



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterización de las HMG-CoA reductasa quinasas de citosol y microsomas de hígado de rata: estudio cinético de su activación por nucleótidos

Alberto Ferrer Prats

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

L. 740.310

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

CARACTERIZACION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA
QUINASAS DE CITOSOL Y MICROSOMAS
DE HIGADO DE RATA. ESTUDIO CINETICO
DE SU ACTIVACION POR NUCLEOTIDOS

ALBERTO FERRER PRATS

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084025

Tesis presentada por el Licenciado
Alberto Ferrer Prats para optar al grado
de Doctor en Farmacia.

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

Abril de 1986
Barcelona

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que con su colaboración han permitido llevar a buen término el presente trabajo.

Al Profesor Dr. Fausto García Hegardt, Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, bajo cuya acertada dirección se ha realizado esta Tesis y de quien en todo momento he recibido conocimientos, comprensión y amistad.

A Carme Caelles y a Nuria Massot, cuya desinteresada ayuda y total entrega ha sido de incalculable valor para la finalización de este trabajo. También a la Dra. Victoria Esser, por haberme ofrecido su sincera amistad unida a infinidad de buenos consejos y sugerencias.

A todos mis demás compañeros de laboratorio y en particular a Diego Haro, a la Dra. Mercedes Sitges y al Dr. Gregorio Gil, con quienes compartí el siempre difícil comienzo. Asimismo, al Dr. Joaquín Ariño, Dolors Serra, Guillermina Asíns, Pedro Marrero, Rosa Giménez, Francesc Plá y a los Profesores Dr. Juan Aguilar y Dr. Juan José Guinovart. Todos ellos se han distinguido por su voluntad de colaboración y me han ofrecido su amistad.

Agradezco a Montse Ballarín, miembro del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, su ayuda en el análisis de nucleótidos.

PRESENTACION

La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa se considera la principal reguladora de la vía metabólica de síntesis del colesterol. Como se expone más adelante, se trata de una enzima que está sometida a múltiples mecanismos diferentes de regulación de su actividad, que pueden agruparse en dos grandes tipos, en función de la rapidez con que se manifiestan sus efectos sobre la actividad enzimática. Así pues, la HMG-CoA reductasa se halla controlada a través de mecanismos que afectan a la cantidad de enzima presente en las células y a través de modificaciones que alteran el estado de actividad de la enzima ya existente.

De entre estos últimos, el mecanismo regulador más importante es el que se ejerce gracias a la modificación covalente de la enzima, por fosforilación reversible.

En el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, se ha desarrollado una línea de investigación dedicada al estudio del mecanismo de interconversión de la HMG-CoA reductasa entre formas de distinta actividad, a través de la fosforilación y desfosforilación de la enzima, mediada respectivamente, por HMG-CoA reductasa quinasas y HMG-CoA reductasa fosfatasa.

La mayoría de estudios acerca de la fosforilación de la HMG-CoA reductasa, realizados anteriormente al inicio del presente trabajo, han sido desarrollados empleando preparaciones de HMG-CoA reductasa quinasa en el citosol, en los microsomas o en preparaciones escasamente purificadas. Por ello, el primer objetivo planteado, fue la obtención de preparaciones de HMG-CoA reductasa quinasa suficientemente purificadas y activas, procedentes de las fracciones citosólica y microsomal

del hígado de rata. Ello permitiría estudiar de una manera sistemática y reproducible, el fenómeno de la inactivación por fosforilación de la HMG-CoA reductasa.

Dada la controversia existente acerca de la realidad y significación del proceso de fosforilación de la HMG-CoA reductasa, nuestro objetivo inmediato fue la demostración de que nuestras preparaciones enzimáticas eran capaces de fosforilar significativamente a la reductasa, inactivándola simultáneamente, de manera reversible. Ello permitiría además, estudiar la posible existencia de características diferenciales en la fosforilación por las dos proteína quinasa purificadas.

Trabajos previos sugerían que la reductasa quinasa de citosol requería la presencia de nucleósidos difosfato durante la inactivación de la HMG-CoA reductasa, además del ATP y del Mg^{2+} . Durante la realización de la presente Memoria fue descrito el aparente carácter alostérico de la activación de la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol por tales nucleótidos. En consecuencia, se consideró sumamente interesante investigar este aspecto regulatorio de la HMG-CoA reductasa quinasa, no sólo de citosol sino también de microsomas. En esta misma línea se decidió estudiar también el posible efecto activador de los nucleósidos monofosfato, puesto que no había sido previamente descrito, ni tan siquiera probado, para ninguna de las HMG-CoA reductasa quinasa.

Una vez confirmada la hipótesis anterior se decidió profundizar en el conocimiento del posible carácter alostérico de la activación por nucleótidos no cíclicos de ambas reductasa quinasa. Este aspecto ha sido estudiado desde una perspectiva cinética, empleando la técnica de inactivación mediante un compuesto de estructura análoga a la de los nucleótidos de adenina, capaz de reaccionar covalentemente con las reductasa quinasa.

Estos estudios han permitido establecer claramente la mayor afinidad de las HMG-CoA reductasa quinasas de microsomas y de citosol por el Mg-AMP, en comparación con el Mg-ADP y también el carácter alostérico de la interacción de dichos nucleótidos.

Finalmente, y como objetivo de tipo más general, el análisis comparativo de los resultados derivados del estudio anterior con ambas HMG-CoA reductasa quinasas, permite investigar la identidad de las dos reductasa quinasas y establecer si realmente se trata de la misma enzima o bien, por el contrario, son enzimas distintas.

ABREVIACIONES MAS USUALES EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

AMP	Adenosina-5'-monofosfato
dAMP	Desoxiadenosina-5'-monofosfato
AMPc	Adenosina-3',5'-monofosfato
ADP	Adenosina-5'-difosfato
Ap ₅ A	P ¹ ,P ⁵ -di(adenosina-5')pentafosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
Bis-Tris	Bis(2-hidroximetil)imino-tris-(hidroximetil)metano
¹⁴ C	Carbono 14
Ci, mCi, μCi	Curio, milicurio, microcurio
CMP	Citidina-5'-monofosfato
CDP	Citidina-5'-difosfato
CTP	Citidina-5'-trifosfato
DBED	Dibenzoiletildiamina
DCCI	Diciclohexilcarbodiimida
DEAE	Dietilaminoetil
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetracetato
EGTA	Etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracetato
FSO ₂ BzAdo, FSBA	Fluorosulfonilbenzoiladenosina
x g	Gravedades
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
GMP	Guanosina-5'-monofosfato
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
Hepes	Acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
HMG, ácido	Acido 3-hidroxi-3-metilglutárico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
³ H	Tritio
IMP	Inosina-5'-monofosfato
IDP	Inosina-5'-difosfato

ITP	Inosina-5'-trifosfato
K_a	Constante de activación
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LDL	Lipoproteína de baja densidad
M, mM, μ M	Molar, milimolar, micromolar
mA	Miliamperios
MVL	Mevalonolactona
NAD^+	Nicotinamidoadenín dinucleótido
NADH	Nicotinamidoadenín dinucleótido reducido
$NADP^+$	Nicotinamidoadenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamidoadenín dinucleótido fosfato reducido
nm	Nanómetros
^{32}P	Fósforo 32
Pi	Ortofosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPO	2,5-difeniloxazol
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SO_2BzAdo	Sulfonilbenzoiladenosina
TBAP	Fosfato de tetrabutilamonio
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TPA	12-tetradecanoil-13-acetil forbol
TPCK	L-1-tosilamido-2-feniletilclorometilcetona
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidades internacionales de actividad enzimática.
UMP	Uridina-5'-monofosfato
UDP	Uridina-5'-difosfato
UTP	Uridina-5'-trifosfato

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1.	REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR MODIFICACION COVALENTE.....	1
1.1.1.	Regulación de la actividad enzimática por ciclos de fosforilación y desfosforilación	2
1.2.	ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL.....	6
1.3	3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL COENZIMA A REDUCTASA.....	14
1.3.1.	Estructura de la HMG-CoA reductasa.....	15
1.3.2.	Distribución de la HMG-CoA reductasa.....	17
1.3.3.	Solubilización de la HMG-CoA reductasa...	18
1.3.4.	Sensibilidad a la temperatura.....	20
1.3.5.	Ritmo cíclico de la HMG-CoA reductasa....	20
1.4.	REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA.....	22
1.4.1.	Regulación a largo plazo.....	24
1.4.2.	Regulación a corto plazo.....	25
1.5.	REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION REVERSIBLE.....	29
1.5.1.	Inactivación y reactivación de la HMG-CoA reductasa en microsomas y soluble.....	29
1.5.2.	Fosforilación y desfosforilación de la HMG-CoA reductasa en microsomas y soluble	35
1.6.	CARACTERIZACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA.....	42
1.6.1.	Distribución subcelular.....	42
1.6.2.	Purificación y propiedades.....	43
1.6.3.	Fosforilación múltiple de la HMG-CoA reductasa.....	46
1.6.4.	Dependencia de nucleótidos.....	48
1.6.5.	Regulación de la HMG-CoA reductasa quina- sa por fosforilación y desfosforilación..	51

1.7.	CARACTERIZACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA.. FOSFATASA.....	57
1.8.	REGULACION DEL SISTEMA BICICLICO.....	62
1.8.1.	Regulación por hormonas.....	62
1.8.2.	Regulación por esteroides y mevalonato....	69
1.9.	ARGUMENTOS EN CONTRA DE LA REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION.....	77
1.9.1.	Interferencia de la mevalonato quinasa en la determinación de la actividad reducta- sa quinasa.....	77
1.9.2.	Resistencia de la HMG-CoA reductasa solu- ble a la fosforilación e inactivación....	79
1.9.3.	Invariabilidad del estado de fosforilación de la HMG-CoA reductasa "in vivo".....	81
1.10.	PROTEINA QUINASAS.....	85
1.10.1.	Proteína quinasas dependientes de AMP cí- clico.....	85
1.10.2.	Proteína quinasas dependientes de calcio.	87
1.10.2.1.	Fosforilasa quinasa.....	87
1.10.2.2.	Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina.....	88
1.10.2.3.	Proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos.....	89
1.10.3.	Proteína quinasas independientes de AMP cíclico y de calcio.....	91
1.10.3.1.	Caseína quinasas-1 y -2.....	91
1.10.3.2.	Glucógeno sintasa quinasa-3....	92
1.10.3.3.	Glucógeno sintasa quinasa-4....	93
1.10.3.4.	Proteína quinasa activable por heparina.....	93
1.10.3.5.	Proteína quinasa multifuncional	94
1.11.	COMPUESTOS ANALOGOS A LOS NUCLEOTIDOS DE- RIVADOS DE LA ADENINA.....	95

2. MATERIAL Y METODOS

2.1.	REACTIVOS Y PRODUCTOS UTILIZADOS.....	101
------	---------------------------------------	-----

2.1.1.	Reactivos generales.....	101
2.1.2.	Proteínas.....	102
2.1.3.	Reactivos para cromatografía.....	103
2.1.4.	Productos radioactivos.....	104
2.1.5.	Productos para autorradiografía.....	104
2.1.6.	Preparación del R,S [^{14}C] HMG-CoA.....	104
2.1.6.1.	Síntesis del R,S [^{14}C] HMG-CoA...	104
2.1.6.2.	Valoración espectrofotométrica del HMG-CoA.....	106
2.1.6.3.	Preparación de la HMG-CoA liasa	108
2.1.7.	Preparación del R,S [$2\text{-}^{14}\text{C}$] mevalonato....	109
2.1.8.	Síntesis del [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP.....	110
2.1.9.	Síntesis del 5'-p-fluorosulfonilbenzoil- adenosina.....	112
2.2.	CONDICION DE LOS ANIMALES UTILIZADOS....	114
2.2.1.	Ratas.....	114
2.3.	OBTENCION DE LOS PREPARADOS ENZIMATICOS.	116
2.3.1.	Obtención de la HMG-CoA reductasa micro- somal libre de HMG-CoA reductasa quinasa	116
2.3.1.1.	Obtención de la HMG-CoA reducta- sa microsomal.....	116
2.3.1.2.	Conservación de la HMG-CoA re- ductasa microsomal.....	117
2.3.1.3.	Neutralización de la HMG-CoA re- ductasa quinasa microsomal.....	118
2.3.2.	Purificación a homogeneidad de la HMG-CoA reductasa.....	118
2.3.2.1.	Obtención de los microsomas....	119
2.3.2.2.	Solubilización de la HMG-CoA re- ductasa de los microsomas.....	119
2.3.2.3.	Calentamiento a 64°C.....	121
2.3.2.4.	Cromatografía en columna de Affi-Gel Blue.....	122
2.3.2.5.	Cromatografía en columna de HMG-CoA-hexano-agarosa.....	122
2.4.	TECNICAS ANALITICAS.....	124
2.4.1.	Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa utilizando [^3H] HMG-CoA como sustrato.....	124

2.4.2.	Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa utilizando [^{14}C]HMG-CoA como sustrato.....	126
2.4.3.	Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa quinasa utilizando HMG-CoA reductasa microsomal como sustrato.....	127
2.4.4.	Determinación de la actividad HMG-CoA reductasa quinasa utilizando HMG-CoA reductasa homogénea como sustrato.....	129
2.4.5.	Determinación de la actividad mevalonato quinasa.....	131
2.4.6.	Determinación de la concentración de proteína.....	132
2.4.7.	Análisis de nucleótidos por cromatografía líquida de alta presión.....	132
2.5.	FOSFORILACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA...	135
2.6.	REACTIVACION Y DESFOSFORILACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA INACTIVA Y FOSFORILADA	137
2.7.	FRAGMENTACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA MARCADA CON ^{32}P	139
2.7.1.	Digestión con tripsina de la HMG-CoA reductasa.....	139
2.7.2.	Hidrólisis parcial de la HMG-CoA reductasa.....	140
2.7.2.1.	Hidrólisis ácida.....	140
2.7.2.2.	Hidrólisis alcalina.....	141
2.8.	TECNICAS ELECTROFORETICAS.....	142
2.8.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.....	142
2.8.1.1.	Preparación de los geles.....	142
2.8.1.2.	Preparación de las muestras....	143
2.8.1.3.	Condiciones de la electroforesis	144
2.8.1.4.	Tinción y secado de los geles..	144
2.8.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y urea.....	145
2.8.2.1.	Preparación de los geles.....	145
2.8.2.2.	Preparación de las muestras....	146
2.8.2.3.	Condiciones de la electroforesis	147

2.8.3. Electroforesis de alto voltaje en capa fina.....	148
2.9. DETECCION DE PROTEINAS RADIOACTIVAS.....	149
2.9.1. Fluorografía.....	149
2.9.2. Autorradiografía indirecta.....	150
2.10. INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA POR 5'-p-FLUOROSULFONILBENZOIL-ADENOSINA.....	152
2.11. INCORPORACION DE 5'-p-[adenina-8- ¹⁴ C]SULFONILBENZOILADENOSINA.....	154

3. RESULTADOS

3.1. PURIFICACION DE HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL DE HIGADO DE RATA.....	156
3.1.1. Obtención del citosol.....	156
3.1.2. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	157
3.1.3. Cromatografía en columna de Affi-Gel Blue	159
3.1.4. Cromatografía de filtración molecular en gel a través de Ultrogel Aca 34.....	161
3.1.5. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	163
3.1.6. Cromatografía en columna de ATP-hexano-agarosa.....	163
3.2. PURIFICACION DE HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA.....	168
3.2.1. Obtención de microsomas de hígado de rata	168
3.2.2. Extracción de la HMG-CoA reductasa quinasa de microsomas.....	169
3.2.3. Cromatografía en columna de Affi-Gel Blue	172
3.2.4. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa	172
3.2.5. Cromatografía de filtración molecular en gel a través de Ultrogel Aca 34.....	175
3.2.6. Cromatografía en columna de ATP-hexano-agarosa.....	175
3.3. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS.....	177

3.4.	PRESENCIA DE ACTIVIDAD MEVALONATO QUINASA EN LAS DISTINTAS ETAPAS DE PURIFICACION DE LAS REDUCTASA QUINASAS.....	181
3.5.	EXPRESION DE LA ACTIVIDAD MEVALONATO QUINASA EN LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD REDUCTASA QUINASA	181
3.6.	FOSFORILACION E INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA CON $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ POR ACCION DE LAS REDUCTASA QUINASAS DE HIGADO DE RATA.....	183
3.7.	IDENTIFICACION Y ANALISIS DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFORILADA CON $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ POR ACCION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS	186
3.8.	DESFOSFORILACION Y REACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFORILADA E INACTIVADA POR LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS DE HIGADO DE RATA.....	189
3.9.	PROPIEDADES ENZIMATICAS DE LAS REDUCTASA QUINASAS.....	193
3.9.1.	Pesos moleculares aparentes.....	193
3.9.2.	Activación por ADP y AMP.....	193
3.9.3.	Dependencia de la concentración de enzima	196
3.9.4.	Determinación de los pHs óptimos.....	197
3.9.5.	Determinación de la concentración óptima de MgCl_2	199
3.9.6.	Determinación de las constantes de Michaelis-Menten de las HMG-CoA reductasa quinasas para el sustrato HMG-CoA reductasa	202
3.9.7.	Determinación de las constantes de Michaelis-Menten de las HMG-CoA reductasa quinasas para el sustrato ATP.....	202
3.9.8.	Condiciones de ensayo de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	204
3.9.9.	Determinación de las constantes de activación de las HMG-CoA reductasa quinasas para el ADP.....	206
3.9.10.	Determinación de las constantes de activación de las HMG-CoA reductasa quinasas para el AMP.....	208

3.10.	ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ACTIVADOR DEL AMP Y DEL ADP SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS.....	211
3.10.1.	Inactivación de la HMG-CoA reductasa....	211
3.10.2.	Fosforilación de la HMG-CoA reductasa...	213
3.11.	INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR LA ACCION COMBINADA DE LAS REDUCTASA QUINASAS.....	216
3.11.1.	Inactivación secuencial de la HMG-CoA reductasa.....	216
3.11.2.	Inactivación simultánea de la HMG-CoA reductasa.....	220
3.12.	FRAGMENTACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA CON TRIPSINA.....	222
3.13.	ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS DE LA HMG-CoA REDUCTASA.....	226
3.14.	EFECTO DE NUCLEOTIDOS Y NUCLEOSIDOS SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS HEPATICAS.....	229
3.14.1.	Efecto de los nucleósidos difosfato.....	229
3.14.2.	Efecto de los nucleósidos monofosfato...	230
3.14.3.	Efecto de 2'-AMP, 3'-AMP y 2'-dAMP.....	230
3.14.4.	Efecto de adenosina, ribosa-5-fosfato y NADP ⁺	234
3.14.5.	Capacidad de diversos nucleósidos trifosfato para actuar como sustratos de las reductasa quinasas.....	234
3.15.	EFECTO DEL AMPc Y DE LA HEPARINA SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS.....	239
3.16.	EFECTO DEL CALCIO, CALMODULINA Y FOSFOLIPIDOS SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS.....	241
3.17.	REACCION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS CON EL COMPUESTO 5'-p-FLUOROSULFONILBENZOILADENOSINA.....	245
3.17.1.	Efecto de la N,N'-dimetilformamida sobre las HMG-CoA reductasa quinasas.....	246
3.17.2.	Efecto del 5'-FSO ₂ BzAdo sobre la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol.....	247

3.17.3. Inactivación dependiente del tiempo de incubación en presencia de 5'-FSO ₂ BzAdo.	249
3.17.4. Efecto de diversos ligandos sobre las velocidades de inactivación de las reductasa quinasa por 5'-FSO ₂ BzAdo.....	254
3.17.4.1. Protección con MgCl ₂	255
3.17.4.2. Protección con ATP y MgCl ₂ /ATP	257
3.17.4.3. Protección con AMP y MgCl ₂ /AMP	259
3.17.4.4. Protección con MgCl ₂ /ADP.....	262
3.17.4.5. Protección con 2'-AMP, 3'-AMP, MgCl ₂ /2'-AMP y MgCl ₂ /3'-AMP...	264
3.17.4.6. Protección con MgCl ₂ /ATP/AMP..	266
3.17.4.7. Protección con HMG-CoA reductasa.....	267
3.17.5. Identificación de la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol de hígado de rata....	267
3.17.6. Incorporación de 5'-SO ₂ Bz [¹⁴ C]Ado a la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol....	271

4. DISCUSION

4.1. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE DOS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS DE HIGADO DE RATA.....	274
4.2. HMG-CoA REDUCTASA QUINASA Y MEVALONATO QUINASA.....	283
4.3. PROPIEDADES CINETICAS DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS.....	285
4.4. INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR LA ACCION COMBINADA DE LAS REDUCTASA QUINASAS.....	287
4.5. FOSFORILACION MULTIPLE DE LA HMG-CoA REDUCTASA.....	289
4.6. ACTIVACION DE LAS REDUCTASA QUINASAS POR NUCLEOTIDOS.....	293
4.7. CARACTER ALOSTERICO DE LA ACTIVACION POR NUCLEOTIDOS DE LAS REDUCTASA QUINASAS....	300

4.8.	INFLUENCIA DE OTROS EFECTORES SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS.....	308
4.9.	ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS.....	310
5.	<u>CONCLUSIONES</u>	312
6.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	318

ESQUEMAS

I.	Vía de síntesis del colesterol.....	9
II.	Productos del metabolismo del mevalonato	11
III.	Mecanismos de regulación de la enzima HMG-CoA reductasa.....	23
IV.	Modelo de regulación de la HMG-CoA reductasa por fosforilación reversible.....	40
V.	Modelo de regulación de la HMG-CoA reductasa y de la HMG-CoA reductasa quinasa a través de fosforilación reversible.....	54
VI.	Modelo de regulación de la HMG-CoA reductasa por dos sistemas de quinasa.....	68
VII.	Relación estructural entre el compuesto 5'-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina y los nucleótidos derivados de la adenina.	99

FIGURAS

1.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del citosol de hígado de rata.....	158
2.	Cromatografía en columna de Affi-Gel Blue de la reductasa quinasa de citosol.....	160

3.	Cromatografía de filtración molecular en gel a través de Ultrogel Aca 34 de la reductasa quinasa de citosol.....	162
4.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de la reductasa quinasa de citosol.....	164
5.	Cromatografía en columna de ATP-hexano-agarosa.....	166
6.	Cromatografía en columna de Affi-Gel Blue de la reductasa quinasa de microsomas de hígado de rata.....	173
7.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa de la reductasa quinasa de microsomas...	174
8.	Cromatografía de filtración molecular en gel a través de Ultrogel Aca 34 de la reductasa quinasa de microsomas.....	176
9.	Cromatografía en columna de ATP-hexano-agarosa.....	178
10.	Fosforilación e inactivación de la HMG-CoA reductasa con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por acción de las reductasa quinasas de hígado de rata.....	184
11.	Identificación de la HMG-CoA reductasa fosforilada con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por acción de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	187
12,13.	Desfosforilación y reactivación de la HMG-CoA reductasa fosforilada e inactivada por acción de las HMG-CoA reductasa quinasas de hígado de rata.....	190
14.	Dependencia de la concentración de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	198
15.	Determinación del pH óptimo de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	200
16.	Concentración óptima de MgCl_2 en el ensayo de las HMG-CoA reductasa quinasas..	201
17,18.	Determinación de las constantes de Michaelis-Menten de las HMG-CoA reductasa quinasas para el sustrato HMG-CoA reductasa	203
19,20.	Determinación de las constantes de Michaelis-Menten de las HMG-CoA reductasa quinasas para el sustrato ATP.....	205

21,22.	Determinación de las constantes de activación de las HMG-CoA reductasa quinasas para el activador ADP.....	207
23,24.	Determinación de las constantes de activación de las HMG-CoA reductasa quinasas para el activador AMP.....	209
25.	Inactivación de la HMG-CoA reductasa por las reductasa quinasas en presencia de ATP, ATP/ADP y ATP/AMP.....	212
26.	Fosforilación de la HMG-CoA reductasa por las reductasa quinasas en presencia de ATP, ATP/ADP y ATP/AMP.....	214
27.	Inactivación de la HMG-CoA reductasa por adición secuencial de la misma reductasa quinasa.....	218
28.	Inactivación de la HMG-CoA reductasa por adición secuencial de la reductasa quinasa procedente de la fracción complementaria.....	219
29.	Inactivación de la HMG-CoA reductasa por acción simultánea de ambas quinasas.....	221
30.	Fragmentación triptica de la HMG-CoA reductasa fosforilada por las HMG-CoA reductasa quinasas.....	225
31.	Análisis de fosfoaminoácidos de la HMG-CoA reductasa fosforilada por las reductasa quinasas.....	227
32.	Efecto de los nucleósidos difosfato sobre la actividad de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	231
33.	Efecto de los nucleósidos monofosfato sobre la actividad de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	232
34.	Efecto de 2'-AMP, 3'-AMP y 2'-dAMP sobre la actividad de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	233
35.	Efecto de adenosina, ribosa-5-fosfato y NADP ⁺ sobre la actividad de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	235

36.	Capacidad de los nucleósidos trifosfato para actuar como sustrato de las HMG-CoA reductasa quinasa.....	237
37.	Efecto de la N,N'-dimetilformamida sobre las HMG-CoA reductasa quinasa.....	248
38.	Efecto del 5'-FSO ₂ BzAdo sobre la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol.....	250
39,40.	Inactivación de las HMG-CoA reductasa quinasa dependiente del tiempo de incubación con 5'-FSO ₂ BzAdo.....	253
41,42.	Protección con MgCl ₂ frente a la inactivación por 5'-FSO ₂ BzAdo.....	256
43,44.	Protección con ATP y MgCl ₂ /ATP frente a la inactivación por 5'-FSO ₂ BzAdo.....	258
45,46.	Protección con AMP y MgCl ₂ /AMP frente a la inactivación por 5'-FSO ₂ BzAdo.....	260
47,48.	Protección con MgCl ₂ /ADP frente a la inactivación con 5'-FSO ₂ BzAdo.....	263
49.	Protección con 2'-AMP, 3'-AMP, MgCl ₂ /2'-AMP y MgCl ₂ /3'-AMP frente a la inactivación por 5'-FSO ₂ BzAdo.....	265
50.	Identificación de la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol por marcaje covalente con 5'-SO ₂ BzAdo.....	270
51.	Incorporación de 5'-SO ₂ Bz [¹⁴ C]Ado a la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol....	272

TABLAS

I.	Purificación de HMG-CoA reductasa quinasa de citosol de hígado de rata.....	167
II.	Extracción de la HMG-CoA reductasa quinasa de microsomas.....	170
III.	Purificación de HMG-CoA reductasa quinasa de microsomas de hígado de rata.....	179

IV.	Distribución subcelular de la HMG-CoA reductasa quinasa.....	180
V.	Activación de las HMG-CoA reductasa quinasas por ADP y AMP.....	195
VI.	Efecto de nucleótidos y nucleósidos sobre la actividad de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	238
VII.	Efecto del AMPc y de la heparina sobre las HMG-CoA reductasa quinasas.....	240
VIII.	Efecto de calcio, calcio/calmodulina, calcio/fosfatidilserina y calcio/fosfatidilserina/dioleína sobre las HMG-CoA reductasa quinasas.....	242
IX.	Efecto de los ligandos sobre las velocidades de pérdida de la capacidad de activación por AMP y de inactivación total de las HMG-CoA reductasa quinasas.....	268

1. INTRODUCCION

1.1. REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR MODIFICACION COVALENTE

El mecanismo de modificación covalente de las proteínas constituye uno de los principales sistemas de regulación de las funciones celulares, tanto en células procariotas como en células eucariotas. De acuerdo con las necesidades celulares, una proteína interconvertible alterna su estado entre formas modificadas covalentemente y formas no modificadas, gracias a la acción de dos enzimas que catalizan las reacciones opuestas.

En la actualidad se conocen numerosas formas distintas de modificación covalente de las proteínas de los sistemas biológicos, que se traducen en una alteración de sus funciones. Sin embargo, tan solo un reducido número de ellas tiene carácter reversible. Las proteínas interconvertibles pueden ser agrupadas en seis clases según el tipo de modificación que experimentan (1): fosforilación, nucleotidilación, ADP-ribosilación, metilación, acetilación y tirosilación.

El trabajo que se expone a continuación está dedicado al estudio del primero de los citados mecanismos de interconversión y más concretamente, al de aquellas enzimas que catalizan las reacciones de fosforilación de la HMG-CoA reductasa, principal enzima regulado-

ra de la biosíntesis de colesterol.

1.1.1. REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR CICLOS DE FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION

La existencia de fósforo en las proteínas es conocida desde hace aproximadamente 100 años, si bien su importancia real sólo se puso de manifiesto cuando se comprobó que su incorporación o liberación de ciertas proteínas iba acompañada de cambios en la actividad enzimática o en la función de las mismas.

Los primeros descubrimientos en este campo fueron protagonizados por Krebs, Fisher y Larner, quienes demostraron que el control nervioso y hormonal del metabolismo del glucógeno en músculo esquelético, se ejercía a través de cambios en el estado de fosforilación de la glucógeno fosforilasa (2), la glucógeno fosforilasa quinasa (3) y la glucógeno sintasa (4). Sin embargo, fue el descubrimiento de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (5), el acontecimiento que desencadenó el extraordinario desarrollo experimentado por las investigaciones en este campo.

Se ha establecido que es mayor el número de enzimas cuya actividad está regulada por fosforilación y desfosforilación, que el de las enzimas que están reguladas por cualquier otro tipo de mecanismo covalente. Las actividades de más de treinta enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, están reguladas mediante ciclos de fosforilación y desfosforilación (6). Además, procesos tales como la contracción del músculo liso (7), la adquisición de resistencia celular a determinados virus (8), ciertas transformaciones inducidas por virus (9,10) y la respuesta celular a hormonas adrenérgicas, insulina y al factor

de crecimiento epidérmico (11), están mediadas también por fosforilación de proteínas. Todos estos ejemplos, a los que cabría añadir la creciente importancia asignada a este sistema de regulación en el control de la estructura y expresión genética, permiten afirmar que el proceso de fosforilación y desfosforilación de proteínas constituye el principal sistema de respuesta de las células frente a los estímulos fisiológicos extracelulares.

En este tipo de sistemas, la interconversión de una proteína fosforilable está catalizada por una proteína quinasa y una proteína fosfatasa. Tales sistemas, en los que una enzima modifica a otra enzima o proteína, se definen como sistemas en cascada. Frecuentemente, cuando la forma activa de una enzima interconvertible actúa a su vez como una enzima modificadora de la actividad de una segunda enzima interconvertible, ambos ciclos trabajan acoplados, constituyendo cascadas bicíclicas.

Habitualmente las enzimas fosforilables están sometidas a una regulación adicional por efectores alostéricos, que modifican su actividad directamente o bien a través de la inducción de cambios en las velocidades de fosforilación y desfosforilación. A su vez, el grado de fosforilación es responsable de modificaciones en los valores de constantes enzimáticas tales como, la K_M para los sustratos, la K_a para un determinado activador o la K_i para un cierto inhibidor, simultánea o separadamente. Es decir, se trata de un mecanismo que modifica la actividad enzimática en función del grado de fosforilación de la proteína, el cual a su vez es dependiente de los niveles de efectores celulares presentes, quienes además, pueden hacer variar la amplitud del efecto derivado del estado de fosforilación de la enzima. En resumen, este tipo de sistemas en cascada constituye un modelo óptimo de integración de las diferentes señales metabólicas, dado que, merced a la existencia de múltiples puntos de

interacción de las enzimas integrantes de los mismos con los diversos efectores alostéricos, son sensibles a las fluctuaciones en los niveles de multitud de metabolitos. Así pues, la actividad específica de una enzima fosforilable puede variar continua y progresivamente, dentro de un amplio margen de valores, debiéndose descartar la idea de un mecanismo de regulación rígido e independiente, que actúa a través de cambios drásticos entre dos estados extremos de activación.

Estos sistemas cíclicos de fosforilación y desfosforilación además de proporcionar, lo que podríamos definir como una elevada flexibilidad regulatoria, presentan ventajas adicionales derivadas de una alta capacidad de amplificación de las señales metabólicas generadas por concentraciones notablemente bajas de un efector primario, de una gran rapidez de respuesta frente a dichas señales (12,13) y de un consumo energético muy pequeño en comparación con el consumo total de energía celular (14).

Un principio generalizado es que las enzimas involucradas en vías metabólicas de degradación resultan habitualmente activadas por fosforilación e inactivadas por desfosforilación, mientras que la mayoría de las enzimas reguladoras de los procesos biosintéticos son inactivadas por fosforilación y activadas por desfosforilación (15).

Este hecho permite que diferentes rutas metabólicas puedan ser reguladas coordinada y sincrónicamente por acción de un reducido número de proteína quinasas y proteína fosfatasas, en respuesta a un relativamente reducido número de mensajeros secundarios, entre los que se pueden citar: AMPc, GMPc, calcio, fosfolípidos, poliaminas, etc. La activación de la glucógeno fosforilasa, simultánea a la inactivación de la glucógeno sintasa producida por la estimulación de la proteína quinasa depen-

diente de AMP cíclico, pone de manifiesto la existencia de una regulación sincronizada del metabolismo del glucógeno en respuesta a la acción de la adrenalina. Esta misma hormona induce la activación de la triacilglicerol lipasa (16) simultánea a la inactivación de la glicerol-fosfato acil transferasa (15), lo cual evidencia de nuevo la existencia de un mecanismo coordinado de regulación de la degradación y síntesis, respectivamente, de los triglicéridos en el tejido adiposo. También la adrenalina estimula la inactivación de la acetil-CoA carboxilasa (17), lo cual asociado a la inactivación de la glucógeno sintasa, señala la existencia de un control coordinado entre las vías de síntesis de ácidos grasos y del glucógeno.

Así pues, el mecanismo de interconversión de una enzima entre formas activas e inactivas por fosforilación y desfosforilación debe ser entendido como un proceso dinámico, en constante funcionamiento, que puede alcanzar diferentes estados de equilibrio, resultantes de las actividades relativas de las enzimas transformadoras (proteína quinasas y proteína fosfatasas) y que se manifiesta en forma de diferentes grados de fosforilación de la proteína regulada.

1.2. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DEL COLESTEROL

El colesterol fue obtenido por primera vez a partir de cálculos biliares a finales del siglo XVIII, sin embargo su estructura no pudo ser determinada hasta el año 1932. Es un esteroide perteneciente al grupo de los lípidos menos polares y su esqueleto carbonado, de 27 átomos de carbono, contiene un solo doble enlace (Δ^5) y un grupo hidroxilo sobre C_3 . La molécula está constituida por tres anillos de ciclohexano y uno de ciclopentano en fusión trans, con una cadena lateral de ocho átomos de carbono.

El colesterol es un componente de las membranas celulares, presente en la casi totalidad de las células eucariotas. Por el contrario, los individuos pertenecientes al reino de los procariotas habitualmente no requieren colesterol (18). En las membranas celulares se encuentra orientado perpendicularmente a la superficie de las mismas, principalmente en forma libre, no esterificado, dispuesto en paralelo entre los esfingolípidos y los glicerolípidos. Algunas células son capaces de almacenarlo, esterificado de manera reversible con ácidos grasos de cadena larga. Por último, también se encuentra formando parte de las lipoproteínas circulantes, que lo transportan entre los diferentes tejidos, bien en forma esterificada, bien en forma libre.

Actualmente se ha comprobado que el colesterol es un componente determinante de la naturaleza físico-química de las membranas celulares y que la concentración y distribución del mismo, puede modificar la capacidad catalítica de enzimas ligadas a dichas membranas (19,20), al modificar su grado de fluidez (21). Entre estas enzimas se encuentra la propia HMG-CoA reductasa, como veremos más adelante.

La mayoría de las células de los organismos eucariotas requieren colesterol para la construcción de las membranas celulares, tanto para la síntesis "de novo" durante la proliferación celular, como para el mantenimiento del ritmo de recambio en las membranas de células ya existentes. Además de cumplir esta importante función estructural, el colesterol en determinados tejidos, es precursor de la síntesis de compuestos esteroideos tales como los ácidos biliares (hígado), las hormonas esteroideas (glándulas suprarrenales y ovarios) y determinadas vitaminas. Debido a las funciones que cumple es necesario que pueda ser transportado a todos los tejidos del organismo, lo cual se hace a través del plasma fundamentalmente, por medio de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (22).

La mayor parte del colesterol transportado por las lipoproteínas plasmáticas lo es en forma de ésteres, generados por transferencia de un residuo de ácido graso procedente de la lecitina (fosfolípido mayoritario en el plasma) al hidroxilo del colesterol. Esta reacción está catalizada por la enzima plasmática, lecitin-colesterol acil transferasa (LCAT) (23). Esta misma reacción de esterificación tiene lugar en los tejidos periféricos del organismo, aunque en este caso catalizada por la enzima acil-CoA-colesterol acil transferasa (ACAT) (24).

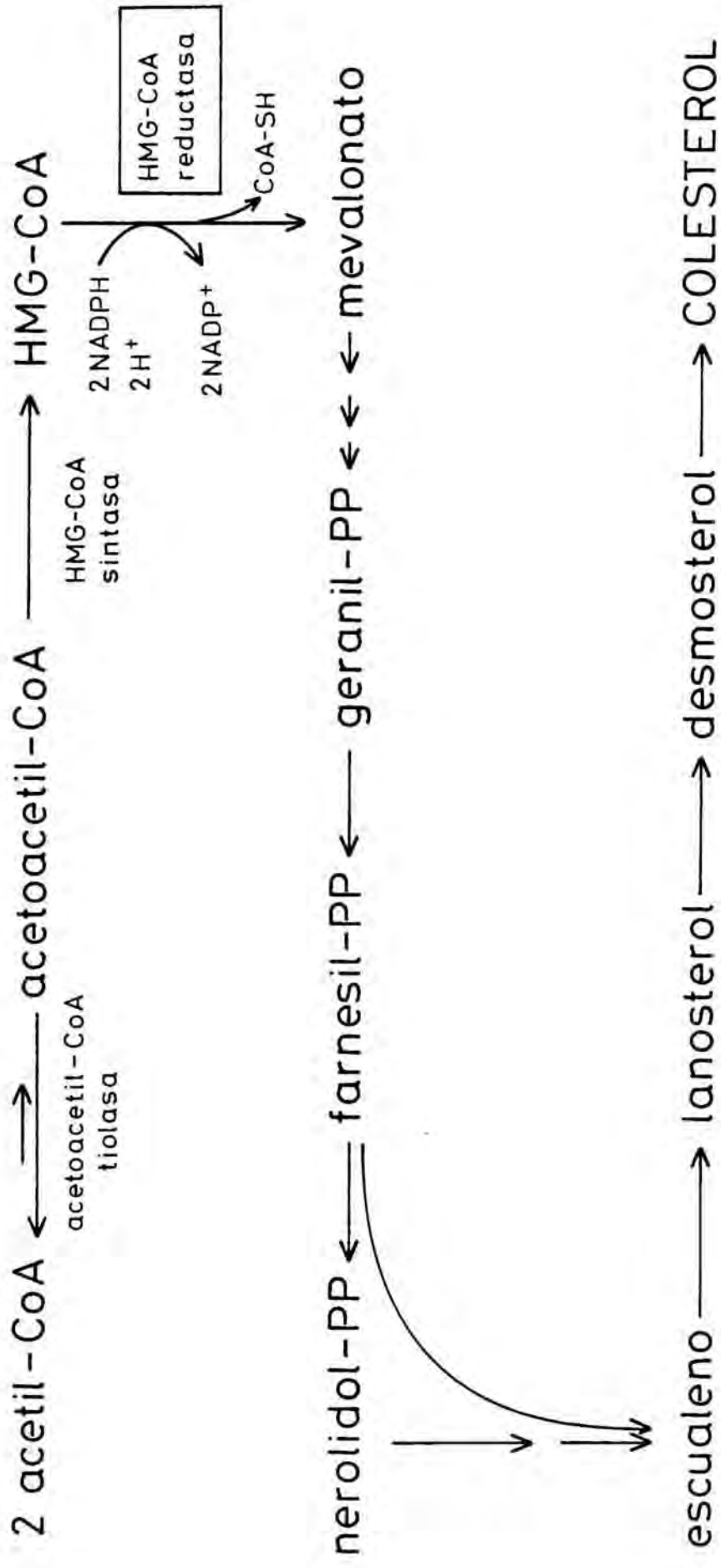
El colesterol requerido para cubrir las necesi-

dades celulares del organismo puede ser obtenido de la dieta o sintetizado en el hígado, aunque en menor proporción también puede ser sintetizado en el intestino, en el riñón y en el cerebro, en los primeros días después del nacimiento. Debemos tener presente que todas las células del organismo tienen capacidad real para sintetizar colesterol sin embargo, el aporte de colesterol por las LDL circulantes hace que esta capacidad no se exprese. Así pues, el hígado es el órgano que capta y degrada más colesterol que ningún otro, debido a su gran tamaño y a la elevada concentración de receptores de LDL (25-27).

En este órgano el colesterol puede ser transformado en ácidos biliares que se excretan por la bilis al intestino, aunque realmente una buena parte es reabsorbida en el propio intestino, con objeto de reducir las necesidades de colesterol por parte del hígado. La eliminación real del colesterol sobrante se verifica mayoritariamente por las heces, como colesterol libre o bien en forma de productos de transformación, tales como las sales biliares y los alcoholes saturados colestanol y coprostanol. La orina en menor proporción elimina derivados del colesterol tales como las hormonas esteroideas o sus productos de transformación.

El colesterol se sintetiza a través de una de las más largas vías metabólicas conocidas, pues su síntesis a partir de ácido acético precisa de más de 45 reacciones enzimáticas diferentes. Son metabolitos importantes de esta vía el hidroximetilglutaril coenzima A, el ácido mevalónico, distintos terpenos como el geraniol, el farnesol y el escualeno y compuestos con estructura esteroidea, como el lanosterol y el desmosterol (esquema I). Esta larga vía presenta dos etapas bien diferenciadas. Una primera totalmente anaeróbica, desde acetato hasta escualeno y una segunda, desde escualeno hasta colesterol, que requiere la presencia de oxígeno molecular.

ESQUEMA I VIA DE SINTESIS DEL COLESTEROL



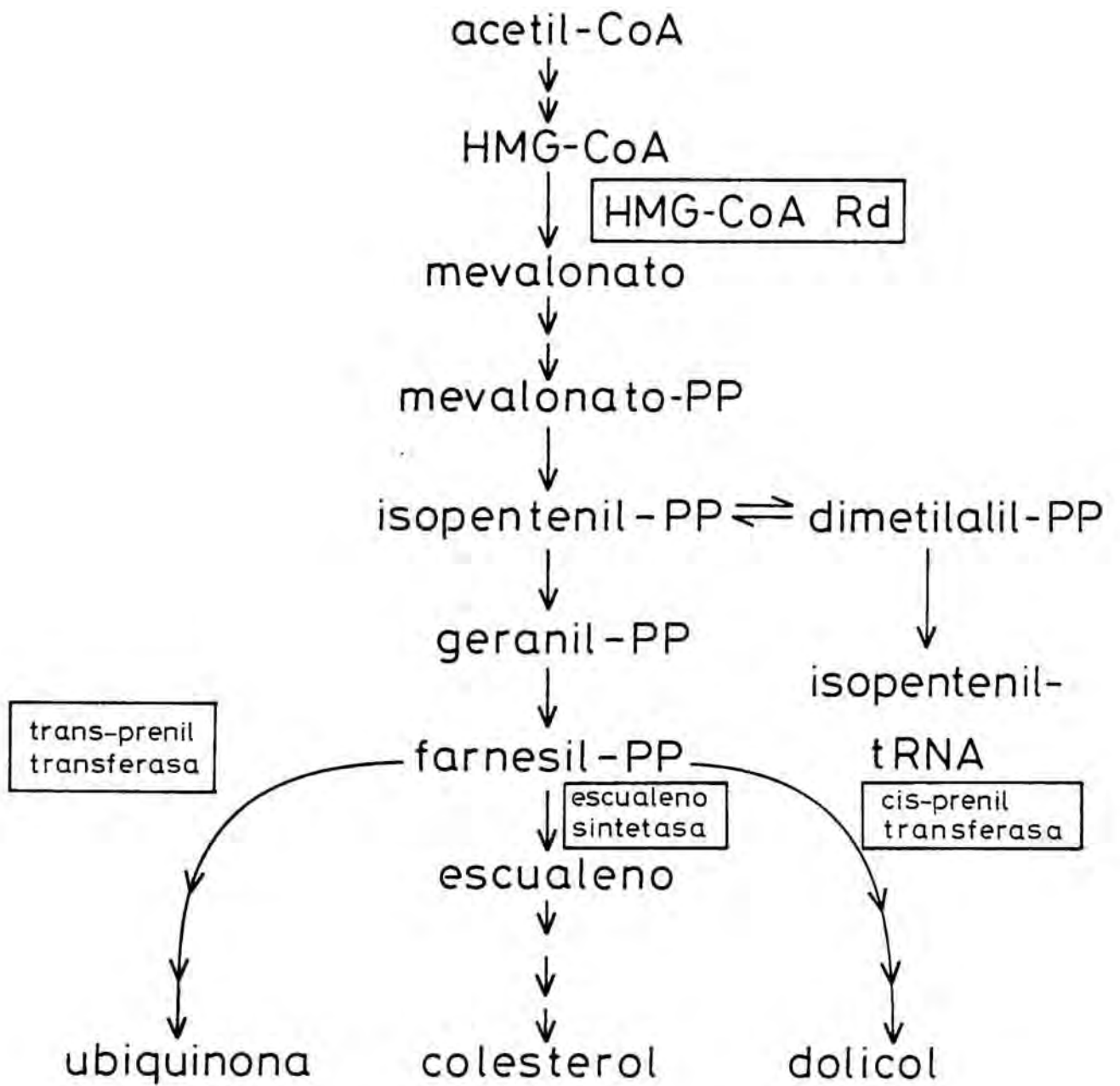
A través de esta vía no sólo se sintetiza escualeno y colesterol, sino también toda una serie de compuestos polisoprenoides que son esenciales para el normal desarrollo de las funciones celulares tales como el dolicol (28) la ubiquinona (29) y la isopenteniladenina de ciertos RNAs de transferencia (30) (esquema II).

Es un hecho sobradamente comprobado que la concentración de colesterol en sangre se mantiene constante dentro de unos valores normales, que oscilan alrededor de 1,9 g/L, lo cual pone de manifiesto la existencia de mecanismos reguladores de los niveles plasmáticos de colesterol. La aparición de defectos en el funcionamiento de estos mecanismos provoca la aparición de alteraciones patológicas causadas por una elevación incontrolada del nivel de colesterol plasmático. De entre ellas, las más frecuentes son la formación de cálculos biliares y la aterosclerosis que es responsable de la mitad de las muertes que se registran en los países occidentales.

En esta enfermedad, el colesterol, carbohidratos complejos, sales de calcio, plaquetas y células proliferadas se acumulan en las paredes de las arterias y forman voluminosas placas, que obstaculizan de tal manera el flujo de la sangre que acaba formándose un coágulo. La obstrucción de la arteria, a su vez, deriva en un ataque cardíaco o una apoplejía de consecuencias generalmente fatales para el enfermo. La formación de cálculos biliares es consecuencia del cambio de composición de la bilis, constituida por micelas en las que el colesterol se halla asociado a la lecitina y los ácidos biliares. Pequeñas variaciones en las proporciones relativas de estos componentes provocan la saturación de colesterol, que precipita en forma de microcristales que pueden crecer hasta constituir cálculos de gran tamaño.

En la actualidad está claro que los niveles de

ESQUEMA II PRODUCTOS DEL METABOLISMO DEL MEVALONATO



colesterol plasmático dependen del equilibrio entre la velocidad de síntesis de las lipoproteínas transportadoras y la eficiencia de los mecanismos que controlan el nivel de los receptores específicos que inician su catabolismo.

El metabolismo intracelular del colesterol viene regulado por la cantidad de colesterol liberado por la vía de las LDL, el cual a su vez ejerce un estricto control sobre las actividades de la HMG-CoA reductasa (22), y de los receptores de las LDL (31).

Estas lipoproteínas se unen a sus receptores específicos de la membrana celular, constituyendo complejos LDL-receptor que se introducen en la célula por endocitosis (32-34). Las vesículas formadas se fusionan con los lisosomas, después de que el receptor se separe para unirse de nuevo a la membrana plasmática, y la fracción proteica de las LDL es degradada, liberándose el colesterol esterificado que es hidrolizado por una lipasa ácida (33,35,36). El colesterol libre sale de los lisosomas y salvo en el caso de células especializadas, se emplea para la síntesis de membranas.

Como hemos dicho antes, la cantidad de colesterol liberado por las LDL controla el metabolismo celular de este esterol. En primer lugar, reduce la capacidad de la célula para elaborar su propio colesterol, reprimiendo la síntesis de la enzima HMG-CoA reductasa, que cataliza una de las principales etapas reguladoras de la vía biosintética. La supresión de esta enzima obliga a la célula a depender del colesterol externo procedente de la captación de LDLs plasmáticas por sus receptores específicos. En segundo lugar, activa la enzima ACAT, promoviendo el almacenamiento de colesterol en la célula, en forma de esteres que se depositan como pequeñas gotas intracelulares. En tercer lugar, el acúmulo de colesterol

intracelular activa un mecanismo de retroinhibición que insta a las células a detener la síntesis de nuevos receptores de LDL. De esta manera las células ajustan el número de sus receptores, de modo que se incorpore el colesterol suficiente para cubrir sus necesidades sin que se produzca exceso.

Son varias las enzimas que se encuentran reguladas en la larga vía de síntesis del colesterol y la mayoría de ellas lo son por esteroides. Estas enzimas son la HMG-CoA reductasa (37), la HMG-CoA sintasa (38,39), la escualeno sintetasa (40,41) y algunas de las enzimas que catalizan la conversión de escualeno en colesterol (42,43). Sin embargo, cuantitativamente el principal punto de control de la ruta metabólica es anterior a la formación de mevalonato y corresponde mayoritariamente a la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa.

1.3. 3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL COENZIMA A REDUCTASA

La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa o reductasa) (mevalonato: NADP⁺ óxido-reductasa, E.C. 1.1.1.34) cataliza la reducción del S-HMG-CoA a R-mevalonato, en una reacción que precisa de dos moléculas de NADPH. Es uno de los tres tipos de enzimas conocidos que catalizan una óxido-reducción asociada a nucleótidos de piridina, con transferencia de cuatro electrones, siendo las otras dos la histidinol deshidrogenasa y las nucleósido difosfato azucar deshidrogenasas (44). La HMG-CoA reductasa es capaz también de catalizar la reacción inversa, es decir, la acilación oxidativa del R-mevalonato a S-HMG-CoA (45). Sin embargo, la termodinámica del proceso hace que "in vivo" el equilibrio siempre esté desplazado en dirección a la síntesis de mevalonato.

El notable interés promovido por el estudio de esta enzima obedece básicamente a dos razones. En primer lugar está el hecho de que la HMG-CoA reductasa juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo del colesterol y que, en consecuencia los fallos en su función reguladora pueden derivar en graves patologías. De ahí la gran importancia que el conocimiento profundo de la regulación ejercida sobre esta enzima, tiene en el terreno de la fisiología, la bioquímica y la diagnosis

clínica. En segundo lugar, se trata de una enzima que está sometida a una estricta regulación por numerosos factores y mecanismos, y que por lo tanto constituye un excelente modelo de regulación de una actividad enzimática por múltiples y diversos efectores. Esto le proporciona un especial interés desde el punto de vista de los estudios bioquímicos básicos.

1.3.1. ESTRUCTURA DE LA HMG-CoA REDUCTASA

En cultivos de células de hamster se ha demostrado que la HMG-CoA reductasa es una glucoproteína que forma parte de la membrana del retículo endoplasmático (46,47) y cuyo centro catalítico se halla orientado hacia el citosol (48). La enzima está constituida por una cadena polipeptídica glucosilada (46,47), con un peso molecular aparente comprendido entre 90 y 100 Kd (49-52), desconociéndose por el momento con exactitud si "in vivo" existe en forma de monómero o de oligómero. Estudios muy recientes en hígado de rata sugieren la posibilidad de que "in vivo" puede existir en equilibrio entre formas monoméricas (100 Kd) y formas diméricas (200 Kd), constituidas por la asociación mediante formación de enlaces disulfuro, de dos monómeros de 100 Kd. Ambas formas son catalíticamente activas aunque sus propiedades cinéticas difieren (53).

Otro grupo de investigadores (54), usando técnicas de inactivación por radiación, ha llegado a la conclusión de que la forma nativa de la reductasa en las membranas del retículo endoplasmático, está constituida por dímeros de 200 Kd de peso molecular, formados por dos subunidades idénticas de 97 Kd unidas por enlaces de tipo no covalente, aunque su naturaleza exacta no se ha establecido. Los experimentos reseñados han sido realizados en presencia de agentes reductores a concentraciones consi-

derablemente elevadas.

Recientemente, se ha podido determinar con exactitud la secuencia de aminoácidos de la HMG-CoA reductasa a partir de la secuencia de nucleótidos de su DNAc, que ha sido clonado a partir de una línea de células de ovario de hamster chino (UT-1), que tienen una elevada cantidad de reductasa (2% de la proteína total celular) (55), como consecuencia de su adaptación al crecimiento en presencia de compactina, que es un inhibidor competitivo de la reductasa (56). La HMG-CoA reductasa de ovario de hamster consta de 887 residuos de aminoácidos, lo que a la vista de su secuencia, le confiere un peso molecular de 97.092 daltons (47,49).

La proteína está dividida en dos regiones bien diferenciadas. La amino terminal, de 35 Kd, extremadamente rica en aminoácidos hidrofóbicos, se considera el punto de anclaje a la membrana del retículo endoplasmático, puesto que se ha demostrado que la atraviesa hasta siete veces (47,57). El extremo amino terminal está localizado en el lumen del retículo endoplasmático.

La segunda región, que contiene el centro catalítico de la enzima, tiene un peso molecular aparente de 62 Kd y su carácter hidrofílico le confiere solubilidad en agua. Esta región, que se encuentra proyectada hacia el citoplasma, puede ser separada del resto de la molécula de reductasa por tratamiento con diversas proteasas (47,57).

La función concreta de la región hidrofóbica de la membrana está aun por descubrir, aunque se especula sobre una supuesta función de "receptor" del colesterol cedido por las LDL (57).

La inserción de la proteína en la membrana del

retículo endoplasmático se produce simultáneamente al inicio de la traducción de RNAm (46) y de manera un tanto sorprendente, en comparación con el modelo propuesto para la síntesis de numerosas proteínas integrales, la secuencia hidrofóbica de reconocimiento en su extremo amino terminal, no resulta escindida y aparece conservada en la luz del retículo endoplasmático (46,49). Esta parece ser una característica propia de las proteínas integrales de las membranas del retículo endoplasmático (58).

1.3.2. DISTRIBUCION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

La actividad HMG-CoA reductasa se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de las células de los mamíferos (59) y también se encuentra en levaduras (*Neurospora*) (60), en ciertas bacterias como *Pseudomonas* y en Actinomicetos (61). Sin embargo, retornando de nuevo a los mamíferos, allí donde la actividad reductasa se manifiesta más notoriamente es en hígado y en intestino, tejidos en los que se sintetiza entre un 65 y un 75 % del colesterol total requerido por el organismo (62). En condiciones normales las células del resto de los tejidos periféricos reciben suficiente aporte de colesterol por la vía de las LDL, como para no tener que expresar su capacidad biosintética.

Recientes trabajos (63) han puesto de manifiesto mediante técnicas de microscopía electrónica de inmunofluorescencia y microscopía electrónica, que la HMG-CoA reductasa de hígado de rata no se encuentra homogéneamente distribuida por todo el tejido hepático, sino que se halla concentrada en grupos de hepatocitos localizados preferentemente en la zona periportal de los lóbulos hepáticos y que tan sólo un 20 % de los hepatocitos de las ratas normales parecen contener a la enzima.

1.3.3. SOLUBILIZACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Al tratarse de una enzima de membrana (integral) debe ser previamente solubilizada para su posterior estudio. Se han descrito numerosas técnicas para ello, entre las que se incluyen la solubilización en presencia de de-oxicolato (64), la congelación y descongelación de los microsomas (65,66), la congelación y descongelación combinada con una incubación en un medio con glicerol al 50% (v/v) (65) y la incubación con KCl 4 M (65).

Con las técnicas descritas se obtenían elevados rendimientos de purificación de una HMG-CoA reductasa, cuya subunidad presentaba un peso molecular comprendido entre 50 y 56 Kd (67-71). Idénticos resultados se obtuvieron a partir de HMG-CoA reductasa de hígado humano (72,73). Más tarde, Ness y col.(74) demostraron que la solubilización de la HMG-CoA reductasa de hígado de rata era debida a la acción de las proteasas de lisosomas, liberadas como consecuencia de la ruptura de las vesículas lisosomales, durante el tratamiento de congelación y descongelación. La incorporación al medio de solubilización de inhibidores de sulfhidril proteasas (antipaina o leupeptina) bloqueaba drásticamente la liberación de la reductasa (menos del 10 % de solubilización). Por el contrario la incorporación al medio de inhibidores de serín proteasas y de carboxil proteasas no modificaba el grado de solubilización. Estos y otros datos permitieron asignar la responsabilidad de la solubilización proteolítica de la reductasa (50-56 Kd) a la catepsina T o a una proteasa muy similar.

Experimentos posteriores desarrollados por Chin y col. (50) con células UT-1, demostraron que la forma nativa de la HMG-CoA reductasa tenía un peso molecular aparente de 90-92 Kd y que podía ser transformada en un fragmento de 62 Kd, por incubación previa a la solubiliza-

ción, en un medio hipotónico. Esta reducción en el peso molecular era impedida por el EGTA, lo que sugería la acción de proteasas dependientes de calcio; esta forma molecular podía ser degradada hasta la especie de 50-56 Kd por congelación y descongelación en ausencia de leupeptina. Los datos obtenidos sugerían que el peso molecular de la HMG-CoA reductasa nativa era de 92 Kd y que las demás formas de menor peso molecular, correspondían a fragmentos proteolíticos derivados de la anterior.

El fragmento catalíticamente activo (50-56 Kd) ha sido purificado a homogeneidad en varios laboratorios (75) y con él han sido realizados la casi totalidad de los trabajos que han permitido conocer las propiedades cinéticas y regulatorias de la HMG-CoA reductasa. Cabe destacar que un hecho común a todas estas técnicas es el aparente enmascaramiento de la actividad HMG-CoA reductasa cuando se halla en los microsomas. Es frecuente detectar más de un 100 % de la actividad reductasa de los microsomas, al sumar la actividad medida en la fracción soluble y en los microsomas residuales. La razón de este fenómeno no está clara; es posible que la solubilización aumente la accesibilidad al sustrato. Otras alternativas son que las moléculas de reductasa aumenten su actividad específica al solubilizarse o bien que, durante este proceso, se pierdan ciertos inhibidores.

En cualquier caso hay que tener presente en todo momento que no se trata de la forma nativa de la enzima, la cual recientemente ha sido solubilizada en presencia de inhibidores de proteasas, empleando detergentes no iónicos (50-52). La enzima de hígado de rata solubilizada en estas condiciones, ha sido purificada parcialmente aunque no se dispone de evidencias concluyentes de que realmente se trate de la forma nativa original (76).

1.3.4. SENSIBILIDAD A LA TEMPERATURA

A pesar de que la enzima microsomal es relativamente insensible al frío o al calor, la reductasa solubilizada es extremadamente sensible a las bajas temperaturas, resultando rápidamente inactivada entre 0 y 4°C (65,66,77).

Esta inactivación es reversible por incubación a 37°C, durante un tiempo mínimo de 20 minutos (78), restaurándose completamente la actividad reductasa original, y puede ser prevenida por incubación previa en presencia de NADPH (79). Otros autores por el contrario, han señalado la irreversibilidad de este fenómeno (66); sin embargo, en ambos casos se sugiere como posible explicación del mismo la disociación de las unidades de la enzima soluble, debida a la ruptura de los enlaces hidrofóbicos que las mantienen agregadas en estructura aparentemente tetramérica (64,65,67,70).

Por otra parte, la HMG-CoA reductasa obtenida por el procedimiento de congelación y descongelación, es considerablemente resistente a temperaturas elevadas, lo cual se aprovecha con excelentes resultados para su purificación; sin embargo, la HMG-CoA reductasa nativa, obtenida por solubilización con detergentes no iónicos, en ausencia de congelación y descongelación, no presenta esta propiedad, sino que es muy sensible a las altas temperaturas (76).

1.3.5. RITMO CICLICO DE LA HMG-CoA REDUCTASA

La actividad de la enzima HMG-CoA reductasa de hígado de rata está sometida a una pronunciada variación diurna, observándose cambios en su actividad comprendidos entre seis y diez veces el valor mínimo (80). La má-

xima actividad se observa al cabo de seis horas del inicio de la fase oscura, aunque el ritmo cíclico está asociado realmente al patrón de alimentación (81).

Varios trabajos sobre el tema apoyan la idea de que estos cambios de actividad, están asociados exclusivamente a cambios en la cantidad total de proteína enzimática inmunoprecipitable existente en el hígado (82,83), debidos principalmente a cambios en la velocidad de síntesis de la enzima (84-86), en respuesta a los niveles de insulina circulante (59,87-89).

Sin embargo, estos resultados están en parcial contradicción con los presentados por Edwards y col.(90), quienes afirmaron que el ritmo circadiano era resultante de una activación de la enzima, así como de un incremento en la cantidad de la proteína enzimática. Tales afirmaciones han sido recientemente confirmadas por Easom y col. (91), quienes demuestran claramente la existencia de una variación tanto de la cantidad total de la enzima, como del estado de activación de la misma, durante el ciclo diurno. Los autores sugieren que el ritmo circadiano de la actividad HMG-CoA reductasa es consecuencia de la superposición de dos ciclos de actividad de la enzima, uno que afecta a la cantidad total de proteína y otro que afecta al estado de fosforilación. Ambos ciclos de actividad presentan algunas diferencias entre ellos y no se superponen exactamente.

1.4. REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Debido al importante papel desarrollado por la HMG-CoA reductasa en el control de la biosíntesis del colesterol y a las frecuentes y graves consecuencias derivadas de la elevación de sus niveles en sangre, se han realizado grandes esfuerzos con objeto de averiguar cuales son los factores que regulan la actividad de la HMG-CoA reductasa y a través de qué mecanismos ejercen su acción. Estos estudios se han centrado preferentemente en la HMG-CoA reductasa de hígado y de intestino, por la razón anteriormente expuesta, de ser los dos órganos en los que se sintetiza mayoritariamente el colesterol precisado por el organismo.

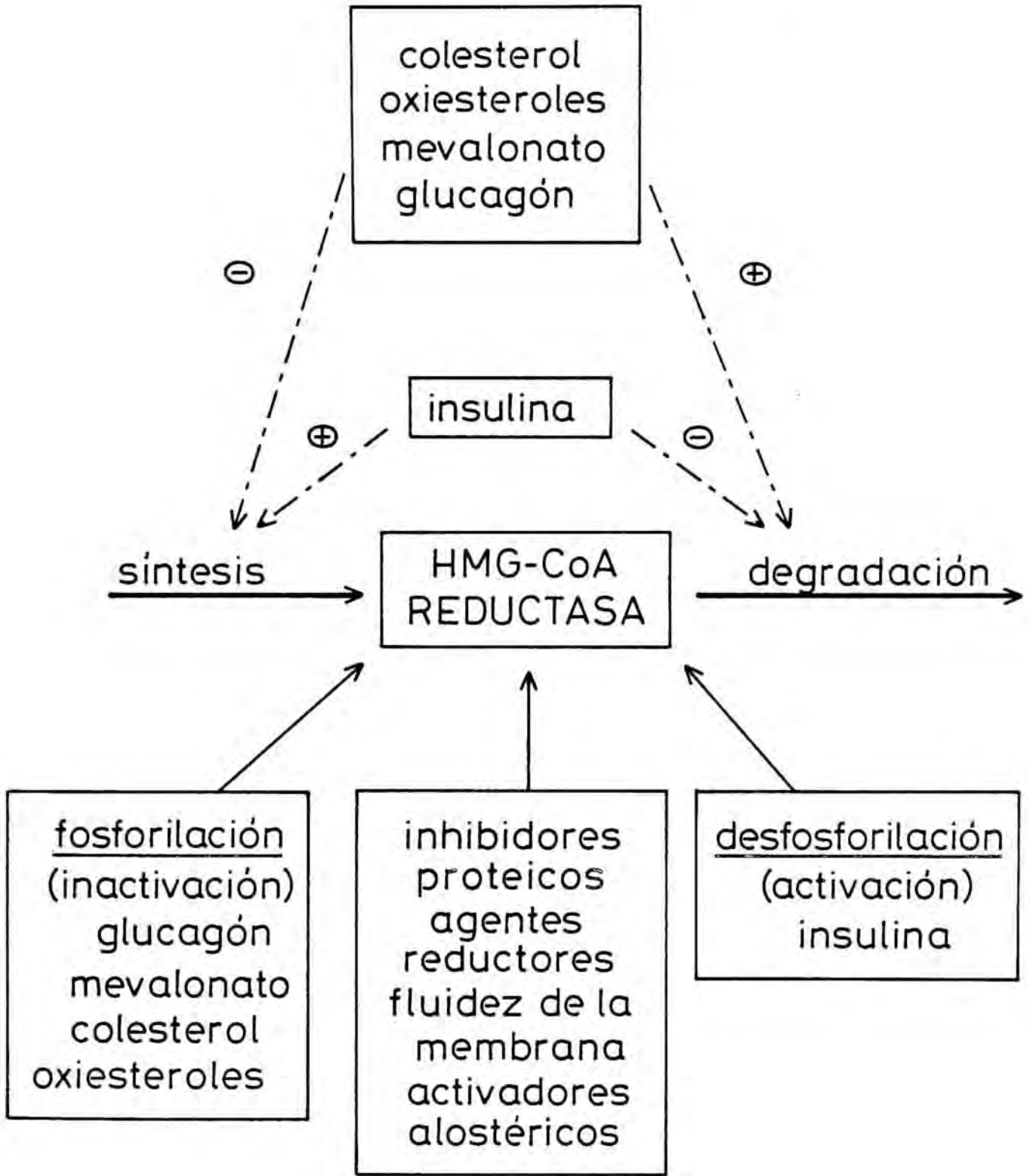
Como se puede observar en el esquema III, la HMG-CoA reductasa está sometida a dos tipos distintos de control:

a) regulación de la cantidad de enzima presente, actuando sobre las velocidades de síntesis y de degradación de la reductasa (parte superior).

b) regulación de la capacidad catalítica de la enzima existente (parte inferior).

El primer tipo de control manifiesta sus efectos a largo plazo, puesto que se ejerce en parte a través del proceso de síntesis de la proteína, mientras que el segun-

ESQUEMA III MECANISMOS DE REGULACION DE LA ENZIMA
HMG-CoA REDUCTASA



do es de efectos más rápidos, es decir, a corto plazo.

1.4.1. REGULACION A LARGO PLAZO

El colesterol y sus derivados oxigenados tales como el 25-hidroxicolesterol y el 7-cetocolesterol (22,92, 93), ejercen una fuerte represión sobre la actividad HMG-CoA reductasa, llegando a disminuir la cantidad de proteína en un 90 %. La cantidad de proteína también resulta notablemente disminuída por compuestos no esteroideos, derivados del mevalonato y por el momento desconocidos (37,51, 92). La reducción en los niveles de la enzima es atribuible por lo menos a dos hechos distintos:

a) supresión de la transcripción del gen de la reductasa, que se traduce en una disminución de la cantidad de RNAm y por lo tanto de la síntesis de la proteína (94-96).

b) aumento de la velocidad de degradación proteolítica de la proteína reductasa (51,92,97).

También se dispone de ciertas evidencias de que la cantidad de HMG-CoA reductasa puede estar regulada a nivel de la traducción de su RNAm (98).

Son varias las hormonas implicadas en la regulación de la HMG-CoA reductasa. La insulina incrementa la actividad de la reductasa, presumiblemente estimulando su síntesis (99-101). Dado que las concentraciones circulantes de insulina "in vivo" también fluctúan de acuerdo con un ciclo rítmico (102,103), cuyo máximo coincide con el de la actividad reductasa, se ha propuesto a esta hormona como principal responsable del mantenimiento del ciclo circadiano de la actividad HMG-CoA reductasa (59,91).

Al efecto de la insulina se le opone el del glucagón, que actúa disminuyendo la actividad reductasa

a largo plazo (68,101).

Otras hormonas tales como las tiroideas y las adrenales, también modifican la actividad de la reductasa, incrementándola (87,104,105). Finalmente, también las hormonas sexuales actúan sobre la reductasa, suprimiendo su actividad, aunque parece ser, dada su estructura esteroidea, que su acción es debida más a su carácter de análogos del colesterol que a su propiedad de hormonas (93,106).

Algunas de las hormonas consideradas ejercen también su acción modificando la actividad específica de la enzima, lo cual será tratado más adelante.

Otro posible mecanismo propuesto para la regulación de la HMG-CoA reductasa, está relacionado con el mantenimiento de la estructura de los microtúbulos que forman parte del citoesqueleto de ciertas células. Estudios en este sentido han sido desarrollados empleando una determinada variedad de células gliales de cerebro de rata (107,108).

1.4.2. REGULACION A CORTO PLAZO

De entre los varios mecanismos de regulación englobados bajo este título, uno de los más importantes, por no decir el más importante, es el de la interconversión de la enzima entre formas activas e inactivas por fosforilación y desfosforilación. Este proceso será tratado extensamente a continuación, pero previamente haremos una breve descripción de otros mecanismos que actúan en la misma dirección.

Se ha sugerido que el propio colesterol, los esteroides derivados de él y los fosfolípidos, pueden afectar

a la reductasa, provocando cambios en el grado de fluidez de las membranas del retículo endoplasmático (19,20,109-113). Estos autores sostienen la teoría de que tanto el colesterol y sus derivados, como los fosfolípidos, al variar su proporción en la membrana, pueden provocar cambios en la conformación de la enzima HMG-CoA reductasa, afectándose su capacidad catalítica. Es posible que ello se deba a un reajuste de la posición de la reductasa en la membrana del retículo endoplasmático, que varíe su grado de exposición al citosol. De ahí podría derivarse una mayor accesibilidad a sus sustratos o tal vez una mayor sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas o de las enzimas que modifican su actividad covalentemente (quinasas y fosfatasa).

Otros autores han estudiado el efecto regulador a corto plazo ejercido por otros metabolitos. En este sentido ha sido descrito el efecto inhibitorio ejercido por el ácido oleico y el oleil-CoA sobre la actividad HMG-CoA reductasa (114), directamente sobre la enzima, modificando su conformación, sin afectar a la composición lipídica de la membrana.

Asimismo se especula con la existencia en el citosol de una proteína con actividad inhibitoria de la reductasa, que requiere la presencia simultánea de Fe^{2+} para actuar (115,116).

También ha sido descrito que la actividad de la HMG-CoA reductasa hepática puede estar regulada de manera reversible por los niveles de metabolitos con grupos tiol. Así pues, se sugiere que los niveles de glutatión reducido de la célula, actuarían como reguladores de la actividad reductasa a través de una interconversión de la enzima entre formas oxidadas (inactivas) y reducidas (activas) (117).

El mecanismo de acción propuesto consiste en una modificación conformacional que altera la capacidad de unión de la reductasa a su sustrato (HMG-CoA), aunque ambas formas pueden unirse al otro sustrato de la reacción (NADPH) (118). Estudios posteriores han demostrado que el NADPH puede unirse al centro catalítico de la reductasa de manera cooperativa, existiendo la posibilidad adicional de unión a un centro regulador de la molécula enzimática (119). Este efecto alostérico disminuye progresivamente hasta desaparecer a medida que aumenta la concentración de agentes reductores (119). Los mismos autores han demostrado que la reductasa microsomal puede ser también regulada alostéricamente por NAD^+ y NADH, cuando las concentraciones de agentes reductores son bajas (120). Estudios estructurales realizados por los mismos autores, indican que la estructura mínima y suficiente requerida para activar alostéricamente a la reductasa es la del 5'-AMP (121). Estos resultados indican que las interacciones entre los distintos centros funcionales de la reductasa requieren la formación de puentes disulfuro, cuya progresiva reducción anula la capacidad de regulación alostérica.

Estudios desarrollados muy recientemente por Ness y col.(53,122) demuestran que la HMG-CoA reductasa microsomal puede existir en dos formas, una monomérica (100 Kd) y una dimérica (200 Kd), constituida por dos monómeros de 100 Kd enlazados por puentes disulfuro. Ambas formas exhiben comportamientos cinéticos distintos en su capacidad de activación alostérica por NADPH, lo que se supone puede ser un mecanismo de respuesta a corto plazo, relacionado con los niveles de agentes reductores presentes en la célula, frente a las necesidades de esteroides.

Gibbons y col.(123,124) han propuesto la existencia de un control de la actividad HMG-CoA reductasa

ejercido por la disponibilidad en el citosol de uno de sus sustratos, el HMG-CoA. Tal afirmación ha surgido de la observación de que en algunas ocasiones, no se ha podido establecer una buena correlación entre las variaciones de la actividad reductasa en respuesta a ciertas hormonas y los cambios en la velocidad de síntesis de colesterol. Asimismo parece ser que a las concentraciones de HMG-CoA presentes en la célula intacta (citosólico y mitocondrial), la HMG-CoA reductasa no se encuentra saturada y por lo tanto, la velocidad de la reacción que cataliza, es inferior a la medida en experimentos "in vitro", en presencia de concentraciones saturantes de sustrato.

Así pues existe la posibilidad de que cambios en la concentración citosólica de HMG-CoA, regulen de manera adicional a la HMG-CoA reductasa. Estos cambios podrían ser consecuencia de las actividades de las enzimas precedentes en la vía de síntesis del colesterol, que a su vez dependen de las disponibilidades de acetil-CoA citosólico. Para poder compensar estas fluctuaciones en la disponibilidad de HMG-CoA, debidas a la actividad metabólica de la célula, la actividad de la HMG-CoA reductasa se modifica, para mantener constante en todo momento el flujo de síntesis de esteroides.

1.5. REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION REVERSIBLE

En este capítulo estudiaremos con más detalle uno de los principales mecanismos de regulación a corto plazo de la actividad HMG-CoA reductasa. En líneas generales podemos decir que el estado de actividad de la reductasa depende de las actividades relativas de las enzimas que la fosforilan (reductasa quinasa) y de las enzimas que la desfosforilan (reductasa fosfatasa).

1.5.1. INACTIVACION Y REACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN MICROSOMAS Y SOLUBLE

En el año 1973, Beg y col.(125) demostraron por primera vez que la preincubación a 37°C de una suspensión de microsomas con Mg-ATP, producía una rápida pérdida de actividad de la enzima HMG-CoA reductasa. La actividad específica de la reductasa inactivada no se modificaba ni por congelación y descongelación de los microsomas, ni por lavados sucesivos de los mismos con solución amortiguadora neutra.

Después de lavados repetidos de los microsomas en condiciones en las que no se extraía la reductasa, és-

tos eran cada vez menos sensibles a la inactivación dependiente de Mg-ATP.

Estos mismos autores (125,126) identificaron una actividad inactivadora presente en los mencionados extractos microsomales, en el citosol o en la fracción proteica resultante de precipitar el citosol con sulfato amónico al 45 % de saturación, que cuando se añadía a los microsomas lavados repetidas veces con solución amortiguadora neutra, restauraba la capacidad para inactivar reductasa microsomal, dependiente de Mg-ATP. En todos los casos el grado de inactivación era dependiente del tiempo de incubación. Así pues, un sistema inactivador parecía encontrarse tanto en el citosol como adsorbido en los microsomas, siendo el primero de ellos sensible a la presencia de AMPc.

En ausencia de Mg-ATP la reductasa microsomal previamente inactivada, podía ser reactivada hasta sus niveles originales, por adición de fracciones de citosol. Este proceso era dependiente de la cantidad de proteína añadida y del tiempo de incubación. De esta forma identificaron la presencia de un activador en la fracción citosólica, que incluso activaba ligeramente a la reductasa de microsomas no tratados previamente con Mg-ATP.

Estos autores (126) indicaron también que la reductasa solubilizada por congelación y descongelación (66) podía resultar inactivada por Mg-ATP y una fracción citosólica.

El conjunto de observaciones indicaba que la reductasa podía interconvertirse entre dos formas de diferente actividad específica, sugiriendo que el modelo más adecuado, de acuerdo con la información disponible, era el de fosforilación y desfosforilación de la proteína.

Goodwin y Margolis (127,128) observaron que la preincubación de un sobrenadante de 10.000 x g de un homogenado de hígado de rata, a 37°C, incrementaba la velocidad de incorporación de [^{14}C] acetato a esteroides entre siete y veinte veces, sin modificar la velocidad de incorporación de [^{14}C] mevalonato a esteroides. La preincubación de microsomas y citosol juntos, producía una activación semejante, mientras que su incubación por separado antes de reconstituir el sistema de ensayo, sólo producía una muy ligera activación. Ellos sugirieron que una o varias de las enzimas que catalizan la síntesis del mevalonato a partir del acetato resultaba activada, posiblemente por una fosfoproteína fosfatasa de origen citosólico.

Estudios posteriores (129,130) empleando microsomas aislados rápidamente por precipitación con calcio, a partir del sobrenadante de 10.000 x g, antes y después de la incubación a 37°C, demostraron que la reductasa se había activado y por tanto, permitieron correlacionar las variaciones en la velocidad de síntesis de esteroides con cambios simultáneos de la actividad HMG-CoA reductasa. De nuevo, se requería la presencia simultánea tanto de los microsomas como del citosol para aumentar la actividad reductasa. Este hecho demostraba el origen citosólico del factor activante de la HMG-CoA reductasa.

Análogos resultados de activación de la HMG-CoA reductasa en homogenados de hígado de ratón fueron obtenidos por Berndt y col. (131,132). El incremento de actividad reductasa de microsomas obtenidos a partir del homogenado incubado previamente, era dependiente del tiempo y de la temperatura de incubación. Este efecto no se reproducía en microsomas aislados, en ausencia de citosol añadido, ni cuando éste último se trataba con tripsina previamente a la incubación con los microsomas.

Estos resultados, unidos a las observaciones

referentes a que el factor citosólico podía reemplazarse por una mezcla de EDTA, Mg^{2+} y Na_2SO_3 (132), que provocaba también la aparente desfosforilación de la glucógeno sintasa (133), y que la activación era inhibida por NaF 100 mM (conocido inhibidor de fosfatasas) (132) conducían a pensar que la activación de la reductasa de microsomas podía ser catalizada por una fosfoproteína fosfatasa presente tanto en el citosol como en los microsomas.

Brown y col.(134) comunicaron la existencia en fibroblastos humanos de un factor inactivador de naturaleza proteica, soluble, capaz de inactivar HMG-CoA reductasa de microsomas de hígado de rata y de fibroblastos humanos, en presencia de Mg^{2+} , ADP y ATP, y cuya actividad no era dependiente de AMPc. Informaron asimismo de la incapacidad de inactivar más de un 70-80 % de la reductasa microsomal empleada como sustrato, ni siquiera prolongando el tiempo de incubación o añadiendo una cantidad adicional de Mg-ATP, de extracto de fibroblastos o de ambos a la vez. Propusieron dos posibles explicaciones para este fenómeno: a) la existencia de dos formas de HMG-CoA reductasa, siendo la mayoritaria (70-80 %) susceptible de ser inactivada totalmente y, b) la existencia de una única especie molecular de HMG-CoA reductasa, que al ser inactivada se transforma en otra especie cuyas moléculas conservan entre un 25 y un 30 % de la actividad catalítica inicial.

Por el contrario, estos mismos autores se mostraron incapaces de poner de manifiesto la inactivación de reductasa solubilizada a partir de fibroblastos o de microsomas, por congelación y descongelación (66), estando esta última parcialmente purificada (135).

Nordstrom y col.(136) trabajando con hígado de rata, consiguieron inactivar y reactivar HMG-CoA reductasa, tanto en microsomas como purificada 1400 veces, em-

pleando para ello una preparación de inactivador de citosol parcialmente purificada por precipitación con sulfato amónico y cromatografía en Sephadex G-200. La inactivación de la reductasa, de acuerdo con Brown y col. (134), requería la presencia simultánea de Mg^{2+} , ATP y ADP, mientras que la reactivación se veía bloqueada por la presencia de 50 mM NaF. Ambos procesos, inactivación y reactivación, se desarrollaban más lentamente y en menor extensión cuando el sustrato era HMG-CoA reductasa purificada. Esta no se inactivaba más allá de un 30 % de la actividad inicial, mientras que la reductasa en microsomas se inactivaba hasta un 5 %. La velocidad de inactivación era unas cinco veces mayor. Estos datos les sugerían que la propia membrana microsomal o determinados componentes de ella podían ser, no imprescindibles, pero sí favorecedores de ambos procesos. También demostraron la existencia en los microsomas de un inactivador, capaz de inactivar a la reductasa microsomal, confirmando resultados previos de Beg y col. (125).

A la vista de los resultados existentes parecía evidente que la reductasa inactivada en presencia de Mg-ATP era una forma estable y real de la proteína, distinta de reductasa activa. La inactivación se traducía en un cambio de la velocidad máxima de la enzima (136), mientras que la K_M para sus dos sustratos (HMG-CoA y NADPH) no se modificaba (134,136), lo cual sugería la permanencia de la misma especie enzimática.

El hecho de que la reductasa solubilizada fuese susceptible a la inactivación, descartaba la absoluta dependencia de la membrana microsomal, así como una posible alteración de dicha membrana, previa a la inactivación. Por otra parte, la actividad de la reductasa inactiva no podía recuperarse ni por diálisis, ni por dilución (136) ni por una nueva obtención de los microsomas, una vez inactivada la reductasa (125). Todos estos hechos sugerían que la inactivación de la reductasa era

debida realmente a una actividad enzimática y no a la producción de sustancias inhibitoras o al estímulo de reacciones que compiten por los sustratos de la reductasa, como las catalizadas por la HMG-CoA liasa y la HMG-CoA deacilasa. Una confirmación adicional provenía del hecho de que el β, γ -metilen ATP (análogo del ATP incapaz de ceder su fosfato terminal) no puede suplir al ATP en la inactivación de la reductasa (134,137).

Trabajos posteriores desarrollados por Bové y Hegardt (138) confirmaron la inactivación de la reductasa microsomal por Mg-ATP y un factor presente en los propios microsomas, aún después de lavarlos por dos veces consecutivas. La inactivación podía ser revertida por incubación en presencia de citosol, en un proceso que podía ser bloqueado por NaF 50 mM.

Ingebritsen y col.(139) confirmaron una vez más la inactivación de la reductasa microsomal por Mg-ATP y un inactivador endógeno de los propios microsomas y comunicaron que la actividad podía recuperarse en presencia de una glucógeno fosforilasa fosfatasa de 35 Kd, obtenida según el método de Brandt (140). Esta recuperación era también bloqueada por NaF 50 mM.

Este mecanismo de regulación ha sido demostrado también en otros tejidos además del hepático. Así, se ha observado en cerebro de rata (141), leucocitos humanos (142), intestino (143-147) y en una gran variedad de especies animales tales como, cerdo, perro, pollo, rana, hamster, ratón, conejo, barbo (148), insectos (149) y en humanos (142,150). Esta amplia distribución induce a pensar que este sistema de regulación, desde un punto de vista evolutivo, presenta un alto grado de conservación entre los vertebrados. Hunter y Rodwell (148) tras un estudio comparativo, afirman que en términos cuantitativos, la modulación reversible de la actividad reductasa

se mantiene más constante que la propia actividad reductasa. Así, ésta varía más de 100 veces entre las diversas especies estudiadas, mientras que la reactivación de la reductasa por una fosfatasa, en términos porcentuales, sólo varía tres veces.

1.5.2. FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN MICROSOMAS Y SOLUBLE

Una vez demostrada la existencia de un mecanismo de interconversión de la reductasa entre formas activas y formas menos activas, y puesto que las evidencias indirectas apuntaban a que el tránsito entre ambas formas se producía a través de una fosforilación reversible de la enzima, era absolutamente necesario demostrar la incorporación de ^{32}P a la molécula de reductasa, a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, así como su posterior liberación.

Los primeros intentos en este sentido fueron desarrollados por Chow y col.(151), quienes no consiguieron demostrar la incorporación de ^{32}P a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a la reductasa aislada por inmunoprecipitación con anticuerpos relativamente poco específicos. Presumiblemente este erróneo resultado fue debido a la baja radioactividad específica del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ empleado. Tampoco demostraron incorporación de radioactividad a partir de $[\text{adenina-}^{14}\text{C}]\text{ATP}$, en un intento de probar una posible adenilación.

Beg y col.(152) pusieron de manifiesto la inactivación y reactivación de reductasa en microsomas, en aparente correlación con la incorporación y liberación de ^{32}P a la proteína microsomal total. La reductasa inactivada en estas condiciones, fue parcialmente purificada, inmunoprecipitada y aislada por electroforesis, mostrando ^{32}P ligado covalentemente a su molécula. Sin embargo, no se presentaron resultados concernientes a la

desfosforilación de la reductasa ni a la estequiometría de la fosforilación. Tampoco se demostró incorporación de radioactividad a la proteína microsomal cuando se sustituyó el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por $[\text{adenina-}^{14}\text{C}]\text{ATP}$.

Bové y Hegardt (138) demostraron una buena correlación entre la inactivación y reactivación de la reductasa y la incorporación y liberación de ^{32}P a la proteína microsomal total.

La principal crítica a estos resultados era la falta de evidencias directas de la incorporación de ^{32}P a la molécula de la reductasa.

Posteriormente, Keith y col.(153) aportaron evidencias algo más concluyentes, al demostrar que la reductasa resultaba fosforilada con ^{32}P , tras la incubación de los microsomas con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, seguida de la purificación de la enzima inactivada hasta homogeneidad. La reductasa aparecía como una única banda en electroforesis en presencia de SDS, que comigraba con el ^{32}P . En condiciones no desnaturizantes, la actividad, la proteína y el ^{32}P también coincidían. Los datos referentes a la incorporación de ^{32}P fueron muy variables, puesto que oscilaban entre 0,25 y 1 mol de fosfato/mol de subunidad (52 Kd), aunque los propios autores reconocen que durante el proceso de purificación de la reductasa se producían considerables variaciones en su estado de actividad, debidas a la existencia de una proteína fosfatasa insensible al fluoruro.

Gil y col.(154) demostraron la incorporación de ^{32}P a reductasa inactivada, también en microsomas, y purificada hasta casi homogeneidad; cuando la preparación era analizada electroforéticamente en condiciones no desnaturizantes, la radioactividad, la actividad y la proteína reductasa, comigraban. En esta ocasión el grado

de inactivación de la reductasa fluctuaba entre 25 y 50 % de la actividad inicial. En este trabajo se presentaron además evidencias muy sólidas acerca de la reactivación y desfosforilación de la reductasa por una reductasa fosfatasa de bajo peso molecular (32 Kd), purificada parcialmente por los mismos autores, poniéndose de manifiesto por primera vez una excelente correlación entre ambos procesos. Este último proceso era bloqueado por NaF 100 mM.

Un trabajo casi simultáneo de Beg y col.(155) demostró por primera vez que la inactivación de la HMG-CoA reductasa, purificada a homogeneidad por congelación y descongelación, con reductasa quinasa de microsomas aparentemente homogénea y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, se traducía en una incorporación de ^{32}P a reductasa de aproximadamente 0,9 moles de ^{32}P / mol de subunidad (51 Kd). La reductasa así fosforilada podía ser reactivada completamente, con liberación simultánea de más del 90 % del ^{32}P ligado, por una fosfoproteína fosfatasa de 35 Kd, parcialmente purificada (140). Asimismo, para demostrar la fosforilación de la reductasa "in vivo", inyectaron $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ortofosfato}$ a ratas. La HMG-CoA reductasa fue purificada parcialmente e inmunoprecipitada o bien purificada a homogeneidad, observándose en ambos casos, tras análisis electroforético, que la radioactividad comigraba con la proteína reductasa. La importancia de este trabajo radicaba en que se conseguía demostrar la fosforilación e inactivación de la HMG-CoA reductasa soluble y en estado homogéneo. Además, quedaba evidenciada la fosforilación de la reductasa "in vivo".

Gil y col.(156) demostraron también que la reductasa podía ser fosforilada una vez extraída de las membranas microsomales. Los extractos solubles obtenidos a partir de microsomas, fueron incubados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y la reductasa, fosforilada e inactivada hasta un 30% de la actividad inicial por la reductasa quinasa acompa-

ñante, fue purificada hasta homogeneidad. Los autores demostraron la migración simultánea de la actividad reductasa, la proteína y la radioactividad de ^{32}P , cuando analizaron la preparación obtenida por electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. La reductasa obtenida en estas condiciones fue desfosforilada en su casi totalidad, cuando se incubó con una reductasa fosfatasa citosólica de bajo peso molecular, purificada por ellos mismos (157). El proceso era dependiente de la concentración de fosfatasa y del tiempo de incubación, siendo bloqueado completamente por KF 100 mM y también por PPI 1 mM, que es un inhibidor de proteína fosfatasas (158). Estos resultados fueron concordantes en todo momento con los obtenidos al estudiar simultáneamente la reactivación de la reductasa, que resultó ser máxima.

Font y col.(159) siguiendo el método descrito por los autores anteriores, comunicaron el aislamiento de una reductasa fosforilada con ^{32}P , en una proporción aproximada de 0,3 moles de fosfato/mol de subunidad de reductasa (51 Kd).

Aunque el carácter covalente de la fosforilación de la reductasa parecía estar suficientemente demostrado, dado que el tratamiento previo a su análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes, no parecía modificar el contenido de ^{32}P de la reductasa, fueron Keith y col.(160) quienes establecieron la naturaleza covalente de la fosforilación de la reductasa. Para ello emplearon HMG-CoA reductasa fosforilada e inactivada hasta un 45 % de la actividad inicial y purificada parcialmente por el método de Rogers y col.(161), hasta aquella etapa en que no había otras proteínas fosforiladas contaminantes. El peso molecular de su subunidad fue de 55-58 Kd; observaron que la HMG-CoA reductasa fosforilada en estas condiciones lo era exclusivamente en residuos de serina, siendo la unión del fosfato a la

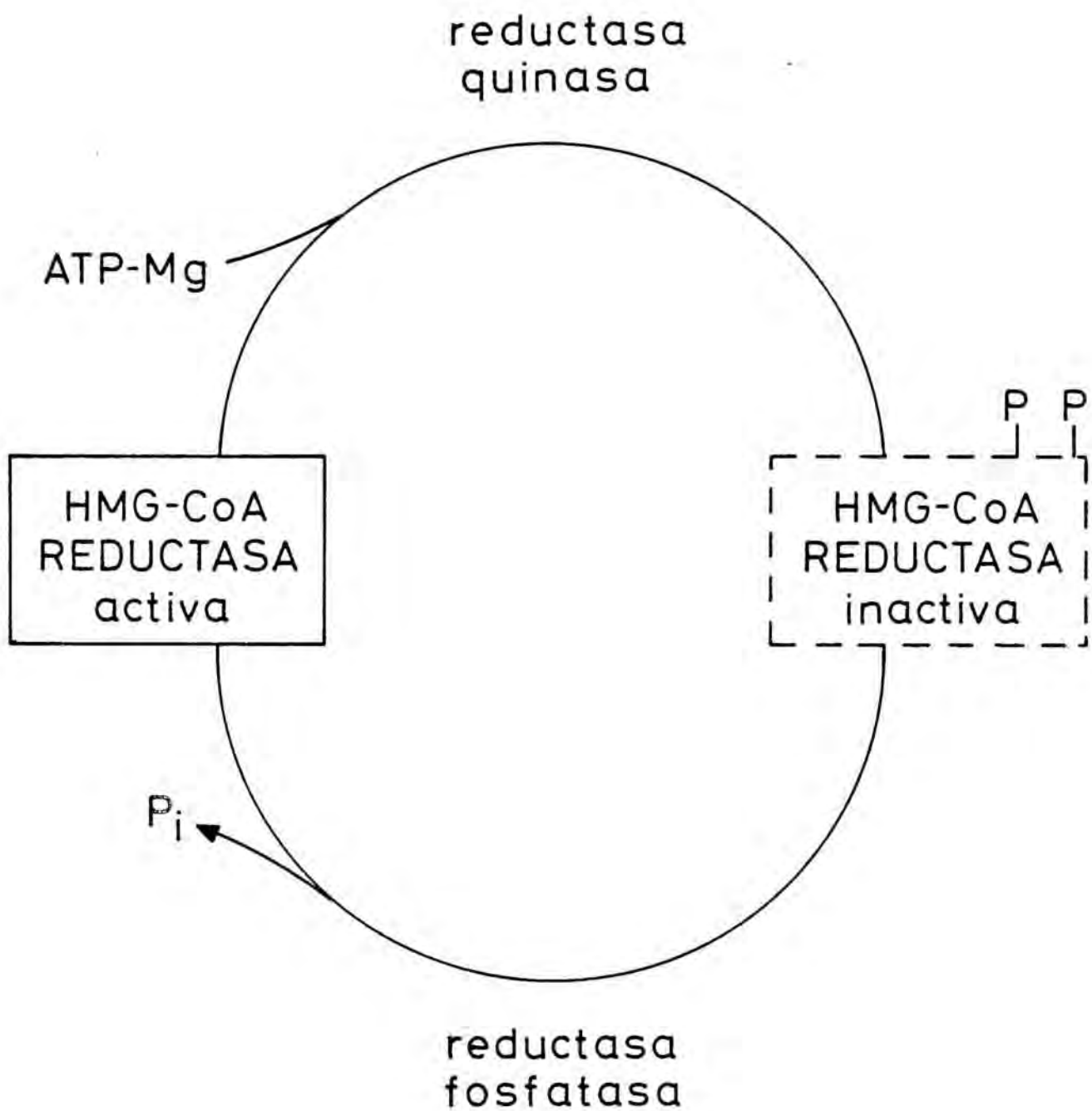
proteína estable frente a la hidrólisis ácida pero sensible a la hidrólisis alcalina. Cabe recordar que la fosforilación en residuos de serina es una característica muy frecuente en las proteínas cuya actividad está regulada por fosforilación y desfosforilación (6).

Trabajos realizados por Beg y col.(150) han proporcionado evidencias directas de la fosforilación y desfosforilación "in vitro" de la HMG-CoA reductasa de hígado humano (53 Kd) purificada hasta homogeneidad (72), empleando reductasa quinasa en citosol de hígado humano y una fosforilasa fosfatasa de bajo peso molecular (140). Simultáneamente la reductasa es inactivada hasta un 48 % de su actividad inicial y reactivada hasta la actividad de partida, a pesar de que todavía retiene ligado a su molécula un 50 % del fosfato incorporado.

Los experimentos estudiados hasta este punto aportan toda una serie de pruebas inequívocas suficientes como para afirmar que la HMG-CoA reductasa es una enzima interconvertible por fosforilación y desfosforilación, en reacciones catalizadas por las correspondientes quinasas y fosfatasas (esquema IV). No obstante lo anterior, es preciso señalar que la fosforilación de la reductasa, hasta ese momento, había sido puesta de manifiesto empleando el fragmento proteolítico soluble, con actividad catalítica.

En este sentido se orientó el trabajo de Kenneally y col.(76), quienes reportaron la inactivación de la reductasa solubilizada de microsomas con detergentes no iónicos y parcialmente purificada. La inactivación, catalizada por una reductasa quinasa de citosol parcialmente purificada, se producía más rápidamente y en mayor extensión al emplear reductasa solubilizada con detergentes, en presencia de leupeptina, EGTA y PMSF, en lugar de reductasa solubilizada proteolíticamente. La reductasa era

ESQUEMA IV MODELO DE REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA
POR FOSFORILACION REVERSIBLE



reactivada por incubación con una proteína fosfatasa de bajo peso molecular. Lamentablemente los autores no informan acerca del peso molecular de la reductasa obtenida. En general su respuesta frente a la inactivación y reactivación la asemeja más a la reductasa en microsomas, que a la solubilizada por congelación y descongelación.

Recientemente este tema ha sido abordado por Beg y col.(162), quienes han demostrado, empleando técnicas de "immunoblotting", la incorporación de ^{32}P a la molécula de HMG-CoA reductasa, solubilizada a partir de microsomas en presencia de detergentes no iónicos e inhibidores de proteasas (100 Kd), por incubación con proteína quinasa C parcialmente purificada a partir de cerebro de rata (163). La fosforilación es absolutamente dependiente del catión calcio y de los fosfolípidos. La máxima incorporación de fosfato conseguida es de 1 mol/mol de subunidad de reductasa. Simultáneamente la reductasa en su forma nativa resulta inactivada. La proteína quinasa C es capaz también de inactivar y fosforilar en iguales condiciones y de manera reversible, al fragmento activo de la reductasa (53 Kd). La velocidad de fosforilación de la reductasa se incrementa 3 veces por la presencia de esteres de forbol (TPA) a concentraciones subsaturantes de calcio. Así pues, la fosforilación de la reductasa por la proteína quinasa C goza de las mismas características que la fosforilación de otras proteínas por dicha quinasa (164-166).

1.6. CARACTERIZACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA

1.6.1. DISTRIBUCION SUBCELULAR

La reductasa quinasa fue detectada inicialmente en microsomas y en citosol de hígado de rata por Beg y col.(125,126) quienes señalaron que la reductasa quinasa microsomal podía ser completamente extraída por tres lavados sucesivos con solución amortiguadora neutra. Estos resultados fueron confirmados por Nordstrom y col. (136) y por Ingebritsen y col.(139,167), quienes a su vez estudiaron la distribución subcelular de la(s) enzima(s) con un cierto detalle, comparándola con la de la proteína quinasa dependiente de AMPc, que es eminentemente citosólica (168). Según estos autores la reductasa quinasa es una enzima de origen citosólico y la actividad hallada en microsomas se debe a uniones inespecíficas de la proteína citosólica con la membrana microsomal. Esta conclusión se veía reforzada por el muy similar comportamiento cromatográfico de ambas enzimas en DEAE-celulosa (169).

Resultados distintos fueron obtenidos por Bové y Hegardt (138), quienes consiguieron inactivar reductasa en microsomas lavados por dos veces consecutivas, hasta un 5 % de su actividad inicial, lo cual sugería la existencia de una reductasa quinasa más fuertemente unida

a la fracción microsomal.

En este mismo sentido se pronunciaron Beg y col. (170) al reconocer la persistencia de una actividad reductasa quinasa en microsomas lavados repetidamente con solución amortiguadora neutra.

Realmente las evidencias experimentales presentadas hasta el momento son absolutamente insuficientes para discernir claramente entre la existencia de una o varias reductasa quinasa de origen común o diferente.

1.6.2. PURIFICACION Y PROPIEDADES

Son relativamente escasos los trabajos publicados referentes a la purificación de las HMG-CoA reductasa quinasa. En este sentido, el primer intento de purificación fue desarrollado por Nordstrom y col.(136), quienes purificaron parcialmente una fracción del citosol, por precipitación con sulfato amónico y cromatografía en Sephadex G-200. El factor proteico responsable de la inactivación de la reductasa, exhibía un peso molecular superior a 150 Kd, aunque no fue estimado con mayor precisión. Los rendimientos de purificación fueron del 10 %, sugiriendo una considerable inestabilidad de la reductasa quinasa.

Ingebritsen y col.(167) purificaron parcialmente reductasa quinasa de citosol, por medio de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, obteniendo una preparación que no resultaba afectada por la preincubación con elevadas concentraciones de AMPc o GMPc, ni por el inhibidor termoestable de la proteína quinasa dependiente de AMPc (171).

Kleinsek y col.(83) asignaron al inactivador

citosólico un peso molecular aparente de 230 Kd.

Harwood y col.(137) en un trabajo reciente, han descrito un procedimiento de purificación de reductasa quinasa de citosol, que rinde una preparación altamente purificada, aunque no homogénea. El método descrito comprende sucesivas cromatografías en DEAE-sephacel, Blue-sepharose, Sephacryl S-300, DEAE-sephacel e hidroxilapatita. Los autores llaman la atención sobre la elevada inestabilidad de la enzima durante el proceso de purificación, a la temperatura de 4°C. Por el contrario, congelada en nitrógeno líquido permanece activa durante varios meses. La pérdida de actividad durante la purificación se acentúa considerablemente cuando en las soluciones amortiguadoras se omiten el PMSF, el DTT el pirofosfato y el glicerol. Además, recomiendan completar el proceso de purificación en el menor tiempo posible, omitiendo allí donde se puede, el seguimiento de la actividad enzimática en las diferentes etapas cromatográficas.

La preparación enzimática purificada es capaz de inactivar HMG-CoA reductasa homogénea y soluble. Este proceso es activado por ADP, posiblemente de forma alostérica. Análogos resultados demostrando la fosforilación de la reductasa no han sido presentados, habiéndose demostrado únicamente su capacidad para incorporar ^{32}P a la albúmina bovina.

Mediante preparaciones de reductasa quinasa menos purificadas han establecido que la K_M para la reductasa es de 0,885 unidades y que para el ATP es de 140 μM . Por otro lado, la constante de activación para el ADP es de 1,4 mM. La actividad reductasa quinasa no se ve afectada por Ca^{2+} ni por Ca^{2+} /calmodulina, así como tampoco por AMPc y GMPc.

Por lo que respecta a la enzima de origen mi-

crossomal, Beg y col. (172) describieron un método de purificación basado en dos cromatografías sucesivas en DEAE-celulosa, seguidas de cromatografías en fosfo-celulosa, sepharosa-6B, adsorción sobre alúmina C_γ y finalmente iso-electroenfoque. La preparación obtenida era electroforéticamente homogénea y exhibía un peso molecular aparente de 380 Kd, con una subunidad única de peso molecular 58 Kd. Sorprendentemente los autores no mostraron fosforilación de la reductasa por la enzima purificada. La inactivación de reductasa por esta preparación no se estimulaba por AMPc, aunque sí se aumentaba la actividad de preparaciones menos puras. La reductasa quinasa parcialmente purificada también podía fosforilar histona 2A y, en menor medida, caseína, incrementándose su actividad por la presencia de AMPc. Además, el incremento en la fosforilación de la histona 2A y la inactivación de la HMG-CoA reductasa eran bloqueadas por el inhibidor de la proteína quinasa dependiente de AMPc (171).

La reductasa quinasa homogénea mostró un punto isoeléctrico de 5,6 y no presentaba autofosforilación, aunque en un trabajo posterior los mismos autores sostenían la afirmación contraria (155).

Indirectamente los resultados sugerían la coexistencia de más de una actividad reductasa quinasa en microsomas, siendo una de ellas aparentemente estimulable por AMPc. Por el momento no se han realizado más estudios sobre este tema. Por otro lado, es de señalar la escasez de datos presentados, relativos al proceso de purificación de esta reductasa quinasa, puesto que se omite toda referencia a perfiles cromatográficos y resultados globales del método.

Este mismo grupo investigador (173) informó posteriormente de la acusada labilidad de la reductasa quinasa, coincidiendo en esta observación con otras posteriores (137). Sin duda este ha sido uno de los facto-

res determinantes que ha condicionado el desarrollo de un mayor número de metodologías para la obtención de estas enzimas en un razonable grado de pureza.

1.6.3. FOSFORILACION MULTIPLE DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Una vez establecido el carácter fosforilable de la reductasa, se hicieron algunos intentos para determinar el número, la estructura y la función de sus centros de fosforilación.

El primer trabajo realizado en este sentido fue llevado a cabo por Font y col.(159) en nuestro laboratorio y en él se demostraba que la reductasa de hígado de rata, fosforilada por las quinasas microsomales endógenas (156) hasta un 16 % de su actividad inicial (0,3 moles de ^{32}P /mol de subunidad de reductasa), una vez purificada a homogeneidad y sometida a digestión exhaustiva con tripsina (60 horas), presentaba dos fosfopéptidos de muy reducido peso molecular. Cuando la misma reductasa se sometía a la acción del bromuro de cianógeno, se obtenía un único fosfopéptido de 18 Kd de peso molecular, en el que estaban contenidos ambos fosfopéptidos trípticos. Las evidencias disponibles sugerían que la reductasa contenía por lo menos dos centros de fosforilación estructuralmente distintos.

Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Keith y col.(160) empleando reductasa fosforilada, en esta ocasión en los propios microsomas y purificada parcialmente (única proteína fosforilada). La digestión exhaustiva con tripsina (100-300 horas) y el análisis subsiguiente por cromatografía líquida de alta presión y por filtración en gel, reveló la existencia de dos fosfopéptidos, presentes en una proporción aproximada de 2 a 1. Ambos parecían estar constituidos por 20 o menos

aminoácidos, siendo menos abundante el más pequeño de ellos. De todo ello concluyeron que la reductasa contenía por lo menos, dos centros de fosforilación estructuralmente distintos, confirmando resultados precedentes.

Así pues, la reductasa debe ser incluida en el grupo de proteínas reguladas por fosforilación en más de un centro (11,174,175). En cuanto a la función de los dos centros, a falta de evidencias concluyentes, se sugiere una posible diferencia (176), basándose en algunos indicios relativos a que la liberación de un 50 % del ^{32}P ligado a la reductasa, produce una reactivación total de la enzima y que la liberación del ^{32}P restante, no se traduce en una posterior activación (150,177). Los autores (176) especulan sobre la posible función de uno de los centros como modulador de la fosforilación del segundo de ellos o bien como señal capaz de alterar la velocidad de degradación proteolítica de la HMG-CoA reductasa (178,179).

Por el contrario, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, demuestran claramente que la reactivación de la reductasa mediada por fosfatasas está acompañada de la liberación de la totalidad del ^{32}P ligado a su molécula (156,180,181).

Por todo lo anteriormente expuesto, parece que la molécula de la HMG-CoA reductasa soluble presenta solamente dos centros de fosforilación estructuralmente distintos, cuando resulta fosforilada por quinasa(s) presente(s) en los microsomas. La incógnita referente a la posible existencia de centros adicionales, cuya fosforilación pudiera estar catalizada por la quinasa de citosol, permanece aún sin resolver, no debiendo ser descartada, ya que la molécula de reductasa contiene 70 residuos de serina de los cuales, alrededor de la mitad se encuentran ubicados en el fragmento soluble (49).

1.6.4. DEPENDENCIA DE NUCLEOTIDOS

En la actualidad parece estar bien establecido que la reductasa quinasa tanto de microsomas como de citosol, es completamente independiente de nucleótidos cíclicos (136-138,167,172). Solamente el grupo de Beg y col.(125,170,172) ha sostenido la existencia de una segunda reductasa quinasa dependiente de AMPc, presente en los microsomas, que copurifica parcialmente con una reductasa quinasa mayoritaria, independiente de AMPc. Por otra parte, la reductasa no resulta inactivada por la proteína quinasa dependiente de AMPc procedente de músculo de conejo (tipo I) o de corazón de buey (tipo II) (167,170).

La primera evidencia referente a los requerimientos de nucleótidos no cíclicos, para la inactivación de la reductasa en presencia de Mg-ATP, fue aportada por Brown y col.(134), empleando reductasa quinasa de fibroblastos humanos y posteriormente, por Nordstrom y col. (136), empleando reductasa quinasa de hígado de rata. Ambos grupos ensayaron la capacidad de los derivados mono, di y trifosforilados de adenosina, guanosina, uridina, citidina e inosina, para actuar como sustrato en la inactivación de la reductasa. De los nucleósidos trifosfato, solamente ATP, dATP y GTP permitían la inactivación de la reductasa, siendo el GTP el menos efectivo. De todos los demás nucleótidos probados, tan sólo el ADP mostró capacidad para inactivar a la reductasa; este hecho tan sorprendente podía explicarse por una rápida transformación del ADP en ATP, por acción de la adenilato quinasa existente en los microsomas. Esta suposición se confirmó al comprobar que no se producía inactivación de la reductasa en presencia de un sistema regenerador de ADP (134), así como añadiendo AMP al medio de reacción (182). La inactivación tampoco era factible en presencia de ATP y un sistema regenerador de ATP (134).

Estos estudios indicaban que la reductasa quinasa precisaba simultáneamente del ADP y del ATP para actuar. A análoga conclusión llegaron Nordstrom y col.(136), al comprobar que la inactivación óptima de la reductasa se conseguía con una relación equimolar de ADP y ATP. Ambos grupos sugirieron la posibilidad, no demostrada, de que el ADP actuase como activador alostérico. La presencia de ADP, con iguales requerimientos, también era necesaria para la inactivación de la reductasa solubilizada (136).

Resultados más claros respecto al papel del ADP en la inactivación de la reductasa, fueron aportados varios años después (137), empleando reductasa quinasa de citosol purificada y HMG-CoA reductasa homogénea. De nuevo se demostró la necesidad de la presencia simultánea de ADP y ATP en la inactivación, puesto que con ATP sólo la actividad reductasa quinasa era nula o muy baja. El ADP podía ser reemplazado por otros nucleósidos difosfato tales como, α,β -metilen ADP, CDP, dADP y UDP, aunque con eficiencias progresivamente menores según el orden de listado, mientras que el GDP era absolutamente incapaz de sustituirlo. Los autores establecieron que el ADP interaccionaba directamente con la enzima puesto que su adición, una vez finalizada la reacción de inactivación de la reductasa, no producía efecto alguno sobre ella; además, la reductasa quinasa también necesitaba ADP para fosforilar a la albúmina y la especificidad de la reductasa quinasa hacia los distintos nucleósidos difosfato era la misma, considerando la inactivación de la reductasa y la fosforilación de la albúmina.

Estos hechos, unidos a que el ADP por sí sólo no permitía la inactivación de la reductasa y que el α,β -metilen ADP (análogo incapaz de ceder grupos fosfato) podía sustituir al ADP como activador, les llevaron a concluir que el nucleósido difosfato actuaba por inte-

racción directa con la reductasa quinasa y además, en un lugar distinto al de unión de los nucleósidos trifosfato, puesto que de ser el mismo, cabría esperar un efecto inhibitorio más que activador. La hipótesis de la interacción alostérica venía reforzada por la distinta especificidad de reconocimiento de los nucleósidos difosfato activadores, con respecto a los nucleósidos trifosfato que actuaban como sustrato. El GDP no puede sustituir al ADP, mientras que el GTP sí puede sustituir al ATP y por otro lado, el CTP no puede reemplazar al ATP pero el CDP sí puede hacerlo con el ADP.

Atendiendo a que la constante de activación del ADP (1,4 mM) está por encima de las concentraciones fisiológicas del nucleótido en hepatocitos (alrededor de 0,8 mM) (183), cabría pensar en un posible mecanismo de regulación de la actividad reductasa quinasa por pequeñas variaciones en los niveles fisiológicos de ADP (137).

El requerimiento de ADP en la inactivación fue puesto también de manifiesto, cuando la reductasa empleada como sustrato era obtenida por solubilización con detergentes no iónicos, en presencia de inhibidores de proteasas y EGTA, y por lo tanto se hallaba en su presunta forma nativa (76). Esta observación apoyaba la hipótesis de que la interacción del ADP era con la reductasa quinasa y no con su sustrato proteico, puesto que ambas formas de la reductasa requerían de su presencia para la inactivación.

Hunter y col.(148) en un estudio comparativo del mecanismo de modulación reversible de la actividad HMG-CoA reductasa hepática, empleando microsomas de diferentes especies de vertebrados, no señalan tal requerimiento en la inactivación por las respectivas reductasa quinasas microsomales.

Si bien el requerimiento de nucleósidos difos-

fato parece establecido claramente para la reductasa quinasa de citosol, no puede decirse lo mismo para la quinasa de microsomas, puesto que ninguna de las preparaciones obtenidas, total o parcialmente puras, parece mostrar esta dependencia (167,172).

En cuanto a los nucleósidos monofosfato, la posible acción del AMP sobre la velocidad de síntesis de esteroides y la actividad reductasa, en homogenados hepáticos, fue estudiada sin que se observase efecto alguno (125). Estudios posteriores no contemplaron siquiera la posibilidad de que el mencionado nucleótido pudiese cumplir funciones activadoras de la reductasa quinasa (134, 136,137).

1.6.5. REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA POR FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION

Los primeros indicios, no relacionados en su momento con el aludido mecanismo de regulación, provinieron de las observaciones realizadas por Brown y col.(134) y Nordstrom y col.(136), de que la preincubación de los microsomas a 37°C durante dos horas, les hacía incapaces de inactivar a la reductasa con Mg-ATP. Ingebritsen y col.(139) observaron que este fenómeno se producía más rápidamente sustituyendo el fosfato de la solución amortiguadora por imidazol y que era inhibido completamente por NaF 50 mM. Por todo ello, asociaron la pérdida de la capacidad inactivadora de reductasa de los microsomas a una inactivación de la reductasa quinasa, mediada por una proteína fosfatasa. En este sentido hay que recordar que el fosfato y el fluoruro son potentes inhibidores de proteína fosfatasas.

Idénticos resultados obtuvieron al tratar un extracto soluble de microsomas concentrado, a 37°C, en

presencia y ausencia de NaF. La reductasa quinasa resultaba inactivada en ausencia de fluoruro, en función del tiempo de incubación. Esta idea fue confirmada al comprobar que la velocidad de inactivación de la reductasa quinasa soluble aumentaba notablemente en presencia de fosforilasa fosfatasa de hígado de rata, parcialmente purificada. Además, cuando un extracto soluble de microsomas, que contenía reductasa quinasa inactiva (2 horas de incubación previa), se incubaba en presencia de Mg-ATP, la actividad quinasa se recuperaba. Este proceso no era estimulado por AMPc y resultaba inhibido por una concentración elevada de sal (NaCl 250 mM).

Los datos experimentales inducían a pensar que la reductasa quinasa de microsomas era también una enzima interconvertible por fosforilación y desfosforilación, mediada por una proteína quinasa y una proteína fosfatasa, presentes ambas en microsomas.

La reductasa quinasa de citosol también era inactivada por una proteína fosfatasa endógena, incluso más rápidamente. El fluoruro bloqueaba también este proceso. A su vez podía ser reactivada por adición de reductasa quinasa quinasa de microsomas (167). El hecho de que la elevada fuerza iónica inhibiese a la llamada desde ese momento, reductasa quinasa quinasa, pero no a la reductasa quinasa, conducía a pensar que la activación de la reductasa quinasa no se debía a un proceso de autocatalisis.

Los mismos autores (167) demostraron que la reductasa quinasa quinasa se hallaba presente en más de un 80 % en el citosol de hígado de rata, al igual que la reductasa quinasa. Consiguieron separar ambas enzimas por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa del citosol y comprobaron que la reductasa quinasa quinasa era distinta a la proteína quinasa dependiente de AMPc,

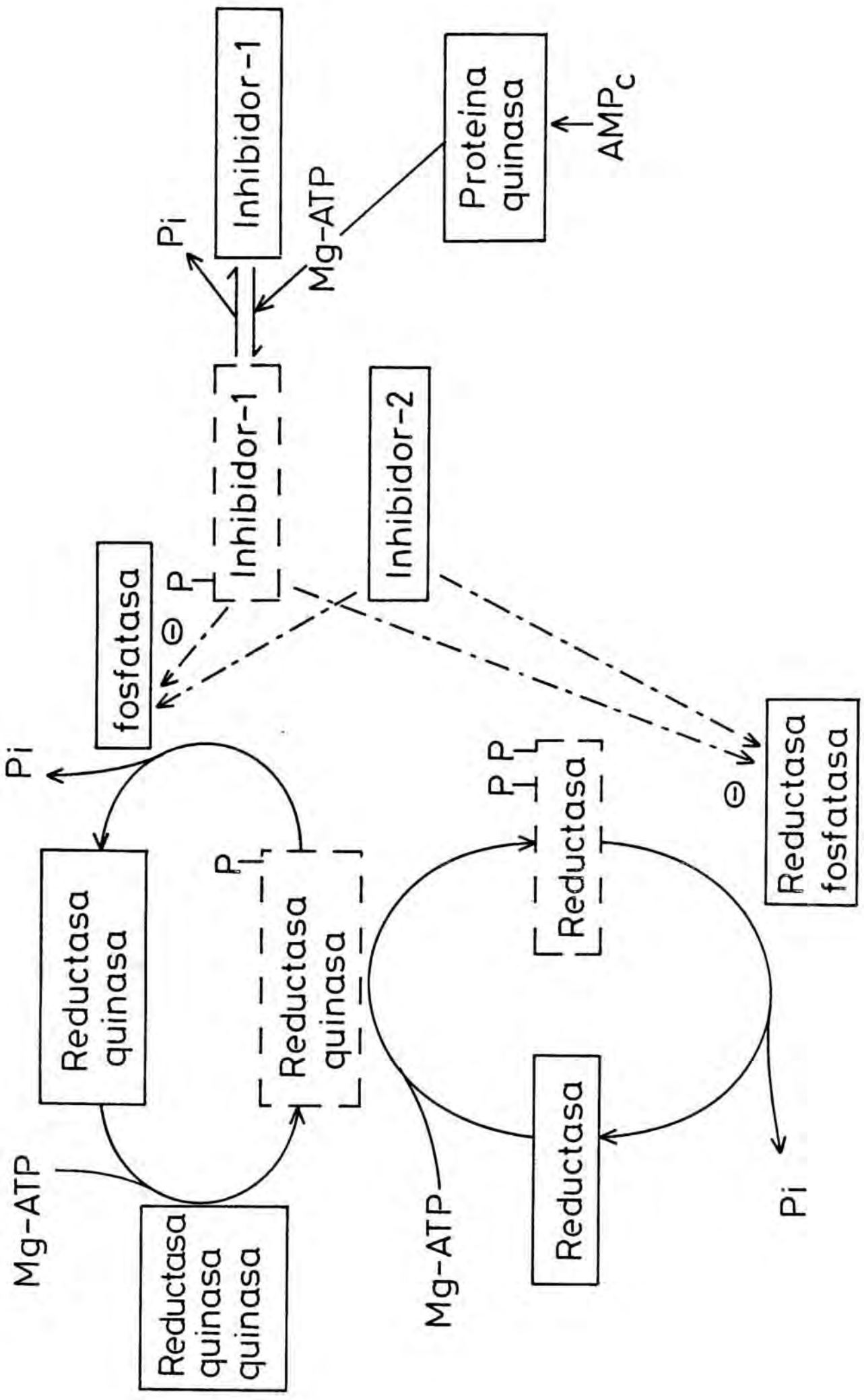
puesto que no resultaba activada por AMPc ni afectada por el inhibidor termoestable de la mencionada proteína quinasa.

Los resultados aportados por el grupo de Ingebritsen les permitieron proponer un mecanismo de regulación de la HMG-CoA reductasa, de tipo bicíclico, como el mostrado en el esquema V (184). Tanto la HMG-CoA reductasa como la HMG-CoA reductasa quinasa son interconvertibles por fosforilación y desfosforilación, siendo la reductasa activa cuando está desfosforilada, al contrario de la reductasa quinasa, que es activa cuando está fosforilada. Se propuso a la proteína fosfatasa C de bajo peso molecular (35 Kd) como responsable de la desfosforilación de ambas enzimas "in vitro". La fosforilación de la reductasa y la reductasa quinasa se lleva a cabo por la reductasa quinasa y la reductasa quinasa, respectivamente, en presencia de Mg-ATP (167).

Recientemente (185,186) se ha informado que las fosfatasas -1, -2A y -2C de hígado de rata desfosforilan tanto a la HMG-CoA reductasa como a la reductasa quinasa. Los autores confieren una especial importancia a las fosfatasas -1 y -2C por ser abundantes en hígado y porque un 20 % de la fosfatasa-1 se halla unida a la fracción microsomal (186).

La existencia del sistema bicíclico propuesto, así como la demostración de la fosforilación de la reductasa quinasa, fueron confirmadas por Beg y col.(172) empleando para ello reductasa quinasa quinasa de citosol de hígado de rata, purificada parcialmente por cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa. La enzima podía catalizar la fosforilación de la caseína y en menor medida de la fosvitina, mientras que su actividad sobre la histona 2A era muy baja. La actividad era independiente de AMPc. La HMG-CoA reductasa no resultaba

ESQUEMA V MODELO DE REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA
Y DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA A TRAVES
DE FOSFORILACION REVERSIBLE



inactivada por la reductasa quinasa quinasa.

La incubación de reductasa quinasa de microsomas solubilizada e inactiva, con reductasa quinasa parcialmente purificada, se tradujo en una progresiva incorporación de ^{32}P a la proteína, asociada a la activación de la reductasa quinasa. La reductasa quinasa fosforilada y parcialmente activa fue seguidamente inactivada y la proteína desfosforilada, en presencia de proteína fosfatasa-1 de citosol de hígado de rata (140). Para establecer definitivamente la fosforilación y desfosforilación de la reductasa quinasa, esta enzima homogénea (172) fue incubada con reductasa quinasa quinasa y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. La fosforilación de la reductasa quinasa se detectó por análisis electroforético de la mezcla, comprobándose que el ^{32}P comigraba mayoritariamente con la actividad reductasa quinasa. Empleando análoga metodología se demostró la desfosforilación de la enzima en un 70 %.

Los mismos autores proporcionaron evidencias de que la reductasa quinasa de microsomas y de citosol de hígado humano, también puede existir en formas activas e inactivas, interconvertibles entre sí. Por ello, proponen la existencia en hígado humano de un sistema bi-cíclico de regulación de la actividad HMG-CoA reductasa, análogo al descrito previamente en hígado de rata (150).

Muy recientemente, Beg y col. (187) han demostrado que la reductasa quinasa de extractos de fibroblastos humanos puede ser activada e inactivada por reductasa quinasa quinasa (172) y proteína fosfatasa-1 (140) de hígado de rata, respectivamente. Asimismo, poner de manifiesto la existencia de reductasa quinasa quinasa en extractos de fibroblastos humanos, capaz de activar a reductasa quinasa de citosol de hígado de rata. Los mismos resultados fueron obtenidos empleando fibroblastos de individuos afectados de hipercolesterolemia familiar,

proponiendo la existencia en ambos casos del sistema regulador bicíclico, descrito inicialmente en hígado de rata (172,184).

1.7. CARACTERIZACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA

Después de las observaciones iniciales de Berndt y col.(132) sobre el sistema activador de la reductasa, Nordstrom y col.(136) fueron los primeros en purificar parcialmente, a partir de citosol de hígado de rata, una forma molecular de 30 Kd del activador de la reductasa en microsomas. La activación era bloqueada por NaF 50 mM, siendo la concentración media inhibitoria de 5 mM.

Ingebritsen y col.(139) comprobaron que la fosforilasa fosfatasa hepática de bajo peso molecular (35 Kd) (140), podía activar a la reductasa e inactivar a la reductasa quinasa. El uso de inhibidores específicos de proteína fosfatasas confirmó las sospechas de que el sistema activador de la reductasa era una proteína fosfatasa. Así, se observó como el NaF inhibía la actividad fosforilasa fosfatasa, reductasa fosfatasa y reductasa quinasa fosfatasa.

Por otra parte, habían sido aisladas dos proteínas termoestables, que eran inhibidores de la fosforilasa fosfatasa, a partir de músculo (171,188) y de hígado de conejo (189-191), denominadas inhibidor-1 e inhibidor-2. Ingebritsen (192) purificó el inhibidor-2 según el método de Khandelwal y col.(191) y apreció su actuación tanto sobre la fosforilasa fosfatasa, como so-

bre la reductasa fosfatasa. Sitges y col.(193) observaron que el inhibidor-2 purificado de hígado de rata, inhibía también la actividad reductasa fosfatasa.

Posteriormente Phillip y Shapiro (194) comunicaron que la reductasa inactiva podía ser activada por una fosfatasa ácida de patata, mientras Brown y col.(80) informaron de la misma capacidad para una fosfatasa alcalina de E.coli.

La activación de la reductasa era fuertemente inhibida por los sustratos de la reacción de la HMG-CoA reductasa, el HMG-CoA y el NADPH. Saucier y Kandustch (195) describieron que la activación de la reductasa por un activador endógeno, tanto en células L, como en cerebro fetal, era inhibida por HMG-CoA, siendo la concentración que producía un 50 % de inhibición la de 5-10 μM . El coenzima A también inhibía la activación, aunque en menor proporción y el ácido hidroximetilglutárico inhibía a una concentración de 80 μM . Considerando que la concentración de HMG-CoA en hígado de rata se encuentra establecida alrededor de 30 μM (196) y dependiendo de la distribución del HMG-CoA entre el citosol y las mitocondrias, dicho compuesto podría ejercer una función reguladora del estado de activación de la reductasa.

El posible papel desempeñado por el NADPH está algo más en entredicho puesto que, mientras algunos autores afirmaban que a una concentración de 20 mM actuaba como potente inhibidor de la activación de la reductasa (195), otros autores observaron que a una concentración 2 mM no inhibía (197). Dado que la concentración normal de NADPH en hígado de rata es inferior a 1 mM (198), el autor descartó la capacidad del nucleótido como regulador de la activación de la reductasa.

A pesar de la importancia de los anteriores

trabajos, por ser los primeros en estudiar el tema, hay que señalar que en ninguno de ellos se comprobó que las preparaciones estudiadas fuesen realmente HMG-CoA reductasa fosfatasa, con capacidad para desfosforilar a la HMG-CoA reductasa. Los primeros autores que desarrollaron un estudio sistemático de las HMG-CoA reductasa fosfatasa y comprobaron que dichas proteínas realmente desfosforilaban a la reductasa, fueron Gil y col.(157). Partiendo de citosol de hígado de rata consiguieron aislar dos reductasa fosfatasa de elevado peso molecular que, por tratamiento con etanol, se disociaban en otras dos fosfatasa de bajo peso molecular (35 Kd). La incubación de HMG-CoA reductasa inactiva, marcada con ^{32}P , con cada una de las cuatro fosfatasa, producía un incremento de la actividad reductasa asociado a una liberación del ^{32}P de la proteína.

Posteriormente, estos autores (199-201) observaron que el efecto inhibitorio del fosfato y del pirofosfato sobre las cuatro fosfatasa, podía ser revertido por cationes divalentes. Estos resultados les llevaron a proponer que las reductasa fosfatasa eran metaloenzimas (199). Asimismo, el HMG-CoA, el CoA y el NADPH, mostraron ser inhibidores de la actividad reductasa fosfatasa (200), de acuerdo con los resultados obtenidos previamente por otros autores (195,197), operando con preparaciones crudas. La incubación de las cuatro reductasa fosfatasa con toda una serie de ácidos policarboxílicos (201) inactivaba a las cuatro fosfatasa, dependiendo de la concentración de ácido empleada. Con posterioridad, Brown y Rodwell (177) confirmaron el trabajo de Gil y col. (201), al aislar dos reductasa fosfatasa de elevado peso molecular, a partir del citosol de hígado de rata.

Ingebritsen y col.(185) han reportado que las fosfatasa denominadas -1, -2A y -2C de hígado de rata,

presentan actividad reductasa fosfatasa, siendo la -2C la más activa sobre este sustrato. Además, observaron que la fosfatasa -2C era la más abundante en el hígado, sugiriendo para ella un papel importante en la regulación de la HMG-CoA reductasa (186). Sin embargo, no descartan la posible intervención de la fosfatasa-1, dado que un 20% de su actividad se encuentra unida a los microsomas (186). No obstante, los autores emplearon como sustrato HMG-CoA reductasa en microsomas, por lo que no se pueden descartar posibles interferencias causadas por las fosfatasas microsomales (181).

Recientemente, Calvet y col. (202) en nuestro laboratorio, han purificado de citosol de hígado de rata cuatro proteína fosfatasas de alto peso molecular o nativas, denominadas I_{1a} , I_{2a} , I_{3a} y II_a , que muestran actividad sobre la HMG-CoA reductasa, la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa, si bien con diferentes actividades específicas frente a cada uno de los tres sustratos. Estas cuatro preparaciones, por tratamiento con etanol a la temperatura ambiente, se transforman en cuatro formas de bajo peso molecular, denominadas I_{1b} , I_{2b} , I_{3b} y II_b , respectivamente. Las ocho preparaciones son capaces de desfosforilar a los tres sustratos marcados con ^{32}P (180,202), demostrando inequívocamente su carácter de proteína fosfatasas. Atendiendo a toda una serie de propiedades significativas, los autores identifican las reductasa fosfatasas I_{3a} y II_a con las proteína fosfatasas -2A₁ y -2A₂ de Ingebritsen y col.(185) y a la fosfatasa I_a con la -2C, mientras que la fosfatasa I_{2a} , que por otra parte presenta una escasa actividad de reductasa fosfatasa, sugieren que podría identificarse con la fosfatasa-1 de Ingebritsen y col.(185).

La mayoría de los estudios realizados acerca de las reductasa fosfatasas utilizan como fuente enzimática la fracción citosólica y pocas son las comunicaciones referentes a las reductasa fosfatasas de microsomas.

Berndt y col.(132) habían comunicado la activación de la reductasa en microsomas en presencia de EDTA, $MgCl_2$ y Na_2SO_3 , posiblemente por estimulación de fosfatasa de microsomas. Posteriormente, Feingold y col.(203) descubrieron la existencia de una actividad reductasa fosfatasa de microsomas, capaz de activar a la reductasa, también de microsomas, en una reacción que podía ser bloqueada por el NaF y los fosfatos.

Recientemente, Sitges y col.(181) informaron por vez primera del aislamiento y purificación parcial de tres reductasa fosfatasa de alto peso molecular, a partir de microsomas de hígado de rata. Las tres fosfatasa eran inhibidas por KF, pirofosfato y fosfato y eran capaces de liberar ^{32}P a partir de una reductasa homogénea marcada con ^{32}P , reactivándola simultáneamente. Los investigadores consideraban poco probable que alguna de sus fosfatasa fuese la -2C identificada por Ingebritsen y col., puesto que ésta se hallaba tan sólo en un 2 % en los microsomas.

1.8. REGULACION DEL SISTEMA BICICLICO

Una vez establecida la existencia de un sistema bicíclico, en el que participan una serie de enzimas cuyas actividades relativas son las responsables del estado de actividad de la HMG-CoA reductasa, se plantea la necesidad de conocer con exactitud cuales son los mecanismos de regulación de estas enzimas y a través de qué señales metabólicas responden a las distintas necesidades celulares. Puesto que la modulación del estado de actividad de una enzima a través de sistemas en cascada, está caracterizada por una extraordinaria capacidad de amplificación de las señales metabólicas, derivadas de pequeñas variaciones de los diversos efectores, los primeros candidatos a la regulación de este sistema, son las hormonas. Por otra parte, varios grupos han sugerido que el colesterol y sus derivados ejercen un efecto regulador a corto plazo sobre la HMG-CoA reductasa, a través de mecanismos distintos a los descritos previamente en el apartado 1.4.1.

1.8.1. REGULACION POR HORMONAS

Ingebritsen y col.(204) observaron, trabajando con hepatocitos aislados de rata, que el tratamiento con glucagón (10 nM) provocaba una acusada disminución de la actividad específica de la reductasa, en los primeros 30

minutos de incubación. Posteriormente, se observaba un efecto adicional a largo plazo (150 minutos) sobre la actividad reductasa total susceptible de expresarse o, lo que es lo mismo, sobre la cantidad de proteína reductasa. La insulina (85 nM) ejercía el efecto contrario, incrementando la forma activa de la reductasa. Por otra parte, la forma activa de la reductasa quinasa de citosol variaba en forma opuesta, en respuesta a las mismas hormonas, en buena correlación con los cambios observados en la actividad reductasa. Es decir, el glucagón estimulaba la expresión de la actividad reductasa quinasa y la insulina la deprimía.

Estudios posteriores, también en hepatocitos, empleando concentraciones fisiológicas de ambas hormonas, evidenciaban cambios en el estado de activación de la reductasa, en el mismo sentido, incluso en menos de 15 minutos (205-207). En todos los casos los cambios de actividad de la reductasa se traducían en cambios en la velocidad de síntesis de esteroides.

Estos resultados han sido confirmados por Hennenberg y Rodwell (208), al observar en hepatocitos aislados de rata, análogos efectos de insulina y glucagón sobre el estado de activación de la reductasa. La adición a los hepatocitos de AMPc o GMPc también se traducía en una disminución de la forma activa de la reductasa. Los efectos observados lo fueron al cabo de 10-15 minutos de adición del efector y se mantuvieron por lo menos durante 60 minutos. Esta es la primera información habida concerniente al efecto del GMPc sobre el estado de activación de la reductasa y la velocidad de síntesis de esteroides. Cabe recordar que a este nucleótido cíclico se le presume una función de segundo mensajero, implicado en la regulación de la biosíntesis de lípidos (209) en el tejido adiposo, posiblemente en respuesta a la insulina (210).

Beg y col.(155) profundizaron en el estudio del

mecanismo de acción del glucagón "in vivo", empleando ratas que fueron inyectadas con [^{32}P]ortofosfato y glucagón. La reductasa fue purificada parcialmente a partir de los microsomas e inmunoprecipitada o bien, purificada hasta homogeneidad sin que durante el proceso se observasen variaciones en la relación de actividades específicas entre las ratas control y las tratadas con la hormona. La administración de glucagón causaba una disminución de la actividad reductasa de un 35 %, asociada a una incorporación de ^{32}P dos veces mayor en las ratas tratadas con la hormona que en las ratas control. El contenido de AMPc del hígado experimentaba un incremento de 10-12 veces. Los resultados fueron completados demostrando que el tratamiento anterior multiplicaba por dos la actividad reductasa quinasa de los microsomas, parcialmente purificada. Este incremento, a su vez, era debido a un aumento de la forma activa (fosforilada) de la reductasa quinasa. Estos resultados tenían la importancia de demostrar "in vivo" que la reductasa estaba fosforilada pero que además, el estado de fosforilación se modificaba en el sentido previsto, en respuesta a efectores hormonales.

En cuanto al efecto de la insulina sobre el estado de activación de la reductasa, son bastante escasos los trabajos publicados. Las observaciones precedentes (204-208) contrastan con las realizadas por Brown y col. (80) y por Dugan y col. (211), quienes comunicaron que la fracción de actividad reductasa permanecía prácticamente invariable durante el día, siendo las variaciones cíclicas de la actividad debidas únicamente a cambios en la cantidad total de enzima (82,84-86). Goodman y col. (212) afirmaron que la fracción activa de la reductasa era la misma en ratas normales y diabéticas e incluso Young y col. (213) sugirieron un incremento de esta fracción en animales diabéticos.

Por el contrario, los efectos de la insulina

sobre la fracción activa de la reductasa han sido observados por Easom y Zammit (214), al detectar rápidas activaciones de la reductasa sin variación paralela de la actividad total de la enzima, en respuesta a la administración intravenosa de insulina a ratas diabéticas. Un efecto idéntico fue observado después de tratamientos hormonales más prolongados, por vía intraperitoneal; tan sólo al cabo de 2-3 horas se apreció un aumento de 5-6 veces en la actividad total de la reductasa. Los mismos autores, en base a estas y otras observaciones, asignan a la insulina la responsabilidad del mantenimiento de los dos ciclos rítmicos que sostienen el ritmo circadiano de la actividad reductasa, afectando tanto a la síntesis como a la fosforilación de la enzima (91).

Los resultados presentados por estos autores son especialmente interesantes por la técnica empleada en la toma de muestras, a la que definen como "cold clamping" (pinzamiento frío). Ellos afirman que es especialmente adecuada para el estudio de cambios en las actividades basal y total de enzimas cuya actividad no puede medirse en homogenados de tejidos, por las interferencias de otras enzimas liberadas al fracturarse distintos orgánulos (HMG-CoA liasa mitocondrial) (215), puesto que con la mencionada técnica esto se evita.

Los resultados anteriores, interpretados de acuerdo con el sistema bicíclico descrito, indican que el glucagón estimula la fosforilación de la reductasa y de la reductasa quinasa, mientras que la insulina activa la desfosforilación de ambas enzimas. Así pues, hay evidencias experimentales del funcionamiento del sistema bicíclico de regulación y de su respuesta a las señales endocrinas. Por tanto la HMG-CoA reductasa y la HMG-CoA reductasa quinasa se incorporan a la lista de enzimas cuya actividad cambia rápidamente, en respuesta a la insulina y al glucagón. Entre ellas cabe citar a la glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa, fosforilasa quinasa, fosfo-

fructoquinasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, piruvato quinasa, piruvato deshidrogenasa y acetil-CoA carboxilasa (216).

En cuanto al mecanismo de acción, representado en el esquema V, está aceptado que el glucagón actúa a través del AMPc (11,217). Puesto que la reductasa quinasa ha sido descrita como una enzima independiente de AMPc (136-138,167,172), salvo contadas excepciones (137,172), hay que pensar en las proteína fosfatasas como blanco de su acción.

Una primera hipótesis surge del hecho de que tanto la reductasa como la reductasa quinasa son desfosforilables por una misma proteína fosfatasa de 35 Kd (139,218), identificada como la proteína fosfatasa-1 (219) o proteína fosfatasa C (220). La forma nativa de alto peso molecular presenta la misma especificidad de sustrato para ambas enzimas; por lo tanto, la inhibición de dicha fosfatasa produciría una respuesta coordinada de activación de la reductasa quinasa e inactivación de la reductasa, que amplificaría la señal biológica (12).

Esta inhibición de la fosfatasa podría ser iniciada por el AMPc, en respuesta al glucagón, a través de la fosforilación del inhibidor-1 (171,188,189,221) por la proteína quinasa dependiente de AMPc. El inhibidor, una vez fosforilado, inhibe a la fosfatasa-1. Esta hipótesis concuerda con la observación de que su estado de fosforilación en músculo de conejo, se aumenta por el tratamiento con epinefrina (222,223) y disminuye tras el tratamiento con insulina (224). El principal punto de duda ante esta hipótesis proviene de que hasta el momento, no ha podido ser demostrada la existencia de inhibidor-1 en hígado de rata, aunque sí lo ha sido en hígado de perro (190).

El modo de acción de la insulina sobre el sistema bicíclico es todavía desconocido, aunque se sugiere una posible acción a través también de la proteína fosfa-

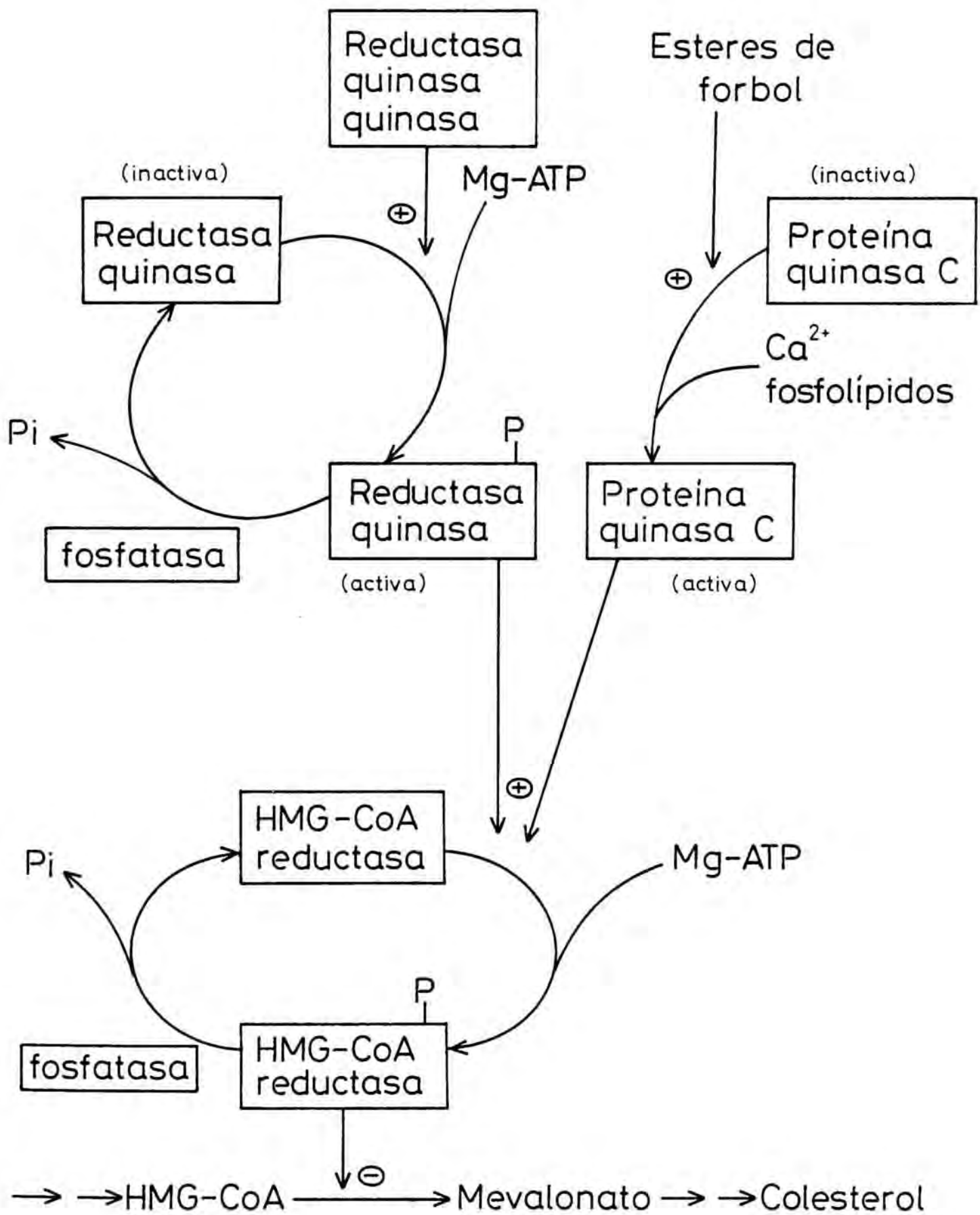
tasa-1. La insulina actuaría activándola a través de sus supuestos efectos sobre la glucógeno sintasa quinasa-3 y el inhibidor-1 (15,224), si los efectos de la hormona en el hígado fuesen similares a los descritos en el tejido adiposo (225). Cohen y col. especulan con la posibilidad de que la insulina regule a la GSK-3, así como a la proteína fosfatasa-1 (226).

La regulación de la actividad fosfatasa implicada en este sistema bicíclico podría producirse pues, a través del inhibidor-2, aislado por distintos autores (189, 190,227). Se ha demostrado que este inhibidor bloquea la actividad reductasa fosfatasa de la preparación I_{2a} obtenida en nuestro laboratorio (202) e identificada con la fosfatasa-1, a la que Ingebritsen y col. asignan también actividad de reductasa quinasa fosfatasa (185). El inhibidor-2 puede formar un complejo inactivo con la fosfatasa-1. Cuando este inhibidor resulta fosforilado por la GSK-3, se separa de la fosfatasa permitiéndole expresar su actividad (228). Debemos recordar que Khandelwal y col.(229) encontraron que el nivel de actividad del inhibidor en hígado de rata aumentaba por la diabetes, mientras que la insulina restablecía sus valores normales.

Aunque los mecanismos descritos no están demostrados, las evidencias existentes apuntan a que el papel desempeñado por las proteína fosfatasas en la regulación del sistema bicíclico descrito es importante.

Recientemente, Beg y col.(162) han propuesto que la actividad enzimática de la reductasa puede estar regulada por dos sistemas de quinasas (esquema VI). El primero comprende a las quinasas que integran el sistema bicíclico en cascada y el segundo está constituido por la proteína quinasa C, capaz también de fosforilar a la reductasa. Este hecho permite presagiar la influencia de toda una serie de sustancias biológicamente activas, ta-

ESQUEMA VI MODELO DE REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA
POR DOS SISTEMAS DE QUINASAS



les como hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc, sobre la velocidad de síntesis de esteroides, a través de la degradación del fosfatidilinositol y la simultánea movilización del calcio. Lo anterior unido al incremento de la fosforilación de la reductasa en presencia de esteres de forbol, sugiere que la fosforilación de la reductasa por la proteína quinasa C podría ser un mecanismo de regulación adicional de considerable importancia.

Asimismo, muchos de los receptores celulares cuyo estímulo induce la degradación del fosfatidilinositol y la movilización de calcio, provocan una activación de la guanilato ciclasa, elevando los niveles intracelulares de GMPc (230,231). En base a observaciones previas (208), diversos efectores (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc.) podrían regular la biosíntesis de esteroides, estimulando la fosforilación de la reductasa.

1.8.2. REGULACION POR ESTEROLES Y MEVALONATO

Desde hace tiempo se conoce que el colesterol y sus derivados oxigenados, así como el mevalonato o sus derivados, ejercen un control negativo sobre la reductasa a través de cambios en su cantidad (22,51,92,93). Sin discutir la existencia de este mecanismo regulador de la actividad reductasa a largo plazo, son varios los grupos de investigación que abogan por la existencia de un efecto regulador de estos compuestos a más corto plazo, por modificación del estado de fosforilación de la reductasa.

Edwards y col.(90) observaron en hepatocitos aislados de rata, ambos efectos producidos por la incubación con suero de rata durante 3 horas, como fuente de colesterol. La adición de mevalonato se traducía en una disminución de la actividad específica de la reductasa hasta un 29 % de la actividad inicial, junto con una disminución

de la proteína enzimática total. Los resultados fueron obtenidos por comparación de los puntos de equivalencia al inmunoprecipitar la reductasa con anticuerpos específicos. Los mismos autores (232) habían demostrado anteriormente, que la actividad reductasa disminuía en un 85% al cabo de 45 minutos de la administración de mevalonolactona por vía intragástrica a ratas. Estos resultados, obtenidos a tiempos de acción cortos, fueron confirmados mediante inyección de mevalonato a ratones, sugiriéndose que el efecto era debido principalmente a un derivado del mevalonato, distinto del colesterol (233).

Erickson y col.(234) observaron que la administración intragástrica de mevalonato a ratas, producía una rápida caída de la actividad reductasa en menos de 15 minutos. La actividad podía recuperarse en presencia de fosfatasa parcialmente purificada de citosol. Todo ello apuntaba a una inactivación de tipo reversible, consistente con el hallazgo de que la actividad fosfatasa del citosol se reducía hasta un 36 % de la actividad inicial. De estas observaciones concluyeron que la rápida y reversible inactivación de la reductasa en respuesta al mevalonato, era debida en parte a la inhibición de la actividad fosfatasa, que actuaba directamente sobre la reductasa y la reductasa quinasa. Observaron también una segunda fase en la inactivación, al cabo de una hora del tratamiento con mevalonato, que no era reversible por tratamiento con una proteína fosfatasa. Por ello se atribuyó a una variación de la cantidad total de la enzima, debida a la represión de su síntesis o al aumento de su degradación.

Por el contrario, la perfusión de 25-hidroxicolessterol en hígado de rata aislado, causó una rápida e irreversible inactivación de la reductasa, sin que se observasen variaciones en la actividad fosfatasa del citosol.

Arebalo y col.(235,236) observaron el mismo ti-

po de inactivación bifásica de la reductasa, tras la administración intragástrica de mevalonato. Los mismos autores obtuvieron resultados similares en ratas alimentadas con una dieta suplementada con un 2% de colesterol, en dosis única y por tiempo limitado (236,237). La actividad reductasa era inactivada reversiblemente durante los 60 primeros minutos de tratamiento y de manera no reversible, a partir de las dos horas. Los autores propusieron que el efecto reversible mediado por mevalonato y colesterol era una primera respuesta, que daba paso a una serie de mecanismos regulatorios que derivaban en un aumento de la degradación de la enzima.

Beg y Brewer (170,238) demostraron que la administración de mevalonato a ratas por vía nasogástrica, provocaba una inactivación reversible de la HMG-CoA reductasa, hasta un 64 % de la actividad inicial, al cabo de 20 minutos, sin variación de la actividad reductasa total. Previamente los animales habían sido inyectados intraperitonealmente con [^{32}P]ortofosfato. Al cabo de los 20 minutos de la administración de mevalonato, la reductasa se aislaba y se purificaba a homogeneidad observándose un aumento de 1,6 veces respecto al control, en el ^{32}P incorporado a la enzima. El fosfato era eliminado en su práctica totalidad por tratamiento con proteína fosfatasa-1, a la vez que se recuperaba la actividad. Al cabo de 60 minutos, la reductasa resultaba inhibida hasta un 22 % de su actividad, pero no se observaba un incremento concomitante de la fosforilación.

La administración de colesterol por la misma vía, causó una inactivación reversible de la reductasa, de un 21 %, al cabo de 75 minutos. Estos resultados confirmaban y ampliaban los presentados anteriormente (235, 237).

El efecto del mevalonato ha sido estudiado también en sistemas de hepatocitos aislados de rata (206,218)

incubados en presencia de mevalonato, observándose una vez más, como al cabo de 15 minutos la actividad reductasa estaba fuertemente inhibida, aunque de manera reversible, sin observarse variaciones en la forma total de la enzima. La actividad reductasa fosfatasa medida en citosol, se reducía a un 37 % de la inicial, sin que este efecto fuese debido a una inhibición directa del mevalonato sobre la fosfatasa. Estos datos coinciden con observaciones previas en ratas enteras (234). Como quiera que la reductasa tampoco resultaba inhibida directamente por el mevalonato, los autores sugirieron que los efectos observados eran causados por algún producto derivado de su metabolismo. Entre los posibles candidatos están numerosos pirofosfatos orgánicos (239,240), así como pirofosfato inorgánico, generados en las sucesivas condensaciones, previas a la síntesis del escualeno.

Los estudios sobre el efecto del mevalonato a corto plazo en la actividad reductasa, aunque de manera no excesivamente concreta, indicaban que el componente del sistema bicíclico a través del cual se ejercía el efecto, eran la(s) proteína(s) fosfatasa(s) que actúan sobre reductasa y reductasa quinasa. Estudios recientes (241) implican directamente en este mecanismo a la reductasa quinasa y a la reductasa quinasa quinasa. Tras confirmar resultados precedentes acerca de la inactivación reversible de la actividad reductasa por efecto del mevalonato, por vía nasogástrica, se demuestra que la actividad de la reductasa quinasa de citosol se incrementa de 2 a 3 veces, también de una manera reversible, como se pone de manifiesto por la inactivación sufrida al incubarla en presencia de proteína fosfatasa.

De igual manera, la actividad de la reductasa quinasa quinasa purificada parcialmente a partir de citosol de ratas tratadas con mevalonolactona, se incrementa de 3 a 4 veces con respecto a la de ratas control. Esta activación no es reversible por tratamiento con proteína

fosfatasa. La activación justifica el incremento de actividad observado en la reductasa quinasa. Paralelamente, la activación de la reductasa quinasa por fosforilación, se ve favorecida por una disminución de la actividad de la(s) proteína(s) fosfatasa(s) de citosol, que desfosforilan a la reductasa y a la reductasa quinasa.

Los autores afirman desconocer el mecanismo de acción del mevalonato sobre la reductasa quinasa quinasa, pero sugieren que la acción sobre la(s) fosfatasa(s) podría involucrar a los inhibidores proteicos -1 y -2.

El hecho de que "in vitro" el mevalonato no actúe directamente sobre ninguna de las enzimas estudiadas, refuerza la hipótesis de la acción del mevalonato a través de productos de su metabolismo.

En un trabajo publicado en este mismo año (187), se demuestra como en fibroblastos humanos en cultivo, las LDL, el 25-hidroxicolesterol, el 7-cetocolesterol y el mevalonato inhiben rápidamente (20-30 minutos) la actividad reductasa, de una manera reversible, disminuyendo simultáneamente la velocidad de síntesis de esteroides a partir de acetato. El mismo estudio realizado en presencia de concentraciones sensiblemente más elevadas de los efectores, durante el mismo tiempo de acción, provoca que la inactivación de la reductasa sea debida simultáneamente, a cambios en su forma activa, así como en su forma total. Por lo tanto, es preciso emplear bajas concentraciones del modulador y tiempos de incubación cortos, para que únicamente se manifieste el efecto de tipo reversible. Análogos resultados fueron obtenidos empleando fibroblastos de individuos afectados de hipercolesterolemia familiar (homocigotos), salvo para las LDL, de cuyos receptores específicos carecen. Este hecho es importante, puesto que permite pensar que las células mutantes pueden también ajustar rápidamente su metabolismo, en respuesta a

pequeñas variaciones en los niveles de esteroides (25-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol), dado que carecen de la posibilidad de hacerlo en respuesta a los niveles de colesterol circulante en forma de LDL.

Diversos estudios realizados en otros laboratorios, apoyan la hipótesis que asigna una función biológica importante al mecanismo de regulación de la reductasa por cambios rápidos y reversibles de su actividad específica. Así, en ratas alimentadas con dietas ricas o deficitarias en ácido ascórbico durante nueve semanas, se observan modificaciones significativas del porcentaje de reductasa en forma activa, sin cambios en la cantidad total de reductasa (242). Semejantes dietas elevan los niveles de colesterol del organismo, al deprimir la síntesis de ácidos biliares.

Panini y Rudney (243) observaron que la exposición de células epiteliales de intestino de rata al efecto del bicarbonato, provocaba una disminución reversible de la fracción activa de la reductasa, durante los primeros 60 minutos. Esta variación iba acompañada de variaciones en la velocidad de síntesis de esteroides.

La administración de dicloroacetato a ratas, droga que reduce los niveles de colesterol sérico en humanos, producía un incremento de la forma inactiva de la reductasa, al cabo de una hora (244).

Leoni y col.(245) estudiaron los cambios en la velocidad de síntesis de colesterol y en el estado de activación de la reductasa, en hepatocitos aislados de rata, en diferentes etapas del desarrollo pre y post-natal. El estado de activación, así como la cantidad total de la reductasa, experimentan amplias variaciones pero, significativamente, la velocidad de síntesis de esteroides está siempre en estrecha correlación con la forma activa de la

reductasa, indicando que durante las primeras etapas del desarrollo, la regulación reversible de la HMG-CoA reductasa juega un papel destacado en el control de la biosíntesis del colesterol.

Numerosas células cancerosas o en estados pre cancerosos exhiben fallos en la regulación de la biosíntesis del colesterol, que se caracterizan por unos elevados niveles de HMG-CoA reductasa y por defectos en el control por retroinhibición ejercido por el propio colesterol (246). Feingold y col.(247) observaron que en ratas afectadas por hepatomas de Morris, la fracción de la enzima presente en su forma activa (53-75 %) era mucho mayor de lo habitual en células normales (10-20 %) (80, 136,141,143,148,204,248).

Sexton y col.(249) informaron acerca de cambios en el estado de activación de la reductasa durante el proceso de proliferación celular, que seguían un patrón de variación distinto al de la actividad reductasa total.

Los estudios anteriores, realizados en distintos laboratorios, indican que la regulación de la actividad de la reductasa por fosforilación y desfosforilación es un mecanismo de control de relevante importancia fisiológica. La fosforilación y desfosforilación de la reductasa produce cambios rápidos de la actividad, en respuesta a estímulos dietarios, hormonales o farmacológicos, en tiempos habitualmente inferiores a los 30 minutos. Estas variaciones son habitualmente transitorias, puesto que al cabo de un tiempo máximo de 2 horas, el estado de activación de la reductasa vuelve a sus valores normales (204,234,235,237), pero permiten a las células ajustar rápidamente su velocidad de síntesis de esteroides, a menudo como preparación de una respuesta más lenta y permanente, mediada por cambios en los niveles de la proteína enzimática. Una vez que la célula ha adaptado de

manera más permanente su velocidad de síntesis de esteroides a la nueva condición fisiológica, el estado de fosforilación de la reductasa vuelve aparentemente a sus niveles normales, en espera de la llegada de nuevos estímulos.

1.9. ARGUMENTOS EN CONTRA DE LA REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION

A pesar de las evidencias existentes, la importancia fisiológica e incluso, la propia existencia del mecanismo de regulación de la actividad reductasa por fosforilación covalente, es objeto de controversia. A continuación expondremos brevemente algunos argumentos esgrimidos en contra de este sistema de control de la actividad enzimática de la reductasa.

1.9.1. INTERFERENCIA DE LA MEVALONATO QUINASA EN LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD REDUCTASA QUINASA

Los ensayos de actividad reductasa quinasa midiendo la velocidad de incorporación de ^{32}P a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a la reductasa, no son adecuados para los análisis de rutina (250). Así pues, la actividad reductasa quinasa suele determinarse a través de la disminución de actividad que acompaña a la fosforilación de la reductasa. La mayoría de los investigadores determinan la actividad reductasa quinasa mediante dos incubaciones separadas (250,251). Durante la primera, la HMG-CoA reductasa es inactivada en ausencia de sus sustratos, por la reductasa quinasa y Mg-ATP. En la segunda, se determina la actividad reductasa residual. Teniendo en cuenta que la

actividad de la reductasa se cuantifica en función del mevalonato producido y que este compuesto puede ser fosforilado por la mevalonato quinasa, rindiendo un producto de propiedades distintas, como es el mevalonato-5-fosfato, existe la posibilidad de infravalorar la actividad de la HMG-CoA reductasa, al medir niveles de mevalonato inferiores a los producidos realmente como consecuencia de su actividad.

Ness y col.(252,253) afirmaron que las preparaciones de reductasa quinasa, tanto de microsomas como de citosol, contenían realmente mevalonato quinasa y que por lo tanto, la inactivación de la reductasa dependiente de Mg-ATP era en realidad un artefacto experimental. Estas afirmaciones se basaban en hechos tales como, la copurificación de ambas actividades en cromatografías de afinidad y de filtración molecular en gel, la inhibición de ambas actividades por geranil pirofosfato y farnesil pirofosfato, que son potentes inhibidores de la mevalonato quinasa (254), y la inhibición de la actividad reductasa quinasa al ensayar la actividad HMG-CoA reductasa residual en presencia de una elevada concentración de mevalonato no radioactivo.

Realmente la actividad mevalonato quinasa, en condiciones adecuadas, puede llegar a simular la actividad reductasa quinasa, pero ambos fenómenos son distintos y diferenciables. Nordstrom y col.(136) y Harwood y col.(250) demostraron que en las condiciones de ensayo empleadas, después de la inactivación de la reductasa en presencia de Mg-ATP y reductasa quinasa de citosol, no se producía mevalonato-5-fosfato. Además, se ha demostrado la inactivación de la HMG-CoA reductasa añadiendo elevadas concentraciones de mevalonato no radioactivo al medio de ensayo de la reductasa (145) o bien, pequeñas cantidades de mevalonato radioactivo como standard interno (137,145,251), no detectándose en ningún caso activi-

dad de mevalonato quinasa. Del mismo modo, ha sido observado repetidamente que la inactivación de la reductasa depende del tiempo de incubación con la reductasa quinasa, durante la que no se halla presente el mevalonato (137, 145,251) y que la determinación de la actividad reductasa se efectúa habitualmente en presencia de concentraciones de EDTA suficientemente elevadas, como para inhibir la actividad de la mevalonato quinasa (250). Finalmente, ha sido demostrado también, que ambas enzimas pueden separarse por técnicas cromatográficas de intercambio iónico (DEAE-sephacel) o de filtración molecular en gel (173, 250).

Así pues, incluso ignorando los experimentos que inequívocamente demuestran la incorporación de [^{32}P] ortofosfato a la proteína HMG-CoA reductasa, simultáneamente a su inactivación está claro que ésta no puede atribuirse en ningún caso a la presencia de mevalonato quinasa. De todas formas, es necesario tomar aquellas precauciones que garantizan la no interferencia de esta enzima durante la determinación de la actividad reductasa quinasa (250).

1.9.2. RESISTENCIA DE LA HMG-CoA REDUCTASA SOLUBLE A LA FOSFORILACION E INACTIVACION

Mientras la HMG-CoA reductasa en microsomas se inactiva en gran medida (85-95 %) y con notable rapidez (138), los primeros intentos de inactivación de la reductasa solubilizada por congelación y descongelación encontraron dificultades y en algunos casos fracasaron (134). Sin embargo, con posterioridad varios grupos de investigadores abordaron el problema con éxito (136,137,155,156), demostrando simultáneamente la incorporación de ^{32}P a la proteína HMG-CoA reductasa. No obstante, es cierto que en muchos casos, la velocidad y la extensión de la inac-

tivación de la reductasa solubilizada, no son comparables con las conseguidas con la reductasa en microsomas (136, 137). Otros investigadores han informado incluso que, en contraste con los resultados obtenidos empleando reductasa microsomal, la inactivación de la reductasa soluble y homogénea es independiente del tiempo de incubación, es reversible por dilución o por eliminación del Mg-ATP y no se reactiva por incubación con fosfatasa.

Estos resultados indujeron a sostener la hipótesis de que la inactivación de la reductasa soluble era debida a la formación de un complejo no covalente, entre el inactivador, la reductasa y el Mg-ATP y que realmente, no se involucraba un mecanismo de catálisis enzimática (255). Estos autores, al igual que Jenke y col.(82), informaron de la imposibilidad de demostrar la incorporación de ^{32}P durante la inactivación de la HMG-CoA reductasa electroforéticamente homogénea. Una posible explicación a este resultado fue sugerida por Beg y col.(173), al afirmar que dada la acusada inestabilidad de la reductasa quinasa, las preparaciones empleadas por aquellos autores podían carecer de tal actividad.

En cualquier caso, un hecho demostrado (137) es que, si bien es posible inactivar el fragmento soluble de la reductasa, las concentraciones de reductasa quinasa requeridas son mucho más elevadas que las necesarias para inactivar a la reductasa en microsomas. En las condiciones empleadas, la actividad de la reductasa quinasa hacia el fragmento soluble de la HMG-CoA reductasa es tan sólo un 5 % de la exhibida hacia la reductasa en microsomas, como consecuencia de su menor afinidad hacia la enzima soluble.

Ante esta disparidad, se pensó que la inactivación de la reductasa en microsomas podía deberse a la formación de algún inhibidor dependiente de Mg-ATP, asociado

a la membrana microsomal, a la presencia de mevalonato quinasa o a la activación de algún sistema consumidor de HMG-CoA o NADPH, que fuese dependiente de Mg-ATP (253). Asimismo, se sugería la posibilidad de que la fosforilación observada fuese debida a uniones inespecíficas o bien, a fosforilación de una proteína contaminante de las preparaciones de reductasa (82,253,255).

La explicación del fenómeno surgió del descubrimiento de que la reductasa solubilizada procedía de la proteólisis de una forma nativa de la enzima (74). La reductasa solubilizada en su forma nativa, empleando detergentes no iónicos, puede ser inactivada con igual rapidez y extensión que la reductasa en microsomas (76). Cabe pues considerar la posibilidad de que la reductasa soluble carezca de algún fragmento necesario para el reconocimiento o para la unión a la reductasa quinasa.

1.9.3. INVARIABILIDAD DEL ESTADO DE FOSFORILACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA "IN VIVO"

En ciertos estudios llevados a cabo empleando ratas o bien células en cultivo, que han sido sometidas a determinadas dietas o a tratamientos con ciertas drogas durante horas e incluso días, no ha sido posible detectar variaciones en el grado de fosforilación de la HMG-CoA reductasa. Brown y col.(80) no observaron variaciones en el estado de activación de la reductasa en diferentes situaciones tales como el ayuno, la realimentación, la diabetes y la administración de dietas con colesterol y colestiramina. Jenke y col.(82) y Dugan y col.(211) demostraron que los cambios de actividad reductasa producidos durante la primera hora después del inicio de una dieta a base de colesterol o de la administración de insulina, glucagón o mevalonato a ratas, se debían exclusivamente a cambios en la cantidad de proteína enzimática presente.

Idénticos resultados han sido obtenidos por otros laboratorios (135,256).

De acuerdo con estos resultados, varios autores han interpretado que "in vivo", la reductasa no experimenta variaciones en su estado de fosforilación y que el mecanismo de interconversión no tiene ninguna significación fisiológica. Sin embargo, un estudio detallado de las numerosas evidencias presentadas en sentido contrario, permite afirmar que ésto no es así.

Son numerosos los estudios que han demostrado variaciones en el estado de actividad de la reductasa, en ausencia de cambios en la cantidad total de la protefina, en rápida respuesta a tratamientos hormonales, farmacológicos o frente a diversas dietas. Además, al comparar la velocidad de síntesis de esteroides con el nivel de actividad de la reductasa, se observa en todo momento una clara correlación (143,187,208,245), indicadora de que la velocidad de síntesis de esteroides está realmente controlada por el estado de fosforilación de la reductasa.

En cualquier caso, estos experimentos han puesto de manifiesto que hay que extremar las precauciones al seleccionar las técnicas experimentales, así como el tiempo al que se efectúa el tratamiento y el análisis (204,234-237). No hay que olvidar que las variaciones de actividad debidas a fosforilación y desfosforilación de la reductasa, suelen ser transitorias y raramente persisten más allá de las dos horas. En esta característica puede residir la explicación de ciertos resultados obtenidos después de tratamientos prolongados de los animales de experimentación.

Sin embargo, en algunos casos estas variaciones del estado de activación de la reductasa son permanentes en el tiempo, como por ejemplo en algunas etapas del de-

sarrollo pre y post-natal (245), en células cancerosas (247) y en desarrollo (249), en el tratamiento con determinadas dietas (242) e incluso, durante el mantenimiento del ciclo circadiano de la HMG-CoA reductasa (214). Sin embargo, parece claro que los cambios en el estado de activación de la reductasa constituyen un mecanismo que actúa fundamentalmente a tiempos cortos, más que durante largos periodos. La interconversión por fosforilación y desfosforilación parece actuar de manera concertada con otros mecanismos más lentos, permitiendo una muy rápida respuesta celular frente a las necesidades de síntesis de esteroides, en espera de una más lenta y permanente respuesta, por cambios en la cantidad total de enzima.

En varios de los trabajos comentados, el denominado grado de activación de la reductasa ha sido determinado en función de las variaciones en el punto de equivalencia, al inmunoprecipitar la HMG-CoA reductasa (número de unidades inhibidas por una determinada cantidad de anticuerpo) (82,84,135,211,235-237). La interpretación de los resultados (253), así como el tipo de antisuero empleado (257), pueden influir de manera importante en las conclusiones obtenidas. Por otra parte, hay ciertas evidencias de que los anticuerpos presentan una diferente especificidad de reconocimiento de la reductasa, dependiendo de su estado de actividad (258,259). Finalmente, hay también evidencias de que la forma fosforilada de la reductasa es tan sólo una de las dos posibles especies inactivas de la enzima, capaces de reaccionar con los anticuerpos (69,260,261). Por tanto, son varios los factores cuya influencia hay que tener presente y controlar en este tipo de experimentos.

Por último, algunos autores sugieren que la regulación de la biosíntesis de esteroides, a través de cambios rápidos de la actividad reductasa, no se da "in vivo" porque las células no precisan ajustar tan rápidamente las

condiciones de su metabolismo. No obstante, hay que considerar que las variaciones en los niveles de la proteína reductasa y en consecuencia, de la velocidad de síntesis de esteroides, se establecen definitivamente al cabo de varias horas de haberse producido la señal biológica que ha inducido tal respuesta. La regulación a través de cambios en el estado de fosforilación permite hacer frente a la nueva situación metabólica, en el tiempo de minutos, siendo ésta precisamente la razón de ser de su existencia. Resulta por lo menos significativo, que otras dos enzimas que participan en el mantenimiento de la homeostasis celular del colesterol, la acil-CoA-colesterol acil transferasa (ACAT) y la colesterol-7 α -hidroxilasa, también regulan su actividad a través de mecanismos de fosforilación y desfosforilación (262,263). Esto parece indicar que la regulación coordinada de las tres enzimas por fosforilación y desfosforilación, puede desempeñar un papel muy importante en el mantenimiento de los niveles apropiados de colesterol libre (262).

1.10. PROTEINA QUINASAS

Se denominan proteína quinasas a aquellas enzimas capaces de catalizar la siguiente reacción:



lo que supone el establecimiento de uniones covalentes entre la proteína sustrato y grupos fosfato.

Las proteína quinasas han sido clasificadas de acuerdo con diferentes criterios de entre los cuales, el más usual es aquel que las agrupa en función de su dependencia de AMP cíclico o de calcio.

1.10.1. PROTEINA QUINASAS DEPENDIENTES DE AMP CICLICO

Cronológicamente fue la primera quinasa identificada como catalizadora de la fosforilación e inactivación de la glucógeno sintasa (264). La enzima se presenta en dos formas isoenzimáticas denominadas tipo I y tipo II, separables por cromatografía en columna de DEAE-celulosa. Ambas isoenzimas constan de dos tipos de subunidades distintas, la reguladora (R) y la catalítica (C). La subunidad catalítica es idéntica en ambas isoenzimas,

mientras que la reguladora es una proteína diferente en cada caso.

El control de la actividad de la enzima se efectúa por medio de la inhibición que la subunidad reguladora ejerce sobre la catalítica. Así, el holoenzima, cuya estructura se representa como R_2C_2 , es inactivo. En presencia de AMPc el holoenzima liga a este nucleótido, formando un complejo ternario que inmediatamente se disocia en R_2 (AMPc) $_4$ y 2C. La subunidad catalítica una vez libre, manifiesta actividad de proteína quinasa. La disociación producida por el AMPc es contrarrestada por el complejo Mg-ATP.

Resulta claro que la variación de los niveles de AMPc es el principal mecanismo de control de esta actividad proteína quinasa, en las células. Sin embargo existen otros dos sistemas adicionales para modificar la actividad de la enzima, como son los inhibidores proteicos y la fosforilación de la subunidad reguladora, aunque este último fenómeno sólo se ha descrito en el caso de la isoenzima de tipo II.

De entre las varias proteínas capaces de inhibir a la quinasa dependiente de AMPc, la más importante parece ser el inhibidor termoestable de músculo, descrito por Walsh y col.(265) capaz de inhibir específicamente a la subunidad catalítica. El papel fisiológico del inhibidor no está totalmente definido aunque se piensa que "in vivo", una parte importante de la subunidad catalítica que se encuentra disociada del complejo, puede estar bloqueada por el citado inhibidor.

Además, la subunidad reguladora de la isoenzima II puede sufrir autofosforilación, con una consiguiente disminución de su afinidad por la subunidad catalítica y activación de la enzima. La subunidad reguladora puede

ser fosforilada "in vitro" por otras proteína quinasas tales como, la caseína quinasa-2 y la glucógeno sintasa quinasa-3 (266,267) sin que por el momento se sospeche cual puede ser su posible función fisiológica.

La proteína quinasa dependiente de AMPc exhibe "in vitro" una amplia especificidad de sustrato. Algunos de éstos, los de mayor interés fisiológico son: la fosforilasa quinasa, la glucógeno sintasa, la piruvato quinasa hepática, la ATP-citrato liasa, el inhibidor-1 de las fosfatasa, etc. Esta proteína quinasa fosforila específicamente aquellos centros que tienen dos aminoácidos básicos adyacentes al residuo fosforilable y que están próximos al extremo amino terminal (15).

1.10.2. PROTEINA QUINASAS DEPENDIENTES DE CALCIO

1.10.2.1. Fosforilasa quinasa

La fosforilasa quinasa es responsable de la activación de la glucógeno fosforilasa, aunque también es capaz de fosforilar a la glucógeno sintasa (2), la caseína (268) y las troponinas I y T (269).

La enzima muscular es un hexadecámero constituido por cuatro tipos distintos de subunidades, α , β , γ , y δ , de pesos moleculares 118-145 Kd, 107-136 Kd, 40-45 Kd y 17 Kd respectivamente, siendo su estequiometría $(\alpha, \beta, \gamma, \delta)_4$ (219). La subunidad δ es idéntica a la calmodulina. Estudios realizados recientemente indican que la fosforilasa quinasa de hígado posee una estructura similar (270).

La fosforilasa quinasa muscular es prácticamente inactiva en ausencia del catión calcio, el cual puede unirse a la enzima por medio de la subunidad δ . La adición de calmodulina exógena contribuye a aumentar la ac-

tividad de la enzima, siendo este efecto adicional bloqueable por derivados fenotiacínicos tales como la trifluoperacina. Estos compuestos no son capaces de inhibir la actividad basal estimulable por calcio. La fosforilasa quinasa es también activable por heparina.

La fosforilasa quinasa se encuentra en dos formas, una activa (forma a) y otra inactiva (forma b), distinguibles "in vitro" por su actividad a pH 6,8. En estas condiciones la forma b es debilmente activa aun en presencia de calcio. La transformación de la forma inactiva en su forma activa puede lograrse "in vitro" a través de la fosforilación de la subunidades α y β por la proteína quinasa dependiente de AMPc y la caseína quinasa-1 (271), por autofosforilación de las subunidades α y β (268, 272) y por proteólisis parcial con tripsina de las mismas subunidades, sin afección aparente de las subunidades γ y δ (2,273,274).

Una notable diferencia entre la enzima hepática y la muscular la constituye el hecho de que el primero tan sólo es parcialmente inhibido por agentes quelantes de calcio, como el EGTA (270).

Los datos anteriores ponen de manifiesto que la fosforilasa quinasa es una de las enzimas claves en el control de la glucogenolisis por efectores hormonales ya que no sólo es activable por calcio, sino que también puede ser fosforilada y activada por la proteína quinasa dependiente de AMPc.

1.10.2.2. Proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina

Esta glucógeno sintasa quinasa fue identificada de manera simultánea en hígado por Ahmad y col.(275) y en

músculo esquelético de conejo por Woodget y col.(276). La forma nativa de la enzima presenta un peso molecular aparente de 275 o 500 Kd, según el criterio empleado para su determinación, y está formada por al menos dos tipos de subunidades (51 y 53 Kd) posiblemente diferentes.

La enzima es susceptible de experimentar autofosforilación y su actividad es totalmente dependiente de calcio y calmodulina, a la vez que es inhibible por trifluoperacina. A pesar de que estas características la asemejan considerablemente a la fosforilasa quinasa, actualmente se acepta que ambas enzimas son diferentes.

Entre sus sustratos conocidos se encuentran la glucógeno sintasa, a la que incorpora 1 mol de fosfato por mol de subunidad, la fenilalanina hidroxilasa hepática y la tirosina hidroxilasa. Por el contrario, es incapaz de fosforilar a la glucógeno fosforilasa y a la cadena ligera de la miosina. A esta proteína quinasa se le asigna un papel importante en la inactivación de la glucógeno sintasa hepática como respuesta a la liberación del catión calcio.

1.10.2.3. Proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos (proteína quinasa C)

Takai y col.(277) fueron los primeros autores que detectaron en cerebro de rata la presencia de una actividad proteína quinasa dependiente del calcio y de los fosfolípidos. Posteriormente esta actividad fue localizada en los más variados tejidos y órganos de diferentes especies (278,279), siendo su actividad en algunos casos, cuantitativamente mayor que la de la propia quinasa dependiente de AMPc, cuando se determinan sus actividades sobre histona H1.

Esta enzima ha sido purificada a partir de ce-

rebros de rata (280), de corazón de buey (281,282), así como de otras fuentes. Su peso molecular oscila entre 70-80 Kd y consta de una única cadena polipeptídica. Su degradación proteolítica, catalizada por proteasas dependientes de calcio, produce un fragmento de 51 Kd, que es completamente activo aún en ausencia de calcio y fosfolípidos (283,284). La proteína quinasa C se encuentra en parte asociada a las membranas y en parte en la fracción soluble.

La afinidad de la enzima por el calcio y los fosfolípidos se ve fuertemente aumentada en presencia de ciertos 1,2-diacilgliceroles (278,285), los cuales son producidos por la hidrólisis de los fosfatidilinositoles de membrana, que es inducida por diversos agonistas. Por ello se ha postulado que los diacilgliceroles pueden actuar como mensajeros intracelulares, en respuesta a agentes que afectan al recambio de fosfolípidos de la membrana plasmática (286).

Ciertos derivados diterpénicos capaces de actuar como promotores de tumores, tales como los ésteres de forbol, pueden activar a la proteína quinasa C, de una manera análoga a como lo hacen los 1,2-diacilgliceroles (164). Incluso se dispone de evidencias de que la propia proteína quinasa C puede ejercer funciones de receptor o al menos formar parte del receptor de membrana de los ésteres de forbol (165). Por todo ello se ha especulado con la hipótesis de que los efectos cancerígenos de estos compuestos puedan ser mediados por la quinasa.

Se han descrito muy diversos sustratos capaces de ser fosforilados por la proteína quinasa C, si bien el carácter fisiológico de este proceso en muchos casos no está establecido. Entre ellos se encuentran la histona H1, la protamina (282), la troponina I y II (287), la tirosina hidroxilasa (288), la fosfofructoquinasa (289),

la guanilato ciclasa (290), el transportador de glucosa en eritrocitos (291), la glucógeno sintasa (292) y la HMG-CoA reductasa (162). La trifluoperacina es capaz de inhibir a la quinasa a pesar de que la calmodulina no ejerce efecto alguno sobre la enzima.

1.10.3. PROTEINA QUINASAS INDEPENDIENTES DE AMP CICLICO Y DE CALCIO

1.10.3.1. Caseína quinasas-1 y -2

La caseína ha sido utilizada como sustrato no fisiológico, para detectar la actividad de las proteína quinasas de numerosos tejidos. Existen dos principales actividades caseína quinasa que están bien definidas y se corresponden con proteínas distintas. Estas son las denominadas caseína quinasas-1 y -2 (CK-1 y CK-2), que se encuentran distribuidas en varios tejidos de los organismos superiores.

La caseína quinasa-1, identificada en músculo por Itarte y Huang (293), es un monómero de 30-40 Kd, que no puede utilizar GTP como sustrato y que sufre autofosforilación (294).

La caseína quinasa-1 fosforila exclusivamente residuos de serina al actuar sobre caseína y fosvitina y para ello es preciso que exista un residuo de ácido glutámico situado a dos residuos de distancia, entre el centro de fosforilación y el extremo amino terminal de la proteína. La enzima puede fosforilar "in vitro" diversos sustratos. Entre ellos se encuentran, la glucógeno sintasa, la fosforilasa quinasa, los factores de iniciación de eucariotas eIF-4B y eIF-5, la RNA polimerasa y la espectrina. La caseína quinasa-1 no es afectada por la heparina, aunque la enzima de hígado de conejo parece ser una excepción.

La caseína quinasa-2 tiene un peso molecular de 130-180 Kd y posee una estructura $\alpha_2\beta_2$. La subunidad α tiene un peso molecular de 43 Kd y la β de 25 Kd (295). La enzima es totalmente inhibida por bajas concentraciones de heparina. También se ha descrito la inhibición por el 2,3-difosfoglicerato. Por el contrario, es activada por las poliaminas, especialmente por la espermina y la espermidina y puede emplear como donador de fosfatos, tanto al ATP como al GTP, si bien este último nucleótido es menos eficaz como sustrato. Este hecho la diferencia de la CK-1 que sólo transfiere fosfato procedente del ATP.

La caseína quinasa-2 fosforila tanto residuos de serina como de treonina, cuando se emplea como sustrato la caseína. En este caso la enzima reconoce regiones altamente acídicas de la proteína, que contienen residuos de ácido glutámico y de ácido aspártico, próximas al extremo carboxilo terminal.

"In vitro" presenta capacidad para fosforilar diferentes sustratos entre los que se cuentan, la glucógeno sintasa, la subunidad R_{II} de la proteína quinasa dependiente de AMPc, algunos factores de iniciación de los eucariotas (eIF-2, eIF-3, eIF-4B, eIF-5), la RNA polimerasa, algunas proteínas de la subunidad ribosomal 60S, la espectrina y proteínas nucleares no histonas.

La caseína quinasa-2 también ha sido denominada por otros autores, $PC_{0,7}$, troponina T quinasa, caseína quinasa G, fosvitina quinasa o glucógeno sintasa quinasa-5.

1.10.3.2. Glucógeno sintasa quinasa-3

Esta proteína quinasa ha sido identificada y parcialmente purificada a partir de músculo esquelético y de hígado (296,297). Se trata de un monómero de 57 Kd

cuya concentración en músculo es relativamente baja a pesar de manifestar una gran actividad. La enzima presenta autofosforilación y puede emplear como nucleótidos donadores de fosfato tanto al ATP como al GTP, aunque este último es menos efectivo como sustrato. Por el momento no se conocen ni activadores ni inhibidores de su actividad enzimática. Una característica distintiva de la GSK-3 es su capacidad para actuar como activador de la proteína fosfatasa dependiente de ATP-Mg (proteína fosfatasa-1), mediante la fosforilación del inhibidor-2 de esta fosfatasa (228). De entre los sustratos de esta quinasa el mejor de ellos es la glucógeno sintasa, aun cuando también es activa sobre la subunidad R_{II} de la quinasa dependiente de AMPc y la caseína.

1.10.3.3. Glucógeno sintasa quinasa-4

Esta actividad proteína quinasa fue aislada y purificada a partir de extractos de músculo por Cohen y col.(298). Su peso molecular se ha establecido en 100 Kd. Su mejor sustrato es la glucógeno sintasa, para cuya fosforilación sólo puede emplear ATP como donador de fosfato. No se conocen por el momento moduladores de su actividad. Otros autores la han denominado $PC_{0,4}$.

1.10.3.4. Proteína quinasa activable por heparina

Muy recientemente, Ahmad y col.(299) han identificado en músculo esquelético de conejo una actividad proteína quinasa activable por heparina, cuyo peso molecular ha sido establecido en 70 Kd. La enzima puede inactivar y fosforilar a la glucógeno sintasa, pero es incapaz de fosforilar a la caseína, fosvitina, histona o glucógeno fosforilasa. La actividad de la quinasa es independiente de calcio, fosfolípidos y AMPc y no resulta afectada por

el inhibidor de la proteína quinasa dependiente de AMPc. Por el contrario, el glucógeno inhibe la actividad de esta proteína quinasa.

1.10.3.5. Proteína quinasa multifuncional

Ramakrishna y Benjamin (300) han informado recientemente de la identificación y purificación de una proteína quinasa hepática capaz de fosforilar diversas enzimas del metabolismo intermediario. Ha sido descrita como un monómero de 36 Kd cuya actividad no se ve afectada por AMPc, calcio, calmodulina, fosfolípidos, heparina, ni por el inhibidor de la proteína quinasa dependiente de AMPc. Asimismo, tampoco es activable por proteólisis. La enzima presenta autofosforilación y puede emplear como sustratos donadores de grupos fosfato, ATP y GTP, aunque éste último con mucha menor eficiencia. El mejor sustrato de esta proteína quinasa es la glucógeno sintasa, pero también es capaz de fosforilar a la ATP-citrato liasa, la acetil-CoA carboxilasa, la proteína ribosómica S6, el factor de iniciación de eucariotas eIF-2 y el inhibidor-2 de las fosfatasas. Este último proceso se acompaña de la activación de la proteína fosfatasa dependiente de ATP-Mg. Por otro lado la enzima no manifiesta actividad sobre glucógeno fosforilasa, fosforilasa quinasa, piruvato quinasa, histona H2B, caseína y fosvitina. Los autores, atendiendo a criterios de especificidad de sustrato, parámetros cinéticos y propiedades fisico-químicas, afirman que es una proteína quinasa distinta a la glucógeno sintasa quinasa-3.

1.11. COMPUESTOS ANALOGOS A LOS NUCLEOTIDOS DERIVADOS DE LA ADENINA

Desde su introducción a principios de los años sesenta, la técnica de marcaje de afinidad se ha convertido en uno de los métodos químicos más versátiles para la caracterización de los centros activos de las moléculas enzimáticas. En un sentido amplio, pueden englobarse bajo este nombre todas aquellas reacciones en las que un compuesto reactivo o potencialmente reactivo, se liga de forma selectiva a una determinada zona de una proteína, estableciendo posteriormente un enlace covalente.

Habitualmente las sustancias que se emplean para actuar como marcadores de afinidad se diseñan procurando combinar en la estructura de la molécula, una porción que mimetice al sustrato o en general, al efector con el que va a competir, y un grupo químico reactivo que atacará determinados residuos de aminoácidos de la proteína, formando un enlace covalente. La deseada complementariedad existente entre la porción de la molécula que simula al efector y el sitio de unión a la enzima, favorece la unión del ligando al sitio habitualmente ocupado por el efector fisiológico o a zonas muy próximas.

El residuo o residuos de aminoácidos atacados pueden estar involucrados directamente en el proceso que

se está estudiando. Otra posibilidad es que los residuos atacados estén suficientemente próximos al centro activo, de manera que cuando se establezca el enlace covalente entre el análogo y la proteína, éste ocupe la posición del efector al que mimetiza o bien esté suficientemente cerca como para impedir que el mencionado efector acceda a su centro de unión. La consecuencia es la misma, pues en ambos casos la enzima pierde la propiedad estudiada.

Resulta obvio que el éxito de la técnica depende de la existencia de aminoácidos capaces de reaccionar con el análogo, situados a una distancia del centro activo adecuada para que dicho análogo lo ocupe o impida el acceso al efector natural.

Muchos de los coenzimas y de los compuestos con propiedades reguladoras que participan en las reacciones bioquímicas, son nucleótidos derivados de la adenina. Así, el ATP y el ADP participan en la mayoría de las reacciones catalizadas por las proteína quinasas, en las que se transfiere un radical fosforilo a diversos sustratos. También el ADP y el AMP pueden actuar en diferentes reacciones como efectores alostéricos con funciones reguladoras. Por último, la molécula de adenosina forma parte de la estructura del difosfopiridín nucleótido y del trifosfopiridín nucleótido, que participan como coenzimas en la mayoría de reacciones catalizadas por deshidrogenasas. Estos compuestos también actúan inhibiendo o activando a numerosas enzimas con funciones reguladoras. A pesar de ello, en muchas ocasiones se dispone de pocos datos acerca de las características de la asociación de tales nucleótidos con las respectivas enzimas.

Una forma de aproximarse al conocimiento de estos procesos consiste en estudiar el comportamiento de las enzimas frente al tratamiento con reactivos que simulan la estructura de los nucleótidos de adenina y que pueden

formar complejos reversibles con la proteína; la existencia adicional de un grupo químico altamente reactivo en la molécula del análogo, le permite establecer enlaces covalentes con diferentes tipos de aminoácidos, durante la formación del complejo reversible. Como consecuencia la unión se transforma en permanente.

Son varios los trabajos en los que se han empleado compuestos derivados de purinas para modificar enzimas que disponen de zonas de unión para nucleótidos derivados de la adenina (301-306). Sin embargo, algunos de los análogos empleados, como el 6-(purina-5'-ribonucleótido)-5-(2-nitrobenzoico)-tioeter, utilizado como análogo del AMP para el estudio de su centro de unión a la fosforilasa b (303), contienen grupos funcionales muy voluminosos unidos directamente al anillo de la base púrica. Este factor de tipo estérico puede impedir o alterar la posición de unión del análogo en cuestión. Otros compuestos carecen de la estructura de la ribosa-fosfato, que desempeña una función importante en la unión de los nucleótidos a sus respectivos centros. Son varias las enzimas que responden a la unión de los diferentes nucleótidos, pero que no lo hacen a las respectivas bases púricas. Entre los análogos de este tipo tenemos al 9-(p-bromoacetamidobenzoil)adenina (301).

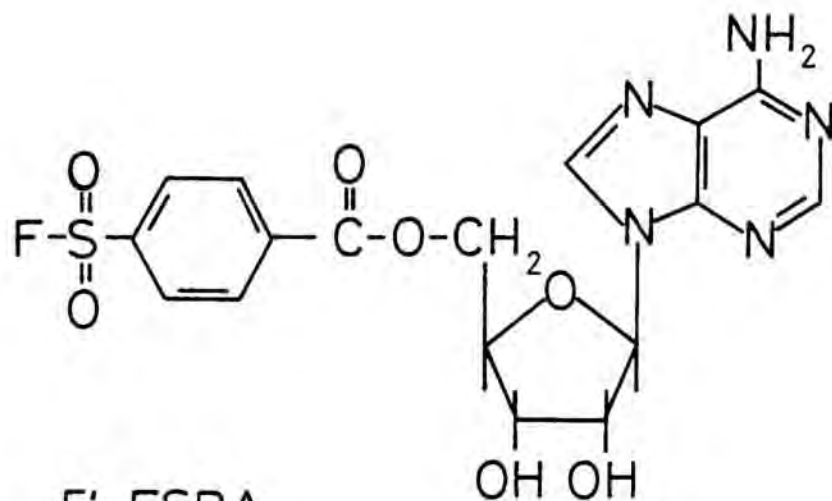
Se ha prestado bastante atención al empleo de reactivos fotosensibles tales como el diazomalonil-AMPc (302), el 8-azidoadenosina-3',5'-monofosfato (304) o el 8-azido-ATP (305). Sin embargo, a pesar de que estos compuestos tienen una amplia capacidad de reacción, su empleo presenta algunas dificultades puesto que al someterlos a irradiación, tienen tendencia a reaccionar con el disolvente y con cualquier aminoácido que se halle próximo al compuesto. En consecuencia, resulta difícil establecer claramente qué residuos de aminoácidos intervienen directamente en la fijación del nucleótido.

Uno de los análogos que no parece presentar los inconvenientes antes citados es el 5'-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina. Este compuesto puede ser considerado como un análogo del ATP, ADP y el AMP, así como de los difosfopiridín nucleótidos. En su estructura (esquema VII) contiene, además de la molécula de la adenosina, un grupo carbonilo ligado a la posición 5' del anillo de la ribosa, que estructuralmente es muy similar al primer radical fosforilo de los nucleótidos de adenina. La observación de la estructura desplegada, permite apreciar como el radical p-fluorosulfonilo puede ocupar una posición análoga a la del radical fosforilo terminal del ATP o de la ribosa próxima al anillo de nicotinamida de los difosfopiridín nucleótidos. Este radical, por sus características electrofílicas, posee una elevada reactividad que le permite establecer enlaces covalentes con varios tipos de aminoácidos, entre los que se incluyen serina, tirosina, lisina e histidina (339), incorporando 5'-sulfonilbenzoiladenosina (5'-SO₂BzAdo) a la proteína. Como consecuencia inmediata se produce una inactivación irreversible de la enzima y si es el caso, una pérdida de la capacidad de regulación de su actividad.

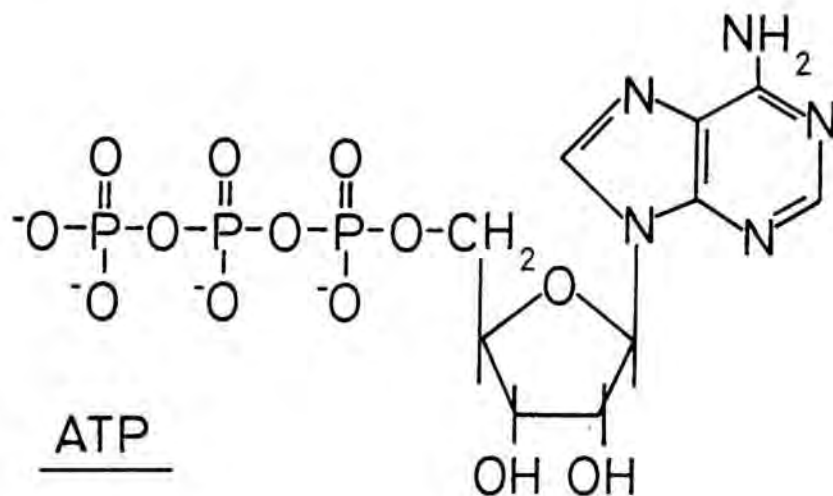
Así por ejemplo, el 5'-FSO₂BzAdo reacciona con residuos de tirosina y cisteína de dos centros distintos de la piruvato quinasa de músculo de conejo (307), con un residuo específico de tirosina del centro de unión al nucleótido de la ATPasa mitocondrial de corazón de buey (308), con un residuo de lisina del centro de unión al coenzima de la malato deshidrogenasa mitocondrial de corazón de cerdo (309) y del centro de unión al ATP de la glutamina sintetasa de E.coli (310).

Su empleo ha permitido establecer la existencia de dos centros reguladores distintos, uno para el ADP y otro para difosfopiridín nucleótidos, en la molécula de la glutamato deshidrogenasa de hígado de buey (311).

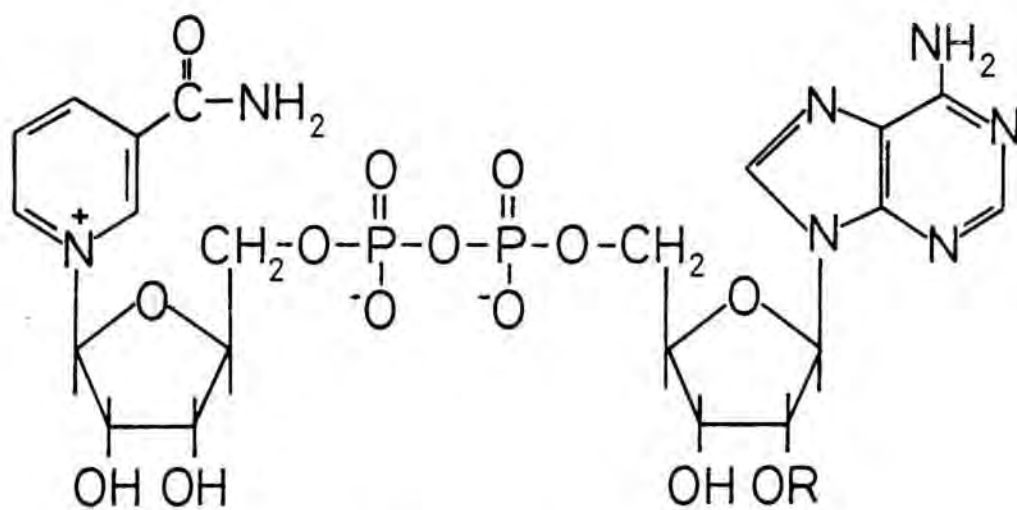
ESQUEMA VII RELACION ESTRUCTURAL ENTRE EL COMPUESTO
5'-p-FLUOROSULFONILBENZOILADENOSINA Y
LOS NUCLEOTIDOS DERIVADOS DE LA ADENINA



5'-FSBA



ATP



NAD⁺ R=H
NADP⁺ R=PO₃²⁻

También permitió establecer la existencia de dos zonas del centro catalítico de la piruvato quinasa de músculo de conejo (312), capaces de ligar al catión magnesio y al sustrato fosfoenolpiruvato, durante el proceso de catálisis. Estudios similares confirmaron evidencias previas acerca de que el centro regulador alostérico para el AMP y el ADP de la fosfofructoquinasa, es distinto al centro catalítico.

Aunque la mayoría de los experimentos realizados con 5'-FSO₂BzAdo lo han sido empleando enzimas purificadas (314), hay algunos trabajos en los que el análogo mencionado ha sido empleado como reactivo de afinidad en sistemas proteicos heterogéneos (315-317). Así, por citar tan sólo un ejemplo, ha sido posible identificar la proteína quinasa asociada al receptor del factor de crecimiento epidérmico en células A-431 de carcinoma epidérmico humano, empleando para tal menester 5'-FSO₂Bz [¹⁴C]Ado (315).

Como se puede apreciar, el compuesto análogo de los nucleótidos de adenina empleado en la presente Memoria, ha demostrado poseer una amplia versatilidad de aplicación al estudio de diversos aspectos, tanto funcionales como estructurales, relacionados con los centros de las proteínas que cumplen funciones catalíticas y reguladoras.

Recientemente, empleando como reactivo de afinidad el compuesto 6-(4-bromo-2,3-dioxobutil)tioadenosina-5'-difosfato, Huang y Colman han confirmado el carácter alostérico de la activación producida por el ADP sobre la actividad de la isocitrato deshidrogenasa de corazón de cerdo (318). Todo ello no hace más que confirmar la general importancia de la mencionada técnica analítica y de su aplicación al conocimiento de los mecanismos de regulación de la actividad enzimática por efectores alostéricos.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. REACTIVOS Y PRODUCTOS UTILIZADOS

Los reactivos y productos que se han utilizado en este trabajo, así como las firmas comerciales que los suministraron, son los que se citan a continuación.

2.1.1. REACTIVOS GENERALES

"Bio-Rad Labs."

Acrilamida; azul de bromofenol; azul de Coomassie R-250; N,N'-dimetilbisacrilamida; persulfato amónico; SDS; TEMED.

"Boehringer"

dAMP, sal disódica; adenosina; ADP, sal disódica; CDP, ácido; CTP, sal disódica; GDP, sal dilítica; IMP, sal disódica; IDP, sal trisódica; ITP, sal disódica; UDP, sal dipotásica; UTP, sal trisódica.

"Farmitalia Carlo Erba"

Acido ortofosfórico; acetato de etilo; N,N'-dimetilformamida; n-propanol; tritón X-100; tolueno.

"Koch Light"

Acetona; benceno; naftaleno.

"Merck"

Acido acético; ácido clorhídrico; ácido fórmico;

bicarbonato amónico; bicarbonato sódico; n-butanol; carbonato sódico; cloruro cálcico; cloruro de litio; cloruro magnésico; cloruro potásico; cloruro sódico; deoxicolato sódico; dicitclohexilcarbodiimida; dietilbarbiturato sódico; dimetilsulfóxido; etanol; éter etílico; éter de petróleo; fluoruro potásico; fluoruro sódico; fosfato monopotásico; glicina; hidróxido potásico; hidróxido sódico; 2-mercaptoetanol; ninhidrina; piruvato sódico; sacarosa; silica-gel HF₂₅₄₊₃₆₆; sulfato amónico; sulfato cúprico; tartrato sódico potásico; trietilenamina; urea.

"Panreac"

Acido acético, ácido clorhídrico; ácido tricloroacético; hidróxido amónico; isopropanol; lana de vidrio lavada; norita.

"Sigma Chemical Co."

Acido hidroximetilglutárico; ácido málico; AMP, sal sódica; 2'-AMP, ácido; 3'-AMP, ácido; AMPc, ácido; Ap₅A, sal sódica; ATP, sal disódica, benzamidina; bis-tris; cloruro de p-fluorosulfonilbenzoilo; CMP, sal disódica; coenzima A, sal de litio; dioleína; DTT; EDTA, sal disódica; EGTA, sal disódica; etilenglicolmonometil éter; fosfatidilserina; fosfoserina; fosfotirosina; fosfotreonina; glicerol; glicerol-1-fosfato, sal monosódica; glucosa-6-fosfato, sal monosódica; GMP, sal disódica; GTP, sal monosódica; heparina; hepes; hexametilfosforamida; mevalonolactona; NAD⁺; NADP⁺; PMSF; PPO; reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteus; ribosa-5-fosfato; tris base; UMP, sal disódica; UTP, sal disódica.

2.1.2. PROTEINAS

"Boehringer"

Calmodulina; catalasa; citrato sintasa; 3-fosfoglicerato quinasa; gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa;

glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; malato deshidrogenasa; triosafosfato isomerasa.

"Sigma Chemical Co."

Albúmina bovina, fracción V; albúmina de huevo; alcohol deshidrogenasa de levadura; aldolasa de músculo de conejo; lactato deshidrogenasa.

"Worthington Biochemical Corp."

Tripsina tratada con TPCK.

2.1.3. REACTIVOS PARA CROMATOGRAFIA

"Bio-Rad Labs."

Affi-Gel Blue; Dowex AG 1X8.

"Eastman KodaK"

Placas de celulosa (13255).

"Gelman Instrument Co."

Papel cromatográfico ITLC, tipo SG.

"LKB"

Ultrogel AcA 34.

"P.L. Biochemicals Inc."

ATP-hexano-agarosa, tipo 3; HMG-CoA-hexano-agarosa.

"Whatman"

DEAE-celulosa (DE-52); papel cromatográfico tipo 3 MM; papel cromatográfico tipo 31 ET.

2.1.4. PRODUCTOS RADIOACTIVOS

"New England Nuclear"

5'-p-[adenina-8- ^{14}C] fluorosulfonilbenzoiladenosina; [2- ^{14}C] mevalonato de dibenzoiletildiamina.

"Radiochemical Center, Amersham"

Acido 3-hidroxi-3-metil [3- ^{14}C] glutárico; ácido 3-hidroxi-3-metil [^3H] glutárico; [^{32}P] ortofosfato.

2.1.5. PRODUCTOS PARA AUTORADIOGRAFIA

"Agfa Gevaert"

Revelador G 150; Fijador G 334.

"Mafe"

Placas para radiografía RP-X1.

2.1.6. PREPARACION DEL R,S [^{14}C] HMG-CoA2.1.6.1. Síntesis del R,S [^{14}C] HMG-CoA

El compuesto R,S 3-hidroxi-3-metil [3- ^{14}C] glutaril coenzima A, sustrato de la enzima HMG-CoA reductasa, se sintetizó en nuestro laboratorio a partir del ácido 3-hidroxi-3-metil [3- ^{14}C] glutárico y del coenzima A, siguiendo una modificación del método descrito por Goldfarb y Pitot (319).

Habitualmente, se partió de 500 μCi de ácido 3-hidroxi-3-metil [3- ^{14}C] glutárico (1,56 mg) y 31,04 mg del mismo ácido sin marcaje radioactivo. Ambos se disolvieron en 2 mL de acetona anhidra. A continuación se añadían 2 mL de una disolución acetónica que contenía 82,8 mg de DCCI. La mezcla se incubaba en un tubo bien cerrado, en un baño termostatzado a 37 $^{\circ}$, durante dos horas, con agitación in-

termitente. En estas condiciones la DCCI provoca la pérdida de una molécula de agua por cada dos moléculas de ácido hidroximetilglutárico, transformándolo en su anhídrido y rindiendo como producto secundario dicitclohexilurea.

Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se enfriaba en un baño de hielo y se filtraba sobre papel, con el fin de eliminar el precipitado de dicitclohexilurea. El papel de filtro era lavado varias veces con acetona anhidra, reuniéndose los líquidos de filtrado, que eran seguidamente evaporados a sequedad por incubación a 37° en corriente de nitrógeno.

Al residuo seco obtenido, se le añadían 4 mL de una disolución de bicarbonato sódico 0,2 N a pH 8,0, que contenía 200 mg de coenzima A, manteniendo el tubo de reacción en un baño de hielo durante 30 minutos, transcurridos los cuales, la incubación se prolongaba por espacio de una hora más, pero a temperatura ambiente y con agitación intermitente. A continuación, el pH de la disolución se acidificaba hasta 3,5 añadiendo HCl 1 N.

La separación del producto de la reacción, el $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA, del resto de componentes de la mezcla, se llevó a cabo por medio de una cromatografía descendente sobre papel Whatman 3 MM, empleando como fase móvil una mezcla de n-butanol:ácido acético:agua, en proporciones 5:2:3 (v:v:v), operándose en una cubeta de vidrio previamente saturada con el mismo disolvente. La duración de la cromatografía, que se desarrolla a temperatura ambiente, suele ser de unas 12 horas.

Una vez completamente seco el papel, se cortaban dos tiras de unos 2 mm de anchura, correspondientes a ambos lados del papel, las cuales eran divididas en fragmentos de 1 cm de longitud. Estos eran colocados en viales que conte-

nían 5 mL de una disolución de PPO al 0,5 % (p/v) en tolueno, midiéndose su radioactividad. El $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA se localiza en una posición correspondiente a un R_f comprendido entre 0,23 y 0,40, mientras que el $[3-^{14}\text{C}]$ HMG ácido que permanece sin reaccionar, se localiza a un R_f comprendido entre 0,84 y 0,93.

Una vez era localizada la zona del papel que contenía el $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA, se cortaba en tiras de 3,5 cm de anchura que se sometían a una cromatografía ascendente en agua destilada, con objeto de concentrar la totalidad del producto en el extremo superior del papel. Estos extremos eran recortados y el producto era eluído mediante lavados sucesivos con agua destilada y posterior centrifugación, con lo cual se conseguía recuperar la casi totalidad del $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA contenido en los fragmentos mencionados.

El R,S 3-hidroxi-3-metil $[^3\text{H}]$ glutaril coenzima A se sintetizaba y aislaba siguiendo la misma metodología descrita para el $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA, con la única diferencia de que en este caso se partía de 500 μCi de ácido 3-hidroxi-3-metil $[^3\text{H}]$ glutárico.

El R,S 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (no marcado radioactivamente) se sintetizaba de manera análoga, pero partiendo de ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico no radioactivo. En este caso se incrementaba en 5 veces la cantidad de ácido HMG, con objeto de mejorar el rendimiento del proceso, con respecto al coenzima A.

Tanto el HMG-CoA no radioactivo, como el marcado con ^{14}C o ^3H , debían ser valorados con objeto de conocer su concentración exacta.

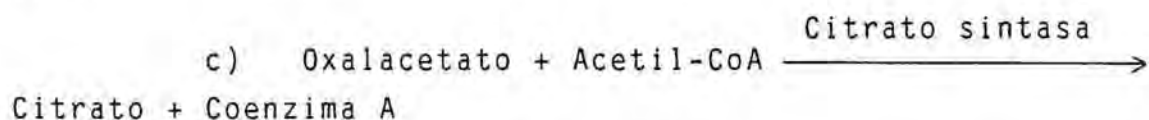
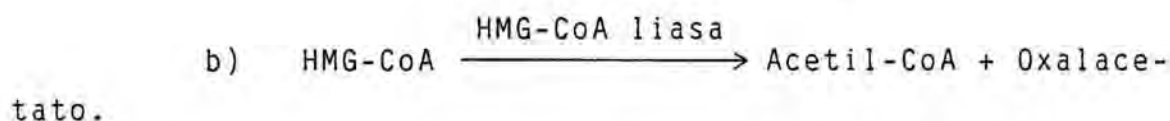
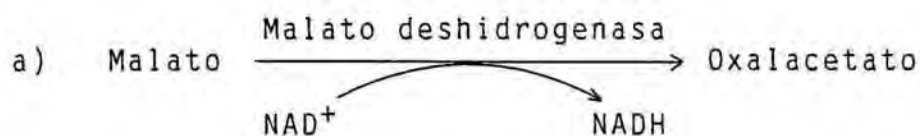
2.1.6.2. Valoración espectrofotométrica del HMG-CoA

La valoración del producto sintetizado según el

método descrito en el apartado anterior, se efectuó siguiendo una modificación del método de Knappe (320).

En dos cubetas espectrofotométricas de 1 cm de paso de luz se disponían las siguientes disoluciones: 0,2 mL de Tris/HCl 1 M pH 8,0; 0,5 mL de $MgCl_2$ 0,2 M; 0,1 mL de malato 0,1 M; 0,05 mL de NAD^+ 0,03 M; 0,02 mL de DTT 0,17 M y 0,48 mL de agua destilada. Ambas cubetas se introducían en un espectrofotómetro de doble haz, Beckman DB-GT, midiéndose la absorbancia a 334 nm.

Una vez ajustado el aparato a cero, a la cubeta problema se le añadían 0,01 mL de malato deshidrogenasa, produciéndose un aumento brusco de la absorbancia. A continuación se añadían 0,05 mL de una preparación cruda de HMG-CoA liasa, obtenida como se describe en el apartado siguiente, y 0,05 mL de citrato sintasa, con lo que se producía un segundo aumento instantáneo de la absorbancia, debido fundamentalmente a la coloración de la preparación de HMG-CoA liasa empleada. Tras unos minutos de estabilización, se adicionaban 0,03 mL de la disolución de HMG-CoA a valorar. Desde este momento se producía un lento incremento de la absorbancia, debido a la progresiva formación de NADH, según se indica en el esquema, que no se detiene hasta que se ha consumido todo el HMG-CoA presente en la cubeta.



Los datos obtenidos fueron tratados de acuerdo con

la siguiente expresión:

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

E_1 = aumento de absorbancia producido al añadir la malato deshidrogenasa.

E_2 = aumento de absorbancia producido al añadir el HMG-CoA a valorar.

v = volumen de la muestra a valorar, expresado en microlitros.

El factor 3,3 incluye el coeficiente de extinción molar del NADH, así como las transformaciones necesarias para que el resultado aparezca expresado en mg/mL de HMG-CoA.

El factor 911 corresponde al peso molecular del HMG-CoA.

En el caso del $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA, se sembraba una alícuota de 10 μL en un papel de filtro Whatman 31 ET que, una vez seco, se introducía en un vial de centelleo que contenía 5 mL de una disolución de PPO al 0,5 % (p/v) en tolueno, para cuantificar la radioactividad del producto sintetizado. Si se trataba de $[^3\text{H}]$ HMG-CoA, se pipeteaban directamente 10 μL de la preparación obtenida en un vial de centelleo que contenía, en este caso, 10 mL de una disolución de PPO al 0,5 % (p/v) en tolueno:tritón, 2:1 (v:v). La radioactividad se medía en un contador de centelleo líquido (Isocap 300, Searle Inc.).

Para su empleo como sustratos en el ensayo enzimático, el $[3-^{14}\text{C}]$ HMG-CoA y el $[^3\text{H}]$ HMG-CoA se ajustaban a una concentración de alrededor de 2,5 mg/mL, con una radioactividad específica comprendida, en ambos casos, entre 3.500 y 4.000 cpm/nmol.

2.1.6.3. Preparación de la HMG-CoA liasa

Se sacrificaba por decapitación una rata de unos 200 g de peso y le era extraído el hígado, cuyo peso oscilaba alrededor de los 8 g. Este se homogenizaba con 80 mL de acetona anhidra, previamente enfriada a -20° , utilizando un homogenizador de vidrio "Potter Elvehjem", con pistilo de teflón.

El homogenado se sometía rápidamente a filtración por succión de vacío, a través de un embudo con placa filtrante, lavándose repetidas veces con acetona fría, para finalmente lavarlo con 10 mL de éter etílico, libre de peróxidos. La operación de filtrado se proseguía hasta sequedad, obteniéndose un polvo seco que se conservaba a 4° C, en desecador, manteniéndose la actividad HMG-CoA liasa durante dos meses.

En el momento de su utilización, la HMG-CoA liasa se extraía a partir de 1 g de polvo acetónico, con 10 mL de una disolución de fosfato sódico 0,05 M pH 7,5, en un pequeño mortero. La preparación cruda de HMG-CoA liasa se obtenía por centrifugación durante dos minutos a $12.500 \times g$, en una centrifuga de sobremesa, modelo Eppendorf. Todas las operaciones se efectuaron a 4° C.

2.1.7. PREPARACION DEL R,S[2- 14 C] MEVALONATO

Este producto nos era suministrado en forma de [2- 14 C]mevalonato de dibenzoiletildiamina, mucho más estable que el ácido mevalónico libre, siendo por lo tanto necesario eliminar previamente la dibenzoiletildiamina y obtener la sal sódica del ácido [2- 14 C]mevalónico.

Todo el proceso se llevaba a cabo en el mismo vial en que se nos suministraba 1 μ mol de [2- 14 C]mevalonato de DBED, en un volumen de 0,5 mL de etanol, con una radioactividad específica de 50 mCi/mmol. Una vez liofiliza-

do el contenido del vial, se añadían 0,5 mL de bicarbonato sódico 40 mM (20 μ moles) y se dejaba incubar durante una hora a temperatura ambiente. Con ello se liberaba la DBED a la vez que se formaba la sal sódica del ácido [2- 14 C] mevalónico. La amina libre se retiraba por extracción con 1 mL de éter etílico y el resto de éter que permanecía disuelto en la fase acuosa se evaporaba en corriente de nitrógeno.

La sal sódica del ácido [2- 14 C] mevalónico, libre de DBED, se liofilizaba y el residuo era redissuelto con 5 mL de una solución compuesta por Hepes 104 mM pH 7,4 y mevalonato no marcado radioactivamente, 40 mM. En estas condiciones de trabajo se obtiene un sustrato con una radioactividad específica de 400 cpm/nmol.

2.1.8. SINTESIS DEL [γ - 32 P] ATP

El [γ - 32 P] ATP se sintetizaba en nuestro laboratorio según el método descrito por Walseth y col. (321) modificado por Palmer y col. (322), partiendo de [32 P] PO_4H_3 y ADP.

La reacción se llevaba a cabo en el mismo vial en que se nos suministraban los 10 mCi de [32 P] PO_4H_3 , en un volumen de 1 mL de agua, al que se añadían 0,35 mL de una mezcla de sustratos que contenía: Tris/HCl 322 mM pH 9,0; NAD^+ 3,4 mM; ADP 0,2 mM; glicerol-1-fosfato 0,6 mM; DTT 28 mM; MgCl_2 50 mM y piruvato sódico 4,2 mM. Paralelamente se preparaba una mezcla de enzimas que contenía: 35 μ L (12 U) de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, 1 μ L (10 U) de triosafosfato isomerasa, 20 μ L (16 U) de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, 2 μ L (9 U) de 3-fosfoglicerato quinasa, 20 μ L (45 U) de lactato deshidrogenasa y 32 μ L de sulfato amónico 3,2 M. De esta mezcla enzimática se tomaban 30 μ L que se añadían a un tubo que contenía: 21 μ L de Tris/HCl 0,5 M pH 9,0, 12 μ L de DTT 0,1 M y

147 μL de agua destilada.

La reacción de síntesis se iniciaba añadiendo 150 μL de la última mezcla descrita al vial que contenía el $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$, junto con los 350 μL de la mezcla de sustratos ya descrita. El vial se incubaba a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 minutos, dándose por finalizada la reacción cuando más del 95 % del $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$ se había incorporado al ADP; es decir, cuando más del 95 % de las cpm de ^{32}P eran adsorbidas por norita activa que, como es sabido, adsorbe fundamentalmente el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, pero no el $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$.

El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ se separaba del $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$ residual, por medio de una cromatografía de intercambio iónico en carbonato de DEAE-celulosa. Esta resina, en su forma de carbonato, se preparaba manteniendo la DEAE-celulosa en constante pero suave agitación, en una disolución saturada de bicarbonato sódico, durante un tiempo mínimo de dos horas.

La mezcla de reacción era aplicada a una columna de carbonato de DEAE-celulosa de 5 mL de lecho. La columna se lavaba con 10 mL de agua destilada, que servían además para recuperar todo el contenido del vial. El $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$ que no había reaccionado, era eluido de la columna por lavado con 15 mL de carbonato de trietilenamina 0,1 M. Seguidamente, se eluía el $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ con 20 mL de carbonato de trietilenamina 1,2 M.

El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ obtenido, libre de sal, se liofilizaba para su posterior empleo y de manera rutinaria se comprobaba su pureza. Para ello se sembraban dos alícuotas, una de la preparación obtenida y otra de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$, a modo de control, sobre una placa de 4 x 20 cm de PEI-celulosa F cromatofolio PL, de un espesor de 0,1 mm. Seguidamente se realizaba una cromatografía ascendente, emplean-

do como fase móvil una disolución acuosa de LiCl 0,7 M y ácido fórmico 2 M, en una cubeta de vidrio previamente saturada con la misma disolución. Finalizada la cromatografía (2-3 horas), la placa se dejaba secar al aire, a temperatura ambiente. La radioactividad era detectada por autorradiografía indirecta.

El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP se localiza en una posición correspondiente a un R_f de 0,21, mientras que el $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$ aparece a un R_f de 0,8. Siguiendo el método anterior, las preparaciones de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP no presentan contaminación de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{H}_3$, obteniéndose un rendimiento de síntesis de un 80 a un 90 %.

2.1.9. SINTESIS DEL 5'-p-FLUOROSULFONILBENZOILADENOSINA

El compuesto 5'-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina, análogo sintético de los nucleótidos de adenina, era sintetizado en nuestro propio laboratorio, siguiendo el método de Pal y col. (311) modificado por Wyatt y Colman (312).

En una síntesis habitual se partía de 0,83 g de adenosina (3,08 mmol), que eran disueltos en 10 mL de hexametilfosforamida, calentando en un baño a 50°C, con suave agitación. La disolución se dejaba enfriar a temperatura ambiente y a continuación se añadía 1 g de cloruro de p-fluorosulfonilbenzoilo (4,54 mmol). De nuevo era necesario agitar suavemente hasta la completa disolución del producto añadido. La disolución se dejaba a temperatura ambiente durante 18 horas, transcurridas las cuales se procedía al aislamiento del producto sintetizado.

A la mezcla de reacción se adicionaban, en una sola vez, 30 mL de éter de petróleo, estableciéndose dos fases, de las cuales se recuperaba la inferior, correspondiente a la hexametilfosforamida, y que contenía el análogo

go sintetizado. El 5'-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina era precipitado por adición lenta de 40 mL de una mezcla constituida por acetato de etilo:éter etílico, 1:1 (v:v). La mezcla se dejaba reposar durante 30 minutos, formándose un precipitado blanco, que se recuperaba por filtración a través de papel Whatman 3 MM, sobre embudo con placa de vidrio poroso, por succión de vacío. El producto sintetizado se dejaba secar al aire sobre el mismo filtro, durante un mínimo de 12 horas. Una vez seco se almacenaba a -20°C en recipiente bien cerrado. Dado el carácter tóxico de la mayoría de los reactivos empleados en este proceso, todas las operaciones descritas eran llevadas a cabo en vitrina.

Habitualmente, partiendo de las cantidades indicadas, se obtienen entre 1,1 y 1,3 g de 5'-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina. Este compuesto presenta un punto de fusión de $149-150^{\circ}\text{C}$ y su espectro de absorción ultravioleta, disuelto en etanol absoluto, presenta dos máximos de absorción a 232 nm y 259 nm, tal como describen los autores antes citados. Su concentración se determinaba espectrofotométricamente, disuelto en etanol absoluto, tomando como valor del coeficiente de extinción molar a 259 nm, $1,35 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

2.2. CONDICION DE LOS ANIMALES UTILIZADOS

2.2.1. RATAS

Las ratas utilizadas eran de la raza Sprague-Dawley, adquiridas en el pabellón de animales de experimentación de la Facultad de Farmacia o cedidas desinteresadamente por los Laboratorios Ferrer Internacional S.A.

Se alojaron en el estabulario del Departamento de Bioquímica, en condiciones de temperatura constante, comprendida entre 20 y 22°C y eran alimentadas con una dieta de pienso "rata-ratón cría", suministrado por la firma Panlab y con acceso libre al agua potable.

Las ratas destinadas a la obtención de la enzima HMG-CoA reductasa estaban sometidas a un ciclo artificial de luz y oscuridad, que comprendía un periodo luminoso desde las 15 horas a las 3 horas y un periodo oscuro, desde las 3 horas hasta las 15 horas. Este ciclo se mantenía con el fin de que el máximo de actividad HMG-CoA reductasa, que se alcanza al cabo de seis horas del inicio del periodo oscuro, coincidiese con las 9 horas de la mañana. El periodo previo de adaptación a estas condiciones, en ningún caso era inferior a los diez días.

Cinco días antes de ser sacrificadas, las ratas

eran alojadas en jaulas individuales, con objeto de reducir al mínimo el nerviosismo producido por la presencia de varios individuos en la misma jaula, que se traduce en la obtención de muy bajos porcentajes de solubilización de la enzima HMG-CoA reductasa. Además, durante estos cinco días anteriores al sacrificio, las ratas eran alimentadas con una mezcla del pienso citado anteriormente, suplementado con un 5 % (p/p) de colestiramina, que fue cedida amablemente por los Laboratorios Rubió. La actividad reductasa de las ratas alimentadas con colestiramina es, aproximadamente, cinco veces superior a la de las ratas alimentadas con una dieta normal (323).

2.3. OBTENCION DE LOS PREPARADOS ENZIMATICOS

2.3.1. OBTENCION DE LA HMG-CoA REDUCTASA MICROSOMAL LIBRE DE HMG-CoA REDUCTASA QUINASA

En determinados experimentos llevados a cabo en esta Memoria, se ha utilizado como sustrato de las HMG-CoA reductasa quinasas, HMG-CoA reductasa microsomal. La enzima se obtenía en su forma activa, es decir, completamente desfosforilada, para poder ser posteriormente inactivada, o sea fosforilada, por acción de las HMG-CoA reductasa quinasas, según el método que se explicará más adelante.

2.3.1.1. Obtención de la HMG-CoA reductasa microsomal

Las ratas se decapitaban a las 9 horas, coincidiendo con el máximo de actividad reductasa en estos animales. Después de desangrado el animal, se le extraía el hígado, que era inmediatamente lavado con la disolución amortiguadora utilizada posteriormente en la homogenización, para eliminar los restos de sangre, procediéndose inmediatamente a su homogenización, manteniendo la temperatura a 4°C.

Los hígados se homogenizaban en un "Potter Elvehjem" provisto de un pistilo de teflón bien ajustado, mante-

niendo la temperatura en todo momento a 4°C. La solución amortiguadora, empleada en una proporción de 1:2 (p/v), estaba compuesta por, sacarosa 100 mM, fosfato potásico 40 mM pH 7,2, EDTA 30 mM, KCl 50 mM y DTT 5 mM. El homogenado obtenido se centrifugaba a 15.000 x g durante 25 minutos, a 4°C, en una centrífuga modelo RC-2B, de la marca "Ivan Sorvall Inc".

El sobrenadante obtenido en esta centrifugación, era filtrado a través de lana de vidrio para eliminar la fracción lipídica, y centrifugado de nuevo durante 90 minutos, en una ultracentrífuga marca "Beckman", modelo L5-65.

Los sedimentos de microsomas así obtenidos se resuspendían en la misma solución amortiguadora utilizada para la homogenización de los hígados, en igual proporción, y se centrifugaban nuevamente a 105.000 x g, durante 60 minutos, a 4°C. Esta segunda ultracentrifugación se llevaba a cabo con objeto de eliminar los restos de citosol que habían quedado impregnando los sedimentos de microsomas.

2.3.1.2. Conservación de la HMG-CoA reductasa microsomal

La fracción de microsomas era resuspendida con la solución amortiguadora compuesta por, sacarosa 100 mM, Tris/HCl 50 mM pH 7,5, KCl 50 mM y DTT 5 mM, en la proporción de 1 mL por cada 5 g de hígado, empleando un homogenizador manual de vidrio, con pistilo del mismo material, a 4°C. La preparación de reductasa microsomal así obtenida, cuya concentración de proteína oscila entre 40 y 50 mg/mL, se repartía en alícuotas de 100 µL, que se guardaban congeladas a -20°C. En estas condiciones la actividad HMG-CoA reductasa se mantiene estable, al menos durante seis meses.

2.3.1.3. Neutralización de la HMG-CoA reductasa quinasa microsomal

Para poder determinar la actividad HMG-CoA reductasa quinasa empleando HMG-CoA reductasa microsomal como sustrato, era preciso neutralizar previamente la actividad reductasa quinasa asociada a esta fracción microsomal.

De las tres técnicas descritas, lavado de los sedimentos microsomales por tres veces consecutivas con solución amortiguadora neutra (125), incubación a 37°C durante dos horas (134) y calentamiento a 50°C durante 10 minutos (324), la que proporciona mejores resultados en lo relativo a, rapidez, estabilidad de la actividad reductasa y neutralización de la actividad reductasa quinasa, es la última de ellas, propuesta por Ramasarma y col. (324). El efecto logrado se basa en la desnaturalización de la reductasa quinasa microsomal por efecto de la elevada temperatura, que por el contrario, no afecta a la actividad HMG-CoA reductasa.

Una alícuota de reductasa microsomal obtenida como se ha descrito en los apartados anteriores (2.3.1.1. y 2.3.1.2.) era descongelada rápidamente y se le adicionaban 200 μ L de la misma solución amortiguadora en que estaba resuspendida. La concentración de proteína microsomal resultante era de alrededor de 15 mg/mL. La preparación se incubaba a 50°C durante exactamente 10 minutos, transcurridos los cuales se enfriaba inmediatamente a 4°C, en un baño de agua y hielo. En estas condiciones la actividad HMG-CoA reductasa disminuye entre un 10 y un 15 %, mientras que la actividad reductasa quinasa se neutraliza completamente.

2.3.2. PURIFICACION A HOMOGENEIDAD DE LA HMG-CoA REDUCTASA

En la gran mayoría de los experimentos descritos

en esta Memoria, se ha utilizado como sustrato de las HMG-CoA reductasa quinazas, una HMG-CoA reductasa purificada a homogeneidad. La enzima se obtenía también en su forma de máxima actividad, es decir, completamente desfosforilada, con objeto de poder ser inactivada, es decir, fosforilada, por acción de las Reductasa quinazas.

El proceso de purificación de la enzima HMG-CoA reductasa se desarrollaba, básicamente, según el método propuesto por Ness y col. (70), a partir de microsomas de hígado de rata.

2.3.2.1. Obtención de los microsomas

La metodología empleada era exactamente igual a la descrita en el apartado 2.3.1.1., obteniéndose los sedimentos de microsomas completamente exentos de restos de citosol.

2.3.2.2. Solubilización de la HMG-CoA reductasa de los microsomas

Son varios los métodos descritos en la literatura para la solubilización de la HMG-CoA reductasa microsomal (325), destacando entre ellos el propuesto por Heller y Gould (65), denominado de congelación y descongelación. No obstante, el único método con el que se han conseguido rendimientos elevados y reproducibles es el propuesto por Brown y col. (66), con ligeras modificaciones.

El método de solubilización combina los efectos de la congelación y descongelación con los de la incubación en presencia de una elevada concentración de glicerol. Los sedimentos de microsomas, preparados tal como se ha descrito, se sumergían en nitrógeno líquido, manteniéndolo-

los así hasta que toda la masa de proteína estaba bien congelada. A continuación, se dejaban descongelar a temperatura ambiente y seguidamente, se homogenizaban en una solución amortiguadora compuesta por, sacarosa 100 mM, fosfato potásico 40 mM pH 7,2, EDTA 30 mM, KCl 50 mM, DTT 5 mM y glicerol 50 % (v/v). La homogenización se llevaba a cabo a temperatura ambiente, con una proporción de solución amortiguadora de 1 mL por cada 9 gramos de hígado de partida, empleando un homogenizador manual de vidrio, con pistilo del mismo material. La suspensión microsomal se dejaba en reposo durante una hora a la temperatura ambiente y a continuación, se le añadía solución amortiguadora igual a la anterior, pero carente de glicerol, hasta alcanzar la proporción de 1 mL por cada gramo de hígado de partida. Seguidamente el conjunto se centrifugaba a 105.000 x g durante dos horas, a 20°C, obteniéndose un sobrenadante que constituye el primer solubilizado microsomal y que se conserva congelado a -80°C, hasta la obtención del segundo solubilizado. Los microsomas precipitados en la primera centrifugación, se sometían de nuevo al mismo tratamiento de congelación y descongelación e incubación con glicerol, pero en esta ocasión, la incubación a temperatura ambiente se prolongaba durante 12-14 horas. El solubilizado microsomal obtenido en la segunda centrifugación se reunía con el primero, constituyendo ambos la denominada fracción soluble, que contiene habitualmente, entre un 90 y un 120 % de la actividad reductasa de los microsomas. Estos elevados rendimientos son debidos a que la reductasa en los microsomas, sólo puede expresar parcialmente su actividad y es únicamente al solubilizarse, cuando se manifiesta en su totalidad (68).

Una vez solubilizada la reductasa, todas las manipulaciones posteriores se llevaron a cabo a la temperatura ambiente y en aquellas ocasiones en que la muestra de reductasa se congelaba, era preciso activarla, incubándola a 37°C, durante un tiempo mínimo de 30 minutos, para rever-

tir el efecto de inactivación de la enzima soluble, por el frío, descrito por Brown y col. (66) y por Heller y Gould (78).

A continuación, la fracción soluble se concentraba por precipitación con sulfato amónico al 50 % de saturación. El precipitado, recuperado por centrifugación, se resuspendía en la siguiente disolución amortiguadora, constituida por, sacarosa 100 mM, fosfato potásico 40 mM pH 7,2 EDTA 30 mM, KCL 1 M, DTT 5 mM y glicerol 33 % (v/v), hasta un volumen total aproximado equivalente a 1/15 del peso de hígado de partida. La incorporación del glicerol y de la elevada concentración de KCl a la disolución amortiguadora, es imprescindible para aumentar la estabilidad de la enzima frente al calor.

2.3.2.3. Calentamiento a 64°C

Este paso de la purificación permite eliminar una gran cantidad de proteínas contaminantes, sin que resulte afectada la HMG-CoA reductasa, por sus especiales características de resistencia a las temperaturas elevadas.

La preparación obtenida en la etapa anterior se introducía en un erlenmeyer de vidrio Pyrex, que se sumergía en un baño termostatzado a 64°C, durante exactamente 10 minutos, transcurridos los cuales se enfriaba rápidamente por inmersión en un baño de agua y hielo, para hacer descender la temperatura rápidamente por debajo de los 20°C. La mezcla resultante se centrifugaba a 30.000 x g durante 45 minutos, para separar todas aquellas proteínas que se habían desnaturalizado durante el calentamiento, permaneciendo en el sobrenadante la casi totalidad de la reductasa. Este sobrenadante se guardaba congelado a -80°C hasta el día siguiente.

2.3.2.4. Cromatografía en columna de Affi-Gel Blue

La fracción obtenida tras el calentamiento a 64°, una vez descongelada y activada, se diluía hasta cinco veces su volumen con la siguiente solución amortiguadora: sacarosa 100 mM, fosfato potásico 40 mM pH 7,2, EDTA 30 mM y DTT 5 mM, con el fin de rebajar la concentración de KCl de la muestra hasta 200 mM, antes de aplicarla a la columna.

La muestra diluída se aplicaba a una columna de Affi-Gel Blue (1,9 x 8 cm) equilibrada previamente con la solución amortiguadora anterior, a la que se había adicionado KCl 200 mM. La velocidad de elución era de 70 mL/h, recogiénose fracciones de 7,5 mL. Una vez lavada la columna, se aplicaba un gradiente lineal de 250 mL totales, entre 200 mM y 2 M de KCl.

Las fracciones con actividad HMG-CoA reductasa eran mezcladas y concentradas por ultrafiltración en una célula Amicon, utilizando un filtro PM-10. El concentrado se desalaba por repetidas diluciones con la misma solución amortiguadora exenta de KCl, seguidas de posterior concentración. El volumen final de la muestra era de alrededor de 8 mL, a los que se adicionaba glicerol en cantidad suficiente para que quedara al 50 % (v/v), guardándose congelada a -80°C hasta el día siguiente.

2.3.2.5. Cromatografía en columna de HMG-CoA-hexano-agarosa

La preparación obtenida en el paso anterior se diluía con su mismo volumen de agua destilada, antes de ser introducida en la columna de HMG-CoA-hexano-agarosa. Dicha columna (1,4 x 3 cm) estaba equilibrada previamente con una disolución amortiguadora compuesta por, una parte de glicerol, dos partes de agua destilada y una parte de la solución amortiguadora empleada en la obtención de los

microsomos. La velocidad de flujo era de 20 mL/h, reco-
giéndose fracciones de 2 mL.

Después de introducida la muestra, la columna se lavaba con 20 mL de la misma disolución con la que había sido equilibrada, a la que se adicionaba 70 mM KCl. A continuación la actividad reductasa se eluía con 20 mL de la disolución anterior a la que se adicionaba HMG-CoA para que quedara a una concentración final de 250 μ M. Una pequeña parte de la actividad reductasa eluía al lavar la columna con la solución de equilibrado, adicionada de 0,5 M KCl, sin embargo, estas fracciones se deshecharon por estar contaminadas con otras proteínas.

Las fracciones con actividad HMG-CoA reductasa se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración, hasta un volumen aproximado de 1,5 mL, con una célula Amicon, utilizando un filtro PM-10. A la preparación de reductasa así obtenida se le añadía albúmina en cantidad suficiente para que quedara a una concentración 0,35 mg/mL y se dializaba frente a 1 litro de una disolución amortiguadora compuesta por: Tris/HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM y DTT 5 mM, durante 5 horas. La enzima se conservaba separada en alícuotas, congelada a -80° C, manteniéndose activa durante al menos un año.

En una purificación habitual se partía de unos 300 g de hígado de rata y operando en estas condiciones, se obtenían alrededor de 0,5 mg de HMG-CoA reductasa homogénea, completamente activa, con una actividad específica de unas 12.500 unidades/mg y un peso molecular aparente de 55 Kd.

2.4. TECNICAS ANALITICAS

2.4.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA UTILIZANDO [^3H] HMG-CoA COMO SUSTRATO

La determinación de la actividad HMG-CoA reductasa se llevaba a cabo utilizando sustrato marcado radioactivamente, bien con tritio, bien con ^{14}C . La diferencia entre ambos métodos radica básicamente en la separación del producto formado durante la reacción, del sustrato que permanece sin reaccionar. En la mayoría de los experimentos presentados, se ha utilizado el sustrato marcado con ^{14}C , empleándose el sustrato tritiado durante los procesos de purificación.

La determinación de la actividad reductasa utilizando [^3H] HMG-CoA, se realizaba por una modificación del método de reparto entre fases, propuesto por Philipp y Shapiro (326). La reacción enzimática en la que se basa el método es la reducción del HMG-CoA a ácido mevalónico, que conlleva la cesión de cuatro electrones a partir de dos moléculas de NADPH. La actividad HMG-CoA reductasa se determina cuantificando la mevalonolactona (MVL) tritiada producida a partir del [^3H] HMG-CoA.

Cantidades de HMG-CoA reductasa, cuya actividad no debía ser superior a 0,12 unidades totales, contenidas

en un volumen de 50 μL , se incubaban con 60 μL de una disolución que contenía 25 μmoles de Tris/HCl pH 7,2, 0,6 U. de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6 μmoles de EDTA, 6 μM de glucosa-6-fosfato, 0,5 μmoles de DTT, 0,3 μmoles de NADP^+ , 0,06 μg de albúmina y 11,2 μg de [^3H] HMG-CoA (3.500 - 4.000 cpm/nmol), a 37°C durante 15 minutos. La reacción se detenía al añadir 40 μL de HCl 2,5 N. Posteriormente se incubaba a 50°C durante 10 minutos, para convertir el mevalonato producido en la reacción a su forma de lactona (MVL) e hidrolizar el HMG-CoA que no había reaccionado, a ácido HMG y coenzima A. La diferencia de propiedades entre el ácido HMG y la mevalonolactona facilita su posterior separación.

Los tubos de reacción, previamente enfriados a 4°C, se centrifugaban durante dos minutos a 12.800 x g en una centrífuga de sobremesa "Eppendorf", a fin de desproteínizar la muestra. A continuación, una alícuota de 100 μL del sobrenadante se depositaba en un vial de vidrio para conteo por centelleo líquido, al que se le añadían 5 mL de líquido de centelleo, constituido por una disolución de PPO al 0,8% (p/v) en tolueno. Dicho vial se agitaba vigorosamente y se dejaba reposar durante una hora, para permitir el reparto de los compuestos a separar entre las dos fases.

En estas condiciones en el vial coexisten el ácido [^3H] HMG y la [^3H] MVL. La separación se basa en el distinto coeficiente de reparto de ambos compuestos entre el agua y el tolueno. La [^3H] MVL es un compuesto más hidrofóbico que el ácido [^3H] HMG, de manera que, mientras el primero tiene tendencia a pasar a la fase orgánica, el segundo la tiene a permanecer en la acuosa. El paso de la [^3H] MVL al tolueno, viene favorecido además, por una relación de volúmenes entre tolueno y agua de 50 a 1. Las partículas β emitidas por el ácido [^3H] HMG, que permanece mayoritariamente en el agua, no son detectadas, puesto que

la baja energía de las partículas β emitidas por el ^3H permite que sean "apagadas" por el medio acuoso, de manera que las únicas radiaciones detectadas y cuantificadas son las procedentes de la $[\text{}^3\text{H}]$ MVL, que se localiza en la fase orgánica. Sin embargo, rutinariamente, en cada ensayo se realizaba un blanco que contenía todos los componentes de la reacción excepto la preparación enzimática. Las cpm obtenidas eran sustraídas a las obtenidas en el conteo de cada vial.

2.4.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA UTILIZANDO $[\text{}^{14}\text{C}]$ HMG-CoA COMO SUSTRATO

El método seguido para la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa, utilizando como sustrato HMG-CoA marcado con ^{14}C , es idéntico al descrito en el apartado anterior, a excepción de las siguientes modificaciones.

El sustrato empleado en este caso era $[\text{}^{14}\text{C}]$ HMG-CoA, con una radioactividad específica comprendida entre 3.500 y 4.000 cpm/nmol. La reacción enzimática se desarrollaba en las mismas condiciones descritas, excepto que se detenía añadiendo 60 μL de una mezcla que contenía, HCl 3,3 N, 1 mg de MVL y 0,2 mg de ácido HMG. La lactona y el ácido HMG sin marcaje radioactivo se añadían para que actuaran como portadores, puesto que al incrementar la cantidad de los compuestos a transportar se facilita la posterior separación cromatográfica, así como su visualización.

La separación de la $[\text{}^{14}\text{C}]$ MVL del ácido $[\text{}^{14}\text{C}]$ HMG, se realizaba en este caso, por una modificación del método de Shapiro y col. (327). Una alícuota de 100 μL del sobrenadante desproteínizado, de cada uno de los tubos de reacción, se sometía a cromatografía en capa fina de gel de sílice $\text{HF}_{254+366}$, en placas de 20 x 20 cm divididas en seis carriles, que previamente habían sido activadas por calen-

tamiento en estufa a 100°C, durante una hora. La cromatografía se desarrollaba en una cubeta de vidrio, utilizando como fase móvil la mezcla acetona:benceno, a partes iguales. Finalizada la cromatografía las placas se dejaban secar a temperatura ambiente.

La visualización de la zona en que había quedado la MVL se hacía con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta, observándose una área más oscura en el lugar correspondiente a la MVL. Esta área era removida con ayuda de una espátula metálica y el polvo de gel de sílice obtenido, se introducía en un vial de vidrio para contaje de centelleo líquido, al que se añadían 10 mL de líquido de centelleo, cuya composición era, PPO 0,7 % (p/v), naftaleno 8 % (p/v), etilenglicolmonometil éter 40 % (v/v) y tolueno 60 % (v/v). Por último, los viales eran contados en un contador de centelleo líquido, como en el caso anterior, tras 30 minutos de reposo.

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

2.4.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA QUINASA UTILIZANDO HMG-CoA REDUCTASA MICROSOMAL COMO SUSTRATO

Para determinar la actividad HMG-CoA reductasa quinasa durante el proceso de purificación, así como en las diferentes etapas del mismo, se empleó como sustrato HMG-CoA reductasa microsomal, activa. El ensayo consistía en medir la disminución de la actividad reductasa producida por la acción de las quinasas, comparándola con la de un control de actividad reductasa.

En este ensayo las diluciones de las enzimas re-

ductasa quinasa se hacían con la disolución compuesta por, Tris/HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA, 1 mM, albúmina 0,2 mg/mL, DTT 5 mM y PMSF 1 mM. Tanto el DTT como el PMSF se añadían extemporáneamente (328).

Inmediatamente antes de iniciar el ensayo se obtenía HMG-CoA reductasa microsomal, libre de HMG-CoA reductasa quinasa, tal como se describe en el apartado 2.3.1.

Las muestras en las que se quería medir actividad reductasa quinasa, diluídas convenientemente y contenidas en un volumen de 25 μ L, se incubaban durante 30 minutos a 37°C, con 25 μ L de una disolución preparada extemporáneamente y compuesta por: 10 μ L de Tris/HCl pH 7,5, NaF 250 mM; 1,5 μ L de Mg Cl₂ 500 mM; 1,75 μ L de ATP 80 mM; 1,75 μ L de AMP 80 mM y 10 μ L de HMG-CoA reductasa microsomal (0,5 unidades). Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción era adecuadamente diluída con la disolución compuesta por, sacarosa 25 mM, fosfato potásico 40 mM pH 7,2, EDTA 45 mM, NaF 100 mM, DTT 5 mM y albúmina 0,5 mg/mL (extemporánea) y la actividad reductasa de 50 μ L de esta dilución, que inicialmente contenían 0,1 unidades de reductasa, se determinaba tal como se ha descrito en el apartado 2.4.1. o bien en el 2.4.2., dependiendo del sustrato empleado.

El objetivo de esta última operación de dilución era doble. En primer lugar, detener la reacción de inactivación al producir la quelación del catión Mg²⁺, por acción de la elevada concentración de EDTA y, en segundo lugar, adecuar la cantidad de reductasa para que la determinación de su actividad se realizase en condiciones óptimas.

Paralelamente, como controles, cuando se procedía al seguimiento de la actividad reductasa quinasa que eluía de las distintas columnas, se incubaba un tubo en el que la muestra de reductasa quinasa se sustituía por 25 μ L de la disolución amortiguadora que contenía la muestra enzimá-

tica, siendo el resto de los componentes idéntico. Cuando se trataba de confeccionar las tablas de purificación, se incubaba un tubo que contenía todos los componentes, excepto el Mg^{2+} , que era sustituido por agua destilada. En ambos casos estos tubos nos proporcionaron la actividad reductasa antes de ser inactivada por la acción de las quinasas.

2.4.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA QUINASA UTILIZANDO HMG-CoA REDUCTASA HOMOGENEA COMO SUSTRATO

Para determinar la actividad HMG-CoA reductasa quinasa en los demás experimentos de esta Memoria, se empleó como sustrato HMG-CoA reductasa purificada a homogeneidad y completamente activa. Como en el caso anterior, el ensayo consistía en medir la disminución de la actividad reductasa producida por la acción de las quinasas, comparándola con la de un control de la actividad reductasa inicial que, salvo que se indique lo contrario, contenía todos los componentes, excepto el Mg^{2+} .

En este ensayo las diluciones de las enzimas reductasa quinasa se realizaban con la misma disolución amortiguadora descrita en el apartado anterior y las diluciones de la enzima reductasa se efectuaban con la disolución compuesta por: Tris/HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, albúmina 0,2 mg/mL y PMSF 0,6 mM. Como en casos anteriores, el DTT y el PMSF eran añadidos extemporáneamente y la solución era calentada previamente a 37°C.

La preparación de HMG-CoA reductasa empleada como sustrato de las quinasas era incubada previamente a 37°C, durante un tiempo mínimo de 45 minutos, con objeto de revertir la inactivación por el frío descrita por Brown y col. (66) y por Heller y Gould (78). Las muestras en las que se

quería medir actividad reductasa quinasa, adecuadamente diluidas y contenidas en un volumen de 5 μL , se incubaban a 37°C, con 10 μL de la solución de HMG-CoA reductasa homogénea y activa (8,5 a 9,5 unidades) y 5 μL de una disolución preparada extemporáneamente, que estaba compuesta por, 100 μL de Tris/HCl 100 mM pH 7,5, DTT 10 mM y PMSF 1 mM (extemporáneo); 25 μL de MgCl_2 500 mM; 20 μL de ATP 80 mM; 20 μL de AMP 20 mM y 35 μL de agua destilada. A los tiempos 0 y 15 minutos de incubación se tomaban alícuotas de 5 μL de la mezcla, que se diluían adecuadamente con la disolución compuesta por, sacarosa 25 mM, fosfato potásico 40 mM pH 7,2, EDTA 45 mM, NaF 100 mM, DTT 5 mM y albúmina 0,5 mg/mL (extemporánea), previamente calentada a 37°C, con el fin de detener la acción de las reductasa quinasa y de ajustar la cantidad de reductasa contenida en 50 μL a las condiciones descritas en el apartado 2.4.3.. Seguidamente se tomaban 50 μL de la preparación, a los que se añadían 60 μL de la disolución para el ensayo de la actividad reductasa, descrita en el apartado 2.4.2., y se proseguía el ensayo según se detalla en dicho apartado.

Es importante destacar el hecho de que en todo momento la reductasa debe ser mantenida a 37°C, con objeto de prevenir la disminución de actividad que se produciría al bajar la temperatura.

Aquellas muestras en las que se quería medir actividad reductasa quinasa en condiciones basales (sin activador), eran ensayadas en las mismas condiciones, pero sustituyendo la solución de AMP por agua destilada.

La actividad reductasa quinasa se calculaba a partir de la diferencia entre la actividad reductasa residual y la actividad reductasa inicial. Una unidad de HMG-CoA reductasa quinasa se define como la cantidad de enzima que disminuye la actividad HMG-CoA reductasa en una unidad, por minuto, a 37°C.

2.4.5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MEVALONATO QUINASA

La actividad mevalonato quinasa se determinó siguiendo básicamente el método propuesto por Ness y col.(252). Un volumen de 100 μL que contenía la muestra enzimática a ensayar, convenientemente diluida, se incubaba a 37°C, durante 15 minutos, con 200 μL de una disolución que contenía 15 μmoles de Hepes pH 7,4, 0,85 μmoles de DTT, 1,5 μmoles de ATP, 5 μmoles de MgCl_2 , 0,3 mg de albúmina y 0,2 μmoles de $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonato (400 cpm/nmol). Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detenía por adición de 10 μL de HCl 2,5 N. Posteriormente los tubos de reacción eran incubados a 50°C durante 10 minutos, para asegurar la completa lactonización del $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonato que no había reaccionado.

Los tubos de reacción, una vez enfriados a 4°C, se centrifugaban durante 2 minutos a 12.800 x g, a fin de desproteinizar la muestra. A continuación, una alícuota de 250 μL de la muestra se aplicaba a una columna de intercambio iónico de AG 1X8, en forma de cloruro, (0,5 x 7,5 cm) equilibrada previamente con agua. Con esta cromatografía, conseguíamos separar el $[2-^{14}\text{C}]$ fosfomevalonato del $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonato. La columna se lavaba con 2 mL de agua destilada, seguidos de otros 2 mL de HCl 0,01 N, con lo que se aseguraba la total elución de la $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonolactona. Finalmente, el $[2-^{14}\text{C}]$ fosfomevalonato era eluido por lavado de la columna con 4 mL de HCl 2,5 N, que se recogían directamente en un vial de vidrio para contaje por centelleo líquido al que se añadían 10 mL de una disolución de PPO al 0,5 % (p/v) en tolueno:tritón, 2:1 (v/v). Los viales se agitaban enérgicamente y se dejaban reposar hasta la formación de un gel de color blanco opalescente, momento en el que se procedía a su contaje.

Una unidad de mevalonato quinasa se define como la cantidad de enzima que convierte 1 nmol de mevalonato en

fosfomevalonato, por minuto, a 37°C.

2.4.6. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA

El método empleado fue el propuesto por Lowry y col. (329), adaptado por Besadoun y col. (330), para la eliminación de productos que producen interferencias que derivan en la obtención de resultados erróneos.

La modificación consiste en la precipitación previa de la proteína a determinar, mediante la adición de TCA al 10 %, en presencia de deoxicolato sódico al 0,002 %, y su posterior recuperación por centrifugación a 4.000 x g, durante 30 minutos, a 4°C.

El precipitado se resuspendía en 0,1 mL de NaOH 1 N y 0,1 mL de agua destilada y , seguidamente, se añadía 1 mL de una disolución que contenía Na_2CO_3 al 2 %, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5 % y tartrato sódico-potásico al 1 %, en la proporción 100:1:1 (v/v/v), preparada extemporáneamente. Transcurridos 10 minutos se añadían 0,05 mL del reactivo de Folin-Ciocalteus y la extinción del complejo coloreado que se formaba, después de 30 minutos a temperatura ambiente, se determinaba a 750 nm. Todas las determinaciones se comparaban con soluciones de albúmina de suero bovino de concentración conocida.

2.4.7. ANALISIS DE NUCLEOTIDOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

Es bien conocida la tendencia de ciertos nucleótidos a sufrir hidrólisis de los enlaces que unen entre sí a los diferentes grupos fosfato, especialmente cuando se hallan en disolución. Este proceso se ve favorecido además, por la congelación y descongelación repetida de las disolu-

ciones. En nuestro caso concreto el ATP, por hidrólisis, puede producir ADP y éste a su vez, por el mismo proceso, rendir AMP. En la totalidad de experimentos de esta Memoria era preciso disponer de soluciones de éstos y otros nucleótidos, que contuviesen una única especie química y que estuviesen exentos de cualquier contaminación por otros nucleótidos.

Con objeto de garantizar el cumplimiento de esta condición, las disoluciones de los nucleótidos de adenina se sometieron a análisis por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa. Esta técnica proporciona una gran rapidez unida a una alta sensibilidad.

Un volumen comprendido entre 30 y 100 μL de las disoluciones de los diferentes nucleótidos, a una concentración 0,3 mM, se aplicaba a una columna "Waters" $\mu\text{bondapak C}_{18}$ de fase reversa, utilizando una velocidad de flujo de 1,5 mL/min.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

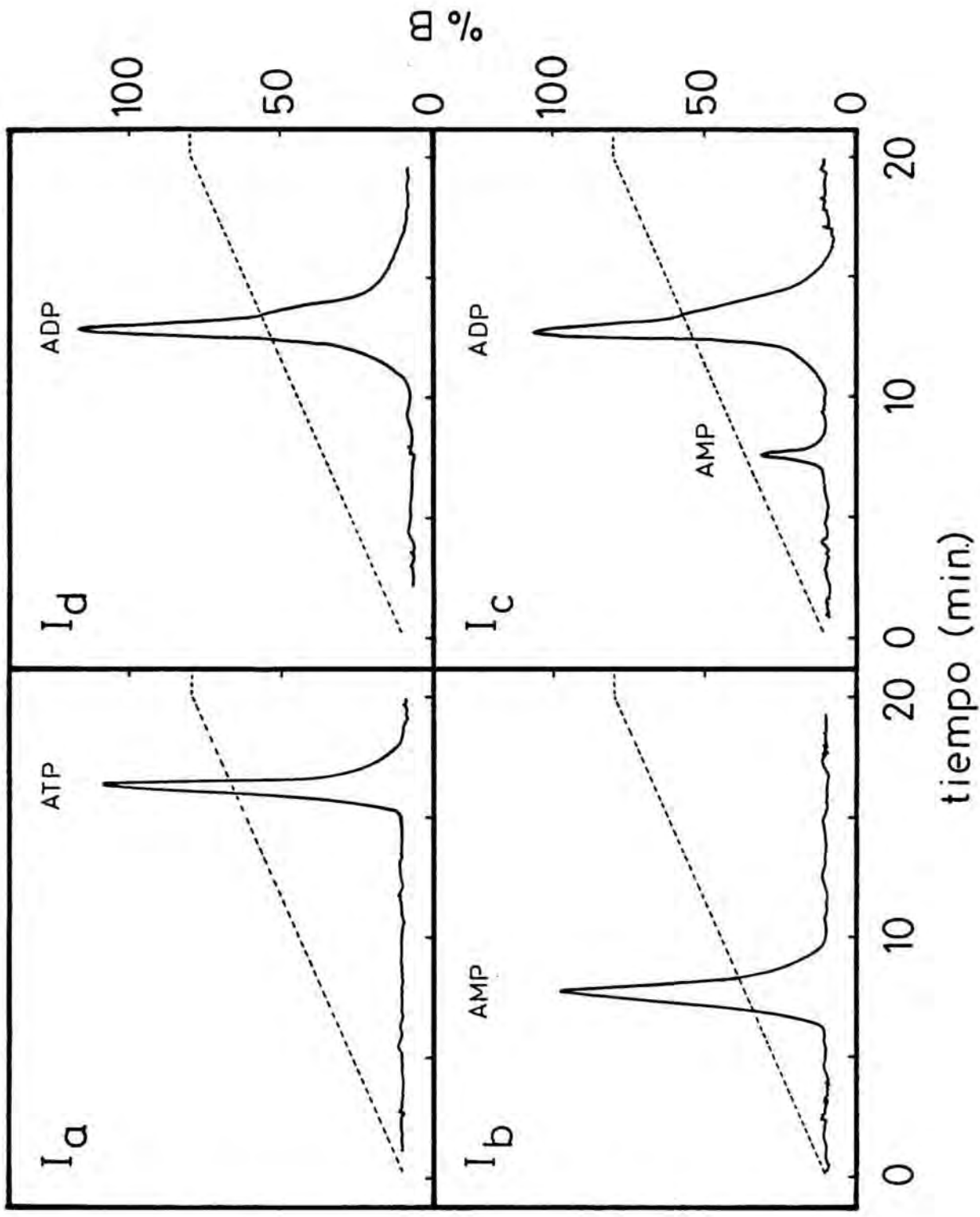
Solución amortiguadora A: KH_2PO_4 0,25 % pH 5,8
TBAP 0,6 %

Solución amortiguadora B: KH_2PO_4 0,65 % pH 5,8
TBAP 0,6 %
Metanol 30 %

Gradiente de elución: 0 % B a 80 % B, durante 20 minutos.

La detección de los distintos nucleótidos eluidos se efectuó por lectura de la absorbancia a 254 nm. Todas las operaciones se desarrollaron a la temperatura de 25°C. Como se puede observar en las figuras I_a y I_b , correspondientes al análisis, en las condiciones descritas, de ATP

Absorbancia 254 nm



(50 μL , 0,3 mM) y AMP (50 μL , 0,3 mM) en disoluciones descongeladas una sola vez después de haber permanecido durante un mes y medio congeladas, no se aprecian indicios de contaminación por otros nucleótidos. En la figura I_c se expone el resultado obtenido al analizar una muestra de ADP (30 μL , 0,3 mM) en las mismas condiciones que las anteriores, observándose la existencia en dicha preparación, de una contaminación por AMP de alrededor de un 10 %. Por otra parte, como se observa en la figura I_d , cuando se sometió a análisis una preparación de ADP (50 μL , 0,3 mM), preparada extemporáneamente y no sometida a congelación y descongelación, no se observó contaminación alguna por AMP.

A la vista de estos resultados, todas las soluciones de nucleótidos y nucleósidos empleados en el presente estudio, se preparaban en disolución acuosa a pH 7,0 y se repartían en alícuotas que se guardaban congeladas a -20°C , durante un máximo de tiempo de un mes y medio. Estas alícuotas una vez descongeladas y usadas eran desechadas. Cuando se empleaban soluciones de ADP, éstas se preparaban inmediatamente antes de llevar a cabo el experimento deseado, no usándose en ningún caso soluciones preparadas con anterioridad o congeladas previamente.

2.5. FOSFORILACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

La HMG-CoA reductasa obtenida como se ha descrito en el apartado 2.3.2. se sometía a fosforilación en una mezcla de reacción que contenía, Tris/HCl 50 mM pH 7,5, DTT 5 mM, EDTA 0,65 mM, EGTA 0,15 mM, PMSF 0,5 mM, albúmina 0,17 mg/mL, MgCl₂ 15,6 mM, AMP 0,25 mM, [γ -³²P]ATP 0,5 mM, con una radioactividad específica comprendida entre 750 y 1.000 cpm/pmol y HMG-CoA reductasa desfosforilada 0,18 mg/mL. La reacción se iniciaba por adición de la HMG-CoA reductasa quinasa, convenientemente diluída, incubándose a 37°C.

A los distintos tiempos de reacción y con el fin de determinar el número de fosfatos introducidos por subunidad de HMG-CoA reductasa, se tomaban alícuotas de 5 μ L (0,7 a 0,9 μ g de reductasa) en las que se determinaba la radioactividad ligada a la proteína, según el método de Huang y Robinson (331). Las alícuotas mencionadas se sembraban sobre tiras de papel cromatográfico ITLC, tipo SG, de 10 x 1,5 cm, en el mismo lugar donde previamente se habían depositado 10 μ L de una solución de TCA al 20 % (p/v) (1,5 cm de la base). Seguidamente se efectuaba una cromatografía ascendente, empleando como fase móvil una disolución de KCl 0,2 M y TCA al 20 % (p/v). Una vez desarrollada la cromatografía, los papeles eran secados por calor y se procedía a recortar el fragmento comprendido entre 1,5 cm por encima y 0,5 cm por debajo del punto de aplicación de la muestra. Los fragmen-

tos de papel se introducían en viales de vidrio para conteo de centelleo líquido, que contenían 5 mL de una solución de PPO al 0,5 % (p/v) en tolueno, determinándose a continuación la radioactividad existente.

Paralelamente se incubaba una mezcla control, constituida por los mismos componentes excepto la HMG-CoA reductasa, que se trataba según la misma metodología. La radioactividad ligada a la proteína HMG-CoA reductasa se calculaba a partir de la diferencia de radioactividad ligada a las proteínas de ambas muestras.

En otros casos, a los distintos tiempos se tomaban alícuotas de 5 μ L (0,7 a 0,9 μ g de reductasa), que se diluían con 35 μ L de agua destilada. Inmediatamente se detenía la reacción añadiendo 45 μ L de TCA frío al 20 % (p/v). La precipitación de las proteínas se favorecía añadiendo 5 μ L de una solución de albúmina 8 mg/mL y colocando las alícuotas en un baño de hielo, en el que se dejaban reposar durante 15 minutos. A continuación se centrifugaban a 12.800 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes eran desechados y el precipitado se redisolvió en 100 μ L de NaOH 0,1 N frío, volviéndose a precipitar inmediatamente con 100 μ L de TCA al 20 % (p/v). Después de reposar durante otros 15 minutos en hielo, el precipitado se recuperaba de nuevo por centrifugación durante 5 minutos a 12.800 x g. El sedimento se lavaba con 300 μ L de éter etílico, para que arrastrara los restos de TCA que podían haber quedado impregnando al precipitado. Las diferentes alícuotas así tratadas, se sometían a electroforesis según la técnica descrita en el apartado 2.8.1., para separar y aislar la HMG-CoA reductasa fosforilada, así como proceder, bien a la determinación del ^{32}P ligado a la enzima, aprovechando el efecto Cerenkov, bien a la hidrólisis parcial para identificar los aminoácidos fosforilados o bien a su digestión total con tripsina.

2.6. REACTIVACION Y DESFOSFORILACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA INACTIVA Y FOSFORILADA

La enzima HMG-CoA reductasa homogénea era inactivada y fosforilada en las condiciones descritas previamente en el apartado 2.5. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detenía añadiendo EDTA en cantidad suficiente para que su concentración fuese tres veces superior a la de $MgCl_2$.

Seguidamente, con objeto de establecer las condiciones adecuadas para la actuación de la HMG-CoA reductasa fosfatasa, descritas recientemente en nuestro laboratorio (180), la mezcla era convenientemente diluída con la disolución amortiguadora compuesta por, Bis-Tris/HCl pH 6,0, albúmina 0,5 mg/mL y DTT 1 mM. La reacción de reactivación y desfosforilación se iniciaba añadiendo HMG-CoA reductasa fosfatasa II de citosol de hígado de rata, cedida amablemente por la Dra. V. Esser. En estas condiciones, la concentración de HMG-CoA reductasa fosforilada e inactiva era de 3,6 $\mu\text{g/mL}$, el pH del medio era de 6,0 y la concentración de aquellos compuestos que podían ejercer un efecto inhibitorio sobre la reductasa fosfatasa, quedaba reducida a niveles insignificantes.

A los distintos tiempos de reacción se tomaban alícuotas de la mezcla, que se dilufan convenientemente y

en las que se determinaba la actividad reductasa, según el método descrito en 2.4.2. Cuando se pretendía poner de manifiesto el proceso de desfosforilación, a los distintos tiempos de incubación se tomaban alícuotas de la mezcla (0,7 a 0,9 μg de reductasa), que eran inmediatamente sometidas a precipitación ácida, seguida de posterior electroforesis y cuantificación del ortofosfato radioactivo ligado a la subunidad de la HMG-CoA reductasa, empleando en todo momento la metodología expuesta en 2.5.

2.7. FRAGMENTACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA MARCADA CON ^{32}P

2.7.1. DIGESTION CON TRIPSINA DE LA HMG-CoA REDUCTASA

La HMG-CoA reductasa fosforilada con ^{32}P era sometida a digestión total con tripsina, que es una proteasa que actúa sobre enlaces peptídicos en los que el grupo carboxílico es aportado por un aminoácido básico (arginina y lisina), excepto cuando el aminoácido vecino es prolina. En todos los casos se emplearon preparaciones de tripsina con TPCK, con objeto de asegurar el bloqueo de la actividad quimotripsina.

La HMG-CoA reductasa marcada con ^{32}P se sometía a tripsinización, directamente sobre la matriz de poliacrilamida del gel en que había sido aislada e identificada, tal como se explica en los apartados 2.5. y 2.9.2.

Los segmentos del gel que contenían la reductasa fosforilada eran incubados durante unos minutos en agua destilada, para permitir la retirada de la cubierta de celofán empleada en el secado del mismo. Los fragmentos del gel eran troceados finamente y secados nuevamente en un evaporador centrífugo. Una vez secos eran incubados con 650 μL de una disolución de bicarbonato amónico 150 mM pH 8,0 y urea 2 M, a la que se añadían 35 μL de una solución de tripsina en bicarbonato amónico 150 mM pH 8,0, de una concen-

tración 2 mg/mL, con lo cual la concentración final de tripsina era de 0,1 mg/mL y la relación tripsina:proteína, de 5:1 (p/p) aproximadamente.

La muestra se incubaba a 37°C, repitiéndose las adiciones de tripsina periódicamente, cada 12 horas. Una vez transcurridas las primeras 60 horas de reacción, se retiraba el sobrenadante y los segmentos del gel se sometían de nuevo al mismo tratamiento descrito. La reacción se proseguía en ambas muestras por separado, hasta un total de 144 horas (6 días), manteniéndose en todo momento la misma frecuencia en las adiciones de tripsina. Finalmente, ambos sobrenadantes eran reunidos y evaporados a sequedad en un evaporador centrífugo, modelo "Speed Vac", de la firma Savant. El residuo seco se preparaba para proceder al análisis electroforético de los fosfopéptidos resultantes de la digestión con tripsina de la reductasa fosforilada por las reductasa quinasas, tal como se describe en el apartado 2.8.2.

2.7.2. HIDROLISIS PARCIAL DE LA HMG-CoA REDUCTASA

2.7.2.1. Hidrólisis ácida

Los segmentos del gel que contenían la subunidad fosforilada de la HMG-CoA reductasa, una vez desprovistos de la cubierta de celofán, se incubaron con 0,2 mL de ácido clorhídrico 6 N durante 2 horas a 110°C, en tubos de vidrio Pyrex cerrados al vacío. A continuación se añadían a las muestras 1,5 mL de agua tridestilada y, tras breve centrifugación, los sobrenadantes se evaporaban a sequedad en un evaporador centrífugo. El residuo seco se disolvía en 10 mL de agua tridestilada, a los que se añadían 0,5 mL de una suspensión de una resina de intercambio iónico, del tipo AG 1X8, en su forma de formiato, ajustándose el pH de la suspensión entre 7,5 y 8,5 con NH_4OH , según lo descrito

(332). La suspensión se mantenía en suave agitación durante al menos 6 horas, a temperatura ambiente.

La resina se empaquetaba en forma de columna, que era lavada con 1-2 mL de agua tridestilada. Los fosfoaminoácidos eran eluidos de la misma con un volumen de 1 a 1,5 mL de ácido clorhídrico 0,4 N. El eluido se evaporaba a sequedad y el residuo seco se preparaba para proceder a su análisis por electroforesis en capa fina, según lo descrito en el apartado 2.8.3.

2.7.2.2. Hidrólisis alcalina

El material de partida era exactamente idéntico al descrito en el apartado anterior. En esta ocasión las muestras eran incubadas con 0,2 mL de una disolución de KOH 5 M durante 35 minutos a 135°C. Los aminoácidos se purificaban y trataban como se describe en el apartado anterior, tras lo cual, se preparaban para su análisis electroforético en las condiciones descritas en el apartado 2.8.3.

2.8. TECNICAS ELECTROFORETICAS

2.8.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

Todas las electroforesis en geles de poliacrilamida realizadas en la presente Memoria, lo fueron en su modalidad de placa, siendo el espesor del gel, en todos los casos, de 1 mm.

El sistema utilizado fue el de soluciones amortiguadoras de pH de tipo discontinuo, descrito por Laemmli y col. (333), con ligeras modificaciones.

2.8.1.1. Preparación de los geles

Las soluciones de partida empleadas en la confección del gel eran las siguientes:

Acrilamida 30 % (p/v)-bisacrilamida 0,8 % (p/v)

Tris/HCl 1,5 M pH 8,9

Tris/HCl 0,5 M pH 6,8

SDS 10% (p/v)

Persulfato amónico 10 % (p/v), preparado extemporáneamente.

En primer lugar se procedía a la confección del gel separador, cuya composición era la siguiente: Tris/HCl 375 mM pH 8,9, acrilamida 7,5 %, bisacrilamida 0,2 %, SDS 0,1 %, persulfato amónico 0,05 % y TEMED 0,025 %. Con anterioridad a la adición de los catalizadores de la reacción de polimerización, la mezcla era desgaseada al vacío.

Una vez incorporado el TEMED, la solución se vertía entre dos placas de vidrio, perfectamente selladas con agar caliente al 1,5 % (p/v). Seguidamente se depositaba cuidadosamente sobre la superficie, una capa de 5 mm de alcohol isopropílico, con objeto de que la superficie del gel, una vez polimerizado, fuese rectilínea.

A continuación se preparaba la solución que generaría el gel apilador y cuya composición era la siguiente: Tris/HCl 125 mM pH 6,8, acrilamida 3 %, bisacrilamida 0,08% SDS 0,1 %, persulfato amónico 0,05 % y TEMED 0,025 %.

Una vez eliminados los restos de alcohol isopropílico de la superficie del gel separador, por lavado con la solución anterior exenta de catalizadores, se introducía una matriz formadora de bolsillos hasta 1,5-2 cm por encima de la superficie del gel y se añadía la solución del gel apilador, procurando evitar la formación de burbujas. Cuando concluía la reacción de polimerización, se retiraba la matriz y los bolsillos formados eran lavados por succión con una aguja hipodérmica.

En el caso de no ser utilizado inmediatamente, el gel podía ser almacenado a 4°C, de 1 a 3 días, en una atmósfera saturada de humedad, teniendo la precaución de llenar los bolsillos con la solución del gel apilador, exenta de los catalizadores.

2.8.1.2. Preparación de las muestras

Habitualmente las muestras consistían, bien en

residuos secos, procedentes de evaporación al vacío, o bien en precipitados de TCA. Estas eran disueltas en 25 μ L de una disolución constituida por: Tris/HCl 42 mM pH 6,8, SDS 5 % y 2-mercaptoetanol 5 % (v/v). A esta disolución se añadían 5 μ L de una solución que contenía azul de bromofenol 0,05 % y sacarosa 20 %.

Como sea que en ocasiones las muestras tenían un pH ácido, que se manifestaba por el viraje al amarillo del azul de bromofenol, era necesario añadir entre 2 y 5 μ L de una disolución de Tris/HCl 1,5 M pH 8,9, para restablecer el pH alcalino. Seguidamente las muestras se incubaban a 100°C durante 5 minutos, dejándose atemperar a la temperatura ambiente antes de sembrarlas.

2.8.1.3. Condiciones de la electroforesis

Las muestras eran sembradas en los diferentes bolsillos y en aquellos que no contenían muestra alguna, se depositaban 25 μ L de la solución empleada en la preparación de las mismas. Los bolsillos se llenaban completamente con la solución amortiguadora que se utilizaba para desarrollar la electroforesis y que estaba constituida por: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,2 %, pH 8,3. El proceso se llevaba a cabo en condiciones de intensidad constante, siendo ésta de 15 mA hasta que el frente formado por el azul de bromofenol alcanzaba el límite del gel apilador, momento en el que se elevaba hasta 25 mA. La electroforesis se daba por finalizada cuando el frente del mencionado colorante distaba entre 0,5 y 1 cm del extremo del gel separador.

2.8.1.4. Tinción y secado de los geles

Acabada la electroforesis, el gel era extraído de entre las placas de vidrio y sumergido durante 30 minutos

en una solución constituida por, azul de Coomassie R-250 0,25 % y TCA 50 % (v/v). A continuación se mantenía durante otros 20 minutos en una solución de ácido acético al 7 % (v/v) y finalmente, se procedía a su destinción por inmersión en una solución constituida por ácido acético 7 % (v/v) y alcohol metílico 35 % (v/v), durante varias horas, con repetidas renovaciones de dicha solución.

Una vez desteñidos, los geles se preparaban para su secado, sumergiéndolos en una solución constituida por glicerol 3 % (v/v) y alcohol metílico 50 % (v/v), durante 3-4 horas. Tras ello se colocaban entre dos hojas de papel de celofán y se secaban al vacío con calefacción, en un secador de geles modelo GSD-4, de Pharmacia.

En determinados experimentos en los que el colorante ligado a la banda de proteína de la subunidad de la molécula de reductasa, podía interferir en el posterior tratamiento de la misma, se omitía la etapa de tinción del gel y, lógicamente, también la de destinción, procediéndose únicamente a fijar las proteínas mediante inmersión, durante 30 minutos, en una solución de ácido acético al 7 % (v/v). A continuación el gel se preparaba para su secado, tal como se ha descrito anteriormente.

2.8.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS Y UREA

El método utilizado es el descrito por Burr y Burr (334) para la resolución de oligopéptidos de peso molecular inferior a 10 Kd, empleando también el sistema de soluciones amortiguadoras de pH, de tipo discontinuo y en presencia de urea.

2.8.2.1. Preparación de los geles

Las soluciones de partida empleadas en la confec-

ción del gel eran las siguiente:

Bisacrilamida 2 % (p/v)

Tris/ PO_4H_3 2 M pH 8,0

Tris/ PO_4H_3 1 M pH 6,8

SDS 10 % (p/v)

Persulfato amónico 10 % (p/v), preparado extemporáneamente.

El gel separador tenía la siguiente composición: Tris/ PO_4H_3 340 mM pH 8,0, acrilamida 12,5 %, bisacrilamida 0,11 %, urea 8 M, SDS 0,1 %, persulfato amónico 0,05 % y TEMED 0,05 %. En una primera etapa se disolvían la urea y la acrilamida en la solución de Tris/ PO_4H_3 y bisacrilamida, para lo cual era preciso incubar el recipiente a 37°C, manteniendo una suave agitación hasta la completa disolución de los reactivos sólidos. Seguidamente se añadía el resto de componentes de la disolución.

El gel apilador, cuya composición era la siguiente: Tris/ PO_4H_3 125 mM pH 6,8, acrilamida 5 %, bisacrilamida 0,07 %, urea 8 M, SDS 0,1 %, persulfato amónico 0,05 % y TEMED 0,05 %, se preparaba tomando las mismas precauciones que en el caso anterior.

La preparación de las placas, así como la preparación del gel, se efectuaba de igual manera a como se ha descrito en el apartado anterior (2.8.1.1.). En esta ocasión la distancia comprendida entre el fondo de los bolsillos y el principio del gel separador era de 2,5-3 cm y la longitud del gel separador era de 15-16 cm.

2.8.2.2. Preparación de las muestras

Como en el caso anterior, las muestras eran residuos secos producto de evaporación al vacío. Estos se di-

solvían en un volumen de 40-60 μL de una disolución constituida por, Tris / PO_4H_3 20 mM pH 6,8, urea 8 M, SDS 1 %, 2-mercaptoetanol 0,02 % (v/v) y azul de bromofenol 0,008 %. Cuando la propia muestra ya contenía una cantidad suficiente de urea, como era el caso de ciertas muestras procedentes de la digestión trípica de la reductasa fosforilada, se disolvían en el mínimo volumen posible (100 μL) de la disolución anterior, exenta de urea. Una vez completamente disueltas, se incubaban a 100°C durante 5 minutos, dejándolas atemperar a la temperatura ambiente antes de sembrarlas.

2.8.2.3. Condiciones de la electroforesis

Las muestras eran sembradas en los diferentes bolsillos y en aquellos que no contenían muestra se depositaban 60 μL de la solución amortiguadora que contenía urea 8 M, empleada en la preparación de las mismas. Los bolsillos se llenaban cuidadosamente con la solución amortiguadora empleada en el desarrollo de la electroforesis, cuya composición era: PO_4H_3 /Tris 100 mM pH 6,8, SDS 0,1 %.

El proceso electroforético se efectuaba en condiciones de voltaje constante, siendo éste de 50 voltios. Dadas las características de los fosfopéptidos a separar, la electroforesis se daba por concluida cuando el frente formado por el azul de bromofenol, alcanzaba una distancia equivalente a 2/3 de la longitud total del gel separador. En estas condiciones la duración aproximada de la electroforesis era de 30 horas.

Acabada la electroforesis, el gel era extraído de entre las placas de vidrio y depositado inmediatamente en una bolsa de plástico impermeable, que era herméticamente sellada por calor. En ningún caso el gel fue sometido al proceso de tinción y secado puesto que, dado el reducido tamaño de los oligopéptidos, éstos no permanecían retenidos

en la matriz de poliacrilamida, sino que resultaban eluidos, haciendo imposible su posterior detección.

2.8.3. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE EN CAPA FINA

Esta técnica fue empleada para la separación e identificación de los fosfoaminoácidos resultantes de la hidrólisis parcial de la HMG-CoA reductasa marcada con ^{32}P .

Las muestras, evaporadas a sequedad, se disolvían en 8-10 μL de la solución empleada en la electroforesis, que estaba constituida por, ácido fórmico:ácido acético:agua, 2,5:7,8:89,7 (v/v/v) pH 1,9, a la que se incorporaban como patrones internos, fosfoserina, fosfotirosina y fosfotreonina. Las muestras se aplicaban mediante un tubo capilar, a 2 cm del extremo de una placa de celulosa de 10 x 20 cm (Eastman Kodak 13255), procediéndose a su secado con ayuda de una corriente de aire caliente.

La superficie de la placa se pulverizaba homogéneamente con la solución de electroforesis y ésta se desarrollaba empleando como depósitos de la solución, dos tiras de electrodo de 6 x 10 mm (Pharmacia 19-3664-01), humedecidas en la misma. La separación de los fosfoaminoácidos se conseguía estableciendo una diferencia de potencial de 1.500 voltios, durante 60-80 minutos. En todo momento la temperatura de la placa se mantenía entre 2 y 4°C.

Finalizada la separación, la placa se secaba en estufa a 65°C y se pulverizaba con una solución de ninhidrina al 0,1 %, tras lo cual volvía a secarse en estufa a 65°C, para detectar la posición de los fosfoaminoácidos. Por último, las placas eran sometidas a autorradiografía indirecta tal como se describe en 2.9.2.

2.9. DETECCION DE PROTEINAS RADIOACTIVAS

2.9.1. FLUOROGRAFIA

Esta técnica se empleaba para la detección de las proteínas separadas por electroforesis, cuando éstas estaban marcadas con radioisótopos emisores de partículas de baja energía, como es el caso del ^{14}C , que no podían ser detectadas por la técnica de autorradiografía indirecta.

El proceso consiste esencialmente en impregnar el gel con un compuesto centelleador que transformará la energía de las partículas emitidas, en radiación lumínica, la cual a su vez, es la responsable de impresionar la placa fotográfica adjunta.

El método seguido es el descrito por Hames y Rickwood (335), que a su vez es una adaptación de las técnicas propuestas por Laskey y col. (336,337) y que puede aplicarse tanto a geles sometidos al proceso previo de tinción y destinción, como a geles sometidos simplemente al proceso de fijación de las proteínas.

El gel era sumergido en dimetilsulfóxido durante 30 minutos, siguiendo una segunda inmersión en dimetilsulfóxido nuevo, durante otros 30 minutos. Tras este tratamiento, que tenía por objeto retirar completamente el agua

que contenía el gel, éste era sumergido en una disolución de PPO al 20 % (p/v) en dimetilsulfóxido, por espacio de 3 horas. Finalmente, y con objeto de provocar la precipitación del PPO en el interior de la matriz del gel, éste se mantenía en agua durante una hora, después de lo cual se procedía a su secado, según se describe en el apartado 2.8.1.4. Los geles secos se colocaban en un chasis metálico, hermético a la luz, en estrecho contacto con una película autorradiográfica tipo MAFE RP-X1, expuesta previamente a un destello luminoso, de duración igual o inferior a 1 milisegundo, emitido por un flash electrónico modelo Vivitar 283, situado a unos 60-70 cm de la película, y provisto de un filtro constituido por los siguientes componentes: un primer filtro absorbente de radiación infrarroja, un segundo filtro tipo "deep orange" kodak Wratten nº 22 y, finalmente, una lámina de papel poroso, tipo Whatman nº 1. Los resultados de este tratamiento se consideran óptimos cuando la absorbancia de la película, medida a 540 nm, antes y después de la pre-exposición se incrementa en 0,2 unidades.

Con este tratamiento se incrementa considerablemente la sensibilidad del método de detección, a la vez que se consigue establecer una relación de proporcionalidad entre la absorbancia de la imagen fluorográfica y la radioactividad de la muestra.

Una vez cerrado el chasis, se colocaba a -80°C y una vez transcurrido el tiempo de exposición adecuado, la película impresionada era revelada manualmente, de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante.

2.9.2. AUTORRADIOGRAFIA INDIRECTA

La técnica de autorradiografía indirecta fue la técnica de elección para la localización de las proteínas, péptidos, o aminoácidos, marcados con ortofosfato radioac-

tivo, por su alta sensibilidad.

Los geles secos o contenidos en bolsas de plástico impermeable, en el caso de geles húmedos, se colocaban en un chasis metálico, hermético a la luz, dotado de dos pantallas intensificadoras (Micron R o Dupont H-Plus). Entre ambas se colocaba el gel en estrecho contacto con una película autorradiográfica, tipo MAFE RP-X1. El chasis se colocaba a -80°C , con objeto de obtener una respuesta lineal, y una vez transcurrido el tiempo de exposición necesario, dependiendo de la radioactividad existente en el gel, la película impresionada era revelada manualmente.

2.10. INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA POR 5'-p-FLUOROSULFONILBENZOILADENOSINA

La mezcla de reacción estaba compuesta por 20 μ L de la preparación de reductasa quinasa y 20 μ L de una disolución constituida por, barbiturato sódico 40 mM pH 7,4, 5'-FSBA 500 mM, DMF 10 % (v/v), incubándose a 25°C.

Transcurridos los distintos tiempos de incubación, se tomaban alícuotas de 5 μ L que eran convenientemente diluidas con la disolución amortiguadora compuesta por, Tris/HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, albúmina 0,2 mg/mL, DTT 5 mM y PMSF 1 mM (estos dos últimos componentes se añadían extemporáneamente), con objeto de que la determinación de la actividad reductasa quinasa residual, realizada como en el apartado 2.4.4., se efectuase en condiciones óptimas de medida.

En aquellos experimentos en los que se estudiaba el efecto protector sobre la inactivación por 5'-FSBA, producido por diversos compuestos, éstos se incorporaban a la disolución que contenía el análogo de los nucleótidos de adenina, en cantidad suficiente para alcanzar la concentración final deseada en el ensayo.

La disolución que contenía 5'-FSBA debía prepa-

rarse extemporáneamente, a partir del producto sólido, de acuerdo con la siguiente secuencia de operaciones. Tras pesar la cantidad adecuada del reactivo en cuestión, éste se disolvía en DMF 100 % (v/v) obteniéndose una solución, que a su vez era convenientemente diluída con el volumen adecuado de una solución de barbiturato sódico 40 mM pH 7,4, para alcanzar las concentraciones finales deseadas de 5'-FSBA y DMF, expuestas con anterioridad.

Paralelamente, en todos los experimentos se incubaba una mezcla control, que contenía todos los componentes, excepto 5'-FSBA, con objeto de estudiar el efecto producido sobre la actividad reductasa quinasa, durante el tiempo de incubación.

2.11. INCORPORACION DE 5'-p-[ADENINA-8-¹⁴C]SULFONILBENZOIL ADENOSINA

Cada una de las mezclas de reacción estaba constituida por una alícuota de la preparación de reductasa quinasa (75 μ L) y un volumen equivalente de una disolución constituida por, barbiturato sódico 40 mM pH 7,4, 5'-p-[adenina-8-¹⁴C]FSO₂BzAdo (45,1 mCi/mmol) 500 mM, DMF 10 % (v/v), incubándose a 25°C durante el tiempo deseado. Transcurrido el tiempo fijado, la reacción se detenía añadiendo el mismo volumen de una solución de TCA al 20 % (p/v), fría.

La precipitación de las proteínas se favorecía colocando los tubos de reacción en un baño de hielo, en el que se dejaban reposar durante 15 minutos. A continuación se centrifugaban a 12,800 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes eran desechados y los precipitados eran lavados con 300 μ L de éter etílico, para arrastrar los restos de TCA que podían quedar impregnándolos. Las diferentes muestras obtenidas se sometían a electroforesis, en las condiciones descritas en el apartado 2.8.1.

Una vez finalizada la separación electroforética de las proteínas, el gel, sometido a tinción y destinción o simplemente al proceso de fijación de las proteínas en él contenidas, se trataba según la metodología descrita en el

apartado 2.9.1., con objeto de obtener una película con la imagen fluorográfica de aquellas proteínas marcadas con el compuesto radioactivo. La radioactividad asociada a la banda de proteína estudiada, se cuantificaba recortando el fragmento del gel que la contenía e introduciéndolo directamente en un vial de vidrio para contaje de centelleo líquido.

El compuesto 5'-p-[adenina-8-¹⁴C]FSBA se nos suministraba disuelto en una mezcla de etanol:agua, 95:5 (v/v). La disolución que contenía 5'-p-[adenina-8-¹⁴C]FSBA para el ensayo descrito, se preparaba extemporáneamente, de manera análoga a lo expuesto en el apartado 2.10., con la salvedad de que previamente era preciso evaporar el volumen de disolvente que contenía la cantidad requerida del análogo radioactivo. Esta operación se llevaba a cabo en corriente de nitrógeno y sin sobrepasar nunca la temperatura de 25°C.