proteína básica.

Tras los resultados obtenidos frente al inhibidor 2, concluimos que nos hallamos frente a una PrP tipo 1 con menor sensibilidad al inhibidor 2 que la subunidad catalítica citosólica tipo 1. Otras actividades PrP con poca sensibilidad frente al inhibidor 2 han sido clasificadas como tipo 1, así se ha descrito que la actividad PrP 1G que es conocida como actividad tipo 1 se comporta con menor sensibilidad frente al inhibidor 2 que la

PrP 1 citosólica, precisando mayores cantidades de inhibidor 2 que la HMG-CoA reductasa fosfatasa M. También la PrP 1 unida a miosina presenta poca sensibilidad al inhibidor 2 (271).

4.5.2. Ensayos de proteólisis y reactivación

El tratamiento de la actividad PrP 1 citosólica con tripsina provoca la destrucción del inhibidor 2 y en consecuencia un marcado incremento de la actividad fosforilasa fosfatasa ; la reactivación es menor en microsomas obtenidos de músculo de conejo y de hígado de rata; el mismo tratamiento provoca pérdida de actividad glucógeno sintasa fosfatasa en las mismas fracciones, Alemany y col. (10), Bollen y col. (37).

El distinto comportamiento de las formas de bajo peso molecular, tras la tripsinización, frente a fosforilasa y glucógeno sintasa ha conducido a dar dos interpretaciones del fenómeno. Por un lado Alemany y col. (9) consideran que existe una única subunidad catalítica tipo 1, que desfosforila la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa D, y que ambas actividades se ven afectadas de forma opuesta por el tratamiento con tripsina; la pérdida de un pequeño fragmento de 4 kDa (por el paso de la forma de 37 a 33 kDa) produciría aumento de la actividad fosforilasa fosfatasa, lo que supondría que en dicho fragmento reside una zona de supresión de la máxima actividad fosforilasa fosfatasa, y la pérdida de actividad glucógeno sintasa fosfatasa. Por otro, para Bollen y col. (37) estos distintos comportamientos residirían o bien en distintos enzimas o bien en que además de la subunidad catalítica la PrP requiere una subunidad específica necesaria en el reconocimiento del sustrato glucógeno sintasa, que es destruido en el proceso proteolítico: la presencia de la subunidad específica disminuye la actividad fosforilasa fosfatasa, antes de que se produzca la rotura.

De los resultados obtenidos en este trabajo, referidos a la tripsinización de las PrP microsomales cuando se ensaya sustrato HMG-CoA reductasa, se constata una gran pérdida de actividad, que no se recupera cuando la tripsinización se realiza en presencia de Mn^{2+} . La pérdida se produce igualmente

cuando se utiliza la precipitación con acetona o etanol. Los resultados presentados para la actividad excluida del DEAE-celulosa coinciden con los obtenidos para las actividades retenidas, tanto cuando se procede a precipitar con acetona como con etanol.

Esta pérdida de actividad es característica de las fosfatasas microsomales con sustrato HMG-CoA reductasa, ya que las citosólicas con sustrato HMG-CoA reductasa se comportan de forma distinta. Así pues, la pérdida de actividad estaría determinada por la procedencia del enzima y por el sustrato utilizado. La unión de la subunidad de 37 kDa de origen microsomal al sustrato HMG-CoA reductasa puede requerir un reconocimiento muy preciso que puede residir en la cadena polipeptídica que se pierde por la tripsinización. Consecuentemente, la rotura de dicha cadena ocasiona la pérdida de actividad.

Los ensayos de calentamiento a 100°C evidencian que en las PrP microsomales no se encuentra presente inhibidor 2.

Fallan tanto los ensayos de reactivación con Mn^{2+} y tripsina como los de GSQ-3 y ATP-Mg, cosa que también sucede con otras proteínas fosfatasas clasificadas de tipo 1, como la PrP 1G de músculo esquelético reportada por Khatra y col. (192).

Los distintos ensayos de caracterización muestran que nos encontramos ante una PrP que puede ser clasificada como PrP 1 con criterios amplios y que no sigue el modelo molecular de PrP 1 citosólica descrito por Villa-Moruzzi. Esta proteína fosfatasa se acerca más al modelo de la procedente del glucógeno en cuanto está formada al menos por una subunidad catalítica y una subunidad de anclaje, no conteniendo la subunidad moduladora o inhibidor 2. Sin embargo, reconoce esta subunidad moduladora al igual que las PrP 1 citosólica y de glucógeno.

4.5.3. Especificidad de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa

La falta de especificidad "in vitro" mostrada por la proteína purificada, no impide que por su localización esté involucrada específicamente en procesos de desfosforilación de proteínas microsomales. Recientemente Diven y col. (86), solubilizando la actividad PrP de microsomas con detergente, advierten que tras la cromatografía en DEAE-celulosa parte de la actividad es excluida del DEAE-celulosa y parte es retenida, hecho ya reportado por nosotros en anteriores trabajos. El interés del trabajo de Diven y col. radica en la utilización de HMG-CoA reductasa y de otros dos enzimas fosforilados involucrados en el metabolismo del colesterol: ACAT y colesterol 7- α -hidrolasa, que al igual que la HMG-CoA reductasa están localizados en el retículo endoplasmático (la ACAT se encuentra localizada exclusivamente en el RER). Demuestran los citados autores que las PrP localizadas en microsomas desfosforilan estos sustratos con distinta especificidad y que la actividad excluida del DEAE-celulosa no es activa sobre la colesterol-7- α -hidrolasa, mientras que las actividades retenidas del DEAE-celulosa tienen distinta especificidad para cada sustrato.

La ausencia de una actividad específica para el sustrato HMG-CoA reductasa no afecta tan solo las PrP sino también a las PrQ. La HMG-CoA reductasa quinasa activable por AMP, purificada en nuestro Laboratorio, se ha mostrado eficaz sobre otros sustratos del metabolismo lipídico: acetil-CoA carboxilasa y lipasa sensible a hormonas, HSL (145).

La falta de especificidad "in vitro" de PrP y de PrQ subraya la importancia de ciertos efectores, como AMP y AMPc, sensibles a variaciones hormonales, y que podrían afectar simultáneamente y de forma contrapuesta las actividades PrP y PrQ. Paralelamente, la descripción de nuevas subunidades acompañantes de las PrP, que inciden directamente sobre su la actividad, como son el inhibidor 2, el desinhibidor o el descubierto en nuestro Laboratorio -RP inhibidor- indican que estas subunidades pueden tener importancia no sólo en la localización sino además en la

modulación de la actividad, permitiendo, junto a la presencia de los efectores, la deseada especificidad "in vivo".

4.6. EL GLUCAGON Y LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA

En este trabajo el tratamiento con glucagon ha sido utilizado para disminuir de forma drástica la contaminación de los microsomas por glucógeno, y para ello se ha seguido el método propuesto por Mvumbi y Stalmans (246).

Las actividades marcadoras LDH y glucosa-6-fosfatasa no se ven poco afectadas por el tratamiento con glucagon, resultados suficientemente conocidos (246)(13). El mantenimiento de la actividad PrP sobre sustrato HMG-CoA reductasa y glucógeno fosforilasa está en la línea de los resultados publicados por Mvumbi y Stalmans (246) para sustrato glucógeno sintasa.

Según Toth y col. (326), la dilución de las muestras puede condicionar los resultados. La actividad glucógeno sintasa fosfatasa no se modifica, pero la actividad fosforilasa fosfatasa disminuye en un 20%, variación que nosotros no hemos apreciado en nuestras condiciones de ensayo. Esta divergencia puede deberse a la distinta dilución de las muestras, menor del 10% en nuestro caso y del 30% en el ensayo de Toth y col. ya que la respuesta hormonal podría estar mediada por efectores citosólicos no cuantificables cuando las muestras se diluyen al 10%.

En los ensayos de centrifugación en gradiente lineal de sacarosa, el seguimiento del marcador microsomal HMG-CoA reductasa, sustrato de nuestro enzima, evidencia que el tratamiento con glucagon modifica su distribución: la actividad se desplaza de microsomas a citosol, lo que confirma lo señalado por otros autores respecto a la disminución de actividad HMG-CoA reductasa por acción del glucagon. La disminución de actividad es probablemente mediada por la fosforilación del enzima, lo que provoca su hidrólisis y solubilización desde el retículo endoplasmático al citosol. En este aspecto el experimento es original y contribuye a apoyar esta hipótesis.

La administración de glucagon provoca disminución de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa en la fracción microsomal. Esta disminución podría contribuir a que la fosforilación de la

HMG-CoA reductasa no se viera rápidamente contrarrestada, al tiempo que una disminución de actividad PrP implica menor posibilidad de que el sustrato se encuentre en su forma activa y así la acción del glucagon disminuye la actividad HMG-CoA reductasa doblemente. La disminución de actividad PrP sobre sustrato HMG-CoA reductasa, en microsomas, coincide con los resultados publicados por Mvumbi y Stalmans (246), para sustrato glucógeno sintasa, en los que la actividad PrP disminuye del 52%, en ratas alimentadas, al 11% en ratas depleccionadas de glucógeno. La disminución del glucógeno presente en microsomas no debe ser, necesariamente, la causa del descenso de actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa.

Si las variaciones son debidas a cambios en la membrana microsomal, provocados directa o indirectamente por cambios de concentración de glucógeno, o se deben, como en el caso de la HMG-CoA reductasa, a una traslocación de actividad de uno a otro compartimiento, es una cuestión que no puede contestarse. Si la administración de glucagon provoca una traslocación de actividad de microsomas a citosol, el efecto sería difícilmente cuantificable, ya que el citosol se ve enriquecido al mismo tiempo por la actividad liberada por la hidrólisis del glucógeno.

El estudio en profundidad de la acción del glucagon sobre la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa, requeriría un estudio "in vivo" y la ayuda de técnicas de investigación con anticuerpos específicos frente a la cada una de las subunidades catalíticas y otras subunidades presentes en microsomas y también la valoración de posibles efectores que modifiquen directamente la actividad PrP.

Al variar las condiciones del tratamiento de glucagon y dejar transcurrir tan sólo 5 minutos desde la administración a la toma de muestras las actividades glucógeno fosforilasa fosfatasa y glucógeno sintasa fosfatasa en las fracciones (microsomas + glucógeno), no se ven afectadas. El tiempo transcurrido desde la administración de glucagon hasta la valoración enzimática es fundamental en el estudio de la acción hormonal sobre la actividad PrP (326)(100).

El cambio de la estructura y/o la función del retículo endoplasmático frente a la presencia de glucógeno ha sido estudiado por Cardell. Este autor (54)(55) propone un modelo en que relaciona de forma activa el retículo endoplasmático con la síntesis de glucógeno, principalmente en los primeros estadios de la formación de glucógeno y también en las fases de deplección. Tras la absorción de glucosa por la sangre, los hepatocitos responde formando retículo endoplasmático liso; cuando las reservas de glucógeno son suficientes se alcanzan los niveles mas bajos de retículo endoplasmático. Así, el ciclo de formación y degradación de glucógeno estaría ligado al de proliferación o disminución del retículo endoplasmático liso.

Cardell (54), acuña la denominación SERGE, para definir el área donde se iniciaría la deposición de glucógeno. A través de micrografías se ponen de manifiesto pequeñas zonas de citosoma ricas en retículo endoplasmático liso y con alta concentración de pequeñas partículas densas, presumiblemente glucógeno en diversos estados de formación. El aumento de tamaño de estas partículas llevaría a la posterior formación de partículas de glucógeno β y α . Estas áreas SERGE podrían generar o retener sustratos de interés en la síntesis de glucógeno.

Como ya hemos descrito en la introducción, un gran número de enzimas relacionados con el metabolismo del colesterol son proteínas ligadas a membranas. Sin embargo de todos los enzimas que directa o indirectamente están implicados en el metabolismo del glucógeno, tan solo la glucosa-6-fosfatasa está inequívocamente ligada al retículo endoplasmático. Enzimas como glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa y fosforilasa quinasa aparentemente no tienen relación con este orgánulo. De ahí el interés de los trabajos de Cardell al relacionar retículo endoplasmático y glucógeno en formación, ya que se crearía un microambiente en el que las proteínas microsomales, en este caso proteínas fosfatasas, estarían próximas a sus sustratos, glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa. La hipótesis es atractiva, pero no ha sido definitivamente demostrada.

Independientemente de la importancia de las proteínas fosfatasas localizadas en microsomas, en la desfosforilación de enzimas del metabolismo del glucógeno, es evidente que con mayor razón pueden ser esenciales en la desfosforilación de enzimas localizados en el retículo endoplasmático, y entre ellos gran número de los relacionados con el metabolismo del colesterol.

La posible interrelación estructura microsomal/glucógeno cobra así el mayor interés en la explicación de la acción del glucagon, al eliminar el glucógeno en microsomas, sobre enzimas relacionados directamente con el retículo endoplasmático.

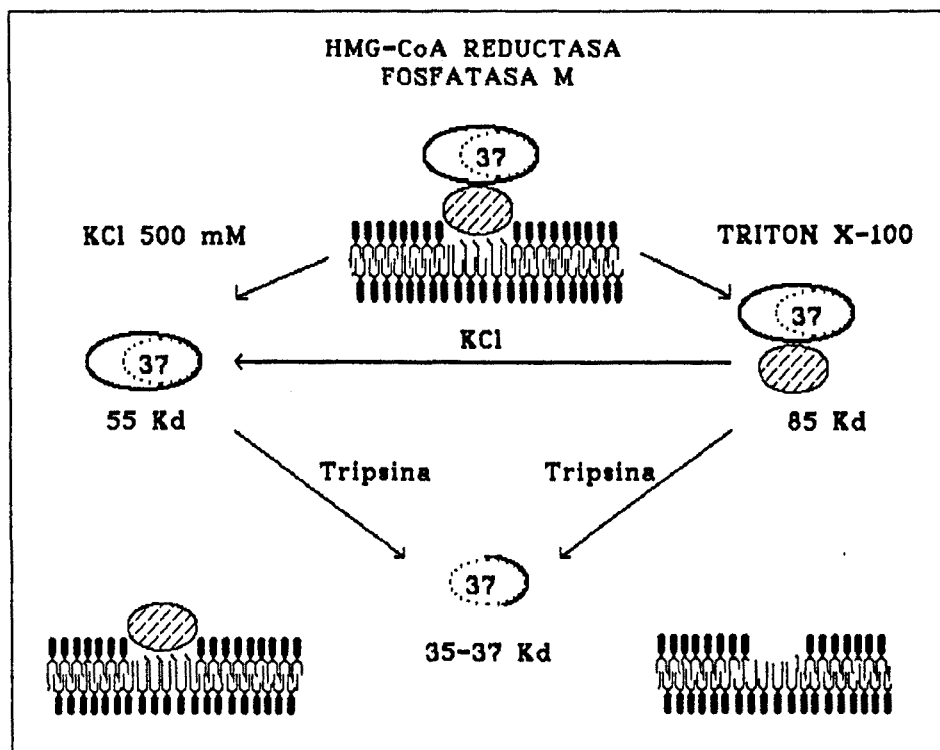
4.7. PROPUESTA DE UN MODELO DE HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA M RELACIONADA CON LOS MICROSOMAS

En microsomas están presentes tres proteínas fosfatasa: PrP 1, PrP 2A y PrP 2C. Su diversidad permite desfosforilar con distinta especificidad las proteínas microsomales relacionadas con el metabolismo del colesterol regulables por fosforilación/desfosforilación. De las distintas PrP únicamente una actividad PrP 2A precisaría de detergentes para solubilizar la subunidad catalítica, las otras actividades podrían solubilizarse simplemente por fuerza iónica.

En el Esquema XIII proponemos un modelo molecular de la proteína HMG-CoA reductasa fosfatasa M. Una subunidad con actividad catalítica se une a otra, sin actividad PrP, de menor peso molecular, anclada en el retículo endoplasmático. La actividad de 85 kDa se solubiliza únicamente en presencia de detergentes. Los diferentes pesos moleculares obtenidos a partir de los solubles de Triton y KCl en cromatografía en gel filtración, 85 y 55 kDa respectivamente, permiten apoyar este modelo. La subunidad de anclaje se disocia con gran facilidad de la subunidad catalítica, lo que explica las pautas de solubilización y el comportamiento como una proteína poco adherida.

La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M, clasificada como PrP 1, no sigue el modelo de la PrP 1 citosólica, no está relacionada con el inhibidor 2, no se reactiva en presencia de GSQ-3 y Mn^{2+} o por acción de la tripsina, y es algo menos sensible al inhibidor 2 que la PrP 1 citosólica.

PROPUESTA DE UN MODELO QUE INTERRELACIONA LA HMG-CoA REDUCTASA
FOSFATASA M Y LAS MEMBRANAS MICROSOMALES



Esquema XIII

La HMG-CoA reductasa fosfatasa M se encuentra anclada en la membrana a través de una subunidad específica de anclaje. La subunidad catalítica puede separarse de la subunidad de anclaje en presencia de sales. La rotura de la subunidad catalítica provoca la aparición de una subunidad menos activa y de menor peso molecular.

La tripsinización o tratamiento con etanol o acetona, tanto de la proteína de 85 kDa como la de 55 kDa, produce una subunidad con menor actividad catalítica, de aproximadamente 35-37 kDa. Se presentan dos propuestas de unión de esta subunidad catalítica a otra cadena polipeptídica para dar lugar a la subunidad de 55 kDa:

- a) La subunidad catalítica de 55 kDa que produce la fragmento de 35-37 kDa por rotura de enlaces de elevada energía;
- b) El enzima de 55 kDa consiste en dos subunidades, una catalítica de 35-37 kDa y otra de menor peso, unida fuertemente.

En la propuesta b) la subunidad de pequeño tamaño, 12-18 kDa, presenta algunas características que recuerdan al desinhibidor: un parecido peso molecular y la capacidad que confiere a la subunidad catalítica tipo 1 de falta de sensibilidad al inhibidor 2. Otro punto en común sería el peso molecular en gel filtración mostrado cuando el desinhibidor está unido a la subunidad catalítica en procedente del precipitado de glucógeno: 51 kDa. Sin embargo, otra serie de características mostraría una neta diferencia entre esta subunidad y el desinhibidor: éste ha sido aislado únicamente del precipitado de glucógeno de hígado de perro y no de microsomas, fuente de nuestra HMG-CoA reductasa fosfatasa M; cuando se cromatografía en un DEAE-celulosa el desinhibidor es retenido en tanto que nuestra proteína no es retenida; la protección que confiere el desinhibidor frente al inhibidor 2 es mucho más efectiva que la encontrada por nosotros para la HMG-CoA reductasa fosfatasa M: 24 ng de inhibidor 2 no afectan la actividad PrP unida al desinhibidor (135), en cambio estas cantidades de inhibidor 2 inhiben sensiblemente la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M. Por estas razones creemos que en la formación del holoenzima no interviene desinhibidor, aunque no se puede descartar la presencia de una proteína de similares características.

La HMG-CoA reductasa fosfatasa M está compuesta por una subunidad específica, hasta ahora no descrita, que permite el anclaje a las membranas del retículo endoplasmático, unida a la

subunidad catalítica, por enlaces de elevada energía, que le confieren las características particulares descritas para la HMG-CoA reductasa fosfatasa M.

5.- CONCLUSIONES

1.- El estado nutricional de las ratas no modifica la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa presente en el sobrenadante postmitocondrial de hígado. La actividad no se ve modificada por ayuno prolongado ni por la administración de glucagon.

2.- El tratamiento con glucagon determina la redistribución de la actividad, la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa asociada a microsomas disminuye significativamente.

3.- El subfraccionamiento por centrifugación a 100.000 xg del sobrenadante postmitocondrial, obtenido de ratas alimentadas, provoca la precipitación de una parte (aproximadamente el 15%) de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa inicial. Esta actividad se distribuye a partes iguales entre microsomas y precipitado de glucógeno.

4.- La actividad presente en microsomas no se debe a contaminación por proteínas de origen citosólicas.

5.- La actividad presente en microsomas no se debe a contaminación por proteínas procedentes del precipitado glucógeno-proteico: a) no tiene afinidad por el glucógeno, b) las pautas de solubilización son distintas para microsomas y glucógeno c) cuando se intenta la purificación de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa a partir de glucógeno siguiendo la misma metodología que la empleada para la HMG-CoA reductasa fosfatasa M se pone de manifiesto un comportamiento cromatográfico diferenciador entre las muestras procedentes de glucógeno y las de microsomas.

6.- La distribución de PrP sobre sustrato HMG-CoA reductasa, tras la centrifugación en un gradiente de sacarosa permite concluir que existe una actividad localizada en microsomas.

7.- La actividad presente en microsomas puede solubilizarse con tratamientos suaves -detergentes no aniónicos a

baja concentración o tratamiento con sales a baja molaridad- sin que queden cantidades significativas en el precipitado final, lo que indica que la proteína responsable de la actividad fosfatasa no es una proteína intrínseca de membrana.

8.- En microsomas están presentes tres actividades proteín fosfatasa sobre sustrato HMG-CoA reductasa: PrP 1, PrP 2A y PrP 2C. No se detecta actividad PrP 2B en microsomas.

9.- Se purifica la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M a partir de microsomas solubilizados con detergente. La preparación final presenta un peso molecular aparente de 85 kDa en gel filtración.

10.- La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M se disocia produciendo dos subunidades: una con actividad catalítica que presenta un peso molecular de aproximadamente 55 kDa, tanto en gel filtración como en geles de acrilamida/SDS y otra de menor peso molecular que es la subunidad de anclaje al retículo endoplasmático.

11.- El enzima HMG-CoA reductasa fosfatasa M no es específico para el sustrato HMG-CoA reductasa. De forma inversa el sustrato HMG-CoA reductasa puede ser desfosforilado por las cuatro serín proteín fosfatasas hasta ahora descritas: PrP 1, 2A, 2B y 2C.

12.- La actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa M se clasifica como PrP 1, al ser inhibida por el inhibidor 2 y al mismo tiempo no ser activable por protamina. Son necesarias para su inhibición mayores concentraciones que las descritas para la PrP 1 citosólica.

13.- La rotura del holoenzima de 85 kDa, o de la subunidad de 55 kDa, por precipitación con acetona o por proteólisis controlada con tripsina, provoca la aparición de una actividad proteín fosfatasa de peso molecular en cromatografía de gel filtración de 35-37 kDa.

14.- La obtención del fragmento de 35-37 kDa conlleva en todas las ocasiones pérdida de la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa que no se recupera por tratamientos posteriores.

15.- Vistas las conclusiones anteriores, el enzima HMG-CoA reductasa fosfatasa M, purificado y parcialmente caracterizado a partir de microsomas de hígado de rata, tiene un comportamiento que lo distingue de otras PrP descritas. Es de origen microsomal y no se debe a contaminación por glucógeno o citosol. Está constituido por una subunidad de anclaje y otra con actividad catalítica. En su constitución no interviene el modulador o inhibidor 2 si bien lo reconoce y es inhibida por el.

6.- BIBLIOGRAFIA

1. AGOSTINIS P., GORIS J., VANDENHEEDE J.R., WAELEKENS E., PINNA L.A., MERLEVEDE W. (1986)
FEBS Lett. 207, 167-172
2. AGOSTINIS P., GORIS J., WAELEKENS E., PINNA L.A., MARCHIORI F., MERLEVEDE W., (1987)
J. Biol. Chem. 262, 1060-1064,
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. ALEMANY S., TUNG H.Y.L., SHENOLIKAR S., PILKIS S.J., COHEN P. (1984)
Eur. J. Biochem. 145, 51,56
9. ALEMANY S., COHEN P. (1986)
FEBS Lett. 198, 194-202
10. ALEMANY S., PELECH S., BRIERLEY C.H., COHEN P. (1986)
Eur. J. Biochem. 156, 101-110.
11. ALEXANDER R., HEXHAM J.M., CRUMPTON M.J. (1988)
Biochem. J. 256, 885-892.
12. ANDRES J.L., JOHANSEN J.W., MALLER J.L. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 14389-14393.
13. ARION W.J., NORDLIE R.C. (1965)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 606
14. ARIÑO J., WOON C.W. BRAUTIGAN D.L. MILLER T.B., JOHNSON G.L. (1988)
Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 4252-4256.
15. ARONSON N.H., TOUSTER O. (1974)
Methods Enzymol. 30, 90-102.
16. AVRUCH J., NEMENOFF A., PIERCE M., KWOK Y.C., BLACKSHEAR P.J (1985)
Molecular Basis in Insuline Action. Ed. Czech M., 263-298,
Plenum. New York
17. BAGINSKI E., FOA P.P. ZAK B (1974)
Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H.U. ed), 877-880.
18. BALLOU L.M., BRAUTIGAN D.L. FISCHER E.H. (1983)
Biochemistry 22, 3393-3399

19. BALLOU L.M. FISCHER E.H. (1986)
The Enzymes, XVII, 312-361.
20. BEG Z.H., ALLMAN D.W. GIBSON D.M. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1362-1369.
21. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 76, 4375-4379.
22. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 8541-8545.
23. BEG Z.H., BREWER H.B. Jr. (1981)
Current Topics in Cellular regulation 20, 139-184
24. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7293-7297.
25. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 488-498.
26. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 1682-1687.
27. BEG Z.H., REZNIKOW D.C., AVIGÁN J. (1986)
Arch. Biochem. Biophys. 244, 310-322.
28. BEG Z.H., STONIK J.A. BREWER H.B. Jr. (1987)
Metabolism 36, 900-917
29. BEG Z.H., STONIK J.A., BREWER H.B. Jr. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 13228-13240.
30. BEINS D.M. VINING R., BALASUBRAMANIAM S. (1982)
Biochem. J. 202, 631-637
31. BERGMAYER H.U., BERNT (1974)
Methods of Enzymatic Analysis 2nd edn., pp. 574-579
32. BERNDT J., GAUMERT R. (1974)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 905-910.
33. BERNDT J., HEGARDT F.G., BOVE J., GAUMERT R., STILL J.
CARDO M-T. (1976)
Hoppe-Seyler's Z. Phisiol. Chem. 357, 1277-1282.
34. BERNDT N., CAMPBELL D.G., BARRY CAUDWELL F., COHEN P., F.DA
CRUZ E SILVA E., B.DA CRUZ E SILVA O., COHEN P.T.W. (1987)
FEBS Lett. 223, 340-346
35. BOLLEN M., STALMANS W. (1984)
Biochem. J. 217, 427-434
36. BOLLEN M., PLANA M., ITARTE E., STALMANS W. (1986)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 139, 1033-1039
37. BOLLEN M., VANDENHEEDE J., STALMANS W. (1987)
Signal Transduction and Protein Phosphorylation. Edited by
L.M.G. Heilmeyer (Plenum Publishing corporation), 225-230.

38. BOLLEN M., STALMANS W. (1988)
Biochem. J. 250, 659-663.
39. BOLLEN M., STALMANS W. (1988)
Biochem. J. 255, 327-333
40. BOLLEN M., VANDANHEEDE J.R., GORIS J., STALMANS W. (1988)
Biochim. Biophys. Acta 969, 66-77
41. BOVE J., HEGARDT F.G. (1978)
FEBS Lett. 90, 198-202.
42. BRADFORD M.M. (1976)
Anal. Biochem. 72, 248-254
43. BRAUTIGAN D.L., SHRINER C.L., GRUPPUSO P.A., (1985)
J. Biol. Chem. 260, 4295-4302,
44. BRAUTIGAN D.L., GRUPPUSO P.A., MUMBY M., (1986)
J. Biol. Chem. 261, 14924-14928,
45. BROWN M.S., DANA S.E., DIETSCHY J.M., SIPERSTEIN M.D. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 4731-4738.
46. BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. DIETSCHY J.M. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 5144-5149.
47. BROWN M.S., GOLDSTEIN, J.L. (1980)
J. Lipid. Res. 21, 505-517
48. BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1981)
Science 212, 628-635.
49. BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1986)
Science 232, 34-47
50. BROWN W.E., RODWELL V.W. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 751, 218-229
51. BURCHELL A., FOULKES J.G., COHEN P.T.W., CONDON G.D., COHEN P. (1978)
FEBS Lett. 92, 68, 72.
52. CALVET V.E., GIL G., HEGARDT F.G. (1985)
Arch. Biochem. Biophys. 236, 753-765
53. CAPPEL R.E., GILBERT H.F. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 12204-12212.
54. CARDELL R.R. (1977)
Int. Rev. Cytology 48, 221-279.
55. CARDELL R.R., MICHAELS J.E., HUNG J.T. CARDELL E.L. (1985)
J. Cell. Biol. 101, 201-206.
56. CAUDWELL F.B., HIRAGA A., COHEN P. (1986)
FEBS Lett. 194, 85-90

57. CHAN C.P., GALLIS B., BLUMENTHAL D.K., PALLAN C.J., WANG J.H
KREBS E.G. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 9890-9895,
58. CHIN D.J., LUSKEY K.L., ANDERSON R.G.W., FAUST J. R.,
GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S., (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1185-1189,
59. 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,
60. CHIN D.J., GIL G., RUSELL D.W. LISCUM L., LUSKEY K.L. BASU
S.K., OKAYAMA H., BERG P., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1984)
Nature 308, 613
61. CHIN D.J., GIL G., FAUST J.R., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S.,
LUSKEY K.L. (1985)
Mol. Cell. Biol. 5, 634-641.
62. CHISHOLM A.A., COHEN P. (1985)
Biochim. Biophys. Acta 847, 155-158
63. CHISHOLM A.A., COHEN P. (1988)
Biochim. Biophys Acta 968, 392-400.
64. CHISHOLM A.A., COHEN P. (1988)
Biochim. Biophys. Acta 971, 163-169.
65. CLARKE C.F., EDWARDS P.A., LAN S.F. TANAKA R.D., FOGELMAN
A.M. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3305-3308.
66. CLARKE C.F. EDWARDS P.A. LAN S.F. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 10439-10447
67. COHEN L.H., GRIFFIOEN M. (1988)
Biochem. J. 255, 61-67.
68. COHEN P. (1973)
Eur. J. Biochem. 34, 1-14.
69. COHEN P., RYLATT D.B. NIMMO G.A. (1977)
FEBS Lett. 76, 182-186.
70. COHEN P. (1983)
Methods Enzymol. 99, 340-344
71. COHEN P. (1985)
Molecular Basis in insuline Action. Ed. Czech M.,
Plenum. New York, pag. 213-234.
72. COHEN P. (1985)
Eur. J. Biochem. 151, 439-448
73. COHEN P. (1986)
The Enzymes Vol. XVII, 461-497.

74. COHEN P., ALEMANY S., HEMMINGS B.A., RESINK T.J., STRAOLFORS P., LIM TUNG H.Y. (1988)
Methods Enzymol. 159, 390-408.
75. COHEN P.T.W. (1988)
FEBS Lett. 232, 17-23.
76. COUNTAWAY J.L., WADDELL I.D., BURCHELL A., ARION W.L. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 2673-2678.
77. CRUZ E SILVA O.B. DA., ALEMANY S., CAMPBELL D.G., COHEN P.T.W. (1987)
FEBS Lett. 221, 415-422
78. CRUZ E SILVA O.B. DA., COHEN, P.T.W. (1987)
FEBS Lett. 226, 176-178.
79. CRUZ E SILVA O.B. DA., CRUZ E SILVA E.F., COHEN P.T.W. (1988)
FEBS Lett. 242, 106-110.
80. DALLNER G. (1974)
Meth. Enzymology 31, 191-201
81. DAMUNI Z., TUNG H.Y.L., REED L.J. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 878-883
82. DAVIS B.J. (1964)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 495-427.
83. DAWSON P.A., HOFMANN S.L., WESTHYZEN D.R., SUDHOF T.C., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 3372-3379.
84. DEFREYN G., GORIS J., MERLEVEDE W. (1977)
FEBS Lett. 79, 125-128.
85. DePIERRE J.W., DALLNER G. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 415, 411-472.
86. DIVEN W.F., SWEENEY J., WARTY V., SANGHVI A. (1988)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 155, 7-13.
87. DOPERE F., STALMANS W. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 443-450.
88. DOTAN I., SHECHTER I. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 713, 427-434
89. DOTAN I., SHECHTER I. (1983)
Arch. Biochem. Biophys. 226, 401-410,
90. DOTAN I., SHECHTER I. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 17058-17064.
91. DRAGLAND-MESERVE C.J., WEBSTER D.K., PARKER BOTELHO L.H. (1985)
Eur. J. Biochem. 146, 699-704
92. DUGAN M.R.E., PORTER J.W. (1972)
Arch. Biochem. Biophys. 152, 28-35.

93. DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R., APPELMANS F. (1955)
Biochem. J. 60, 604-617,
94. EASOM A., ZAMMIT A. (1984)
Biochem. J. 220, 739-745
95. EASOM A., ZAMMIT A. (1985)
Biochem. J. 230, 747-752
96. EDELMAN A.M., BLUMENTHAL D.K., KREBS E.G. (1987)
Ann. Rev. Biochem. 56, 567-613.
97. EDWARDS P.A., LAN S-F., TANAKA R.D., FOGELMAN A.M. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 7272-7275.
98. EDWARDS P.A., LAN S.F. FOGELMAN A.M. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 10219-10222.
99. EDWARDS P.A., LAN S.F., FOGELMAN A.M. (1986)
J. Lip. Res. 27, 398-403.
100. FARKAS I., TOTTH B., BOT G., GERFELY P. (1986)
FEBS Lett. 203, 253-256.
101. FAUST J.R., GOLDSTEIN J.L. BROWN M.S. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5018-5022.
102. FAUST J.R., BROWN M.S. GOLDSTEIN J.L. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 6546-6548.
103. FAUST J.R., LUSKEY K.L., CHIN D.J., GOLDSTEIN J.L., BROWN M. S. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5205-5209.
104. FEINGOLD K.R., WILEY M.H., MOSER A.H., SIPERSTEIN M.D. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1376-1383.
105. FEINGOLD K.R., WILEY M. H., MOSER A. H., LEAR S.R., SIPERSTEIN M. (1983)
J. Lipid Res. 24, 290-296.
106. FEINGOLD K.R., MOSER A.H. (1986)
Arch. Biochem. Biophys. 249, 46-52.
107. FERRER A., HEGARDT F.G. (1984)
Arch. Biochem. Biophys. 230, 227-237.
108. FERRER A., CAELLES C., MASSOT N., HEGARDT F.G. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 132, 497-504.
109. FERRER A., CAELLES C., HEGARDT F.G. (1987)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 148, 1009-1016.
110. FERRER A., CAELLES C., MASSOT N., HEGARDT F.G. (1987)
Biol. Chem. Hoppe Seyler 368, 249-257.
111. FERRER A., CAELLES C., MASSOT N., HEGARDT F.G. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 13507-13512.

112. FIOL.C.J., HASEMAN J.H., WANG Y., ROACH P.J. ROESKE R.W., KOWALCZUK M., DePAOLI-ROACH A.A. (1988)
Arch. Biochem. Biophys. 267, 797-802.
113. FISCHER E.H., KREBS E.G. (1962)
Methods Enzymol. 5, 369-373.
114. FONT E., SITGES M., HEGARDT F.G. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 705-710.
115. FOULKES J.G., COHEN P. (1979)
Eur. J. Biochem. 97, 251-256.
116. FOULKES J.G., COHEN P. (1980)
Eur. J. Biochem. 105, 195-203.
117. FOULKES J.G., JEFFERSON L.S., COHEN P. (1980)
FEBS Lett. 112, 21-24.
118. FOULKES J.G., COHEN P., STRADA S.J., EVERSON W.V., JEFFERSON L.S. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 12493-12496.
119. FOULKES J.G., ERIKSON E., ERIKSON R.L. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 431-438.
120. FOULKES J.G., ERNST V., LEVIN D.H. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 1439-1443.
121. GABBAY, R.A., LARDY H.A. (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 2218-2222.
122. GIBSON D.M. PARKER R.A. (1987)
The Enzymes, XVIII, 179-215.
123. GIL G., SITGES M., BOVE J., HEGARDT F.G. (1980)
FEBS Lett. 110, 195-199.
124. GIL G., SITGES M., HEGARDT F.G. (1981)
Biochem. Biophys. Acta 663, 211-221.
125. GIL G., SITGES M., HEGARDT F.G. (1981)
Arch. Biochem. Biophys. 210, 224-229.
126. GIL G., HEGARDT F.G. (1982)
Arch. Biochem. Biophys. 197, 493-499.
127. GIL G., FAUST J.R., CHIN D.J., GOLDSTEIN J.L. BROWN M.S. (1985)
Cell 41, 249-258.
128. GIL G., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 3717-3724.
129. GIL G., GOLDSTEIN J.L., SLAUGHTER C.A., BROWN M.S. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 3710-3716.
130. GILBOE D.P., LARSON K.L., NUTALL F.G. (1972)
Anal. Biochem. 47, 20-27.

131. GILBOE D.P., NUTALL F.Q. (1984)
Arch. Biochem. Biophys. 228, 587-591.
132. GOLDFARB S., PITOT H.C., (1971)
J. Lipid Res. 12, 512-515.
133. GOLDSTEIN J.L., ANDERON R.G.W., BROWN M.S. (1979)
Nature 279, 679-685.
134. GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1984)
J. Lipid. Res. 25, 1450-1461.
135. GORIS J., CAMPS T., DEFREYN G., MERLEVEDE W. (1981)
FEBS Lett. 134, 189-193.
136. GORIS J., WAELKENS E., MERLEVEDE W. (1983)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 349-354.
137. GORIS J., PARKER P.J. WAELKENS E., MERLEVEDE W. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 405-410.
138. GORIS J., WAELKENS E., MERLEVEDE W. (1986)
Biochem. J. 239, 109-114.
139. GORIS J., MERLEVEDE W. (1988)
Biochem. J. 254, 501-507.
140. GREEN D.D.M., YANG S., MUMBY M.C. (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4880-4884.
141. GRUPPUSO P.A., JOHNSON G.L., CONSTANTINIDES M., BRAUTIGAN D. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 4288-4294.
142. GUNSHORE S., HAMILTON G.A. (1986)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 93-99.
143. GUTIERREZ C., OKITA R., KRISANS S. (1988)
J. Lipid. Res. 29, 613-628.
144. HANLEY R.M., STRADA S.J., STEINER A.L., THOMPSON W.J.,
SHENOLIKAR S., (1987)
Molecular Cell. Endocrinol. 50, 115-122.
145. HARDIE G.D., CARLING D., SIM A.T.R. (1989)
TIBS 14, 20-23.
146. HARWOOD H.J., BRANDT K.G., RODWELL V.W. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 2810-2815.
147. HARWOOD H.J. Jr., SCHNEIDER M., STACPOOLE P.W. (1984)
Biochem. Biophys. Acta 805, 245-251.
148. HEGARDT F.G., GIL G., CALVET E.V. (1983)
J. Lip. Res. 24, 821-830.
149. HELLER R.A., GOULD R.G. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 5254-5260.

150. HELLER R.A., SHREWSBURY M.A. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 3815-3819.
151. HEMMINGS B.A., YELLOWLEES D., KERNOHAM J.C., COHEN P. (1981)
Eur. J. Biochem. 119, 443-451.
152. HEMMINGS B.A., RESINK T.J., COHEN P. (1982)
FEBS Lett. 150, 319-324.
153. HEMMINGS H.C., GREENGARD P., TUNG H.Y.L., COHEN P., (1984)
Nature 310, 503-504.
154. HEMMINGS H.C., NAIRN A.C., GREENGARD P. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 14491-14497.
155. HINO Y., ISHIO S., MINAKAMI S. (1987)
Eur. J. Biochem. 165, 195-199.
156. HIRAGA A., KIKUCHI K., TAMURA S., TSUIKI S. (1981)
Eur. J. Biochem. 119, 503-510.
157. HIRAGA A., COHEN P. (1986)
Eur. J. Biochem. 161, 763-769.
158. HIRAGA A., KEMP B.E., COHEN P. (1987)
Eur. J. Biochem. 163, 253-258.
159. HOLMES C.F.B., CAMPBELL D.G., CAUDWELL F.B., AITKEN A.,
COHEN P. (1986)
Eur. J. Biochem. 155, 173-182.
160. HOLMES C.F.B., KURET J., CHISHOLM A.A.K, COHEN P. (1986)
Biochim. Biophys. Acta 870, 408-416.
161. HUANG K.P., ROBINSON J.C. (1976)
Anal. Biochem. 72, 593-599.
162. HUANG L.F., GLINSMANN W.H. (1976)
Eur. J. Biochem. 70, 419-426.
163. HUBBARD, COHEN P. (1989)
Biochem. Biophys. Acta
164. HUNTER C.F., RODWELL V.W. (1980)
J. Lipid. Res. 21, 399-405.
165. HUNTER T. (1987)
Cell 50, 823-829.
166. INGEBRITSEN T.S., LEE H., PARKER R.A., GIBSON D.M. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1268-1277.
167. INGEBRITSEN T.S., GEELEN M.J.H., PARKER R.A., EVENSON K.,
GIBSON D.M. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 9986-9989.
168. INGEBRITSEN T.S., GIBSON D.M. (1980)
Recent. Discod. Systems of E. Regult. by Rever. Phosporylat.
Vol. 1, 63-69. Elsevier, Biochem. Press, North Holland

169. INGBRITSEN T.S., PARKER R.A., GIBSON D.M. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 1138-1144.
170. INGBRITSEN T.S., BLAIR J., GUY P., WITTERS L., HARDIE D.G. (1983)
Eur. J. Biochem. 132, 275-281.
171. INGBRITSEN T.S., COHEN P. (1983)
Science 221, 331-338.
172. INGBRITSEN T.S., COHEN P. (1983)
Eur. J. Biochem. 132, 255-261.
173. INGBRITSEN T.S., FOULKES J.G., COHEN P. (1983)
Eur. J. Biochem. 132, 263-274.
174. INGBRITSEN T.S., STEWART A.A., COHEN P. (1983)
Eur. J. Biochem. 132, 297-307.
175. ITAYA K., UI M. (1966)
Clin. Chim. Acta 14, 361-366.
176. JAKES S., MELLGREN R.L., SCHLENDER K.K. (1986)
Biochim. Biophys. Acta 888, 135-142.
177. JAKES S., SCHLENDER K.K. (1988)
Biochim. Biophys. Acta 967, 11-16.
178. JOHANSEN W.J., INGBRITSEN T.S. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 207-211.
179. JOHNSON G-L., BRAUTIGAN D.L., SHRINER C., JASPERS S., ARIÑO J., MOLE J.E., MILLER T.B. Jr., MUMBY M.C. (1987)
Molecular Endocrinology 1, 745-748.
180. KAMDUSTSCH A.A. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 8404-8417.
181. KAMDUSTSCH A.A. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 6057-6061.
182. KATZ J., GOLDEN S., WALS P.A. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3433-3437.
183. KEITH M.L., RODWELL, V.W., ROGERS D.H., H. RUDNEY (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 969-975.
184. KEITH M.L., KENNELLY P.J., RODWELL V.W. (1983)
J. Protein Chem. 2, 209-220.
185. KELLER G.A., BARTON M.C., SHAPIRO D.J., SINGER S.J., (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 770-774.
186. KELLER G.A., PAZIRANDEH M., KRISANS S. (1986)
J. Cell. Biol. 123, 875-886.
187. KENNELLY P.J., BRANDT J.G., RODWELL V.W. (1983)
Biochemistry 22, 2784-2788.

188. KENNELLY P.J., RODWELL V.W. (1985)
J. Lipid Res. 26, 903-914.
189. KHATRA B.S., CHIASSON J.L., SHIKAMA H., EXTON J.H.,
SODERLING T.R. (1980)
FEBS Lett. 114, 253-256.
190. KHATRA B.S., SODERLING T.R. (1983)
Arch. Biochem. Biophys. 227, 39-51.
191. KHATRA B.S., PRINTZ R., COBB C.E., CORBIN J.D. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 130, 567-573.
192. KHATRA B.S. (1988)
Methods Enzymol. 159, 368-377.
193. KIKUCHI K., TAMURA S., HIRAGA A., TSUIKI S. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 29-37.
194. KINCAID y col. (1989)
in prens
195. KITAGAWA Y., SAKAI R., TAHIRA T., TSUDA N.I., SUGIMURA T.,
NAGAO M. (1988)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 157, 821-827.
196. KLEE y col. (1989)
in prens
197. KLEINSEK D.A., DUGAN R.E., BAKER T.A., PORTER J.W. (1981)
Methods Enzymol. 71, 462-479.
198. KNAPPE J. (1974)
Methods Enzymatic Analysis 4, 2026-2030.
199. KOBAYASHI M., OZAWA T. (1981)
J. Biochem. 89, 731-740.
200. KREBS E.G., FISCHER E.H. (1956)
Biochim. Biophys. Acta 20, 150-157.
201. KREBS E.G., FISCHER E.H. (1962)
Methods Enzymol. 5, 373-376.
202. KREBS E.G. (1985)
Annu. Rev. Biochem. 48, 923-959.
203. KREBS E.G. (1985)
Biochem. Soc. Trans. 13, 813-820.
204. KREBS E.G. (1986)
The Enzymes Vol. XVII, 3-20.
205. KURET J., BELL, H., COHEN P. (1986)
FEBS Lett. 203, 197-202.
206. LAEMMLI U.K. (1970)
Nature 227, 680-685.

207. LANGE Y., MATHIES H.J.G. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 14624-14630.
208. LANGE Y., STECKT T.L. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 15592-15597.
209. LANGE Y., MURASKI M.F. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 4433-4436.
210. LANZETTA P.A., ALVAREZ L.J., REINACH P.S., CANDIA O.A. (1979)
Anal. Biochem. 100, 95-97.
211. LAU K.H.W., FARLEY J.R., BAYLINK D.J. (1989)
Biochem. J. 257, 23-36.
212. LAWRENCE J.C.Jr., HIKEN J., BURNETTE B., DePAOLI-ROACH A.A. (1988)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 197-203.
213. LEE, E.Y.C., BRANDT H., CAPULONG Z.L., KILLILEA S.D. (1976)
Adv. Enzyme Regul. 14, 467-490.
214. LEIS J.F., KNOWLES A.F., KAPLAN N.O. (1985)
Arch. Biochem. Biophys. 239, 320-326.
215. LI H-CH., PRICE D.J., TABARINI D. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 6416-6426.
216. LISCUM L., CUMMINGS R.D., ANDERSON R.G.W., DEMARTINO G.N.,
GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1983)
Poc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7165-7169.
217. LISCUM L., LUSKEY K.L., CHIN D.J., GOLSTEIN J.L., BROWN M.S. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 8450-8455.
218. LISCUM L., FINER-MOORE J., STROUD R.M. LUSKEY K.L. BROWN M.
S., GOLDSTEIN J.L. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 522-530.
219. LUSKEY K.L., STEVENS B. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 10271-10277.
220. LUST W.D., PASSONNEAU J.V., CRITES S.K. (1975)
Anal. Biochem. 68, 328-331.
221. MACKENZIE C.W., BULBULIAN G.J., BISHOP J. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 614, 413-424.
222. MACKINTOSH C., CAMPBELL D.G., HIRAGA A., COHEN P. (1988)
FEBS Lett. 234, 189-194.
223. MARGOLIS R.N., CARDELL R.R., CURNOW T. (1979)
J. Cell. Biol. 83, 348-356.
224. MARGOLIS R.N., CURNOW T. (1983)
Endocrinology 113, 2113-2119.
225. MARGOLIS R.N. (1987)
Adv. Prot. Phosphatases 4, 1-33.

226. MARRERO P.F., HARO D., HEGARDT F.G. (1986)
FEBS Lett. 197, 183-186.
227. MARTIN B.L., GRAVES D.J. (1987)
Adv. Prot. Phosphatases, 4, 95-120.
228. MARTIN G.G., SHAPIRO D.J. (1985)
Biochim. Biophys. Acta 837, 163-172.
229. MCGOWAN C.H., CAMPBELL D.G., COHEN P. (1987)
Biochim. Biophys. Acta 930, 279-282.
230. MCGOWAN C.H., COHEN P. (1987)
Eur. J. Biochem. 166, 713-722.
231. MCGUIRE D.M., OLSON C.D., TOWLE H.C., DEMPSEY M.E. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 5368-5371.
232. McNALL S.J., FISCHER E.H. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 1893-1897.
233. MELLGREN R.L., COULSON M. (1983)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 114, 148-154.
234. MELLGREN R.L., WILSON S.E., SCHLENDER K.K. (1984)
FEBS Lett. 167, 291-294.
235. MENON A.S., DEVI S.U., RAMASARMA T. (1985)
Arch. Biochem. Biophys. 239, 342-351.
236. MERLEVEDE W., GORIS J., VANDENHEEDE J.R., WAEKENS E., YANG S.D. (1984)
Proc. Soc. Ex. Biol. Med. 177, 3-11.
237. MERLEVEDE W. (1985)
Adv. Prot. Phosphatases 1, 1-18.
238. MIESKES G., SOLING H-D. (1987)
Eur. J. Biochem. 167, 377-382.
239. MILLER T.B., GARNACHE A., VICALVI J.J. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 2851-2855.
240. MILLER T.B. Jr. (1985)
Molecular Basis of Insulin Action pags. 247-261.
Ed. Michael P. Czech, Plenum Press. New York.
241. MISUMI Y., TASHIRO K., HATTORI M., SAKAKI Y., IKEHARA Y. (1988)
Biochem. J. 249, 661-668.
242. MITROPOULOS K.A., VENKATESAN S., REEVES D.E.A. (1981)
Biochem. J. 194, 265-271.
243. MORUZZI M., BARBIROLI B., MONTI M.G., TADALINI B., HAKIM G., MEZZETI G. (1987)
Biochem. J. 247, 175-180.
244. MVUMBI L., DOPERE F., STALMANS W. (1983)
Biochem. J. 212, 407-416.

245. MVUMBI L., BOLLEN M., STALMANS W. (1985)
Biochem. J. 232, 697-704.
246. MVUMBI L., STALMANS W. (1987)
Biochem. J. 246, 367-374.
247. MYANT N.B., MITROPOULOS K.A. (1977)
J. Lipid. Res. 18, 135-153.
248. NAHAS N., JUHL H., ESMANN V. (1984)
Mol. and Cell. Biochemistry 58, 147-156.
249. NAKANISHI M., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 8929-8937.
250. NEMENOFF R.A., BLACKSHEAR P.J., AVRUCH J. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 9437-9443.
251. NESS G.C., SPINDER C., NOFFLER M.H. (1979)
Arch. Biochem. Biophys. 214, 192-198.
252. NESS G.C., WAY S.C., WICKHAM P.S. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 81-85.
253. NISHIZUKA Y. (1984)
Nature 308, 693-698.
254. NORDSTROM J.L., RODWELL V.W., MITSCHELEN J.J. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 8924-8934.
255. NUTTALL F.Q., GILBOE D.P. (1980)
Arch. Biochem. Biophys. 203, 483-486.
256. NUTTALL F.Q., GANNON M.C. (1984)
Molecular Cell. Biochem. 63, 75-81.
257. OKU H., IDE T., SUGANO M. (1984)
J. Lipid. Res. 25, 254-261.
258. ORCI L., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L., GARCIA-SEGURA L.M.,
ANDERSON R.G.W. (1984)
Cell 36, 835-845.
259. OSBORNE T.F., GIL G., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 3380-3387.
260. PALLEN C.P., WANG J.H. (1985)
Arch. Biochem. Biophys. 237, 281-291.
261. PALLEN C.P., WANG J.H. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 16115-16120.
262. PALMER J.L., AVRUCH J. (1981)
Anal. Biochem. 116, 372-373.
263. PANINI S.R., RUDNEY H. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 11633-11636.

264. PANINI S.R., GUPTA A., SEXTON R.C., PARISH E.J. RUDNEY H. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 14435-14440.
265. PARKER P.J., GORIS J., MERLEVEDE W. (1986)
Biochem. J. 240, 63-67.
266. PARKER R.A., MILLER S.J., GIBSON D.M. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commum. 125, 629-635.
267. PARKER R.A., MILLER S.J., GIBSON D.M. (1985)
Fed. Proc. 44, 657 A
268. PATO M.D., KERC E. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 12359-12366.
269. PATO M.D., KERC E. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 3770-3774.
270. PATO M.D., KERC E. (1987)
Regulation and Contraction of Smooth Muscle, pag. 207-218
Alan R. Liss. Inc.
271. PATO M.D., KERC E. (1988)
Methods Enzymol. 159, 446-456.
272. PEFFLEY D., SINENSKY M. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 9949-9952.
273. PELECH S., COHEN P., FISHER M.J., POGSON C.I.,
EL-MAGHRABI M.R., PILKIS S.J. (1984)
Eur. J. Biochem. 145, 39-49.
274. PELECH S., COHEN P. (1985)
Eur. J. Biochem. 148, 245-251.
275. PHILIPP B.W., SHAPIRO D.J. (1979)
J. Lip. Res. 20, 588-593.
276. PHILLIPS C.E., NESS G.C. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commum. 119, 772-778.
277. POLOKOFF R., TORGET R., LOGEL J., SINENSKY M. (1983)
Arch. Biochem. Biophys. 227, 71-80.
278. QURESHI N., NIMMANNIT S., PORTER J.W. (1981)
Methods Enzymol. 71, 455-509.
279. REED L.J., DAMUNI Z. (1987)
Adv. Prot. Phosphatases 4, 59-75.
280. REINHART M.P., BILLHEIMER J.T., FAUST J.R., GAYLOR J.L. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 9649-9655.
281. RESINK T.J., HEMMINGS B.A., TUNG H.Y., COHEN P. (1983)
Eur. J. Biochem. 133, 455-461.
282. RICHERT L., CASTAGNA M., BECK J.P. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 192-198.

283. ROACH P., ROACH P.J., DePAOLI-ROACH A.A. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 6314-6317.
284. RODWELL V.W., BENSCH W.R. (1981)
Methods Enzymol. 71, 480-486.
285. ROGERS D.H., KIM D.N., LEE K.T., REINER J.M., THOMAS W.A. (1979)
J. Lip. Res. 22, 811-819.
286. ROITELMAN J., SCHECHTER I. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 902-907.
287. ROITELMAN J., SCHECHTER I. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 14029, 14032.
288. ROITELMAN J., SHECHTER I. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 870-877.
289. ROTENBERG S.A., BRAUTIGAN D.L. (1987)
Biochem. J. 243, 747-754.
290. RUSELL D.W., YAMAMOTO T., SHNEIDER W.J., SLAUGHTER C.J.,
BROWN M.S., GOLSTEIN J.L. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7501-7505.
291. RUSNAK N., KRISANS S. (1987)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 148, 890-895.
292. SABINE J.R. (1983)
J.R. Sabine ed. p. 3-10. CRC. Pres. Boca Ratón Florida
293. SAMPLE C.E, NESS G. (1986)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 137, 201-207.
294. SCHELLING D., LEADER D.P., ZAMMIT V.A., COHEN P. (1988)
Biochim. Biophys. Acta 972, 221-231.
295. SERRA D., ASINS G., HEGARDT F.G. (1989)
J. Biol. Chem., (in press)
296. SHACTER-NOIMAN E., CHOCK P.B. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 4214-4219.
297. SHACTER-NOIMAN E., McCLURE J.A., KORN E.D., CHOCK P.B. (1985)
Arch. Biochem. Biophys. 242, 523-531.
298. SHAN S.S. (1981)
Arch. Biochem. Biophys. 211, 439-446.
299. SHAPIRO D.J., NORDSTROM J.L., MITSCHELEN J.J., RODWELL V.W.,
SCHIMIKE R.T. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 370, 369-377.
300. SHENOLIKAR S., INGEBRITSEN T.S (1984)
Methods Enzymol. 107, 102-129.
301. SINENSKY M., LOGEL J. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 8547-8549.

302. SINGER I.I., KAWKA D.W., KAZAZIS D.M., ALBERTS A.F., CHEN J. S., HUFF J.W., NESS G.C. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5556-5560.
303. SITGES M., GIL G., HEGARDT F.G. (1984)
J. Lipid Res. 25, 497-506.
304. SKALNIK D.G., NARITA H., KENT C., SIMONI R.D. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 6836-6841.
305. SPARKS J.W., BRAUTIGAN D.L. (1986)
Int. J. Biochem. 18, 497-504.
306. SPETH M., ALEJANDRO R., LEE E.Y.C. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 3475-3481.
307. SPRANG S.R., ACHARYA K.R., GOLDSMITH E.J., STUART D.I.,
VARVILL K., FLETTERICK R.J., MADSEN N.B., JOHNSON L.N. (1988)
Nature 336, 215-221.
308. STALMANS W. (1983)
Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 66/1. Lefèbre P.
J. ed. Springer-Verlag, Berlin, 291-314.
309. STALMANS W., MVUMBI L., BOLLEN M. (1985)
Adv. Prot. Phosphatases 2, 333-353.
310. STALMANS W., BOLLEN M. (1987)
Adv. Prot. Phosphatases 4, 391-408.
311. STALMANS W., BOLLEN M., MVUMBI L. (1987)
Diabetes/metabolism. Rev. 3, 127-161.
312. STEER R.C., WILSON M.J., AHMED K. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 1082-1087.
313. STEINER R.F., GREER L., BHAT R., OTON J. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 611, 269-279.
314. STEWART A.A., INGEBRITSEN T.S., MANALAN A., KLEE C.,
COHEN P. (1982)
FEBS Lett. 137, 80-84.
315. STEWART A.A., INGEBRITSEN T.S., COHEN P. (1983)
Eur. J. Biochem 132, 289-295.
316. STONE S.R., HOFSTEEGE J., HEMMINGS B.A. (1987)
Adv. Prot. Phosphatases, 4, 375-389.
317. STONE S.R., HOSFSTEEGE J., HEMMINGS B.A. (1987)
Biochemistry 26, 7215-7220.
318. STRALFORS P., BJORGELL P., BELFRAGE P. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3317-3321.
319. STRALFORS P., HIRAGA A., COHEN P. (1985)
Eur. J. Biochem. 149, 295-303.

320. SUDHOF T.C., RUSELL D.W., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1987)
Cell 48, 1061-1069.
321. TAN A.W.S., NUTALL F.Q. (1978)
Biochem. Biophys. Acta 522, 139-150.
322. TANAKA R.D., EDWARDS P.A., LAN S-F., KNÖPPEL E.M., FOGELMAN A.M. (1982)
J. Lipid Res. 23, 1026-1031.
323. TANAKA R.D., EDWARDS P.A., LAN S-P., FOGELMAN A.M. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 13331-13339.
324. TONKS N.K., COHEN P. (1983)
Biochem. Biophys. Acta 747, 191-193.
325. TONKS N.K., COHEN P. (1984)
Eur. J. Biochem. 145, 65-70.
326. TOTH B., BOLLEN M., STALMANS W. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 14061-14066.
327. TSUIKI S., KIKUCHI K., TAMURA S., HIRAGA A., SHIMERA R. (1985)
Adv. Prot. Phosphatases 1, 193-194.
328. TUNG H.Y.L., COHEN P. (1984)
Eur. J. Biochem. 145, 57-64.
329. TUNG H.Y.L., RESINK T.J., HEMMINGS B.A., SHENOLIKAR S., COHEN P. (1984)
Eur. J. Biochem. 138, 635-641.
330. TUNG H.Y.L., ALEMANY S., COHEN P. (1985)
Eur. J. Biochem. 148, 253-263.
331. TUNG H.Y.L., PELECH S., FISCHER M., POGSON C.I., COHEN P. (1985)
Eur. J. Biochem. 149, 305-313.
332. USUI H., IMAZU M., MAETA K., TSUKAMOTO H., AZUMA K., TAKEDA M. (1988)
J. Biol. Chem. 263, 3752-3761.
333. VANDEN ABEELE C., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W. (1988)
FEBS Lett. 232, 167-171.
334. VANDENHEEDE J.R., GORIS J., YANG S-D., CAMPS T., MERLEVEDE W. (1981)
FEBS Lett. 127, 1-3.
335. VANDENHEEDE J.R., YANG S-D., MERLEVEDE W., JURGENESEN S., CHOCK B. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 10512-10516.
336. VILLA-MORUZZI E., BALLOU L.M., FISCHER E.H. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 5857-5863.
337. VILLA-MORUZZI E. (1986)
Arch. Biochem. Biophys. 247, 155-164.

338. VILLA-MORUZZI E., HEILMEYER L.M.G. (1986)
Adv. Prot. Phosphatases 3, 225-236.
339. VILLA-MORUZZI E., HEILMEYER L.M.G. (1987)
Eur. J. Biochem. 169, 659-667.
340. WAELKENS E., GORIS J., MERLEVEDE W. (1987)
Biochem. Int. 15, 385-393.
341. WAELKENS E., GORIS J., MERLEVEDE W. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 1049-1059.
342. WALLACE R.W., TALLANT E.A., CHEUNG W.Y. (1980)
Biochemistry 19, 1831-1837.
343. WALSETH T.F., JOHNSON R.A. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 526, 11-31.
344. WANSON J.C., DROCHMANS P. (1968)
J. Cell. Biol. 38, 131-150.
345. WILLIAMS K.R., HEMMINGS H.C., LOPRESTI M.B., KONIGSBERG W.H.
GREENGARD P. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 1890-1903.
346. YANG S.D., VANDENDEEDE J.R., GORIS J., MERLEVEDE W. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 11759-11767.
347. YANG S.D., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W. (1981)
FEBS Lett. 126, 57-60.
348. YANG S.D., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 10231-10234.
349. YANG S.D., VANDENHEEDE J.R., MERLEVEDE W. (1981)
FEBS Lett. 132, 293-295.
350. YANG S.D. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 1132-1138.
351. ZAMMIT V.A., EASOM R.A. (1987)
Biochim. Biophys. Acta 927, 223-228.
352. ZHENG S.Y., LEE E.Y.C. (1988)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 1398-1402.

APENDICES

CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE LAS HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASAS

	<u>Localización</u>	<u>Año</u>	<u>Ref.</u>
Beg y col.	citosol	1973	20
Nordstrom y col.	"	1977	254
Ingebritsen y col.	"	1978, 1980	166-168
Gil y col.	"	1980, 1981	123-124
Calvet y col.	"	1985	52
Kennelly y Rodwell	"	1985	188
Berndt y col.	microsomas	1976	33
Feingold y col.	"	1983	105
Brown y Rodwell	"	1983	50
Sitges y col.	"	1984	303
Diven y col.	"	1988	86

APENDICE I

Trabajos que hacen referencia a la actividad HMG-CoA reductasa fosfatasa

**CLASIFICACION DE LAS PROTEIN FOSFATASAS BASADA EN
LA REGULACION DEL ENZIMA**

Protein fosfatasa dependiente de ATP-Mg²⁺	
Enzima que remueve grupos prostéticos	Cori, 1943
Enzima que rompe la fosforilasa	Cori, 1955
Fosforilasa fosfatasa	Sutherland, Fischer y Krebs, 1956-1959
Protein fosfatasa dependiente de ATP-Mg ²⁺	Merlevede, 1966-1974
Fosfatasa III	Cohen, 1977
	Li, 1982
Fosfatasa 1	Cohen, 1978. Li, 1983
Fosfatatasa HI y CI	Lee, 1984
Calcineurina	
Proteína que une al modulador	Wang, 1977
Calcineurina	Klee, 1979
CaM-BP ₈₀	Cheung 1980
Fosfatasa 2B	Cohen 1981
Fosfatasa 2	Li 1983
Protein fosfatasa dependiente de Mg²⁺	
Fosfatasa U ²	Li 1977
Fosfatasa IA	Tsuiki, 1977
Fosfatasa dependiente de Mg ²⁺	Tsuiki, 1980
Fosfatasa 2C	Cohen, 1981
Fosfatasa II	Li, 1981
Fosfatasa II cadena ligera	Pato y Adelstein, 1982
Fosfatasa II de músculo liso	Pato y Adelstein, 1983
Fosfatasa 4	Li, 1983
Fosfatasa PFK	Söling, 1984
Protein fosfatasas estimuladas por policationes	
Fosfatasa IB	Tsuiki, 1978
Fosfatasa II	Tsuiki, 1978
Fosfatasa eIF-2	Safer, 1980
Fosfatasa 2A	Cohen, 1981
Fosfatasa I	Li, 1982
Fosfatasa I cadena ligera	Pato y Adelstein, 1982
Fosfatasa I de músculo liso	Pato y Adelstein, 1983
Fosfatasa 3	Li, 1983
Fosfatasa estimable por histona H ₁	Schelender, 1984
Fosfatasas modulables por policationes	Di Salvo, 1984
Fosfatasa HII	Lee, 1984
Fosfatasas estimulables por policationes	Merlevede, 1985

APENDICE II

Principales contribuciones al estudio de las protein fosfatasas y clasificación de las PrP según los criterios de Merlevede (237)

