



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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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

### **3. RESULTADOS**

### 3.1. PURIFICACION DE HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL DE HIGADO DE RATA

#### 3.1.1. OBTENCION DEL CITOSOL

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y seguidamente se les extrajo el hígado, que fue inmediatamente homogenizado a la temperatura de 4°C, en un homogenizador "Potter-Elvehjem" provisto de un pistilo de teflón, con 3 mL por gramo de hígado, de la siguiente solución amortiguadora: Tris/HCl 50 mM pH 7,5, sacarosa 500 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, pirofosfato sódico 3 mM, DTT 5 mM, PMSF 0,5 mM y benzamidina 1 mM. En todas las soluciones amortiguadoras en que se hallaban presentes, el DTT, el PMSF y la benzamidina fueron incorporados extemporáneamente. Los compuestos NaF y pirofosfato sódico, conocidos inhibidores de proteína fosfatasas, se añadieron con objeto de prevenir la posible desfosforilación e inactivación de la reductasa quinasa, mediada por fosfatasas de origen citosólico (139,167,172). El homogenado obtenido se centrifugó a 15.000 x g durante 30 minutos, recuperándose el sobrenadante.

El empleo de una disolución amortiguadora con una elevada concentración de sacarosa, 500 mM, en una proporción 1:3 (p/v), suministraba un medio de homogenización hi-



pertónico que impedía la ruptura de las vesículas lisosomales y permitía su posterior eliminación por centrifugación a 15.000 x g durante 30 minutos (74). De esta forma se prevenía la liberación de las enzimas proteolíticas contenidas en dichas vesículas lisosomales y su consiguiente acción sobre la reductasa quinasa.

El sobrenadante anterior se ultracentrifugó a 105.000 x g durante 90 minutos. El precipitado, constituido por los sedimentos microsomales, tratado como se describirá más adelante, constituyó la fuente de HMG-CoA reductasa quinasa microsomal, mientras que el sobrenadante fue la fuente enzimática utilizada para la purificación de la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C, a lo largo de todo el proceso de purificación.

### 3.1.2. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

La fracción citosólica se introdujo en una columna de DEAE-celulosa (4,5 x 15 cm), la cual había sido previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora en la que se hallaba disuelta la muestra, pero en esta ocasión exenta de sacarosa y adicionada de glicerol 10 % (v/v). A continuación la columna fue lavada con la misma disolución, (aproximadamente 900 mL), hasta que la absorbancia a 280 nm retornaba a la línea de base. La velocidad de flujo de la columna fue de 100 mL/h y se recogieron fracciones de 10 mL, en un colector "Redirac" de LKB. La columna fue eluída con un gradiente lineal de 700 mL entre 0 y 500 mM NaCl, a la misma velocidad, recogién dose fracciones de 10 mL.

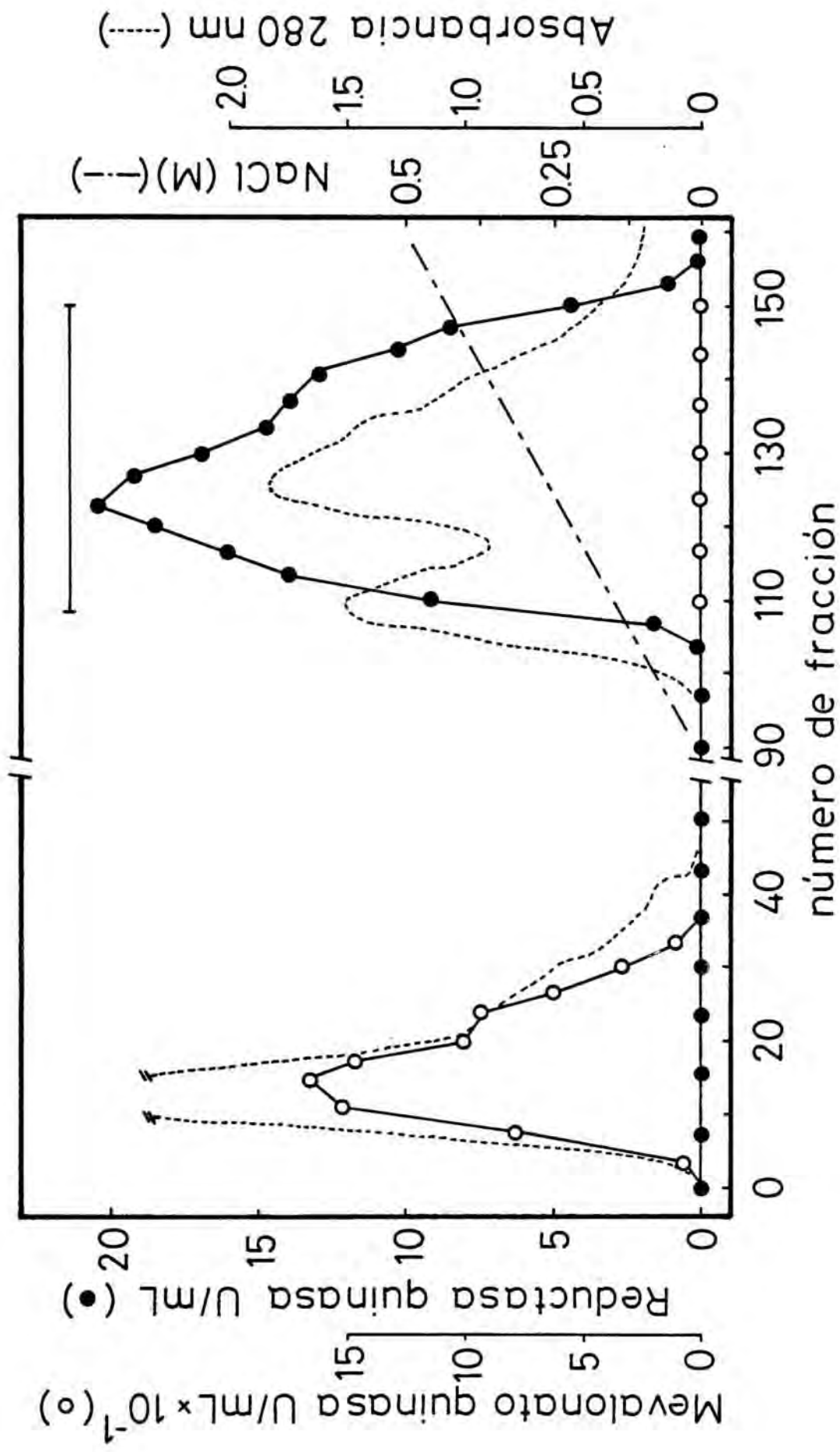
El perfil de elución se ha representado en la figura 1, en la que se observa como la actividad reductasa quinasa queda retenida por la DEAE-celulosa, eluyendo en un único pico a 130 mM NaCl, mientras que la actividad me-

FIGURA 1 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA DEL CITOSOL DE HIGADO DE RATA

La figura muestra los perfiles de elución de las actividades de HMG-CoA reductasa quinasa (●) y de mevalonato quinasa (○).

En la fracción 90 se aplicó un gradiente lineal de 700 mL totales entre 0 y 500 mM NaCl (---). Se recogieron fracciones de 10 mL. La proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm (-----).

La actividad de mevalonato quinasa eluye en el volumen vacío de la columna, mientras que la actividad de reductasa quinasa lo hace a una concentración 130 mM NaCl. La línea horizontal delimita las fracciones que fueron seleccionadas para su posterior concentración.



valonato quinasa no lo es, eluyendo en el volumen vacío. De esta forma se separan las dos actividades enzimáticas que coexistían en el citosol.

Las fracciones con actividad reductasa quinasa fueron reunidas y concentradas por adición de sulfato amónico sólido hasta alcanzar el 50 % de saturación (313 g/L). Transcurridos 30 minutos, los precipitados fueron recogidos por centrifugación (15.000 x g, 20 min.), despreciándose los sobrenadantes. Los precipitados se resuspendieron en el mínimo volumen posible de la solución amortiguadora 1 compuesta por: Tris/HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, pirofosfato sódico 3 mM, DTT 5 mM, PMSF 0,5 mM, benzamidina 1 mM y glicerol 10 % (v/v) y se dializaron extensivamente durante toda la noche, con dos cambios de la solución 1.

### 3.1.3. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AFFI-GEL BLUE

La siguiente etapa de purificación fue una cromatografía en columna, empleando como fase sólida Affi-Gel Blue (3,5 x 8 cm), previamente equilibrada con la misma disolución 1.

La preparación anterior se introdujo en la columna, lavándose a continuación con la misma disolución 1 adicionada de 500 mM NaCl, hasta que dejó de eluir proteína (aproximadamente 400 mL). Seguidamente se aplicó un gradiente lineal de 500 mL totales entre 0,5 y 2 M NaCl. El flujo de elución de la columna fue de 70 mL/h y se recogieron fracciones de 5 mL, en las que se determinó actividad de reductasa quinasa, la cual eluye en forma de un único pico a 0,95 M NaCl, como puede observarse en la figura 2.

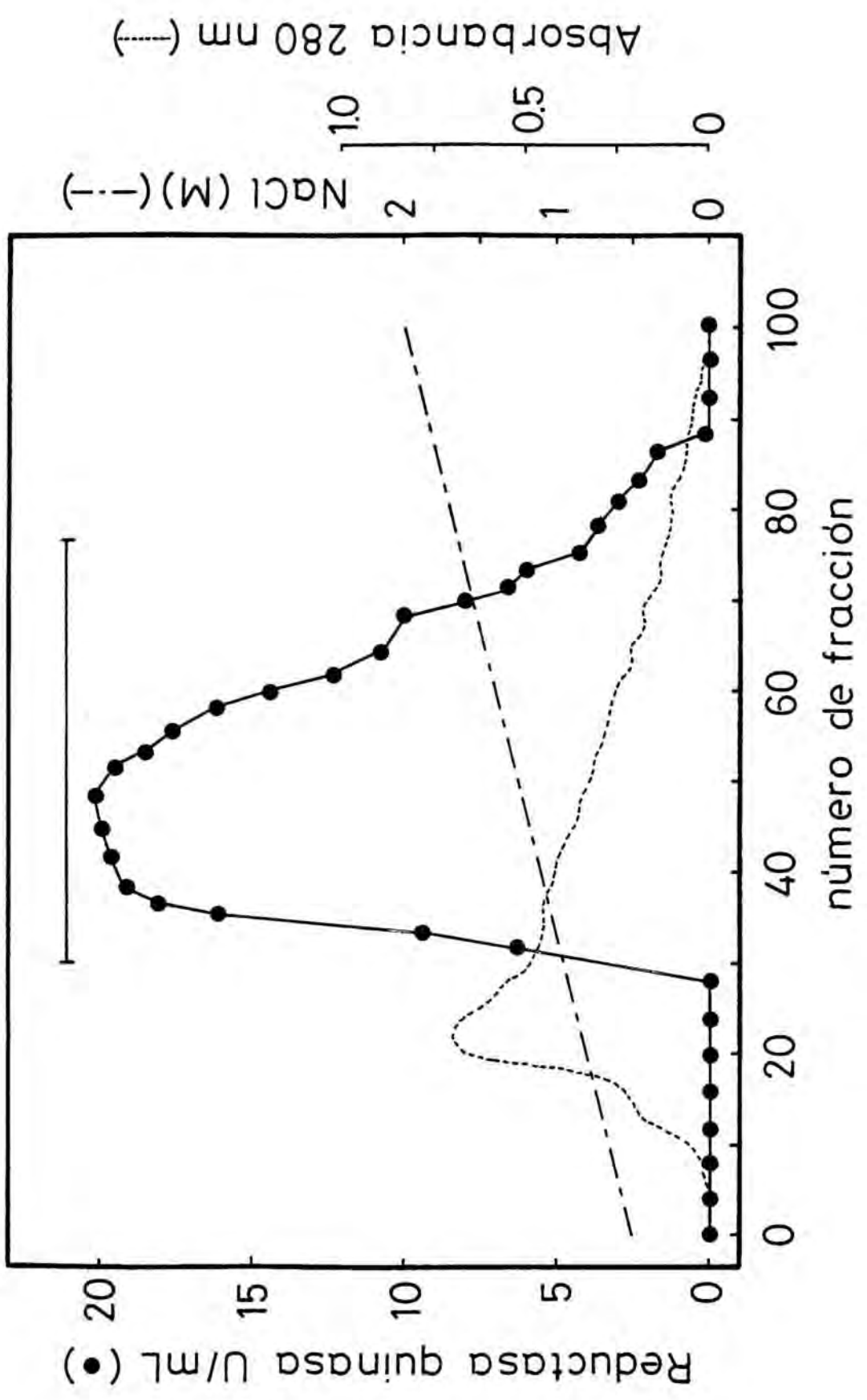
Se reunieron aquellas fracciones con actividad de reductasa quinasa y se concentraron por precipitación con

FIGURA 2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AFFI-GEL BLUE DE LA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL

La figura muestra el perfil de elución de la actividad de HMG-CoA reductasa quinasa (●).

En la fracción 1 se aplicó un gradiente lineal de 500 mL totales entre 0,5 y 2 M NaCl (---). Se recogieron fracciones de 5 mL. La proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm (-----).

La reductasa quinasa eluye a una concentración 0,95 M de NaCl. La línea horizontal indica las fracciones que se recogieron para su posterior concentración.



sufato amónico sólido al 50 % de saturación, como en la etapa anterior. El precipitado proteico, resuspendido en el mínimo volumen posible de solución amortiguadora 1, se dializó con un cambio de la misma solución, durante el tiempo mínimo necesario para conseguir la total redisolución de la proteína (alrededor de 3 horas).

#### 3.1.4. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION MOLECULAR EN GEL A TRAVES DE ULTROGEL AcA 34

Una alícuota de la preparación de reductasa quinasa fue cromatografiada en una columna de Ultrogel AcA 34, mientras que el resto de la preparación se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Se cromatografiaron un máximo de 2 mL de la preparación descrita, a través de una columna de Ultrogel AcA 34 (1,5 x 95 cm), equilibrada con la solución amortiguadora 1, a una velocidad de flujo de 12 mL/h, recogiendo fracciones de 2 mL.

Como se puede apreciar en la figura 3, la reductasa quinasa eluye como una única forma molecular cuyo peso molecular aparente es de 210 Kd. La columna de Ultrogel AcA 34 fue calibrada con las siguientes proteínas marcadoras: Catalasa de hígado de buey (240 Kd), aldolasa de músculo de conejo (158 Kd), alcohol deshidrogenasa de levadura (148 Kd) y ovoalbúmina (45 Kd).

Las fracciones con actividad reductasa quinasa fueron reunidas y concentradas por ultrafiltración hasta un volumen de 1-1,5 mL, utilizando una célula Amicon equipada con una membrana filtrante PM-10. La preparación obtenida se guardó congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , manteniéndose estable durante al menos, 6 meses.

En aquellas ocasiones en las que se avanzó más en

FIGURA 3 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION MOLECULAR EN GEL A TRAVES DE ULTROGEL AcA 34 DE LA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL

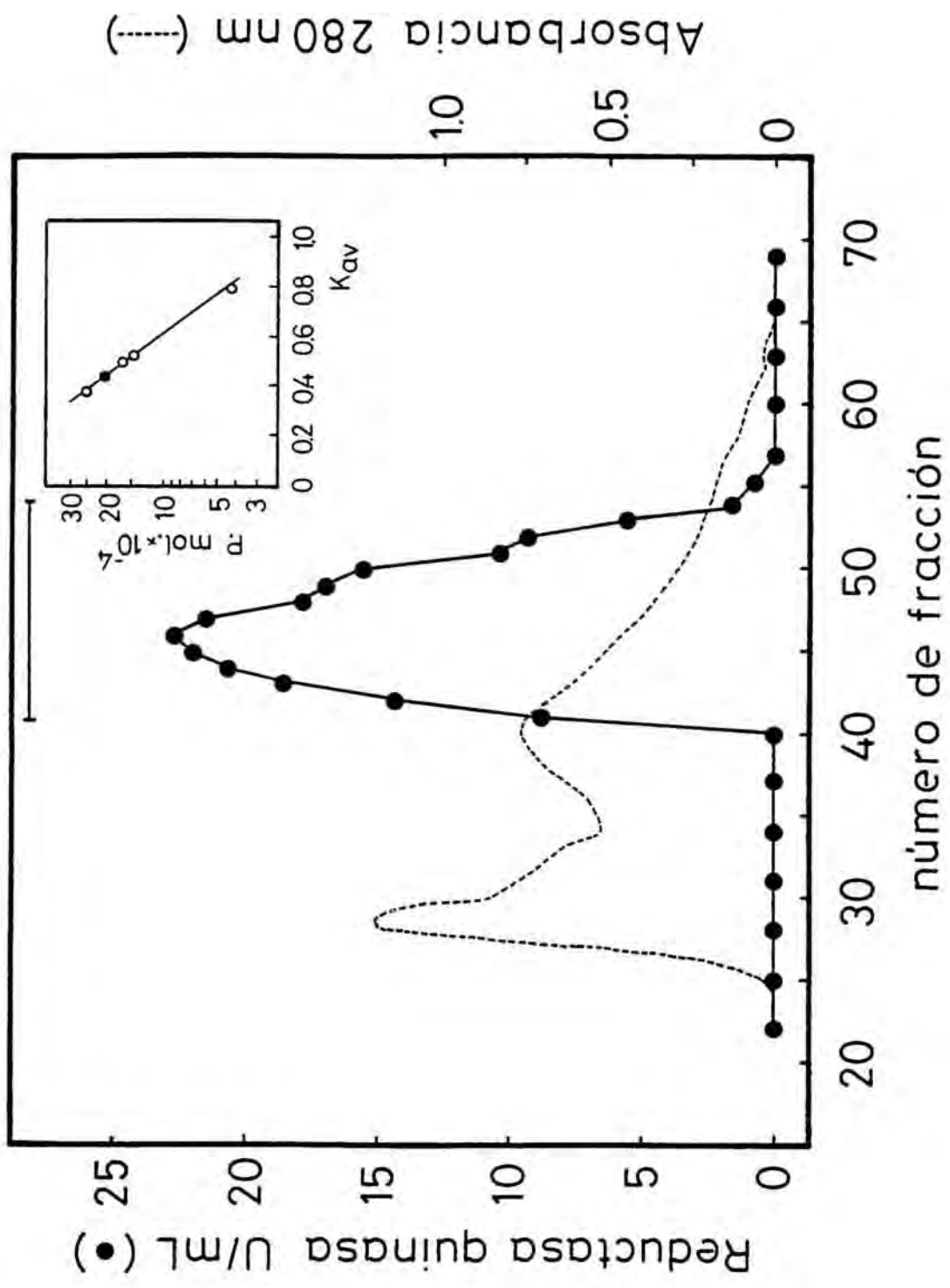
La figura muestra el perfil de elución de la actividad de reductasa quinasa (●) a través de una columna de Ultrogel AcA 34, cuando se aplicaron 2 mL de la preparación concentrada, obtenida de la cromatografía de Affi-Gel Blue.

Se recogieron fracciones de 2 mL. La proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm (-----).

El peso molecular aparente fue calculado comparando el volumen de elución de la reductasa quinasa (●) con los de las proteínas marcadoras enumeradas en el texto (○), que permitieron elaborar la recta de calibración representada en el recuadro.

$K_{av}$  se define como la relación  $(V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ , siendo  $V_e$  el volumen de elución de cada proteína,  $V_0$  el volumen vacío de la columna y  $V_t$  el volumen de lecho de la columna.





el proceso de purificación, las fracciones con actividad quinasa procedentes de la cromatografía descrita se concentraron por el mismo método, pero hasta un volumen de 10 mL.

### 3.1.5. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

La preparación de reductasa quinasa de citosol fue sometida a una segunda cromatografía a través de una columna de DEAE-celulosa (1,5 x 4,5 cm), equilibrada como en los casos anteriores, con solución amortiguadora 1. Una vez aplicada la muestra, la columna fue lavada con la misma solución amortiguadora hasta que no se detectó proteína en los líquidos de lavado (100 mL). A continuación se estableció un gradiente lineal de 80 mL totales entre 0 y 500 mM NaCl. En todo momento la velocidad de flujo de la columna fue de 30 mL/h, recogiendo fracciones de 2 mL en las que, tras determinar actividad de reductasa quinasa, se comprobó que ésta quedaba retenida en la columna, eluyendo posteriormente en forma de un único pico a 130 mM NaCl, como puede observarse en la figura 4.

Las fracciones que contenían actividad de reductasa quinasa, después de ser reunidas, fueron concentradas por ultrafiltración hasta un volumen de 5-7 mL. La concentración de NaCl fue reducida hasta aproximadamente 25 mM, por dilución repetida (2 veces) con solución amortiguadora 1 exenta de NaCl, seguida de posterior concentración hasta el mismo volumen final. Todas estas operaciones se efectuaron en una célula Amicon provista de una membrana filtrante PM-10.

### 3.1.6. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE ATP-HEXANO-AGAROSA

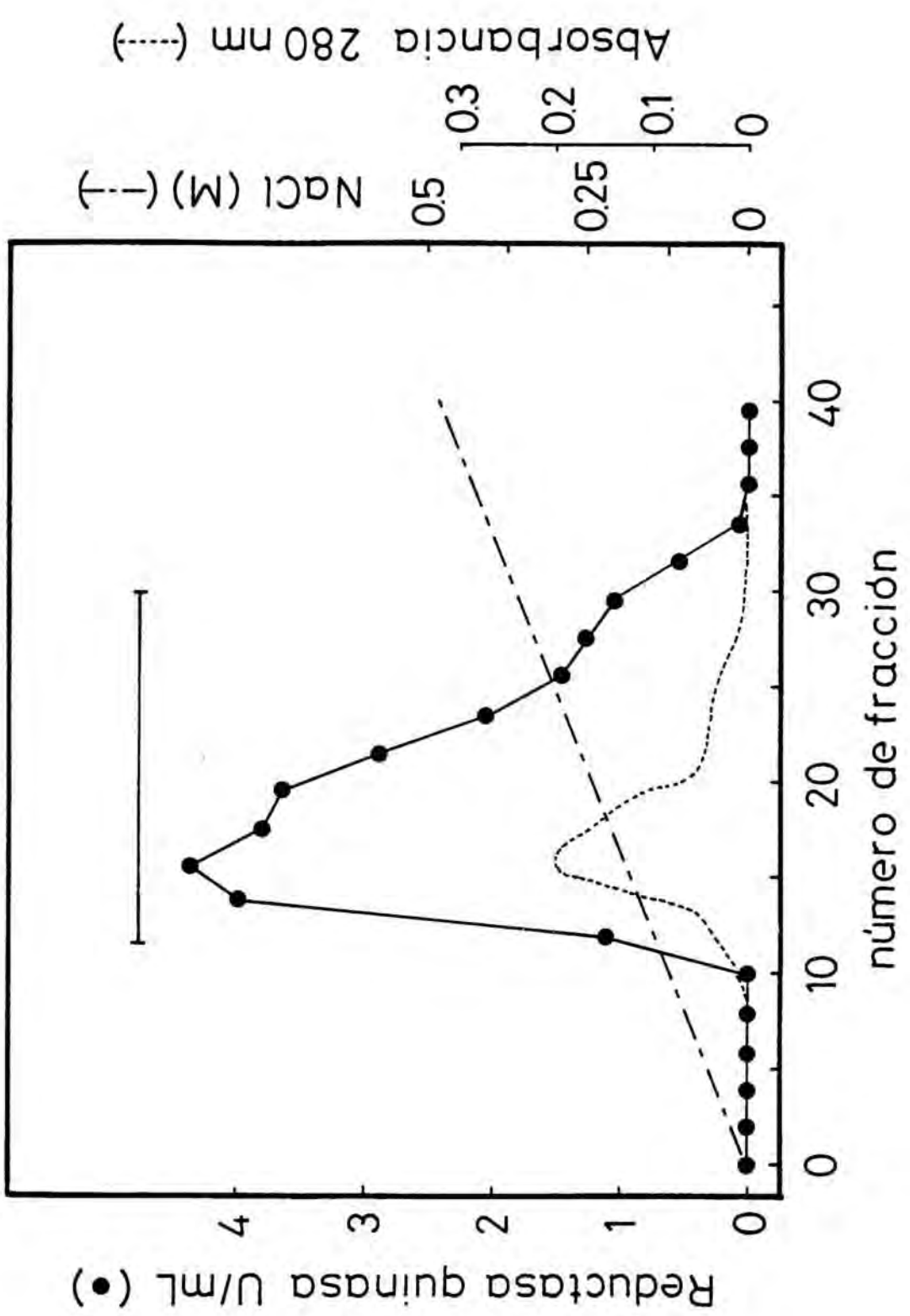
La fracción procedente de la anterior etapa de

FIGURA 4 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA DE LA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL

La figura muestra el perfil de elución de la actividad de reductasa quinasa (●).

En la fracción 1 se aplicó un gradiente lineal de 80 mL totales entre 0 y 500 mM NaCl (---→). Se recogieron fracciones de 2 mL y la proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm (-----).

La reductasa quinasa eluye a una concentración 130 mM NaCl. La línea horizontal indica las fracciones que se recogieron para su posterior concentración.



purificación, convenientemente desalada, fue introducida en una columna que contenía como fase sólida ATP-hexano-agarosa (1,5 x 2,5 cm), equilibrada con solución amortiguadora 1. Después de aplicar la muestra, la columna se lavó con 25-30 mL de la solución de equilibrado, para después aplicar un gradiente lineal de 80 mL totales entre 0 y 400 mM NaCl. La velocidad de flujo fue de 20 mL/h y el volumen de las fracciones recogidas de 2 mL.

Como se puede observar en la figura 5, la actividad de reductasa quinasa eluye en forma de un único pico, a una concentración de 100 mM NaCl. Se reunieron las fracciones más activas y se concentraron por ultrafiltración hasta un volumen de 1-1,5 mL, después de reducir la concentración de NaCl por debajo de 25 mM, por dilución repetida con solución amortiguadora 1, como en la etapa anterior. La preparación final de reductasa quinasa de citosol, una vez repartida en alícuotas, se guardó congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , manteniéndose estable como mínimo, durante 6 meses.

En la tabla I se resumen los resultados globales del proceso de purificación de la reductasa quinasa de citosol de hígado de rata. La reductasa quinasa no está purificada a homogeneidad, puesto que se observan algunas bandas contaminantes, cuando la preparación se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (2.8.1.).

FIGURA 5 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE ATP-HEXANO-AGAROSA DE LA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL

La figura muestra el perfil de elución de la actividad de HMG-CoA reductasa quinasa (●).

En la fracción 20 se aplicó un gradiente lineal de 80 mL totales entre 0 y 400 mM NaCl (---). Se recogieron fracciones de 2 mL. La proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm (-----).

La reductasa quinasa eluye a una concentración 100 mM NaCl. La línea horizontal indica las fracciones que se recogieron para su posterior concentración.

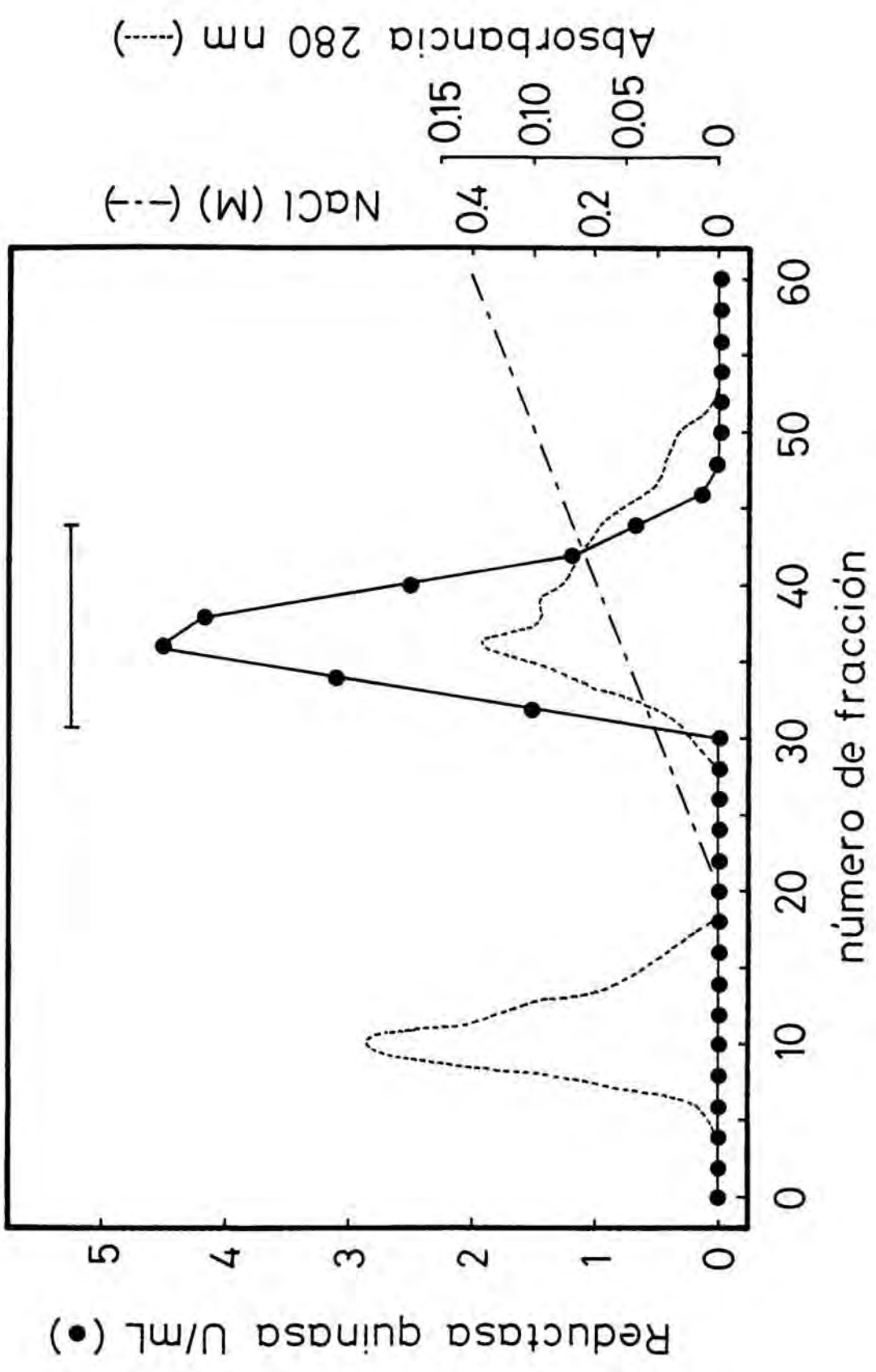


TABLA I PURIFICACION DE HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE  
CITOSOL DE HIGADO DE RATA

Los resultados presentados corresponden a una purificación en la que se partió de 115 gramos de hígado de rata.

Los valores de las preparaciones obtenidas en la cromatografía de filtración molecular por gel y en etapas sucesivas, están corregidos como si la totalidad de la muestra obtenida en la cromatografía en columna de Affi-Gel Blue hubiese sido empleada para purificar la reductasa quinasa.

La actividad de la reductasa quinasa se determinó empleando HMG-CoA reductasa microsomal como sustrato, tal como se describe en el apartado 2.4.3. de Métodos.



Fracción	HMG-CoA reductasa quinasa	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Citosol	9672	7125	1,3	1	100
DEAE-celulosa	5187	631	8,2	6	54
Affi-Gel Blue	2980	147	20,3	15	31
Ultroge1 Aca 34	1986	26	76,4	56	20,5
DEAE-celulosa	968	8	121	89	10
ATP-hexano-agarosa	242	1,6	151	111	2,5

### 3.2. PURIFICACION DE HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

La existencia de una actividad HMG-CoA reductasa quinasa asociada a la fracción microsomal del hígado de rata, fue sugerida por primera vez por Beg y col. en 1973 (125). Gibson e Ingebritsen (184) propusieron como técnica para su total extracción, el lavado de los microsomas por tres veces consecutivas, con solución amortiguadora adicionada de NaCl 250 mM.

#### 3.2.1. OBTENCION DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

Los sedimentos de microsomas de hígado de rata se obtuvieron tal como se explica en el apartado 3.1.1. Para asegurar la procedencia microsomal de la reductasa quinasa se procedió a separar el precipitado de glucógeno, dejando deslizar por gravedad el precipitado microsomal, por las paredes de los tubos en que se había obtenido.

Con objeto de eliminar los restos de citosol que quedaban impregnando a los microsomas, éstos se resuspendieron con la siguiente disolución amortiguadora: Tris/HCl 50 mM pH 7,5, sacarosa 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, pirofosfato sódico 3 mM, DTT 5 mM, PMSF 0,5 mM y

benzamidina 1 mM, en una proporción de 1:2 (p/v) y se centrifugaron a 105.000 x g durante 60 minutos. De nuevo el NaF y el pirofosfato sódico se añadieron para bloquear la acción de las fosfatasas microsomales sobre la HMG-CoA reductasa quinasa (139). Una vez lavados los sedimentos microsomales, se repitió la operación de separación del pequeño precipitado de glucógeno acompañante.

Los microsomas obtenidos en estas condiciones estaban exentos de contaminación por citosol, membrana plasmática o glucógeno (181) y constituyeron la fuente enzimática de partida utilizada para la purificación de la HMG-CoA reductasa quinasa de microsomas. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C, durante el proceso de purificación.

### 3.2.2. EXTRACCION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE MICROSOMAS

Los precipitados de microsomas obtenidos según se describe en el apartado anterior, fueron resuspendidos en una proporción de 2 mL por cada gramo de hígado de partida, de la solución amortiguadora compuesta por, Tris/HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 250 mM, NaF 50 mM, pirofosfato sódico 3 mM, DTT 5 mM, PMSF 0,5 mM, benzamidina 1 mM y glicerol 10 % v/v. En esta operación se empleó un homogenizador manual de vidrio con pistilo del mismo material. El homogenado obtenido, tras permanecer 15 minutos a 4°C, fue centrifugado a 105.000 x g durante 90 minutos. El sobrenadante fue recuperado, constituyendo el primer extracto, y el precipitado de microsomas fue sometido de nuevo al mismo tratamiento.

En la tabla II se muestran las actividades de reductasa quinasa de los microsomas de partida y de cada uno de los cinco extractos obtenidos, expresadas en actividad

TABLA II EXTRACCION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE MICROSOMAS

Los precipitados de microsomas obtenidos a partir de 36 gramos de hígado de rata (3 ratas), fueron sometidos a extracción por cinco veces consecutivas, en las condiciones descritas en el texto (3.2.2.).

Se determinó la actividad de reductasa quinasa y la concentración de proteína en los microsomas de partida y en los cinco extractos obtenidos.

La actividad de reductasa quinasa se midió empleando HMG-CoA reductasa microsomal como sustrato.

Fracción	HMG-CoA reductasa quinasa (unidades)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Microsomas	322	526	0,61	100
Extracto 1	127	42	3	39,5
Extracto 2	67,5	21	3,2	21
Extracto 3	16	12,5	1,3	5
Extracto 4	3	6	0,5	0,9
Extracto 5	1,5	4,8	0,31	0,45

absoluta y actividad específica. Se observa como a partir del tercer extracto, el porcentaje de reductasa quinasa recuperada es muy bajo, a la vez que la actividad específica de la muestra obtenida es sensiblemente inferior a la de las precedentes. En consecuencia, se optó por limitar a tres el número de extractos que se obtendrían para iniciar el proceso habitual de purificación de la enzima.

Merece la pena destacar que en ningún caso se consiguió extraer más del 70-75 % de la actividad enzimática presente en la fracción microsomal de partida, ni siquiera incrementando la concentración de NaCl presente en la solución amortiguadora hasta 800 mM. Es de señalar que en las mencionadas muestras también se midió actividad HMG-CoA reductasa, siendo ésta nula, por lo cual no se podía esperar ninguna interferencia en las determinaciones de actividad reductasa quinasa, durante el proceso de purificación.

El empleo de la técnica de solubilización utilizada en la purificación de la HMG-CoA reductasa (2.3.2.2.), proporcionó resultados análogos en lo relativo al porcentaje de actividad reductasa quinasa extraída, con la contrapartida de resultar en una considerable solubilización de HMG-CoA reductasa, así como de proteínas en general. Por estas razones la técnica fue desestimada.

En el proceso habitual de purificación, los tres extractos solubles fueron reunidos y concentrados por adición de sulfato amónico sólido, hasta alcanzar un 50 % de saturación. Transcurridos 30 minutos, los precipitados fueron recogidos por centrifugación ( $15.000 \times g$ , 20 min.), despreciándose los sobrenadantes. Los precipitados proteicos se resuspendieron en el mínimo volumen posible de solución amortiguadora 1, dializándose extensivamente durante toda la noche con dos cambios de la solución 1.

### 3.2.3. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AFFI-GEL BLUE

La muestra anterior se aplicó a una columna de Affi-Gel Blue (3,5 x 8 cm), previamente equilibrada con solución amortiguadora 1, lavándose a continuación con la misma disolución adicionada de NaCl 500 mM, hasta que no eluyó proteína (400 mL). A continuación se aplicó un gradiente lineal de 500 mL totales entre 0,5 y 2 M NaCl, siendo el flujo de elución de la columna de 70 mL/h y recogién-dose fracciones de 5 mL, en las que se determinó actividad de reductasa quinasa, la cual eluye en forma de un único pico a 1 M NaCl, como se observa en la figura 6.

Las fracciones con actividad reductasa quinasa fueron reunidas y se concentraron por precipitación con sulfato amónico sólido al 50 % de saturación. El precipitado obtenido, tras ser resuspendido en el mínimo volumen de solución amortiguadora 1, se dializó extensivamente con dos cambios de dicha solución.

### 3.2.4. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

La preparación de reductasa quinasa se introdujo en una columna de DEAE-celulosa (1,5 x 4 cm) equilibrada con la solución habitual. La columna fue lavada con la misma solución hasta que no se detectó proteína en los líquidos de lavado (100 mL). Seguidamente se estableció un gradiente lineal de 80 mL totales entre 0 y 500 mM NaCl, manteniéndose la velocidad de flujo en 30 mL/h. Se recogieron fracciones de 2 mL y en ellas se midió actividad de reductasa quinasa, la cual eluye como un único pico a 130 mM NaCl, como se aprecia en la figura 7.

Aquellas fracciones que contenían actividad de reductasa quinasa se reunieron y fueron concentradas por adición de sulfato amónico, como en casos anteriores. El

FIGURA 6 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AFFI-GEL BLUE DE LA REDUCTASA QUINASA DE MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

La figura muestra el perfil de elución de la actividad de HMG-CoA reductasa quinasa (▲).

En la fracción 1 se aplicó un gradiente lineal de 500 mL totales entre 0,5 y 2 M NaCl (---). Se recogieron fracciones de 5 mL. La proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm (-----).

La reductasa quinasa eluye a una concentración 1 M NaCl. La línea horizontal señala aquellas fracciones que fueron recogidas para su posterior concentración.



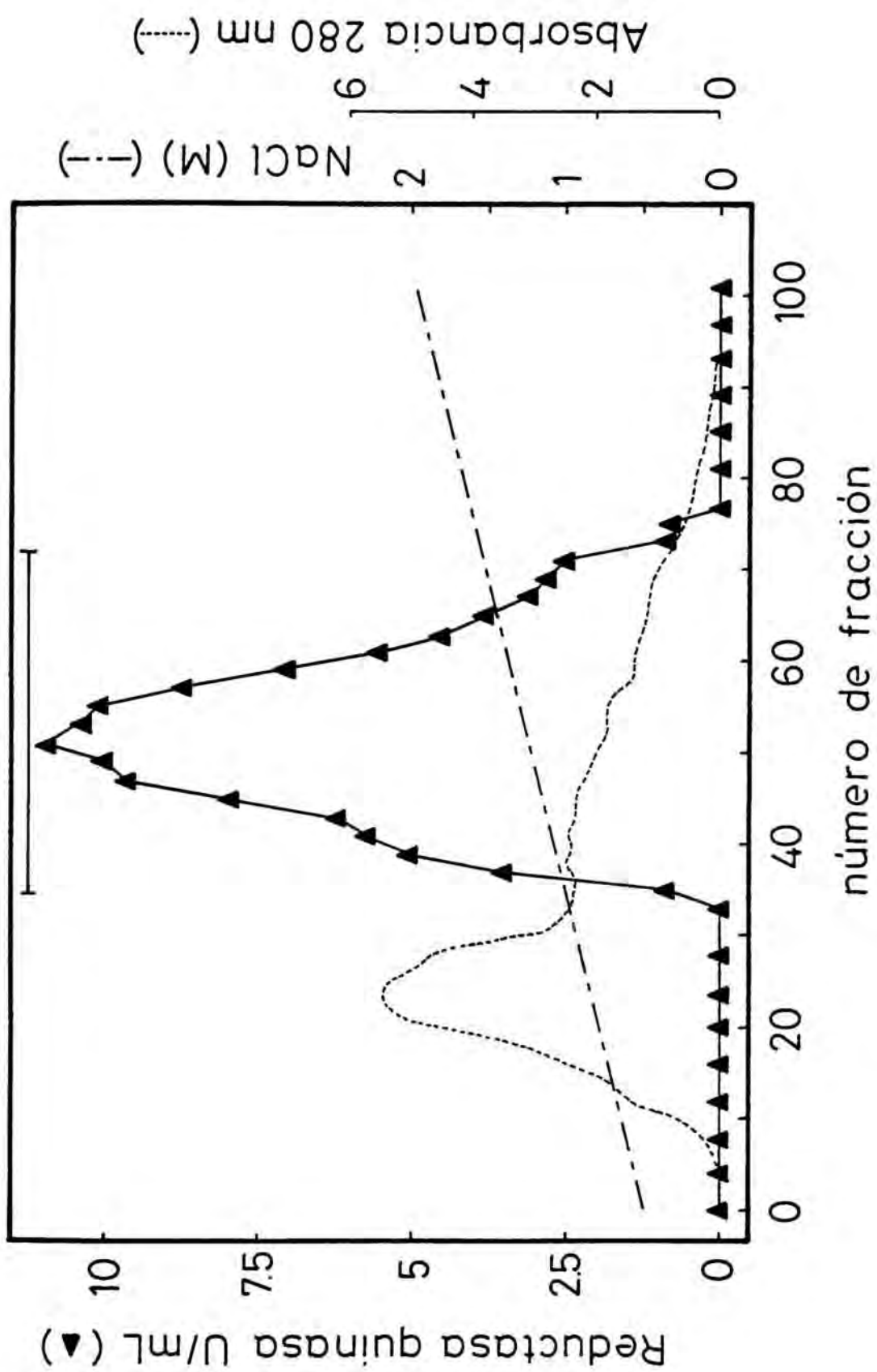
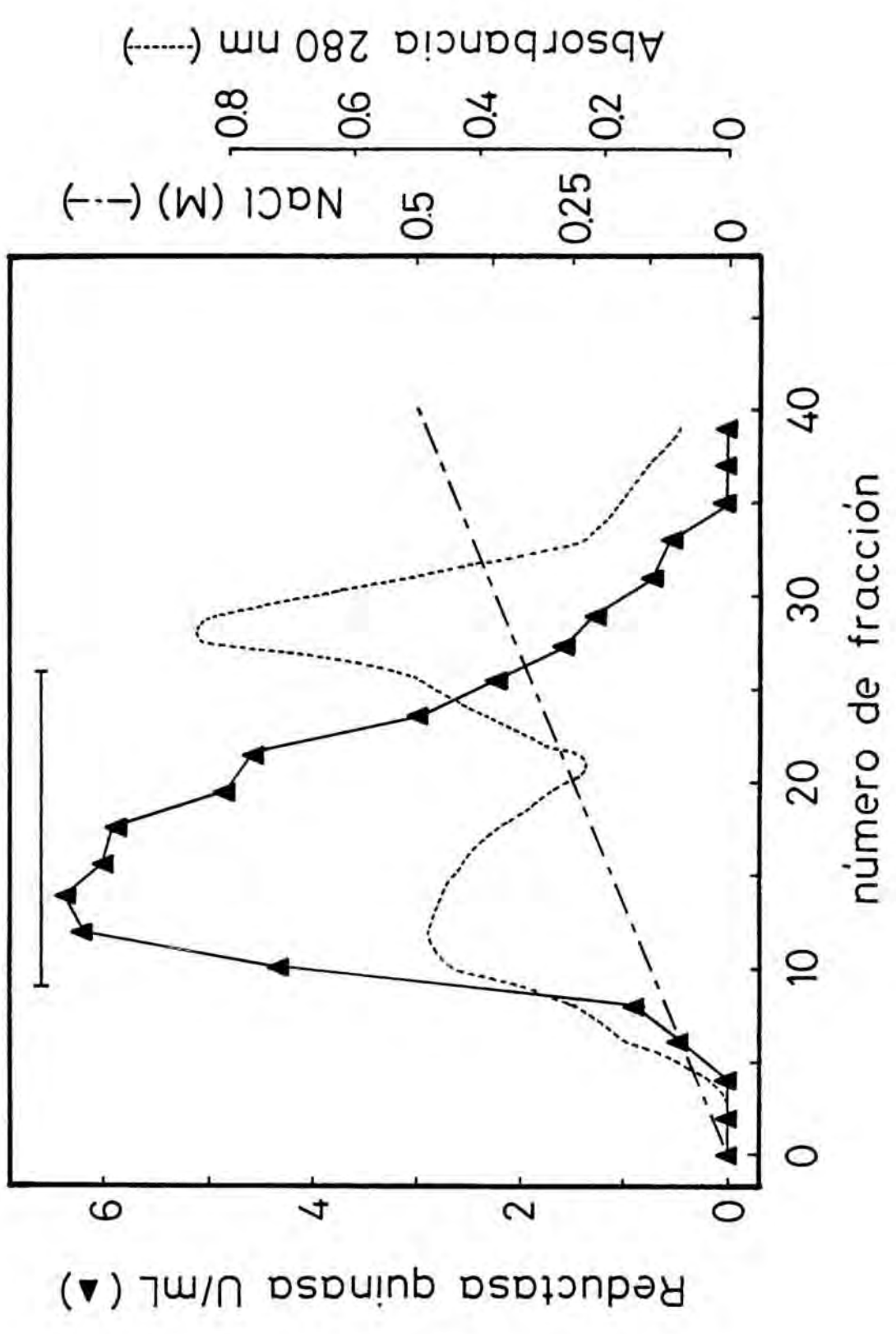


FIGURA 7 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA DE LA REDUCTASA QUINASA DE MICROSOMAS

La figura muestra el perfil de elución de la actividad de reductasa quinasa (▲).

En la fracción 1 se aplicó un gradiente de 80 mL totales entre 0 y 500 mM NaCl (---). Se recogieron fracciones de 2 mL. La proteína se determinó midiéndose su absorbancia a 280 nm (-----).

La reductasa quinasa eluye a una concentración 130 mM NaCl. La línea horizontal indica las fracciones que fueron reunidas para su concentración.



precipitado proteico, tras ser resuspendido en el mínimo volumen posible de la solución 1, se dializó durante el tiempo mínimo necesario para la total redisolución de las proteínas (alrededor de 3 horas).

### 3.2.5. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION MOLECULAR EN GEL A TRAVES DE ULTROGEL Aca 34

Una alícuota de 2 mL de la preparación anterior se cromatografió en una columna de Ultrogel Aca 34 (1,5 x 95), mientras el resto de la muestra se guardó congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en espera de ser sometida al mismo tratamiento. La columna, equilibrada con solución amortiguadora 1, fue eluida a una velocidad de flujo de 12 mL/h, recogién dose fracciones de 2 mL.

Como se observa en la figura 8, la reductasa quinasa de microsomas eluye, al igual que la de citosol, como una única forma molecular de peso molecular aparente 210 Kd. La columna fue calibrada con las mismas proteínas marcadoras de peso molecular (3.1.4.).

Las fracciones con actividad de reductasa quinasa fueron reunidas y concentradas por ultrafiltración, en una célula Amicon equipada con una membrana filtrante PM-10, hasta un volumen de 1-1,5 mL. Esta preparación se mantuvo estable durante al menos 6 meses, congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cuando se consideró oportuno avanzar más en el proceso de purificación, las fracciones que contenían actividad quinasa se concentraban por el mismo método, pero hasta un volumen de 10 mL.

### 3.2.6. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE ATP-HEXANO-AGAROSA

La fracción procedente de la etapa anterior de

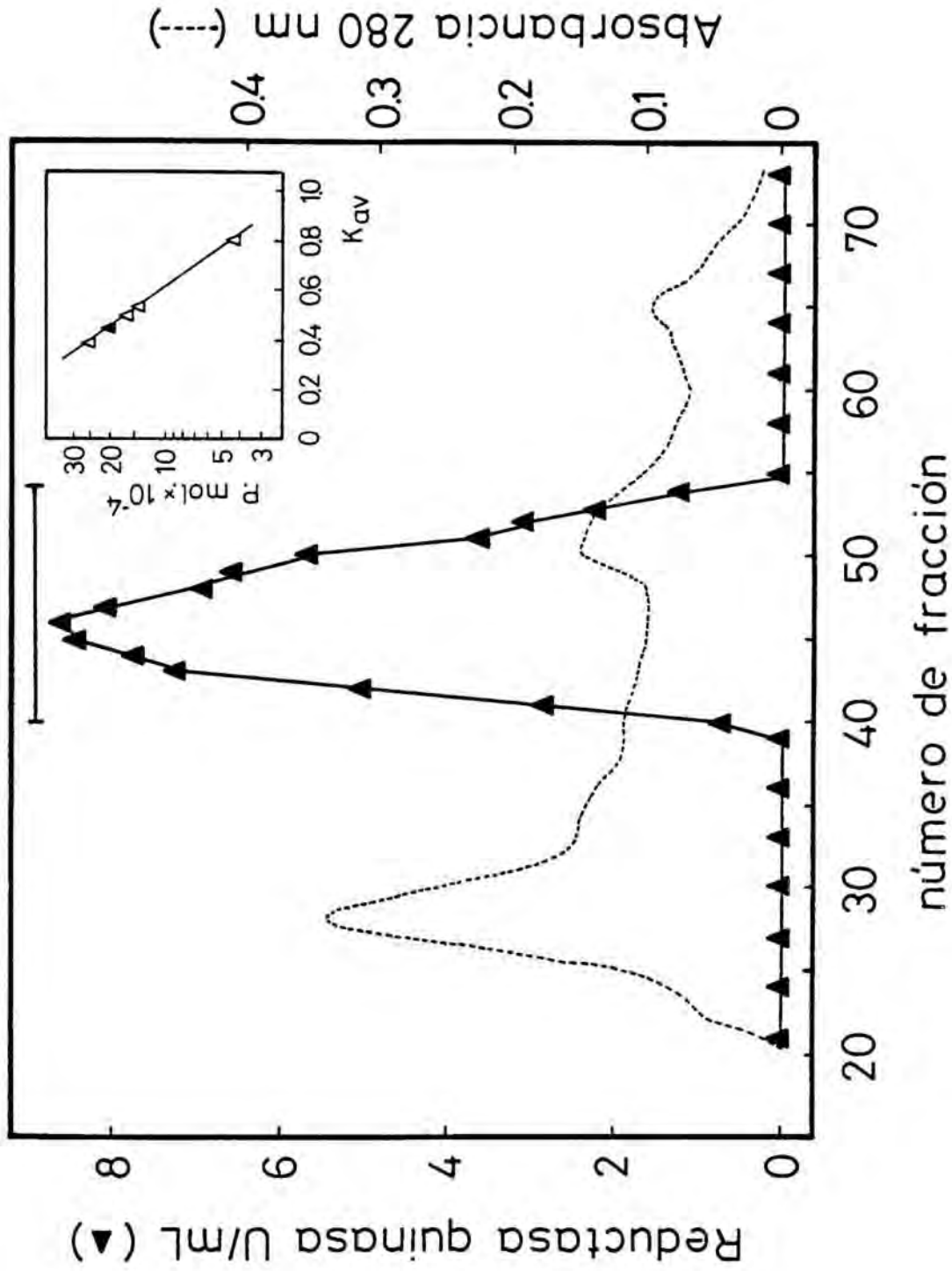
FIGURA 8 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION MOLECULAR EN GEL A TRAVES DE ULTROGEL AcA 34 DE LA REDUCTASA QUI- NASA DE MICROSOMAS

La figura muestra el perfil de elución de la actividad de reductasa quinasa ( $\blacktriangle$ ) a través de una columna de Ultrogel AcA 34, obtenido al aplicar 2 mL de la preparación procedente de la cromatografía en DEAE-celulosa.

Se recogieron fracciones de 2 mL. La proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm (-----).

El peso molecular aparente fue calculado por comparación del volumen de elución de la reductasa quinasa ( $\blacktriangle$ ) con los de las proteínas marcadoras enumeradas en el texto ( $\Delta$ ), que permitieron elaborar la recta de calibración representada en el recuadro.

$K_{av}$  se define como la relación  $(V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ , siendo  $V_e$  el volumen de elución de cada proteína,  $V_0$  el volumen vacío de la columna y  $V_t$  el volumen de lecho de la columna.



purificación fue sometida a cromatografía en una columna de ATP-hexano-agarosa (1,5 x 2,5 cm), equilibrada con solución amortiguadora 1. Cuando se hubo aplicado la muestra, la columna se lavó con 25 mL de la solución empleada en el equilibrio y posteriormente, se aplicó un gradiente lineal de 80 mL totales entre 0 y 400 mM NaCl. La velocidad de flujo fue de 20 mL/h y el volumen de las fracciones recogidas de 2 mL.

Como muestra la figura 9, la reductasa quinasa eluye como un único pico a una concentración 100 mM NaCl. Las fracciones con actividad fueron reunidas y concentradas por ultrafiltración hasta un volumen de 1-1,5 mL, después de reducir la concentración de NaCl por debajo de 25 mM, mediante dilución repetida con solución amortiguadora (2 veces) y posterior concentración hasta el mismo volumen final.

La preparación concentrada de reductasa quinasa de microsomas, repartida en alícuotas, se guardó congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , manteniéndose estable durante un mínimo de 6 meses.

En la tabla III se resumen los resultados globales del proceso de purificación de la reductasa quinasa de microsomas de hígado de rata. Esta enzima no está purificada a homogeneidad, presentando un reducido número de bandas contaminantes, cuando es analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

### 3.3. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

En la tabla IV se muestra la distribución subcelular de las HMG-CoA reductasa quinasa de hígado de rata. La actividad reductasa quinasa se localiza en un 85 % en el citosol, mientras que un 10 % de la misma se halla asociado a la fracción microsomal, por lo que se puede afirmar que la

**FIGURA 9 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE ATP-HEXANO-AGAROSA**

La figura muestra el perfil de elución de la actividad de HMG-CoA reductasa quinasa (▲).

En la fracción 20 se aplicó un gradiente lineal de 80 mL totales entre 0 y 400 mM NaCl (---). Se recogieron fracciones de 2 mL. La proteína se determinó midiendo su absorbancia a 280 nm (-----).

La reductasa quinasa eluye a una concentración 100 mM NaCl. La línea horizontal indica las fracciones que se seleccionaron para su posterior concentración.



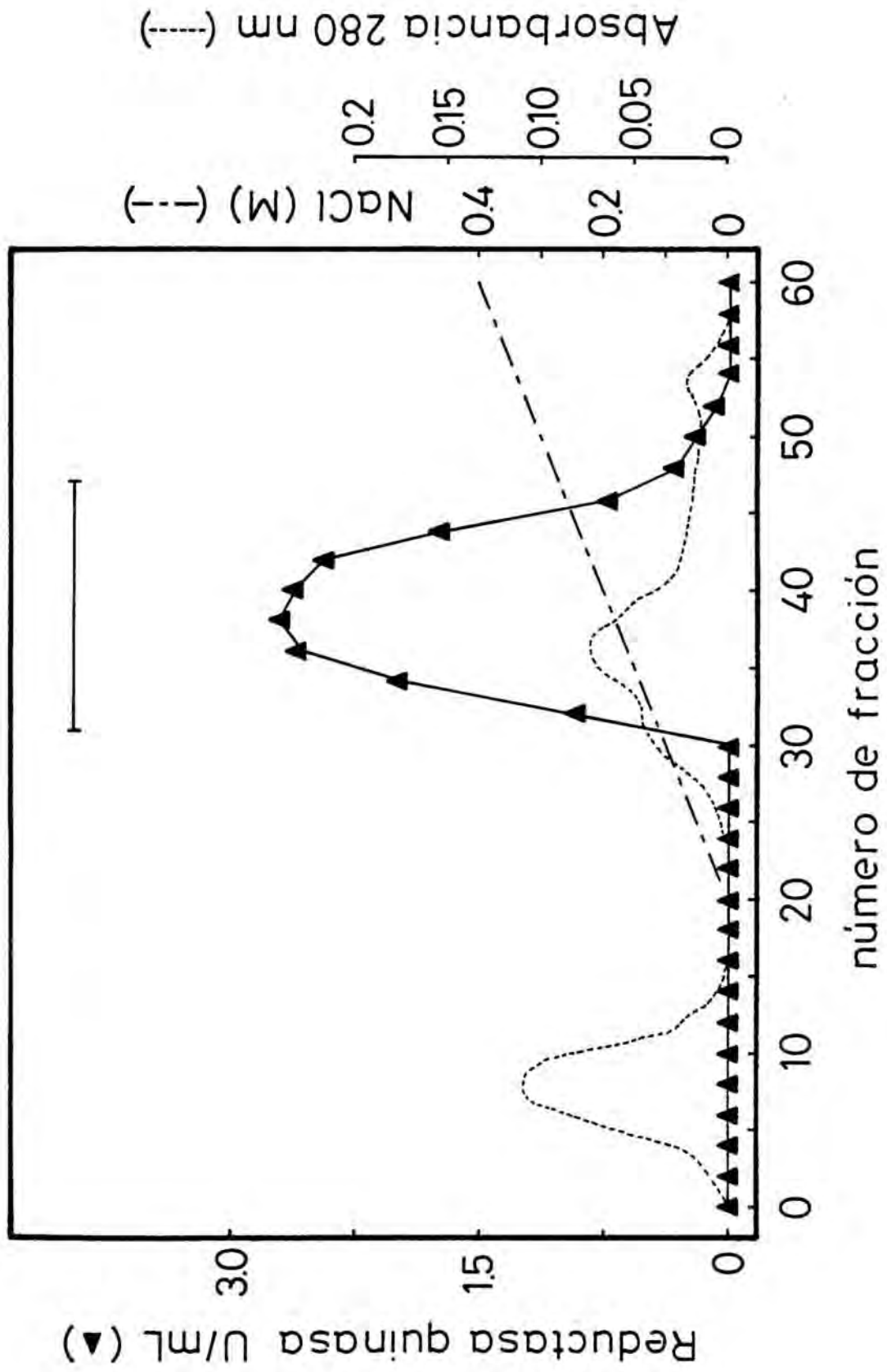


TABLA III PURIFICACION DE HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE  
MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA

Los resultados presentados corresponden a una purificación en la que se partió de 245 gramos de hígado de rata.

Los valores de las preparaciones obtenidas en la cromatografía de filtración molecular por gel y en etapas sucesivas, están corregidos como si la totalidad de la muestra obtenida en la cromatografía en columna de DEAE-celulosa hubiese sido empleada para purificar la reductasa quinasa.

La actividad de la reductasa quinasa se determinó empleando HMG-CoA reductasa microsomal como sustrato, tal como se describe en el apartado 2.4.3. de Métodos.

Fracción	HMG-CoA reductasa quinasa	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Microsomas	2371	3730	0,6	1	100
Extractos microsomales	1518	509	3,0	4,7	64
Extractos concentrados	1500	415	3,6	5,7	63,5
Affi-Gel Blue	531	57,5	9,2	14,5	22,4
DEAE-celulosa	340	23	14,8	23,5	14,5
UltrogeI Aca 34	193	1,5	129	203	8
ATP-hexano-agarosa	50	0,36	139	218	2,1

TABLA IV. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA

El porcentaje de actividad HMG-CoA reductasa quinasa en cada una de las dos fracciones celulares, se calculó a partir de las unidades por gramo de hígado de partida presentes en ellas. Se ha tomado como valor 100 a las unidades por gramo de hígado presentes en el sobrenadante de 15.000 x g del hígado de rata.

La actividad reductasa quinasa se determinó empleando HMG-CoA reductasa microsomal como sustrato, tal como se describe en el apartado 2.4.3. de Métodos.

Fracción	Unidades/g hígado	Porcentaje
Sobrenadante 15.000 x g	99	100
Citosol	84	85
Microsomas	10	10

enzima presente en la fracción citosólica es mayoritaria con respecto a la existente en la fracción microsomal.

#### 3.4. PRESENCIA DE ACTIVIDAD MEVALONATO QUINASA EN LAS DISTINTAS ETAPAS DE PURIFICACION DE LAS REDUCTASA QUINASAS

Se determinó la actividad de mevalonato quinasa, siguiendo el método descrito en el apartado 2.4.5., en cada una de las etapas de purificación de las dos HMG-CoA reductasa quinasa. Únicamente fue posible detectar y medir dicha actividad en el citosol (3,7 unidades/mg), no siendo detectable en ninguna de las demás fracciones ensayadas. En consecuencia, nuestras preparaciones de reductasa quinasa están exentas de cualquier contaminación por mevalonato quinasa. Además, se confirma que ambas actividades residen en proteínas distintas, separables por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

#### 3.5. EXPRESION DE LA ACTIVIDAD MEVALONATO QUINASA EN LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD REDUCTASA QUINASA

La interferencia producida por la mevalonato quinasa en el ensayo de actividad reductasa quinasa se produce, caso de coexistir ambas enzimas, en la segunda parte del ensayo de actividad reductasa quinasa o, lo que es lo mismo, durante la determinación de la actividad HMG-CoA reductasa residual (250).

Con objeto de averiguar si en nuestras condiciones de ensayo de la actividad HMG-CoA reductasa remanente, después de la acción de las reductasa quinasa, era posible la expresión de la actividad mevalonato quinasa, se determinó dicha actividad en una alícuota del citosol en la que se

habían reproducido exactamente las condiciones existentes en la segunda parte del ensayo de actividad reductasa quinasa (2.4.3.).

La actividad de mevalonato quinasa del citosol que se expresa en las mencionadas condiciones (0,028 unidades/mg), representa menos de un 1 % de la actividad real existente. Por lo tanto, en nuestras condiciones de ensayo de reductasa quinasa, aun cuando coexista la enzima mevalonato quinasa, ésta no interfiere en la determinación de la actividad de la reductasa quinasa.

### 3.6. FOSFORILACION E INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA CON $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ POR ACCION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS DE HIGADO DE RATA

Mediante los procedimientos descritos en los apartados 3.1. y 3.2. habíamos obtenido dos reductasa quinasa procedentes del citosol y de los microsomas de hígado de rata, respectivamente, con capacidad para inactivar HMG-CoA reductasa en presencia de ATP. Sin embargo, era preciso demostrar que el efecto de inactivación producido por las reductasa quinasa sobre su sustrato proteico, se debía realmente a un proceso de fosforilación.

Una alícuota de cada una de las dos preparaciones de las reductasa quinasa (fracción procedente de la cromatografía en columna de ATP-hexano-agarosa) se incubó a 37°C con una cantidad fija de HMG-CoA reductasa homogénea y activa, en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en las condiciones descritas en el apartado 2.5. A intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción en las que se determinó el  $^{32}\text{P}$  ligado a la proteína, por el método de Huang y Robinson, descrito en 2.5., así como la actividad HMG-CoA reductasa, según se describe en 2.4.2.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10, observándose como en ambos casos hay una incorpora-



FIGURA 10 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

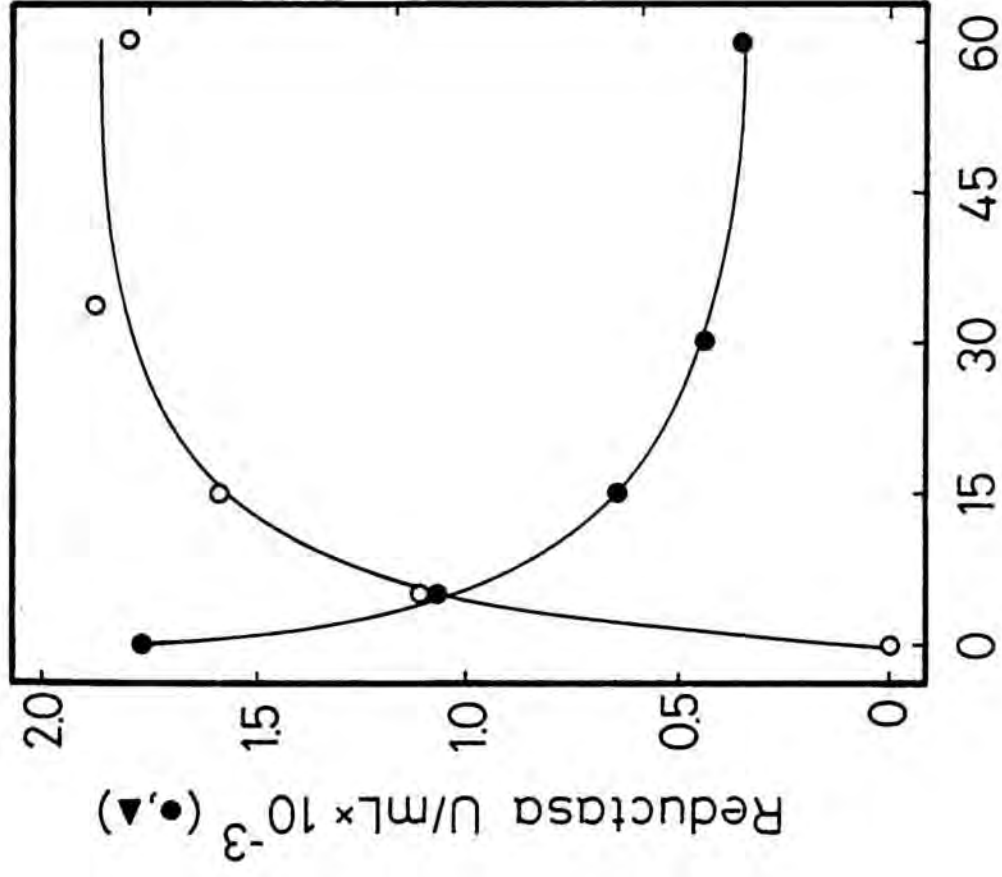
Dos alícuotas de HMG-CoA reductasa homogénea (7,9  $\mu\text{g}$ , 98 U.) fueron incubadas a 37°C con 3,2 U. de reductasa quinasa de citosol y de microsomas, respectivamente, en un volumen total de 55  $\mu\text{L}$ , en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (900 cpm/pmol), y del resto de componentes descritos en el texto.

A los tiempos indicados en abcisas se tomaron alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción, en las que se determinó el  $^{32}\text{P}$  ligado a proteína ( $\circ, \Delta$ ). Simultáneamente se determinó la actividad reductasa residual, a los mismos tiempos, también en alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  adecuadamente diluídas ( $\bullet, \blacktriangle$ ).

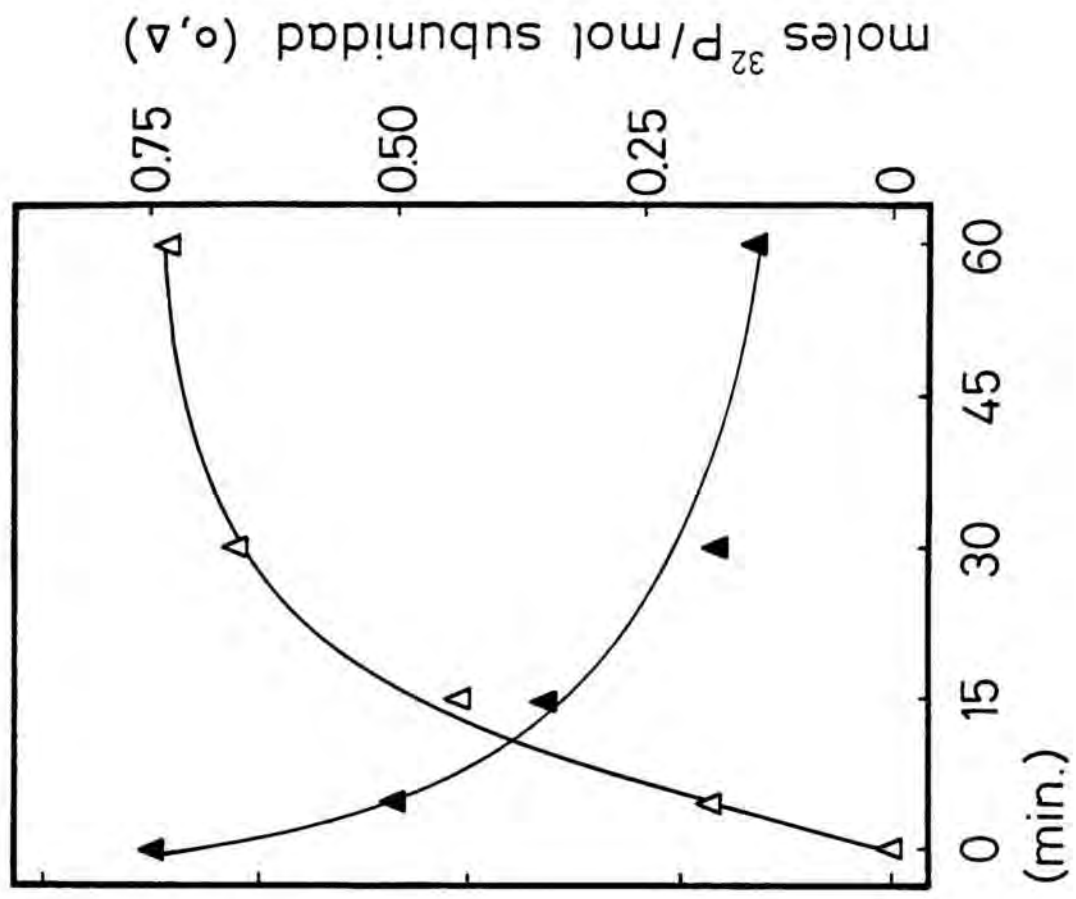
Paralelamente se incubaron en cada experimento dos mezclas control que contenían todos los componentes descritos con excepción, en un caso de HMG-CoA reductasa y en el otro de HMG-CoA reductasa quinasa. En este último caso la actividad reductasa permaneció invariable durante la incubación.

Los valores de radioactividad ligada a la proteína reductasa representados en la gráfica, son los obtenidos después de sustraer la radioactividad ligada a la proteína de ambos controles.

Reductasa quinasa de citosol



Reductasa quinasa de microsomas



ción de  $^{32}\text{P}$  a partir de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  a la proteína reductasa concomitante con una disminución de su actividad. Estos resultados demuestran inequívocamente que ambas enzimas purificadas son efectivamente, HMG-CoA reductasa quinasas con capacidad para ligar covalentemente  $^{32}\text{P}$  a la molécula de HMG-CoA reductasa, a la vez que la inactivan.

La incorporación de ortofosfato radioactivo con ambas quinasas por separado es máxima al cabo de 60 minutos de incubación a  $37^\circ\text{C}$  y oscila entre 0,7 y 0,8 moles de  $^{32}\text{P}$  por mol de subunidad de HMG-CoA reductasa, provocando una inactivación simultánea del 81%, que también es máxima. La incorporación de fosfato radioactivo no se incrementó al prolongar el tiempo de incubación.

### 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

Dado que las dos preparaciones de reductasa quinasa, empleadas en los experimentos de fosforilación de HMG-CoA reductasa a partir de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , no eran absolutamente homogéneas en cuanto a su composición proteica, y que la presencia de la albúmina de suero bovino era absolutamente necesaria para la conservación de la actividad de la reductasa homogénea, siendo como es una proteína susceptible también de resultar fosforilada, se hizo necesario estudiar la composición de fosfoproteínas de las mezclas de reacción preparadas como en el apartado anterior, tras 60 minutos de incubación a 37°C.

Como puede verse en la figura 11, en ambos casos se aprecia la existencia de una banda de proteína que resulta fosforilada mayoritariamente por acción de las reductasa quinasa, poniéndose de manifiesto asimismo la existencia de otras bandas de proteína contaminante, entre ellas la mencionada albúmina, que aunque en muy inferior medida también resultan fosforiladas.

La identidad entre la proteína fosforilada mayoritariamente y la subunidad de la HMG-CoA reductasa resulta evidente, puesto que ambas presentan una movilidad electro-

FIGURA 11 IDENTIFICACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFORILADA CON  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  POR ACCION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

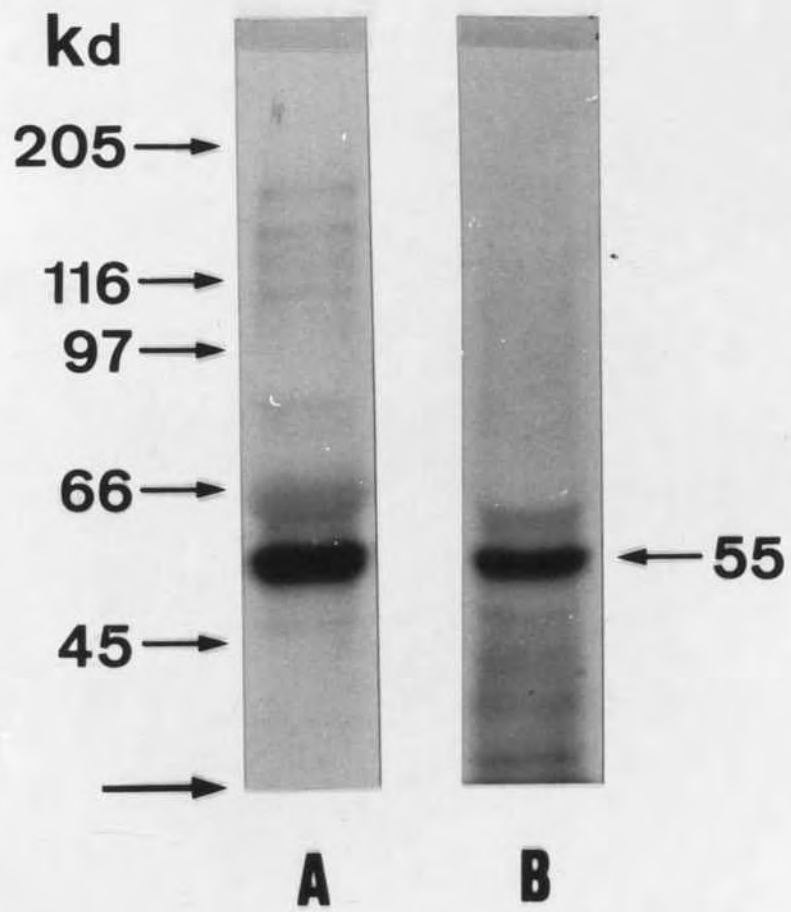
Dos alícuotas de reductasa homogénea (2-3  $\mu\text{g}$ , 24-36 U.) fueron incubadas a 37°C con 1,2 U. de reductasa quinasa de microsomas y citosol, respectivamente, en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (900 cpm/pmol) y del resto de componentes descritos en el texto.

Transcurridos 60 minutos de incubación a 37°C, la reacción se detuvo por precipitación ácida de las proteínas (2.5.). El precipitado de TCA fue analizado electroforéticamente (2.8.1.) y se obtuvieron los correspondientes autorradiogramas (2.9.2.).

A) Fosforilación de la HMG-CoA reductasa mediada por la reductasa quinasa de citosol.

B) Fosforilación de la HMG-CoA reductasa mediada por la reductasa quinasa de microsomas.

Las cifras laterales indican los pesos moleculares de las proteínas empleadas como patrón. La flecha señala la posición del frente formado por el azul de bromofenol.



forética correspondiente a la de una proteína de 55 Kd. Además, dicha banda de proteína fosforilada (55 Kd) no se pone de manifiesto cuando en las preparaciones analizadas se omite la enzima HMG-CoA reductasa, sustrato de las reductasa quinasa hepáticas.

El conocimiento de estos resultados aconsejó proceder al aislamiento de la subunidad de la reductasa fosforilada, previa identificación por autorradiografía indirecta, a partir de los desarrollos electroforéticos de las mezclas de reacción, para llevar a cabo los experimentos de fragmentación de la misma con la total garantía de trabajar exclusivamente con HMG-CoA reductasa fosforilada.

Los fragmentos del gel seco que contenían la banda de reductasa fosforilada, fueron recortados e introducidos en viales de vidrio para contaje por centelleo líquido. Estos fueron mantenidos en oscuridad total durante un tiempo mínimo de 12 horas, transcurridas las cuales fueron contados aprovechando el efecto Cerenkov. De este modo se estableció un factor de equivalencia entre la radioactividad medida por el mencionado efecto y la determinada por el método de Huang y Robinson (aproximadamente 4).

### 3.8. DESFOSFORILACION Y REACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFORILADA E INACTIVADA POR LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS DE HIGADO DE RATA

Los experimentos detallados en los dos apartados precedentes demuestran la capacidad de las reductasa quinasas hepáticas para fosforilar e inactivar a la reductasa. Inmediatamente se planteó la necesidad de demostrar el carácter reversible de este proceso, o lo que es lo mismo, la susceptibilidad del fosfato unido covalentemente a la reductasa, a la hidrólisis enzimática mediada por HMG-CoA reductasa fosfatasa, con la consiguiente recuperación de la actividad enzimática.

Una alícuota de cada una de las dos preparaciones de reductasa quinasa (fracción procedente de la cromatografía en columna de ATP-hexano-agarosa), se incubó a 37°C con una determinada cantidad de HMG-CoA reductasa homogénea y activa y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, en las condiciones descritas en el apartado 2.5. Al cabo de 60 minutos de reacción, ésta se detuvo por adición de EDTA, añadiéndose a ambas mezclas una cantidad fija de HMG-CoA reductasa fosfatasa II de citosol de hígado de rata (202), diluyéndose las mezclas convenientemente según se describe en 2.6.

A distintos intervalos de tiempos se tomaron alí-



## FIGURAS 12 Y 13

## DESFOSFORILACION Y REACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFORILADA E INACTIVADA POR ACCION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS DE HIGADO DE RATA

Dos alícuotas de HMG-Coa reductasa (11,5  $\mu$ g, 142 U.) fueron incubadas a 37°C con 4,6 U de reductasa quinasa de citosol y de microsomas, en un volumen total de 80  $\mu$ L, en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (850 cpm/pmol) y del resto de componentes descritos en el texto.

A los tiempos indicados en abcisas se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L en las que se detuvo la reacción por precipitación con TCA al 20 %. Simultáneamente se determinó la actividad reductasa a los mismos tiempos, en alícuotas de 5  $\mu$ L adecuadamente diluídas.

Al cabo de 60 minutos de reacción ésta se detuvo por adición a la mezcla (30  $\mu$ L) de 6  $\mu$ L de una solución de EDTA 500 mM pH 7,2, diluyéndose seguidamente con solución amortiguadora. La reacción de desfosforilación y reactivación se inició por adición de 3,5 U de reductasa fosfatasa II (volumen total 1,5 mL). De esta forma se conseguían las condiciones de ensayo idóneas, detalladas en 2.6.

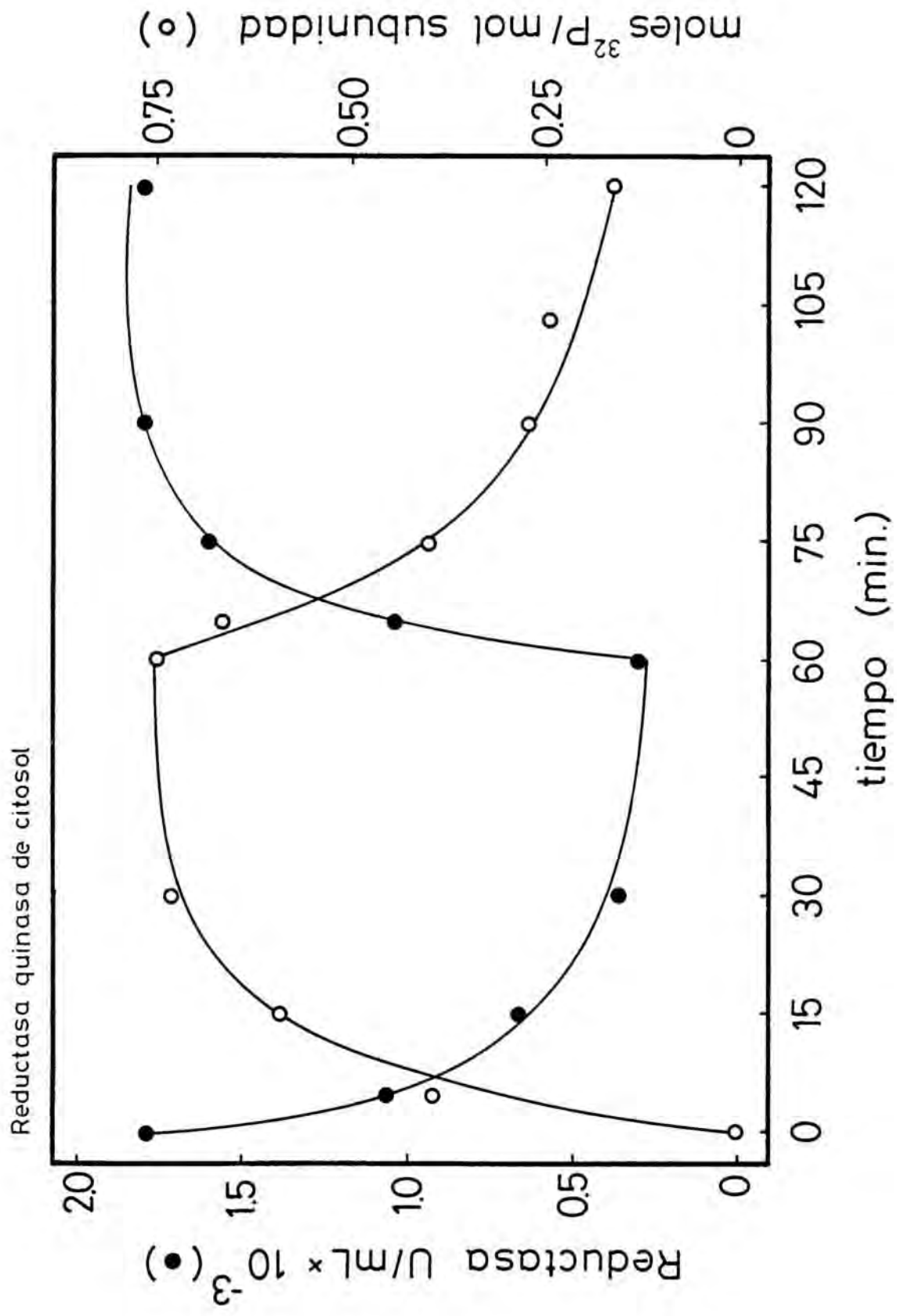
A los distintos tiempos se tomaron alícuotas de 250  $\mu$ L en las que se detuvo la reacción por precipitación con TCA al 20 %. Simultáneamente se determinó la actividad reductasa en alícuotas de 5  $\mu$ L adecuadamente diluídas.

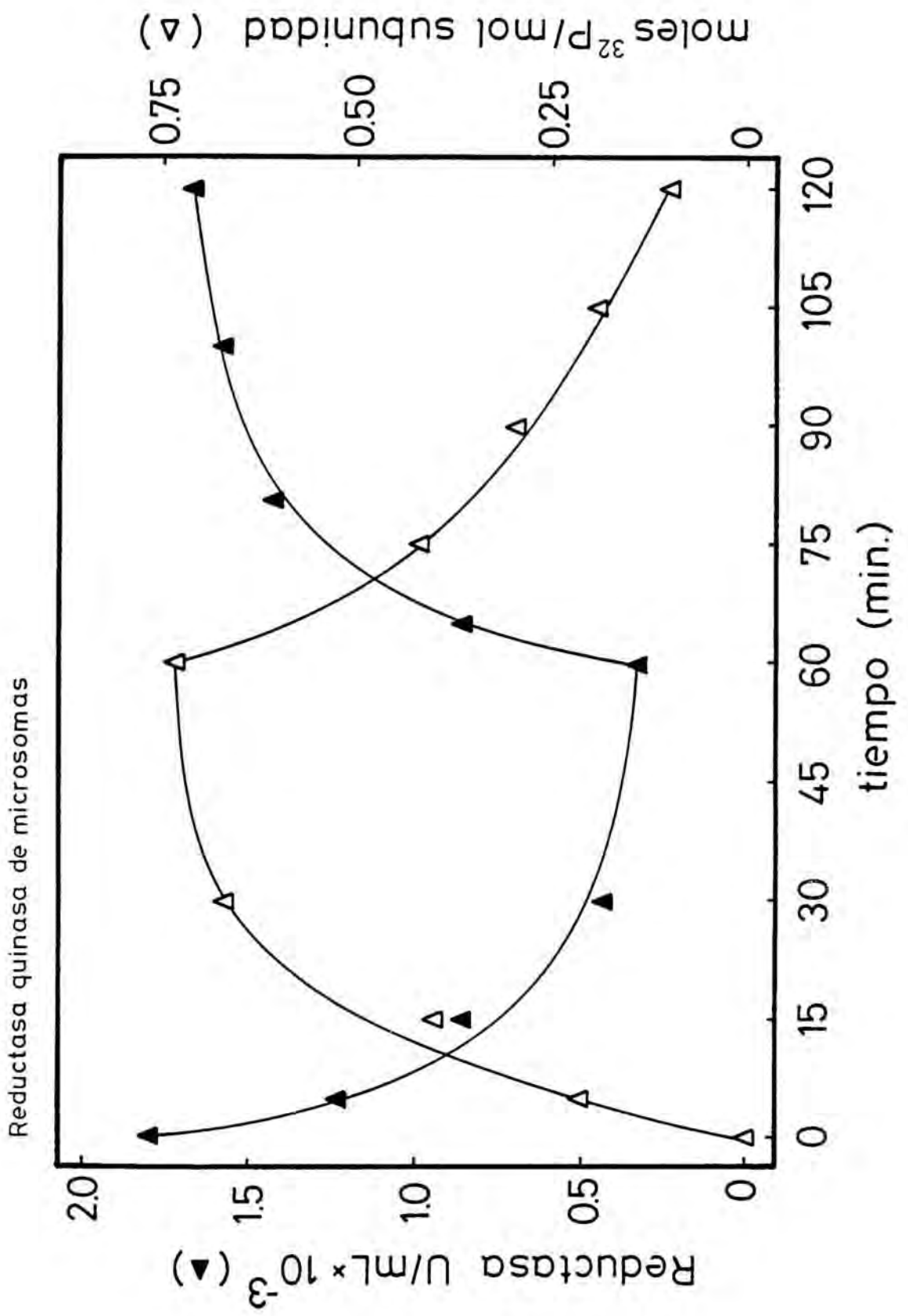
Las alícuotas precipitadas con TCA fueron

sometidas al tratamiento descrito en 2.5., para su posterior análisis electroforético (2.8.1.) y obtención de los autorradiogramas correspondientes (2.9.2.). La radioactividad ligada a la reductasa se cuantificó por efecto Cerenkov, en los segmentos del gel que contenían la proteína.

En ambas gráficas se representa la actividad HMG-CoA reductasa (●,▲) y el  $^{32}\text{P}$  ligado a reductasa (○,△), frente al tiempo de incubación a 37°C.

Una unidad de HMG-CoA reductasa fosfatasa se define como la cantidad de enzima que activa una unidad de HMG-CoA reductasa, por minuto, a 37°C.





cuotas de las mezclas de reacción en las que se determinó el  $^{32}\text{P}$  ligado a la HMG-CoA reductasa, tal como se describe en 2.5., así como la actividad reductasa según la técnica descrita en 2.4.2. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 12 y 13. En ellas se pone de manifiesto que la reductasa inactivada y fosforilada con cada una de las reductasa quinasa hepáticas resulta desfosforilada, a la vez que recupera su actividad inicial por acción de una determinada reductasa fosfatasa. Análogo experimento llevado a cabo en presencia de NaF 50 mM y PPI 1 mM permitió comprobar que en presencia de inhibidores de proteína fosfatasas, la reductasa no se reactiva ni se desfosforila.

Se demuestra claramente el carácter reversible de la fosforilación e inactivación de la reductasa de hígado de rata, a la vez que se confirma de nuevo la correlación existente entre el nivel de incorporación de fosfato a la reductasa y su grado de actividad.

### 3.9. PROPIEDADES ENZIMATICAS DE LAS REDUCTASA QUINASAS

Como primera aproximación al estudio y caracterización de las HMG-CoA reductasa quinasas de citosol y microsomas de hígado de rata, procedimos a estudiar una serie de propiedades cinéticas, lo que permitió además una correcta puesta a punto del ensayo de la actividad de ambas quinasas sobre su sustrato, la HMG-CoA reductasa. A partir de este punto, salvo que se indique lo contrario, los experimentos de esta Memoria se realizarán con las preparaciones de reductasa quinasa procedentes de la cromatografía de filtración molecular por gel.

#### 3.9.1. PESOS MOLECULARES APARENTES

Los pesos moleculares aparentes de ambas enzimas fueron determinados por filtración molecular en gel, tal como se ha explicado en los apartados 3.1.4. y 3.2.5. Ambas reductasa quinasas exhibieron un mismo peso molecular aparente de 210 Kd.

#### 3.9.2. ACTIVACION POR ADP Y AMP

El requerimiento de la presencia de ADP en la inactivación de HMG-CoA reductasa de microsomas de hígado

de rata o de fibroblastos humanos por acción de una(s) reductasa quinasa(s) presente en extractos de fibroblastos humanos, fue descrito ya en 1975 por Brown y col.(134) y dos años más tarde por Nordstrom y col.(136), quienes reprodujeron resultados análogos empleando tanto reductasa en microsomas como solubilizada y reductasa quinasa de citosol de hígado de rata.

En tal sentido y teniendo en cuenta los fenómenos de hidrólisis espontánea frecuentemente experimentados por los nucleótidos, puestos de manifiesto en el apartado 2.4.7., así como la capacidad de interconversión entre ellos por enzimas tales como la adenilato quinasa, cuya presencia en nuestras preparaciones era, por otra parte, muy poco probable, se diseñó el experimento cuyos resultados se resumen en la tabla V.

Los objetivos perseguidos eran tres:

a) Demostrar la capacidad activadora del ADP sobre ambas reductasa quinasa.

b) Investigar el posible efecto activador del AMP, que suele estar presente con frecuencia, en las disoluciones de ADP como producto de su hidrólisis espontánea.

c) En el caso de ser cierta la hipótesis formulada en el apartado anterior, referente a la capacidad activadora del AMP, confirmar la permanencia del nucleótido como tal, en nuestras condiciones de ensayo, excluyendo su conversión en ADP a partir de ATP.

Se cuantificó la actividad de nuestras dos preparaciones empleando reductasa homogénea como sustrato, tal como se describe en el apartado 2.4.4., con la salvedad de que los nucleótidos añadidos fueron los descritos en la tabla V, a las concentraciones indicadas.

Por comparación de las líneas 1,2 y 3 se observa

TABLA V      ACTIVACION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS POR ADP Y AMP

La actividad reductasa quinasa se determinó empleando reductasa homogénea como sustrato (0,7  $\mu$ g, 8,7 U), en un volumen total de 20  $\mu$ L, que contenía todos los componentes a las concentraciones descritas (2.4.4.), a excepción de los nucleótidos de adenina y el  $A_p_5A$ , que fueron adicionados a las concentraciones señaladas en la tabla. Paralelamente se realizaron controles de actividad reductasa en los que se omitió el  $Mg^{2+}$ ; no observándose en ningún caso disminución de su actividad.

A la actividad reductasa quinasa medida en ausencia de activador se le dio el valor 100.



Adición	(mM)	Reductasa quinasa de citosol (U/mL)	(%)	Reductasa quinasa de microsomas (U/mL)	(%)	
1.	ATP	2	5,1	100	4,9	100
2.	ADP	2	0	0	0	0
3.	AMP	2	0	0	0	0
4.	ATP/ADP	2/2	25,0	490	24,5	495
5.	ATP/AMP	2/2	25,7	504	27,6	557
6.	ATP/AMP	2/0,2	25,3	496	27,0	545
7.	ATP/ADP/AP <sub>5</sub> A	2/2/0,5	25,0	490	24,1	487
8.	ATP/AMP/AP <sub>5</sub> A	2/2/0,5	25,8	506	27,1	547
9.	ATP/AMP/AP <sub>5</sub> A	2/0,2/0,5	25,9	488	26,6	537

que de entre los tres nucleótidos de adenina, solamente el ATP puede actuar como donador de fosfato en la inactivación de la reductasa por ambas quinasas. Los resultados resumidos en las líneas 4,5 y 6 demuestran que efectivamente, ambas enzimas resultan activadas alrededor de cinco veces por ADP, así como por AMP y que una concentración 0,2 mM de AMP proporciona el mismo grado de activación que una concentración diez veces mayor de ADP. Esta concentración 0,2 mM AMP, se seleccionó por ser la que se hallaba presente, como contaminación, en las preparaciones de ADP empleadas habitualmente (alrededor del 10 %)(2.4.7.). La obtención de análogos resultados en presencia de 0,5 mM  $Ap_5A$ , que es un inhibidor competitivo de la adenilato quinasa (338), garantiza que el efecto activador sobre ambas quinasas, producido por la adición al ensayo de AMP, se debe a este nucleótido y no al posible ADP sintetizado a partir de él y ATP, por una poco probable contaminación de adenilato quinasa (líneas 8 y 9). La actividad reductasa quinasa medida en presencia de ADP no experimentó modificación alguna por la adición de 0,5 mM  $Ap_5A$  al ensayo (líneas 4 y 7).

Estos resultados demuestran por primera vez el efecto activador ejercido por el ADP sobre la HMG-CoA reductasa quinasa de microsomas, confirmando este mismo efecto sobre la enzima de procedencia citosólica, y ponen de manifiesto la activación ejercida por el AMP sobre ambas enzimas, lo cual no ha sido descrito hasta el momento en la literatura científica.

El nucleósido monofosfato en ausencia de ATP no ejerce ningún efecto sobre la actividad HMG-CoA reductasa.

### 3.9.3. DEPENDENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA

Para determinar la concentración óptima de nuestras reductasa quinasas en los ensayos de actividad y, por

otra parte, comprobar que ésta corresponde a la de un proceso enzimático, en el que un aumento de la concentración de enzima es proporcional a un incremento en la actividad, se incubaron cantidades crecientes de las reductasa quinasa comprendidas entre 0 y 40  $\mu\text{g}$  para la reductasa quinasa de citosol, y entre 0 y 17,5  $\mu\text{g}$  para la reductasa quinasa de microsomas durante un tiempo fijo de 15 minutos, con una cantidad constante de reductasa (0,55  $\mu\text{g}$ , 6,5 u.); todo ello en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ . La actividad reductasa quinasa se determinó como se explica en Métodos (2.4.4.), en presencia y ausencia de AMP.

Los resultados obtenidos se expresan en la figura 14 y como se puede observar, ambas quinasa presentan una primera fase lineal a cantidades bajas de enzima, perdiéndose posteriormente esta proporcionalidad entre cantidad de enzima y actividad enzimática. La cantidad de quinasa por encima de la cual se pierde dicha relación de proporcionalidad es alrededor de cinco veces mayor cuando la determinación de actividad se efectúa en ausencia de activador; en ambos casos, se observa por efecto del AMP un incremento de alrededor de cinco veces en la actividad reductasa quinasa expresada por la misma cantidad de proteína. Por otra parte, la actividad máxima alcanzada a altas cantidades de enzima es prácticamente la misma en presencia o ausencia de activador, en el caso de ambas quinasa.

Los resultados obtenidos por tanto, concuerdan perfectamente, como era previsible, con un proceso de tipo enzimático.

#### 3.9.4. DETERMINACION DE LOS pHs OPTIMOS

Se determinó la actividad de las HMG-CoA reductasa quinasa en distintas condiciones de pH, comprendidas entre 5,5 y 9,5 unidades de pH. En todos los casos, se

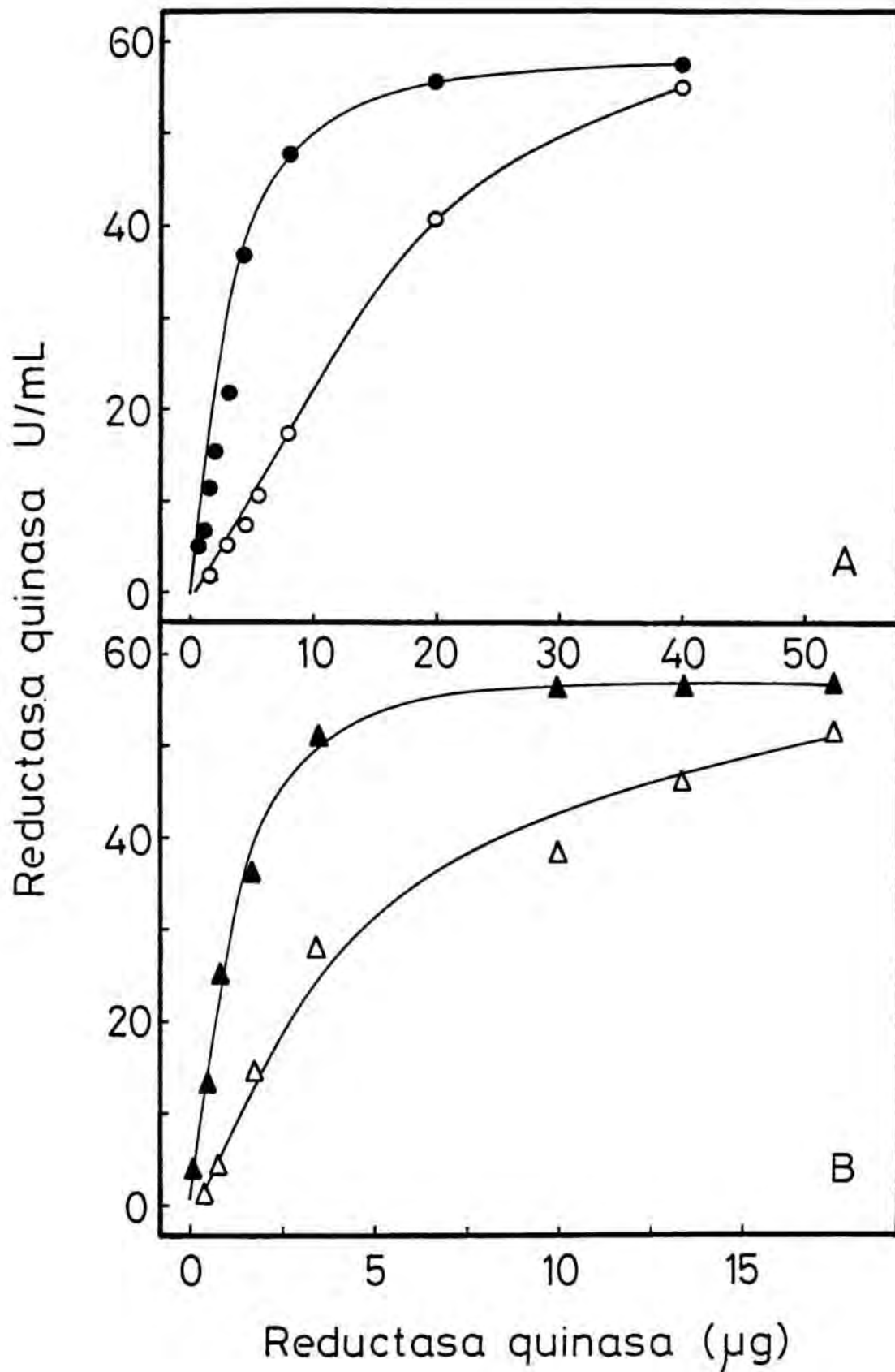
FIGURA 14 DEPENDENCIA DE LA CONCENTRACION DE LAS HMG-CoA  
REDUCTASA QUINASAS

Una cantidad constante de HMG-CoA reductasa (0,55  $\mu$ g, 6,5 U.) se incubó durante 15 minutos a 37°C con cantidades crecientes de ambas reductasa quinasa, representadas en abcisas. El volumen total de la mezcla de ensayo fue de 20  $\mu$ L.

La actividad de reductasa quinasa se determinó como se describe en Métodos (2.4.4.) y se representa en ordenadas, expresada en U/mL.

A) Reductasa quinasa de citosol: -AMP (○), +AMP (●).

B) Reductasa quinasa de microsomas: -AMP (△), +AMP (▲).



mantuvo constante tanto la cantidad de quinasa como la de reductasa y la actividad de reductasa quinasa se determinó en presencia de AMP.

Las disoluciones amortiguadoras empleadas en la dilución de las quinasas y de la reductasa, así como aquella que contenía los demás componentes necesarios para llevar a cabo la reacción enzimática, fueron idénticas a las descritas en el apartado 2.4.4., a excepción del agente amortiguador de pH que fue Bis-tris/HCl para obtener los pHs comprendidos entre 5,5 y 7,0; Tris/HCl para los pHs comprendidos entre 7,0 y 8,5 y glicina/NaOH entre los pHs 8,5 y 9,5, siempre a las mismas concentraciones descritas.

Como se observa en la figura 15 el pH óptimo de ambas reductasa quinasas está localizado a 7,5, por lo cual todos los ensayos de actividad reductasa quinasa se efectuaron a dicho pH. Por otra parte, se aprecia también que el patrón de comportamiento de ambas enzimas en las diferentes condiciones de pH es notablemente similar.

### 3.9.5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE $MgCl_2$

Se determinó la actividad de una cantidad constante de cada una de las dos reductasa quinasas incubadas durante 15 minutos, con una cantidad fija de reductasa y concentraciones variables de  $MgCl_2$ , comprendidas entre 0 y 62,5 mM. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Métodos, en presencia de AMP como activador.

Como se observa en la figura 16 la actividad reductasa quinasa de ambas preparaciones, experimenta un comportamiento similar frente a las distintas concentraciones de  $MgCl_2$ . Esta se incrementa progresivamente al aumentar la concentración de  $MgCl_2$ , alcanzando un máximo de actividad a una concentración 15,6 mM  $MgCl_2$ , para después dismi-

FIGURA 15 DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

La actividad reductasa quinasa se determinó utilizando HMG-CoA reductasa homogénea como sustrato (0,7  $\mu$ g, 8,7 U.), en un volumen total de 20  $\mu$ L.

Las mezclas de reacción se incubaron durante 15 minutos a 37°C y a continuación, tras diluir convenientemente la reductasa, se procedió a determinar su actividad tal como se ha descrito en Métodos. Esta operación de dilución permitió ajustar en todos los casos, el pH a 7,2, que es el óptimo para la HMG-CoA reductasa.

Paralelamente se realizaron controles de estabilidad de la actividad reductasa durante los 15 minutos de incubación a 37°C, para cada uno de los pHs ensayados, en ausencia de  $Mg^{2+}$ .

La actividad de la reductasa quinasa de citosol (●) y de microsomas (▲) se representa en ordenadas y se expresa en U/mL.

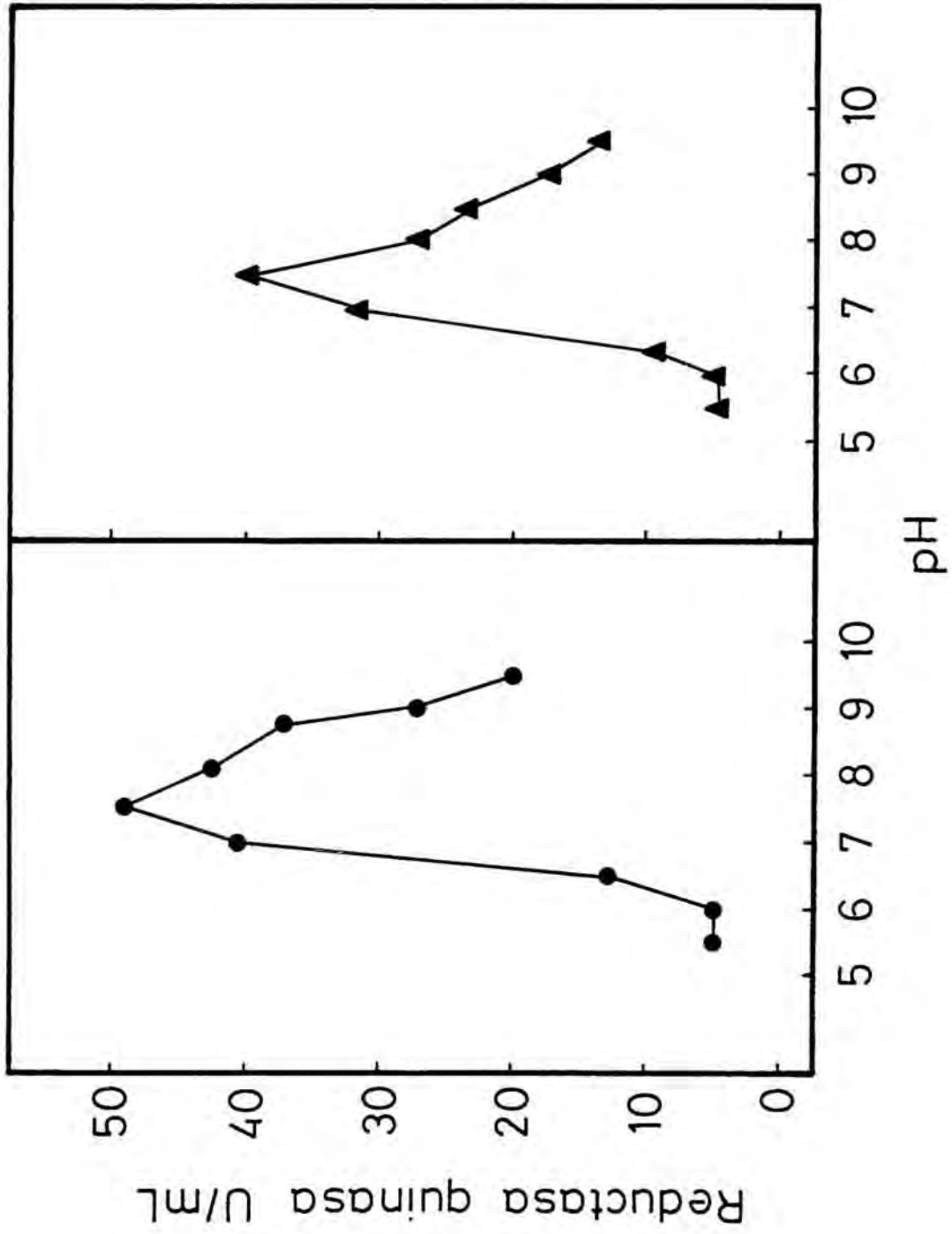


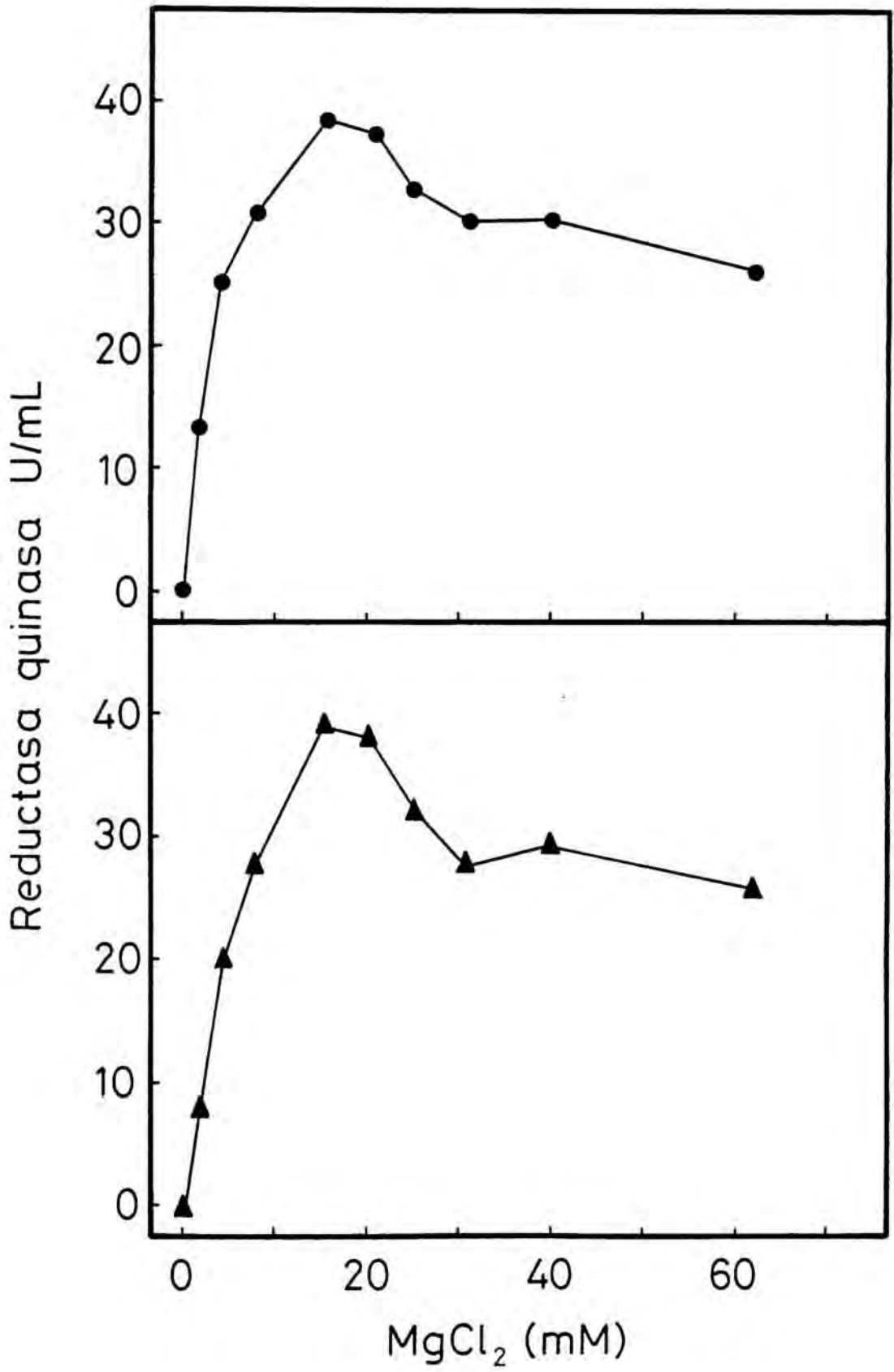


FIGURA 16 CONCENTRACION OPTIMA DE  $MgCl_2$  EN EL ENSAYO DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

La actividad HMG-CoA reductasa quinasa se determinó utilizando HMG-CoA reductasa homogénea como sustrato ( $0,7 \mu g$ ,  $8,7 U$ ), en un volumen total de  $20 \mu L$  y en presencia de AMP. Las mezclas de reacción se incubaron a  $37^\circ C$  durante 15 minutos y a continuación, tras diluir convenientemente la reductasa, se procedió a medir su actividad tal como se ha descrito en Métodos (2.4.4.).

Paralelamente se realizaron controles de estabilidad de la actividad reductasa durante los 15 minutos de incubación a  $37^\circ C$ , para cada una de las concentraciones de  $MgCl_2$  ensayadas, en ausencia de reductasa quinasa.

La actividad de las reductasa quinasa de citosol (●) y de microsomas (▲) se representa en ordenadas y se expresa en U/mL.



nir lentamente hasta un 70-75 % de la actividad máxima a la concentración máxima ensayada,  $MgCl_2$  62,5 mM.

### 3.9.6. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS-MENTEN DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS PARA EL SUSTRATO HMG-CoA REDUCTASA

Se incubaron idénticas cantidades de las dos reductasa quinasas (0,12 u) a 37°C, con concentraciones crecientes de HMG-CoA reductasa comprendidas entre 52 y 810 unidades/mL durante un tiempo constante establecido en 15 minutos, en un volumen total de 20  $\mu$ L. La actividad reductasa quinasa se determinó como se explica en métodos (2.4.4.), en presencia de AMP.

Los resultados obtenidos se encuentran representados en las figuras 17 y 18. La actividad de ambas reductasa quinasas manifiesta un comportamiento dependiente de la concentración del sustrato HMG-CoA reductasa, característico del modelo cinético propuesto por Michaelis y Menten.

Los valores de  $K_M$  calculados para las reductasa quinasas de citosol y de microsomas son 204 U/mL y 244 U/mL respectivamente, (U/mL=unidades de HMG-CoA reductasa/mL). Asimismo, en las condiciones de trabajo descritas los valores de velocidad máxima son de 24,3 U/mL y 23,2 U/mL respectivamente, (U/mL=unidades de HMG-CoA reductasa inactivadas/min.x mL).

### 3.9.7. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS-MENTEN DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS PARA EL SUSTRATO ATP

Se incubaron cantidades idénticas de ambas reduc-

## FIGURAS 17 Y 18

DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS-  
MENTEN DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS PARA  
EL SUSTRATO HMG-CoA REDUCTASA

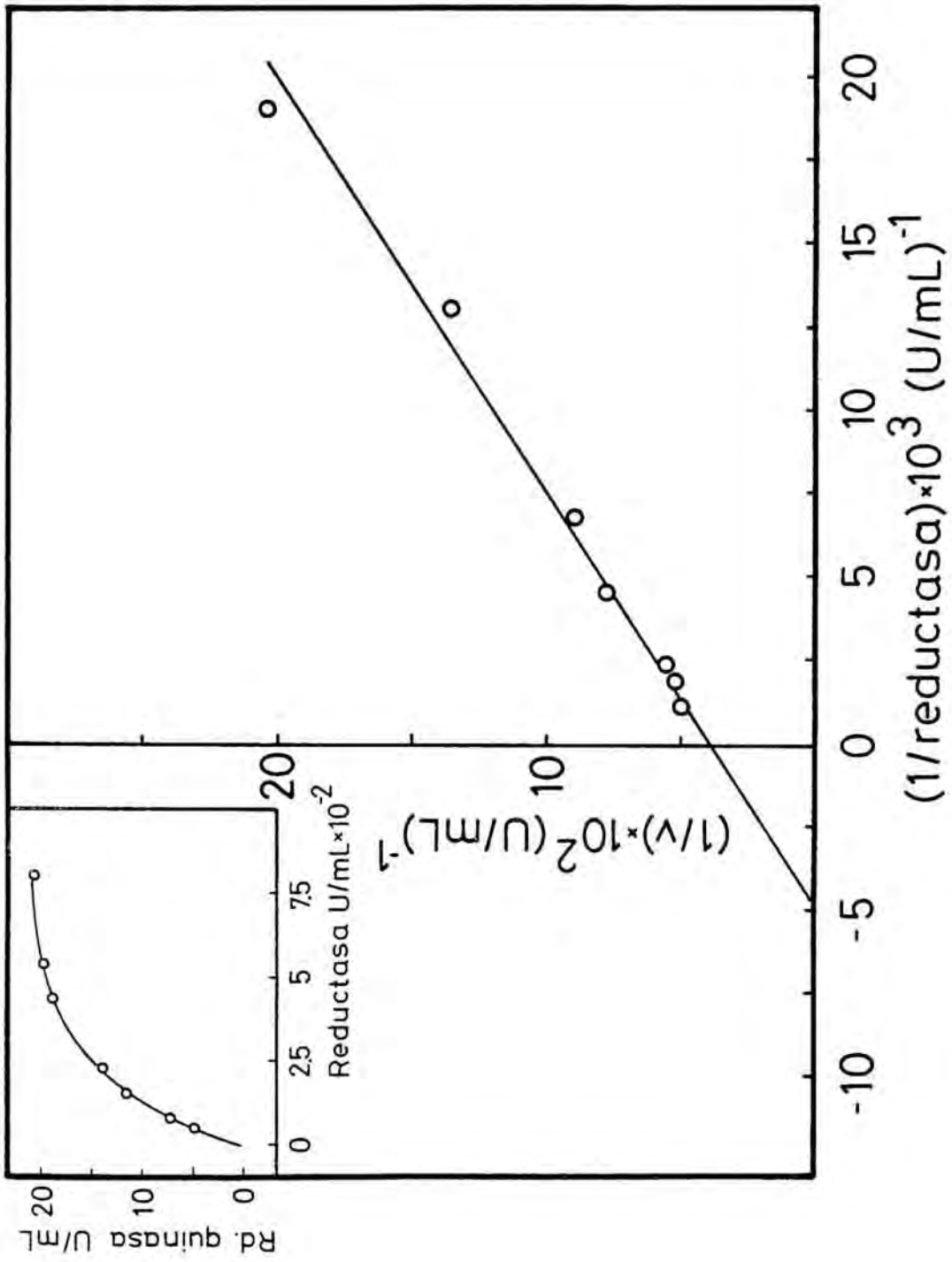
Se determinó la actividad reductasa quina-  
sa de las mezclas descritas en el texto, que con-  
tenían concentraciones crecientes del sustrato  
HMG-CoA reductasa, tal como se describe en el  
apartado 2.4.4. de Métodos.

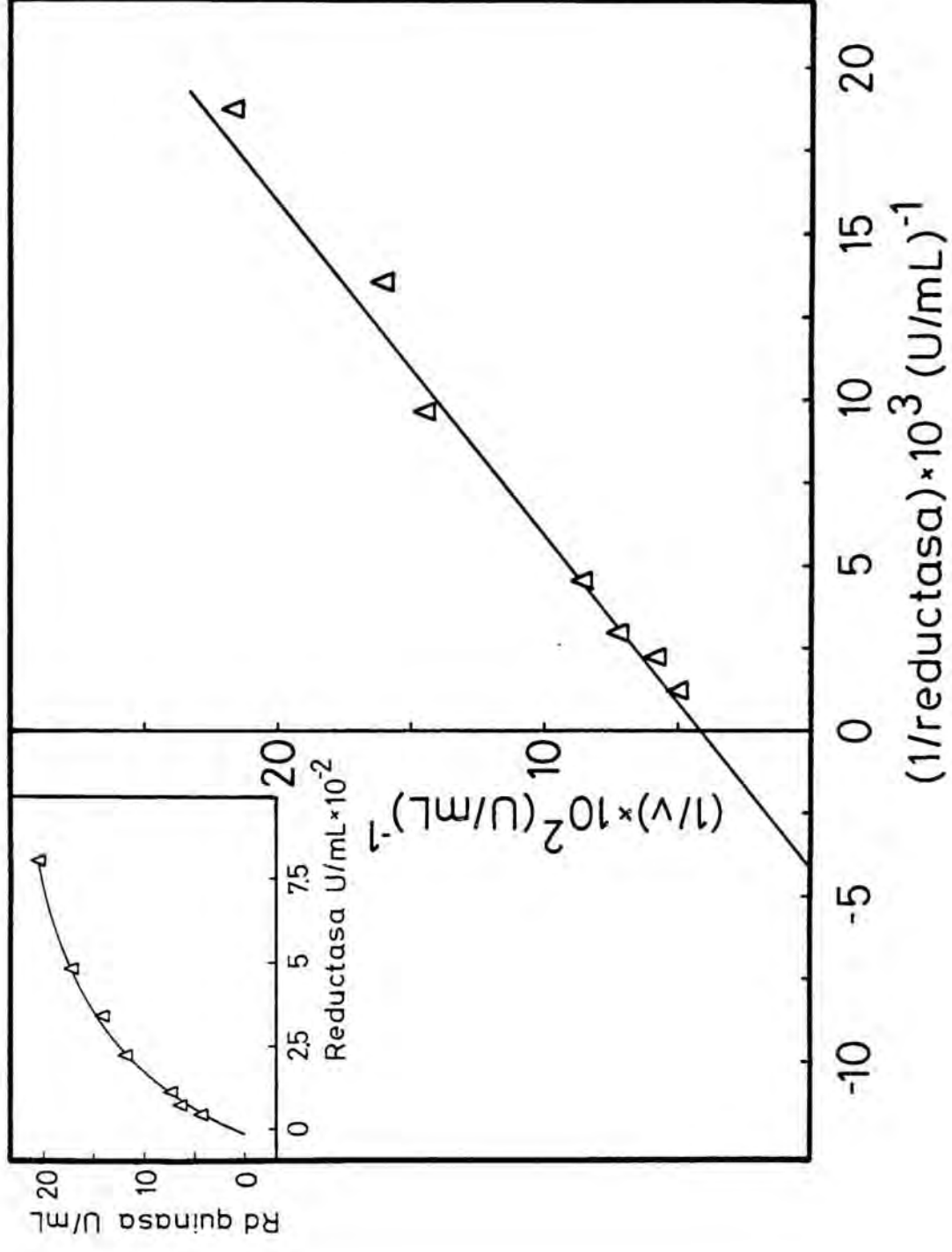
Las figuras muestran las representaciones  
de dobles recíprocos, siguiendo el método de Li-  
neweaver y Burk. En ordenadas se expresan los  
inversos de los valores de la velocidad de reac-  
ción, expresada en unidades de HMG-CoA reductasa  
inactivadas/min.x mL y en abcisas los inversos  
de las concentraciones de HMG-CoA reductasa ex-  
presadas en U/mL.

Las rectas se calcularon por regresión lí-  
neal de los datos.

En el recuadro se representa, en ordenadas  
la velocidad de la reacción y en abcisas la con-  
centración de HMG-CoA reductasa, ambas expresa-  
das en las mismas unidades descritas.

Los resultados obtenidos para la reductasa  
quinasa de citosol (○) se muestran en la figura  
17 y los obtenidos para la reductasa quinasa de  
microsomias (△) en la figura 18.





tasa quinasa (0,16 U) a 37°C con concentraciones crecientes de ATP, comprendidas entre 0,05 y 2 mM durante 15 minutos, en un volumen total de 20  $\mu$ L. La cantidad de HMG-CoA reductasa presente en los ensayos se mantuvo constante al igual que los demás componentes de las mezclas de reacción. La actividad reductasa quinasa se midió en presencia de AMP tal como se explica en el apartado 2.4.4.

Las figuras 19 y 20 muestran los resultados obtenidos. También en este caso las actividades de las dos reductasa quinasa, exhiben un comportamiento dependiente de la concentración del sustrato ATP, propio del modelo cinético descrito por Michaelis y Menten.

Los valores de  $K_M$  calculados para las reductasa quinasa de citosol y de microsomas, son de 360  $\mu$ M y 330  $\mu$ M, respectivamente. Asimismo, en estas condiciones de trabajo los valores de velocidad máxima son de 32,5 U/mL y 30,7 U/mL respectivamente.

### 3.9.8. CONDICIONES DE ENSAYO DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Una vez habían sido determinadas las condiciones óptimas de ensayo, procedimos a establecer la metodología que se ha seguido a lo largo de este trabajo, salvo que se indique lo contrario.

Las condiciones utilizadas son esencialmente las descritas en el apartado 2.4.4. de Métodos. El volumen de la mezcla de reacción es de 20  $\mu$ L totales y está compuesta habitualmente por 5  $\mu$ L de cada reductasa quinasa (0,1-0,2 unidades), 10  $\mu$ L de HMG-CoA reductasa (9 unidades) y 5  $\mu$ L de la solución amortiguadora que, entre otros componentes descritos, contenía ATP 2 mM, AMP 0,5 mM y  $MgCl_2$  15,6 mM. El pH del medio de reacción se mantiene en todo momento a

## FIGURAS 19 Y 20

DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS-  
MENTEN DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS PARA  
EL SUSTRATO ATP

Se determinó la actividad reductasa quinasa de las mezclas descritas en el texto, que contenían cantidades crecientes del sustrato ATP, tal como se describe en el apartado 2.4.4. de Métodos. La cantidad de HMG-CoA reductasa fue la misma en todos los ensayos (0,7  $\mu\text{g}$ , 8,7 U).

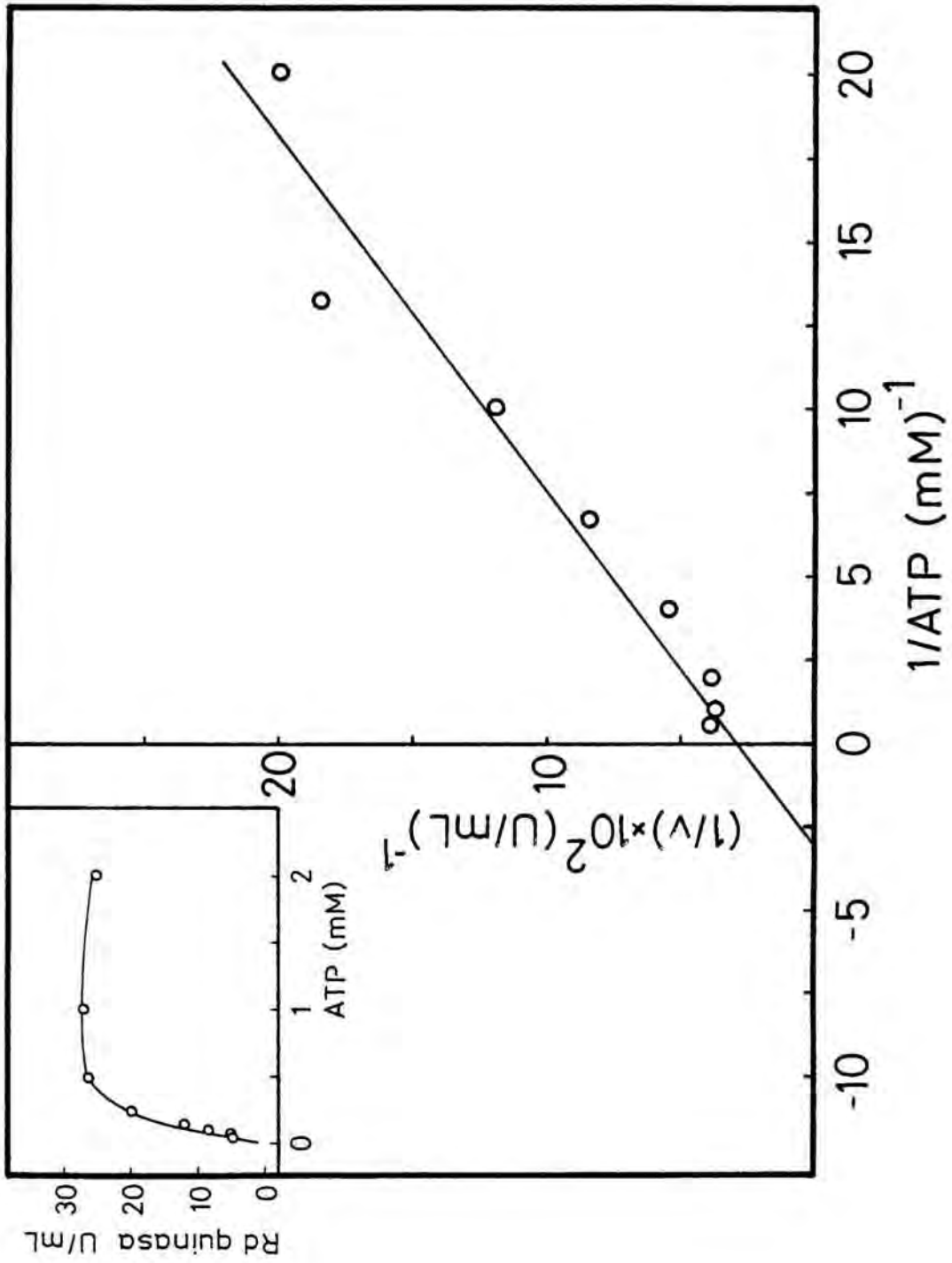
Las figuras muestran las representaciones de dobles recíprocos, siguiendo el método de Lineweaver y Burk. En ordenadas se expresan los inversos de los valores de la velocidad de reacción, expresada en unidades de HMG-CoA reductasa inactivadas/min.x mL y en abcisas los inversos de las concentraciones de ATP expresadas en mM.

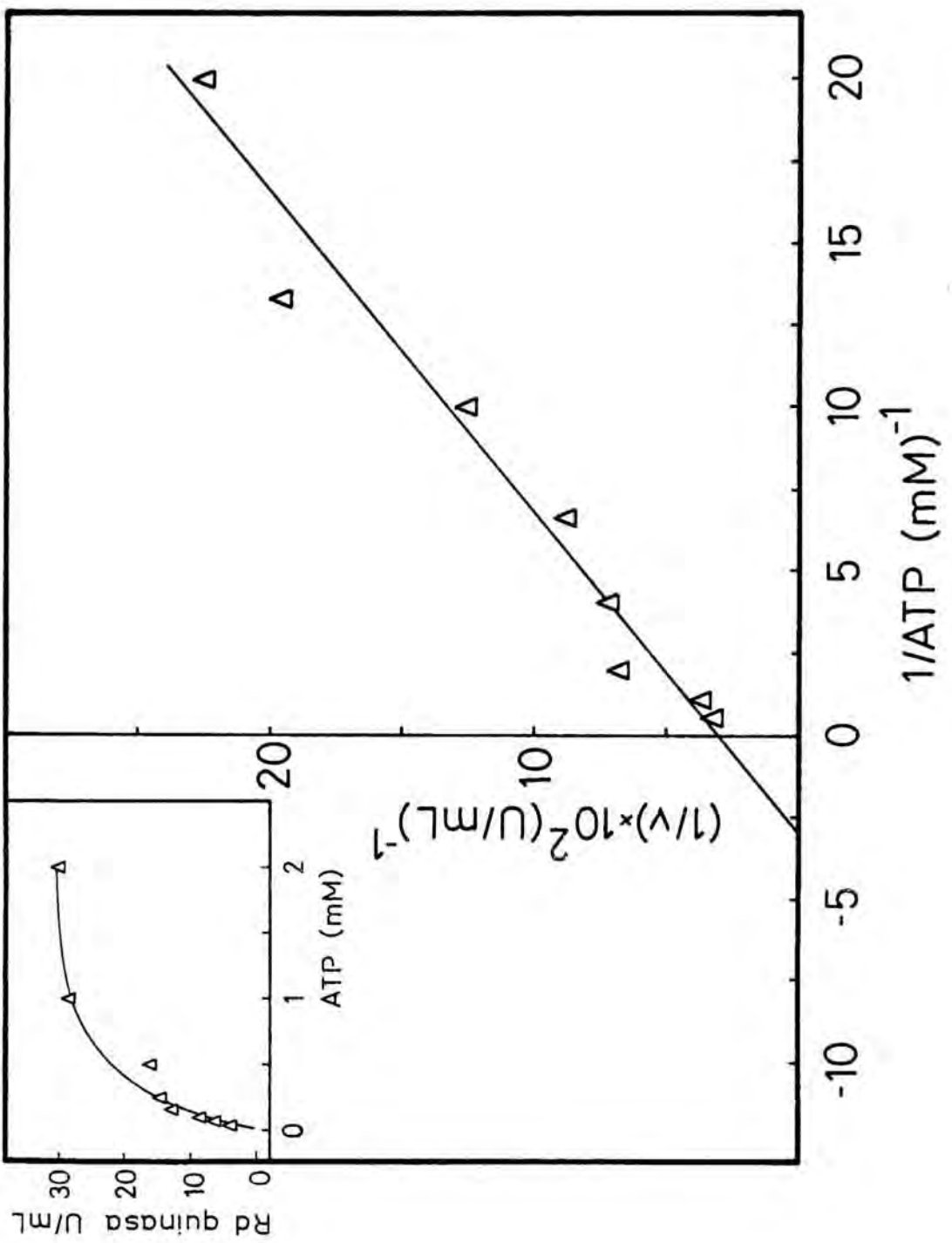
Las rectas se calcularon por regresión lineal de los datos.

En el recuadro se representa, en ordenadas la velocidad de la reacción y en abcisas la concentración de ATP, ambas expresadas en las mismas unidades anteriores.

Los resultados obtenidos para la reductasa quinasa de citosol (O) se muestran en la figura 19 y los obtenidos para la reductasa quinasa de microsomas ( $\Delta$ ) en la figura 20.







7,5. La reacción se inicia por adición de la última solución descrita. La mezcla se incubaba a 37°C durante 15 minutos y la actividad reductasa remanente, se determina tal como se describe en el apartado 2.4.4. En estas condiciones no se transforma más de un 20% del sustrato HMG-CoA reductasa. Tampoco se detecta contaminación de nuestras preparaciones por HMG-CoA reductasa fosfatasa.

### 3.9.9. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE ACTIVACION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS PARA EL ADP

Los resultados presentados en el apartado 3.9.2., además de demostrar por primera vez la capacidad activadora del AMP sobre la actividad de reductasa quinasa, parecían confirmar esta misma facultad para el ADP. Sin embargo, la existencia en las preparaciones de ADP usadas de una contaminación de AMP estimada en un 10% (2.4.7.), no permitía descartar completamente la hipótesis de que el único nucleótido con capacidad para activar a las reductasa quinasas fuera el AMP. El incremento de la actividad enzimática observado al adicionar a la mezcla de reacción ADP, se debería en consecuencia, única y exclusivamente a la presencia del nucleósido monofosfato contaminante.

Para poder esclarecer este punto de duda procedimos a comprobar la capacidad activadora del ADP, empleando para ello soluciones del nucleótido preparadas extemporáneamente, en las que la proporción de AMP contaminante era despreciable, tal como se ha demostrado en el apartado 2.4.7. de Métodos.

Se incubaron cantidades idénticas de las dos reductasa quinasas hepáticas (0,16 U) a 37°C, con concentraciones crecientes de ADP comprendidas entre 0,05 y 2 mM, durante 15 minutos en un volumen total de 20 µL. Las concentraciones de HMG-CoA reductasa y de ATP se mantuvieron constantes y fueron las descritas en el apartado anterior.

## FIGURAS 21 Y 22

DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE ACTIVACION  
DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS PARA EL  
ACTIVADOR ADP

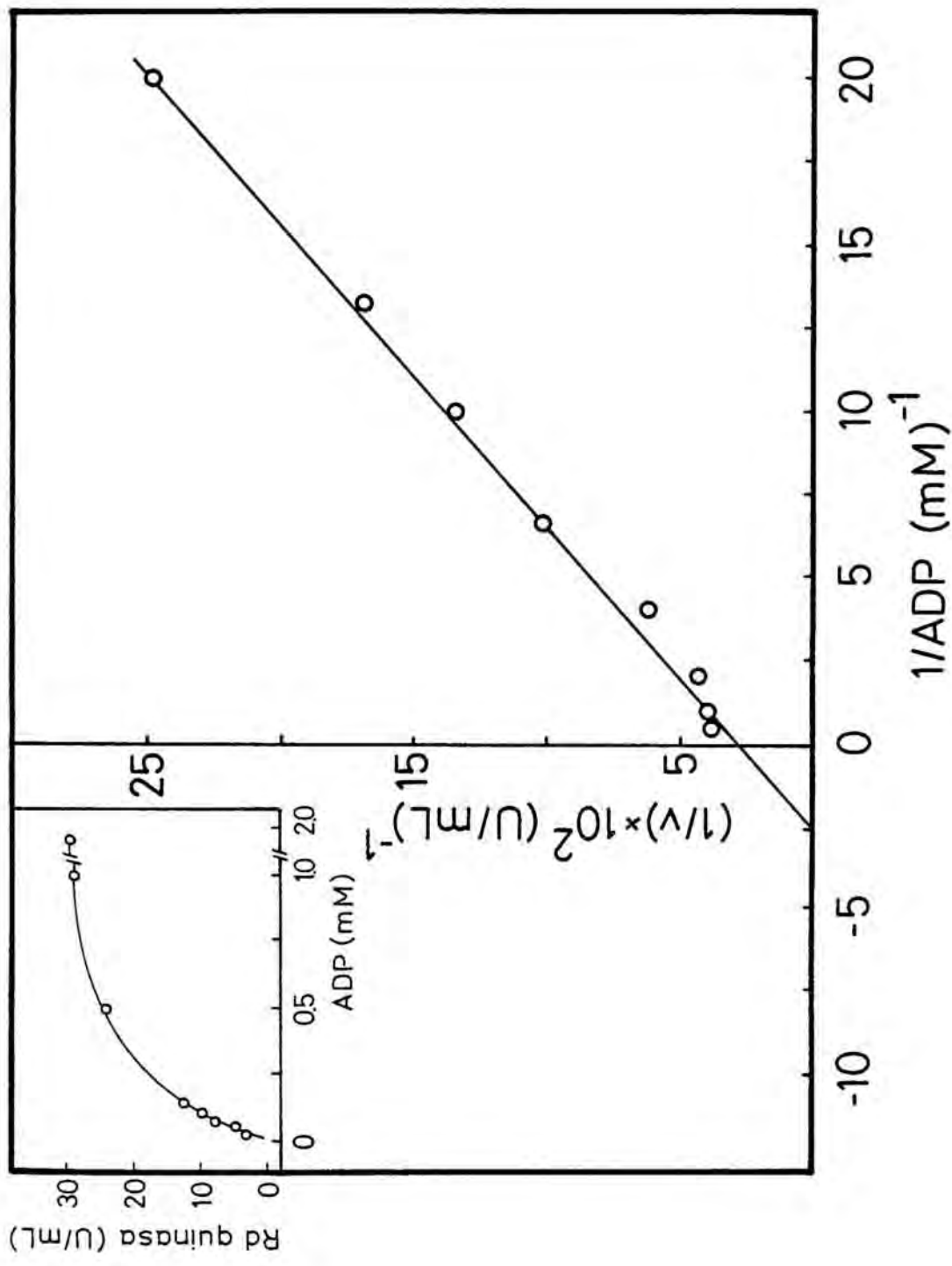
Se determinó la actividad reductasa quinasa de las mezclas descritas en el texto, que contenían concentraciones crecientes del activador ADP. Las concentraciones de los dos sustratos fueron las descritas en el apartado 3.9.8. y se mantuvieron constantes en todos los ensayos.

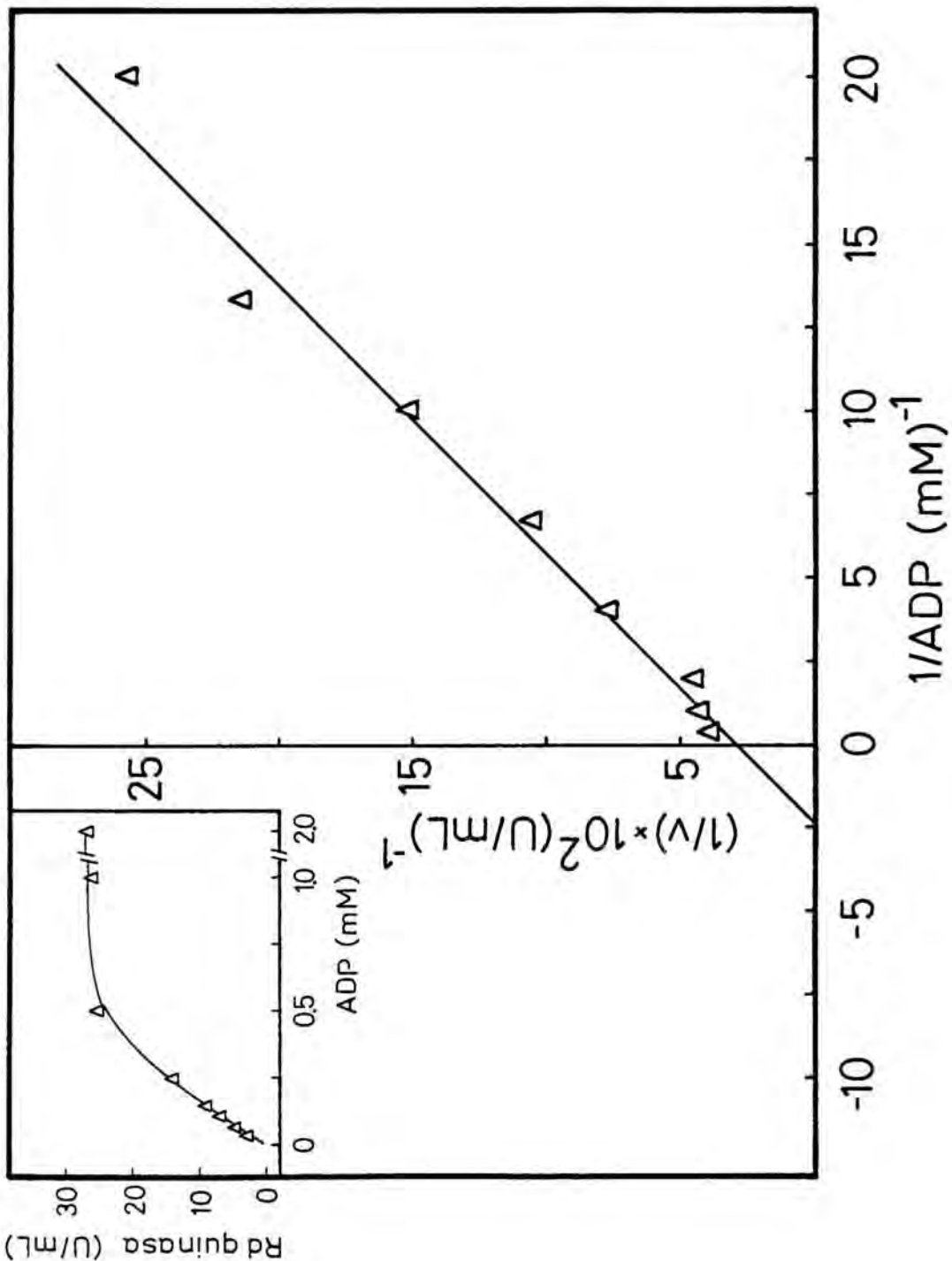
Las figuras muestran las representaciones de dobles recíprocos, siguiendo el método de Lineweaver y Burk. En ordenadas se representan los inversos de los valores de la velocidad de reacción, expresada en unidades de HMG-CoA reductasa inactivadas/min.x mL y en abcisas, los inversos de las concentraciones de ADP expresadas en mM.

Las rectas se calcularon por regresión lineal de los datos.

En el recuadro se representa, en ordenadas la velocidad de la reacción y en abcisas la concentración de ADP, ambas expresadas en las mismas unidades anteriores.

Los resultados obtenidos para la reductasa quinasa de citosol (○) se muestran en la figura 21 y los obtenidos para la reductasa quinasa de microsomas (△) en la figura 22.





Los resultados obtenidos se encuentran representados en las figuras 21 y 22. Los valores de las constantes de activación,  $K_a$ , calculadas para las reductasa quinasas de citosol y de microsomas son de 420  $\mu\text{M}$  y 431  $\mu\text{M}$  de ADP respectivamente. En las condiciones empleadas los valores de velocidad máxima son de 35,3 U/mL y 33,3 U/mL, respectivamente.

Simultáneamente se efectuaron una serie de controles destinados a comprobar la posible influencia del nucleósido difosfato sobre la HMG-CoA reductasa durante los 15 minutos de incubación a 37°C, así como sobre la expresión de su actividad. No se apreció ningún efecto derivado de la presencia de ADP sobre la HMG-CoA reductasa, tanto sobre su estabilidad como sobre la expresión de su actividad.

#### 3.9.10. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE ACTIVACION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS PARA EL AMP

Se incubaron las mismas cantidades de las dos reductasa quinasas (0,16 U) a 37°C, en presencia de concentraciones crecientes de AMP comprendidas entre 0,005 y 2 mM durante 15 minutos, en un volumen total de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . Como en el apartado anterior las concentraciones de HMG-CoA reductasa y de ATP fueron constantes e iguales a las descritas en el apartado 3.9.8.

Los resultados se hallan representados en las figuras 23 y 24, siendo los valores de las constantes de activación calculados para las reductasa quinasas de citosol y de microsomas de 20  $\mu\text{M}$  y 17,2  $\mu\text{M}$  respectivamente. Los valores de velocidad máxima obtenidos en las condiciones descritas, son de 33,3 U/mL y 28,5 U/mL respectivamente.

Controles llevados a cabo paralelamente con idénticos

## FIGURAS 23 Y 24

DETERMINACION DE LAS CONSTANTES DE ACTIVACION  
DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS PARA EL  
ACTIVADOR AMP

Se determinó la actividad reductasa quinasa de las mezclas descritas en el texto, que contenían concentraciones crecientes de AMP. Las concentraciones de los dos sustratos, que se mantuvieron constantes en todos los ensayos, fueron las descritas en el apartado 3.9.8.

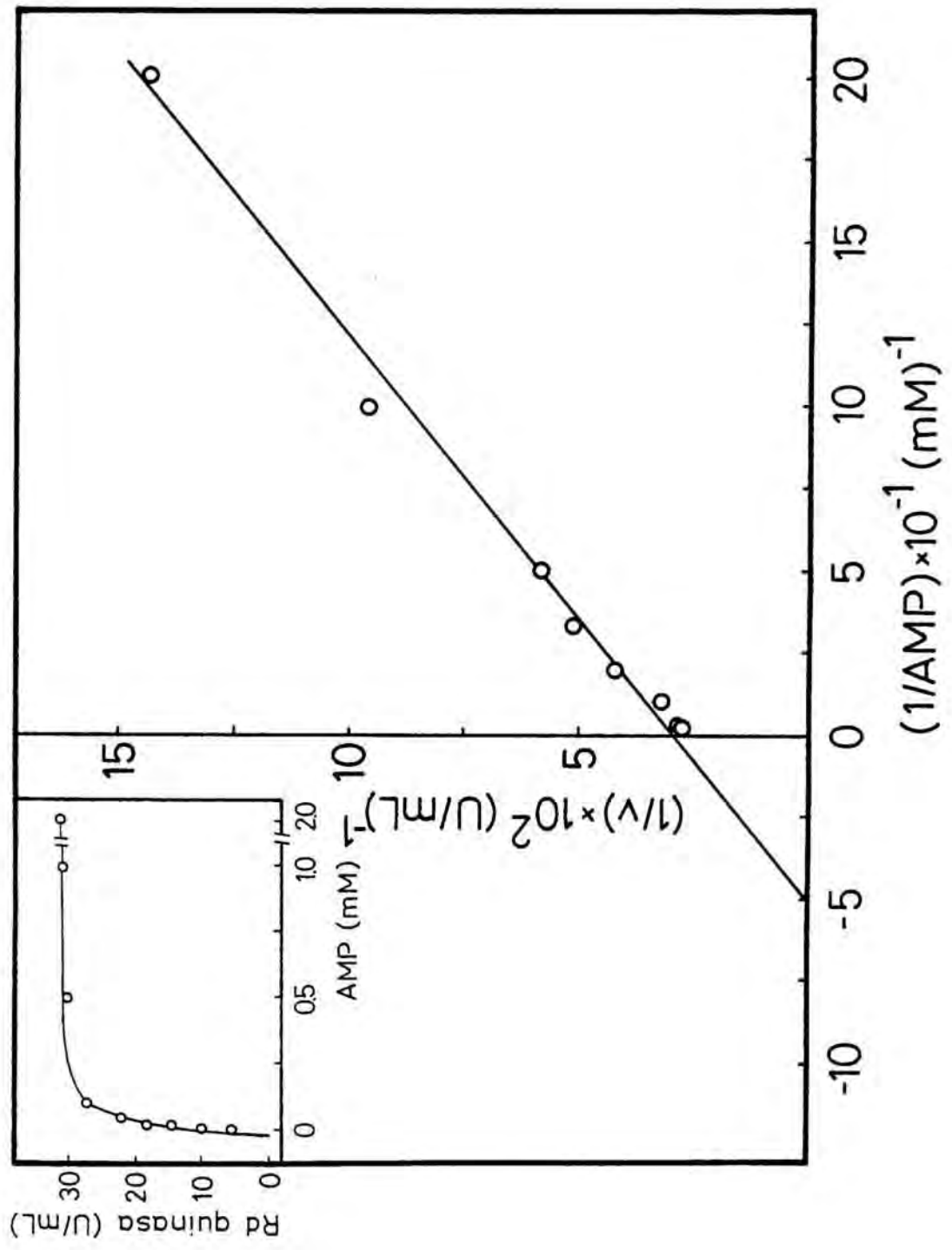
Las figuras muestran las representaciones de dobles recíprocos, siguiendo el método de Lineweaver y Burk. En ordenadas se representan los inversos de los valores de la velocidad de reacción, expresada en unidades de HMG-CoA reductasa inactivadas/min.x mL y en abcisas los inversos de las concentraciones de AMP expresadas en mM.

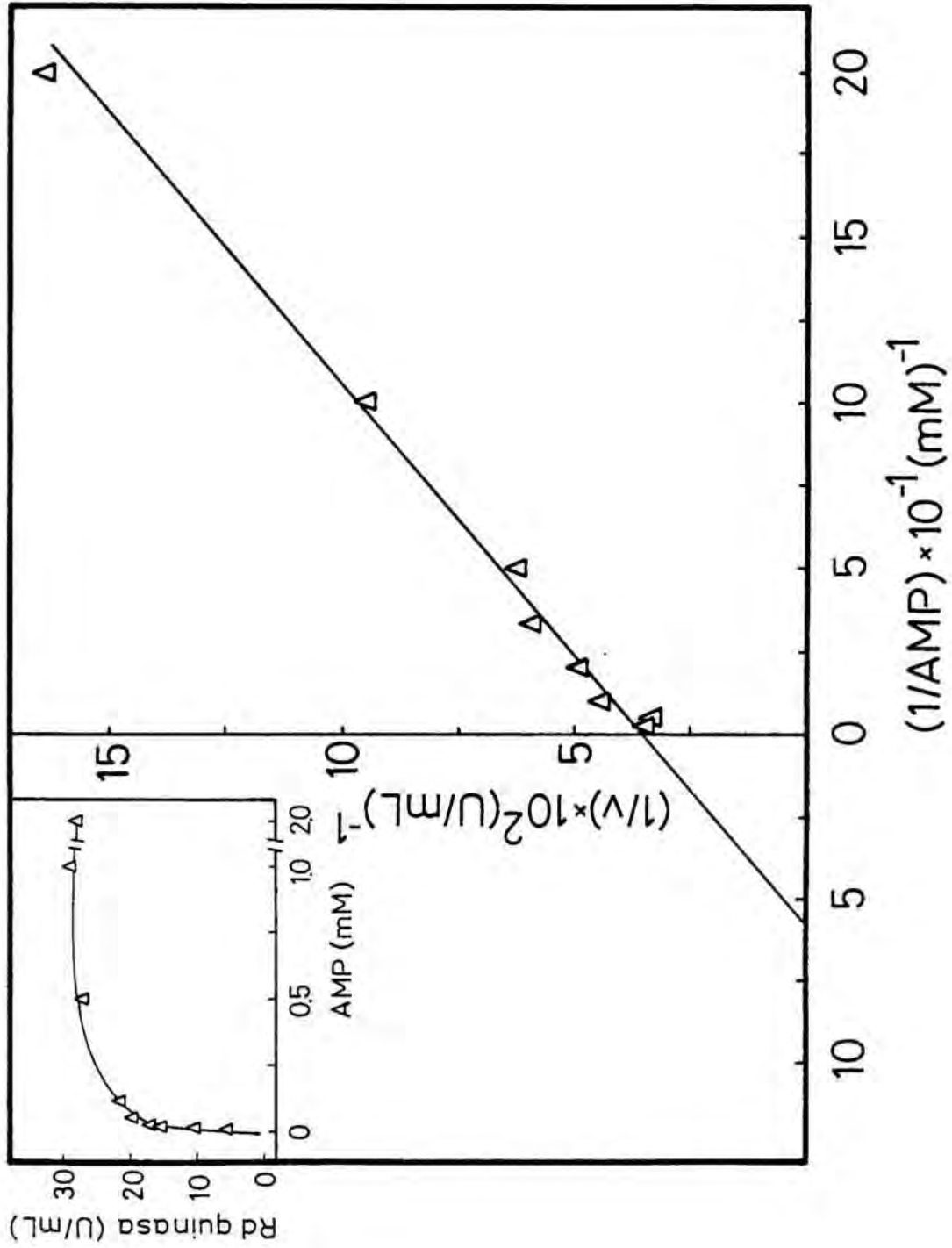
Las rectas se calcularon por regresión lineal de los datos.

En el recuadro se representa, en ordenadas la velocidad de la reacción y en abcisas la concentración de AMP, expresadas ambas en las mismas unidades descritas.

Los resultados obtenidos para la reductasa quinasa de citosol (○) se muestran en la figura 23 y los obtenidos para la reductasa quinasa de microsomas (△) en la figura 24.







tico propósito al descrito en el apartado anterior, pero en este caso con el nucleósido monofosfato, proporcionaron también análogos resultados, no apreciándose ninguna influencia del AMP sobre la HMG-CoA reductasa.

Los resultados presentados en este apartado y en el precedente, sugieren claramente que ambos nucleótidos (ADP y AMP), tienen capacidad activadora sobre la actividad de reductasa quinasa de nuestras dos preparaciones dadas las precauciones tomadas en su preparación. Por otra parte, resulta evidente la muy superior potencia activadora del AMP frente al ADP, como se deduce de la comparación de ambas constantes de activación. Las dos reductasa quinasas exhiben una  $K_a$  para el AMP que es alrededor de 20 veces más pequeña que la  $K_a$  para el ADP. Por el contrario, la velocidad máxima de reacción obtenida en presencia de concentraciones saturantes de ambos activadores, presenta valores semejantes en las reacciones catalizadas por ambas enzimas.

Finalmente, merece la pena destacar la notable similitud en la respuesta de las dos reductasa quinasas de citosol y de microsomas, frente a ambos efectores, como se deduce de la comparación de los valores de las constantes cinéticas determinadas.

### 3.10. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ACTIVADOR DEL AMP Y DEL ADP SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Los experimentos cuyos resultados se presentan en este apartado se llevaron a cabo con objeto de confirmar definitivamente los resultados obtenidos con anterioridad, relativos a la superior capacidad activadora del AMP respecto del ADP. Además, permitieron establecer aquellas condiciones de ensayo más adecuadas para poder demostrar que la capacidad activadora de ambos nucleótidos (superior en el caso del AMP), se manifestaba incrementando las velocidades iniciales de inactivación en distinta medida, y que este efecto se traducía también en una modificación análoga de las velocidades de fosforilación de la HMG-CoA reductasa a partir de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, por acción de las reductasa quinasas.

#### 3.10.1. INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Tres alícuotas de cada una de las dos preparaciones de las reductasa quinasas (fracción procedente de la cromatografía en columna de ATP-hexano-agarosa) se incubaron a 37°C con una cantidad constante de HMG-CoA reductasa en presencia de ATP, ATP/ADP y ATP/AMP. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron alícuotas en las que, tras diluir convenientemente la reductasa, se determinó su acti-

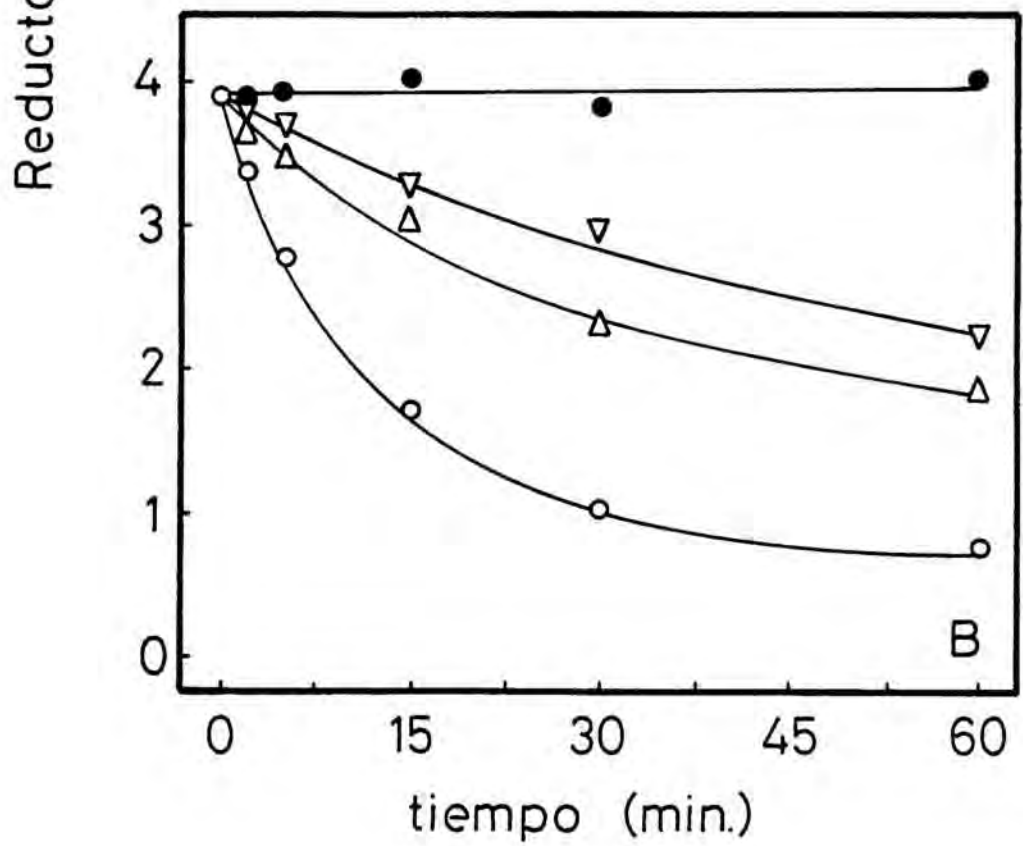
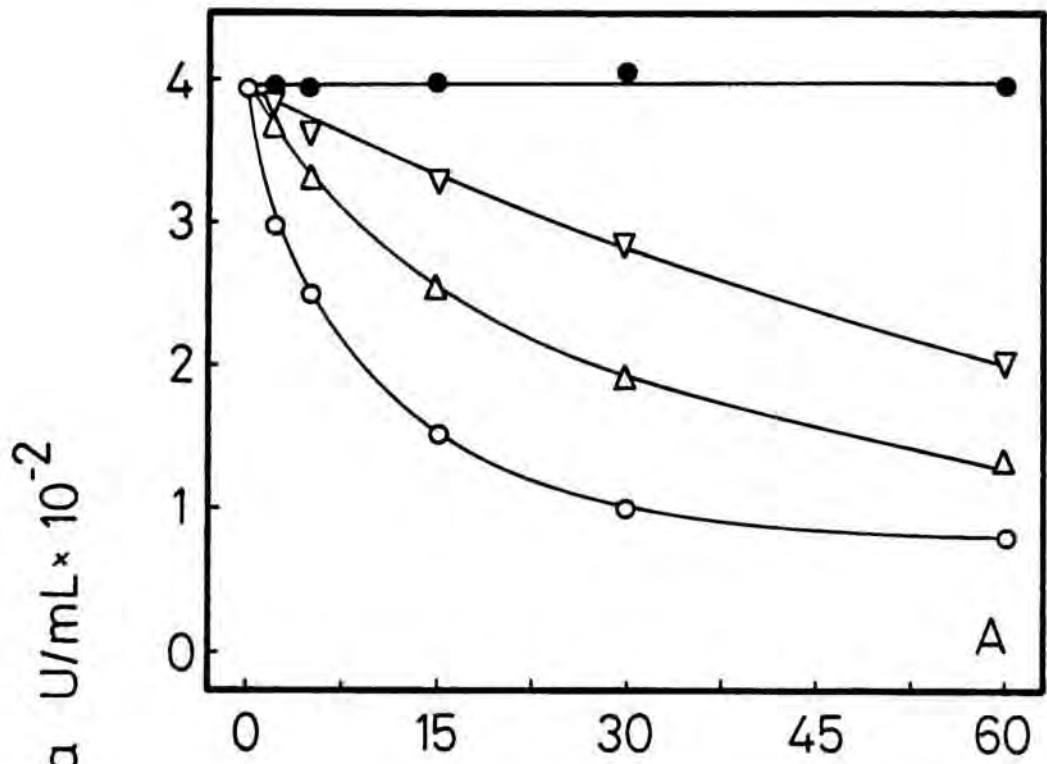
FIGURA 25 INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR LAS REDUCTASA QUINASAS EN PRESENCIA DE ATP, ATP/ADP Y ATP/AMP

Tres alícuotas de ambas reductasa quinasas (0,9 U) se incubaron a 37°C con una cantidad constante de HMG-CoA reductasa (1,28 µg, 16 U), en un volumen total de 40 µL. A cada una de las tres mezclas se añadió, ATP 1 mM (▽), ATP/ADP 1/0,1 mM (△) y ATP/AMP 1/0,1 mM (○). Las demás condiciones de ensayo se mantuvieron constantes y fueron las descritas en 2.4.4.

A los tiempos indicados en abcisas se tomaron alícuotas de 5 µL en las que se determinó la actividad reductasa, una vez diluidas, tal como se explica en 2.4.2. La actividad reductasa se representa en U/mL, en ordenadas.

Simultáneamente se realizaron controles de actividad reductasa en todas las condiciones descritas pero en ausencia de MgCl<sub>2</sub>. Se ha representado la media de los valores obtenidos (●).

- A) Reductasa quinasa de citosol.
- B) Reductasa quinasa de microsomas.



vidad tal y como se explica en el apartado 2.4.2.

La concentración de nucleótido activador (ADP o AMP), allí donde lo había, fue de 0,1 mM. Esta concentración se seleccionó a partir de los valores de las constantes de activación obtenidos previamente. Como se puede apreciar, resulta ser saturante para el AMP (5 veces superior a la  $K_a(\text{AMP})$ ) y subsaturante para el ADP (4,2 veces inferior a la  $K_a(\text{ADP})$ ).

Los resultados se muestran en la figura 25 en la que se observan las diferentes velocidades de la reacción de inactivación de la reductasa. Este fenómeno se acentúa en las etapas iniciales de la misma. Las velocidades de reacción en presencia de ATP/ADP y de ATP/AMP son 1,7 y 5,7 veces mayores respectivamente, en relación a la velocidad de reacción medida en ausencia del activador, para la reductasa quinasa del citosol. Cuando se emplea reductasa quinasa de microsomas, las velocidades en presencia de ATP/ADP y de ATP/AMP son 1,8 y 5,1 veces mayores respectivamente.

### 3.10.2. FOSFORILACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Tres alícuotas de cada una de las dos preparaciones de las reductasa quinasas (fracción procedente de la cromatografía en columna de ATP-hexano-agarosa) se incubaron a 37°C con una cantidad constante de HMG-CoA reductasa, en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . La primera de ellas no recibió adición alguna, las otras dos mezclas recibieron ADP 0,1 mM y AMP 0,1 mM respectivamente. A distintos intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de las mezclas de reacción en las que se determinó el  $^{32}\text{P}$  ligado a reductasa, tal como se describe en 2.5.

Los resultados obtenidos se hallan representados

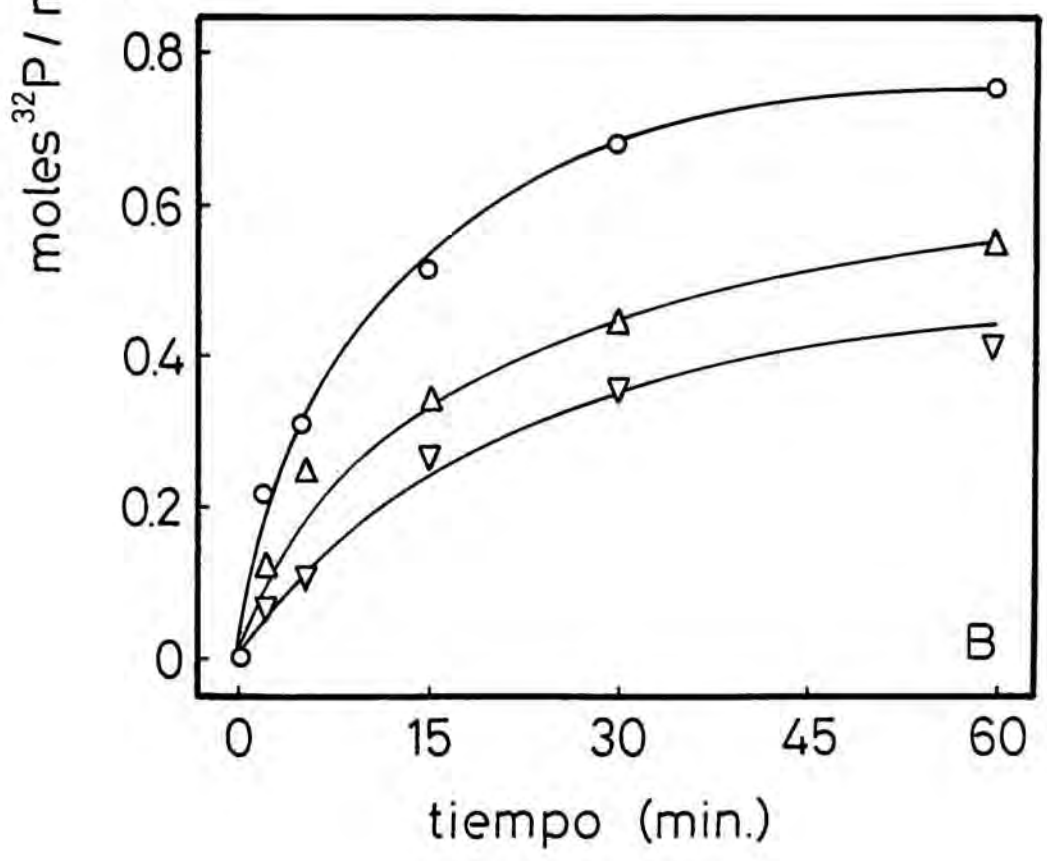
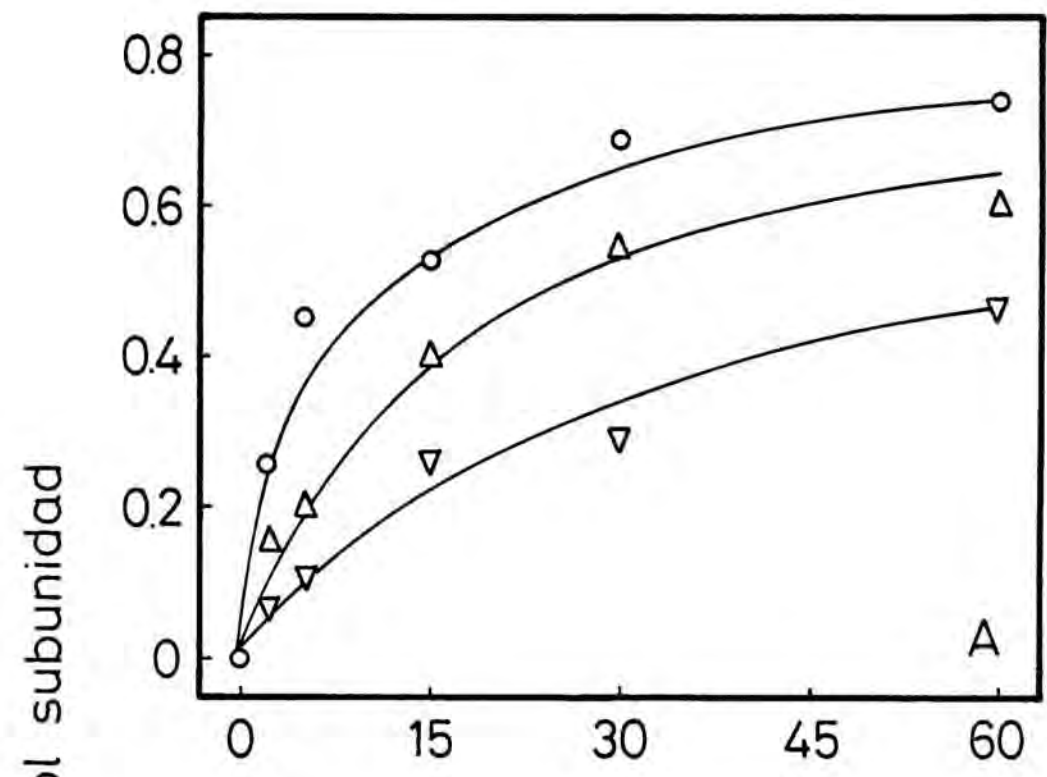
FIGURA 26 FOSFORILACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR LAS REDUCTASA QUINASAS EN PRESENCIA DE ATP, ATP/ADP Y ATP/AMP

Tres alícuotas de ambas reductasa quinasas (3,5 U) se incubaron a 37°C con una cantidad constante de HMG-CoA reductasa (5,6 µg, 70U), en un volumen total de 160 µL. A cada una de las tres mezclas se añadió, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 1 mM (∇), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP/ADP 1/0,1 mM (Δ) y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP/AMP 1/0,1 mM (○). La radioactividad específica fue de 450 cpm/pmol. Las demás condiciones de ensayo se mantuvieron constantes y fueron las descritas en 2.4.4.

A los tiempos indicados en abcisas se tomaron alícuotas de 20 µL en las que se detuvo la reacción por precipitación de las proteínas con TCA (2.5.). El precipitado proteico fue analizado electroforéticamente (2.8.1.) y se obtuvieron los correspondientes autorradiogramas (2.9.2.). La radioactividad ligada a la reductasa se cuantificó por efecto Cerenkov, en los segmentos del gel que contenían la proteína.

- A) Reductasa quinasa de citosol.
- B) Reductasa quinasa de microsomas.





en la figura 26, en la que se observa como la fosforilación de la HMG-CoA reductasa por ambas quinasas en las condiciones descritas, se produce más rápidamente en presencia de AMP que en presencia de ADP y en ambos casos, más rápidamente que con ATP solo. Las velocidades de la reacción de fosforilación catalizada por ambas reductasa quinasas en presencia de ATP/ADP son entre 1,7 y 2 veces mayores y con ATP/AMP entre 4 y 6 veces mayores con respecto a la velocidad de la reacción en presencia de ATP solo. Estos resultados se correlacionan perfectamente, con los obtenidos al estudiar la inactivación de la HMG-CoA reductasa en análogas condiciones y confirman el carácter del AMP como principal nucleótido activador de las reductasa quinasas hepáticas.

### 3.11. INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR LA ACCION COMBINADA DE LAS REDUCTASA QUINASAS

En la totalidad de experimentos de inactivación de la HMG-CoA reductasa, independientemente de la quinasa empleada, ésta no progresaba más, cuando la actividad reductasa remanente oscilaba alrededor del 20 % de la actividad reductasa inicial.

Los experimentos presentados a continuación, se realizaron con el fin de comprobar si realmente la reductasa empleada como sustrato, era refractaria a cualquier superior inactivación o bien, por el contrario, el grado de inactivación podía aumentar por la acción secuencial o simultánea de ambas reductasa quinastas.

#### 3.11.1 INACTIVACION SECUENCIAL DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Una alícuota de cada una de las dos muestras de reductasa quinasa se incubó a 37°C con una cantidad fija de reductasa, en las condiciones descritas en el apartado 3.9.8. A intervalos de tiempo, hasta un máximo de 60 minutos, se tomaron alícuotas en las que se determinó la actividad reductasa según se describe en 2.4.2

Al cabo de 60 minutos de incubación, a una alí-

cuota de cada mezcla, se le añadió una cantidad adecuada de la reductasa quinasa presente previamente, manteniéndose constantes las concentraciones de los metabolitos requeridos para la reacción de inactivación. La segunda alícuota no recibió adición de reductasa quinasa, aún cuando se reprodujeron idénticas condiciones que en el primer caso. La reacción de inactivación, se prolongó durante otros 45 minutos, determinándose la actividad reductasa en alícuotas tomadas a diferentes tiempos.

Los resultados obtenidos, mostrados en la figura 27, indican que el porcentaje de inactivación de la HMG-CoA reductasa, no se incrementa una vez se ha alcanzado el máximo grado de inactivación tras 60 minutos de incubación, por la adición de la misma reductasa quinasa que ha actuado previamente. Este resultado obtenido en las inactivaciones catalizadas por ambas quinasas, descarta cualquier fenómeno de destrucción o inactivación de las reductasa quinasas, durante la incubación  $37^{\circ}\text{C}$  así como el agotamiento del sustrato ATP.

Seguidamente se desarrolló un experimento similar al anterior, pero con la diferencia de que después de la primera incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos, la reductasa quinasa añadida no era la misma, sino aquella procedente de la fracción hepática complementaria. Por lo demás, las condiciones del experimento fueron las mismas en todo momento.

Los resultados del experimento, mostrados en esta ocasión en la figura 28, indican, como en el caso anterior, que la inactivación de la reductasa no progresa más allá del valor alcanzado durante la primera incubación. Este resultado nos induce a pensar que ambas reductasa quinasas por separado son capaces de inactivar en igual medida a la HMG-CoA reductasa y que la inactivación (fosforilación) previa por una reductasa quinasa, no modifica la mo-

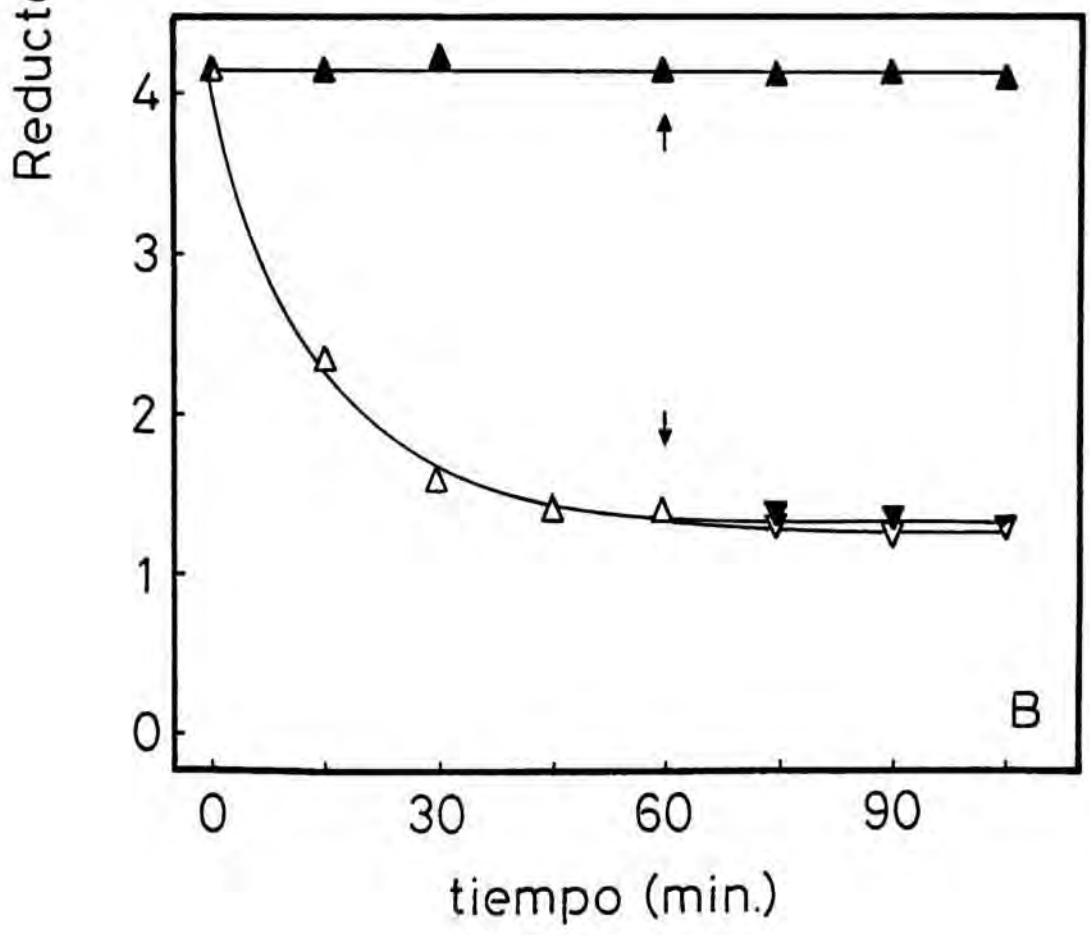
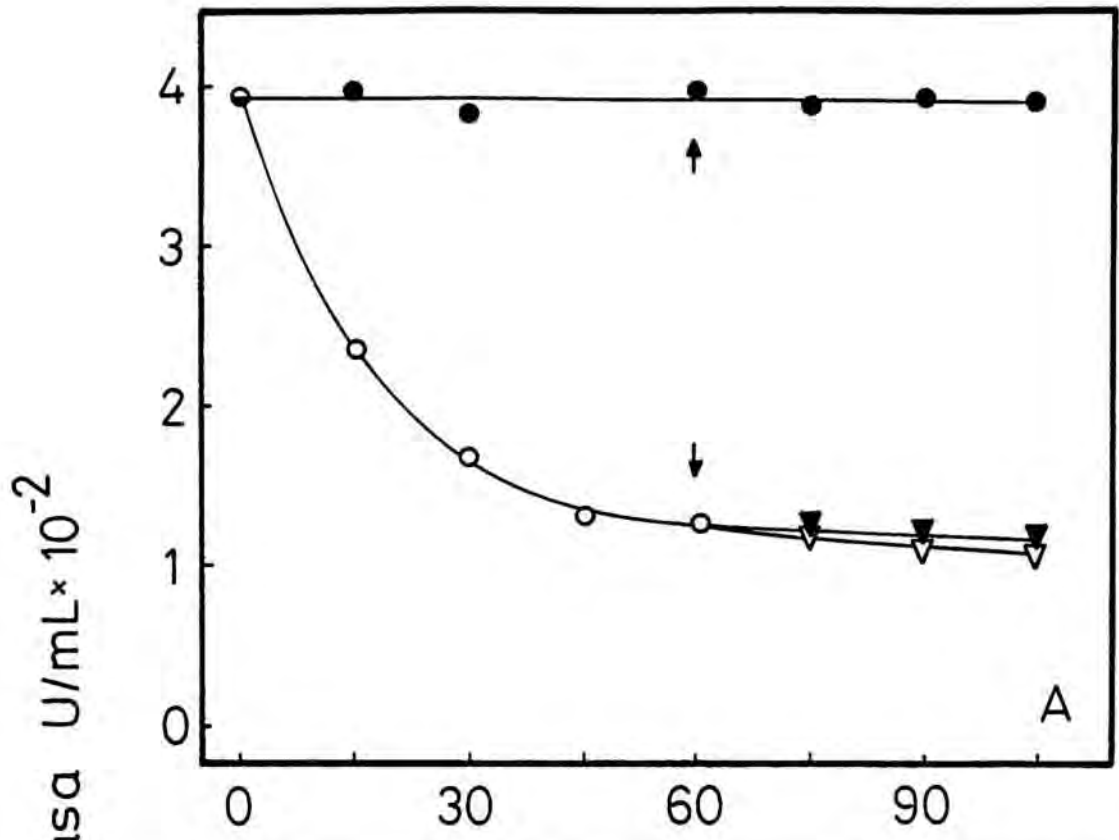
FIGURA 27 INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR ADICION SECUENCIAL DE LA MISMA REDUCTASA QUINASA

Dos alícuotas de ambas reductasa quinasas (0,9 U) se incubaron a 37°C con una cantidad constante de HMG-CoA reductasa (1,6 µg, 20 U) en un volumen total de 50 µL (○, △). Al cabo de 60 minutos de incubación se tomaron dos alícuotas de 10 µL a las que se añadieron respectivamente, 0,45 U de la misma reductasa quinasa previamente empleada en cada caso (▽) y otras dos alícuotas a las que se añadió solución amortiguadora en la que se hallaban disueltas las reductasa quinasas (▼). El volumen final fue de 20 µL.

La actividad reductasa remanente se determinó en alícuotas de 5 µL, tomadas a los distintos tiempos indicados en abcisas y adecuadamente diluídas. La actividad reductasa se representa en ordenadas, expresada en U/mL.

Sinultáneamente se realizó un control de actividad reductasa en ausencia de MgCl<sub>2</sub>, tratado en iguales condiciones (●, ▲).

- A) Reductasa quinasa de citosol.
- B) Reductasa quinasa de microsomas.



tiempo (min.)

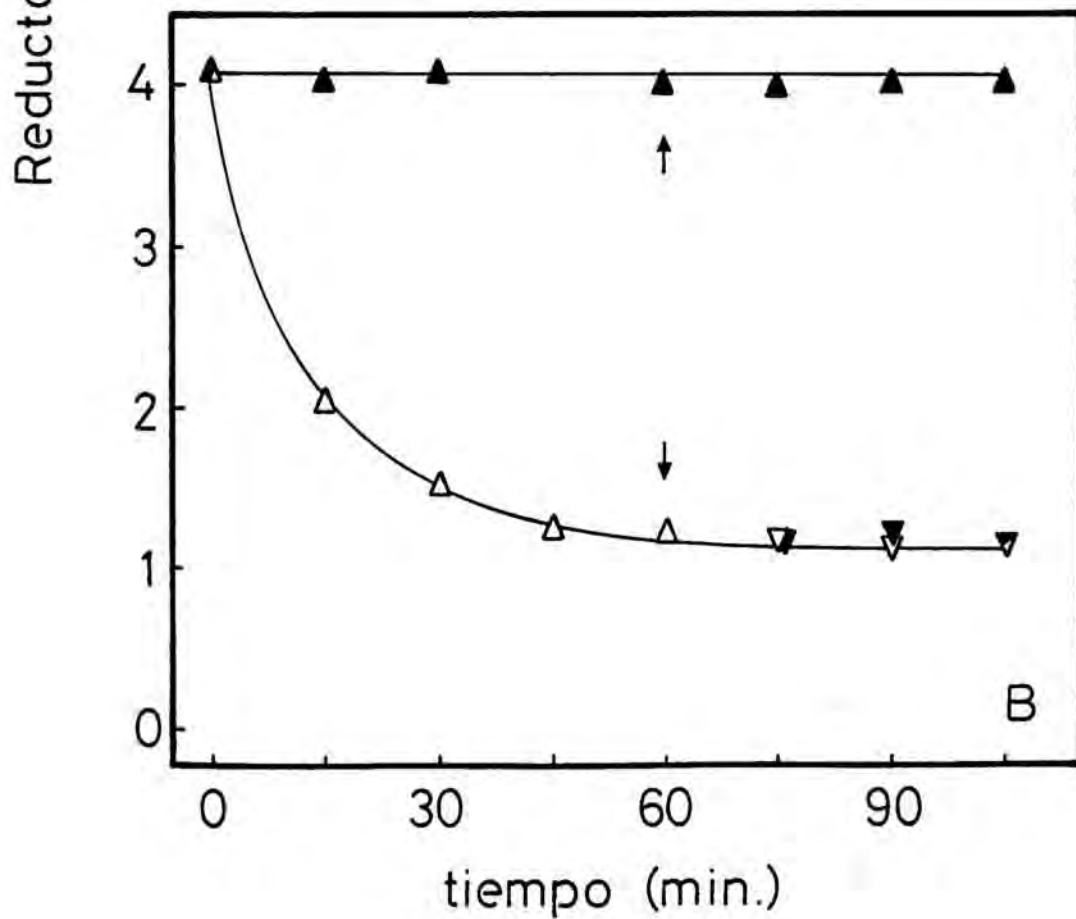
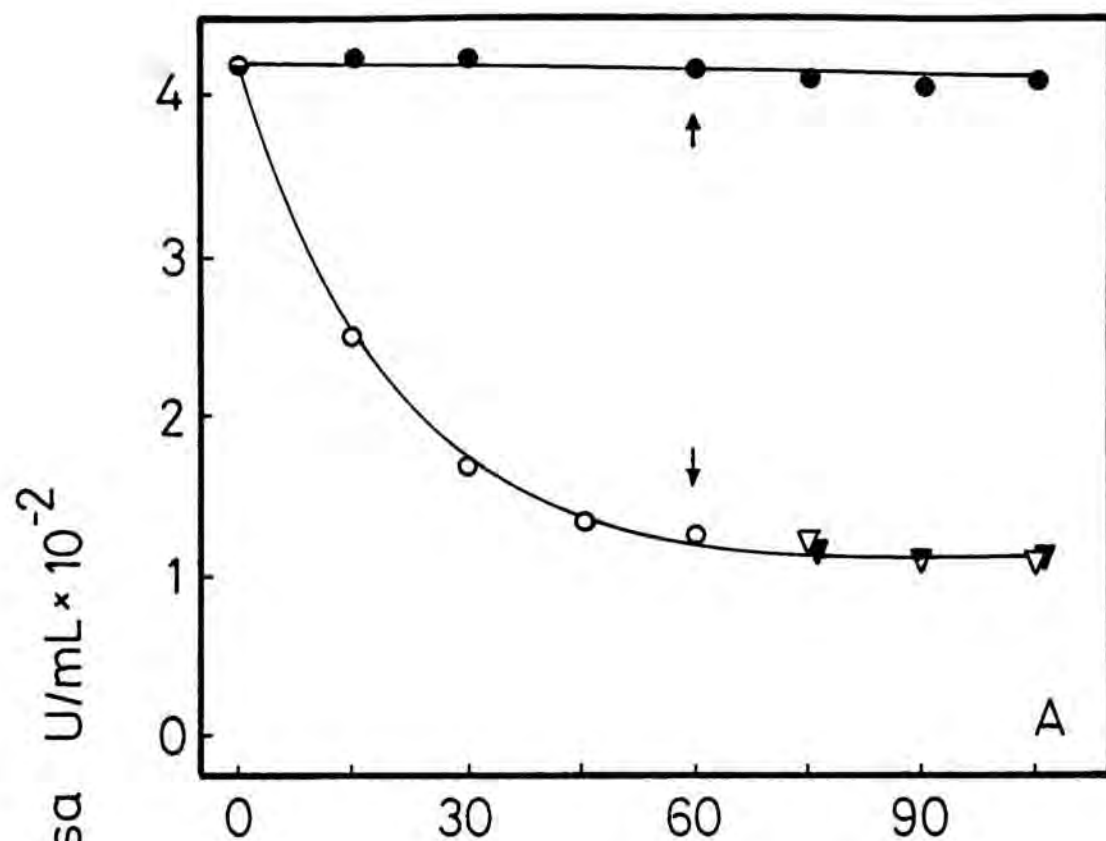
FIGURA 28 INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR ADICION SECUENCIAL DE LA REDUCTASA QUINASA PROCEDENTE DE LA FRACCION COMPLEMENTARIA

Dos alícuotas de ambas reductasa quinasa (0,9 U) se incubaron a 37°C con una cantidad constante de HMG-CoA reductasa (1,6 µg, 20 U) en un volumen total de 50 µL (○, △). Al cabo de 60 minutos de incubación se tomaron dos alícuotas de 10 µL a las que se añadieron respectivamente 0,45 U de la reductasa quinasa procedente de la fracción hepática complementaria a la empleada previamente en cada caso (▽) y otras dos alícuotas a las que se añadió solución amortiguadora en la que se hallaban disueltas las reductasa quinasa (▼). El volumen final fue de 20 µL.

La actividad reductasa residual se determinó en alícuotas de 5 µL tomadas a los distintos tiempos indicados en abscisas, adecuadamente diluidas. La actividad reductasa se representa en ordenadas, expresada en U/mL.

Simultáneamente se realizó un control de actividad reductasa en ausencia de MgCl<sub>2</sub>, tratado en iguales condiciones (●, ▲).

- A) Reductasa quinasa de citosol.
- B) Reductasa quinasa de microsomas.





lícula de HMG-CoA reductasa, aumentando su susceptibilidad a la inactivación por la segunda reductasa quinasa.

### 3.11.2. INACTIVACION SIMULTANEA DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Alícuotas de HMG-CoA reductasa se incubaron con una misma cantidad total de: reductasa quinasa de microsomas, reductasa quinasa de citosol y reductasa quinasa de microsomas + reductasa quinasa de citosol respectivamente, en las condiciones detalladas en el apartado 3.9.8. A los distintos tiempos de incubación se tomaron alícuotas en las que se determinó la actividad reductasa.

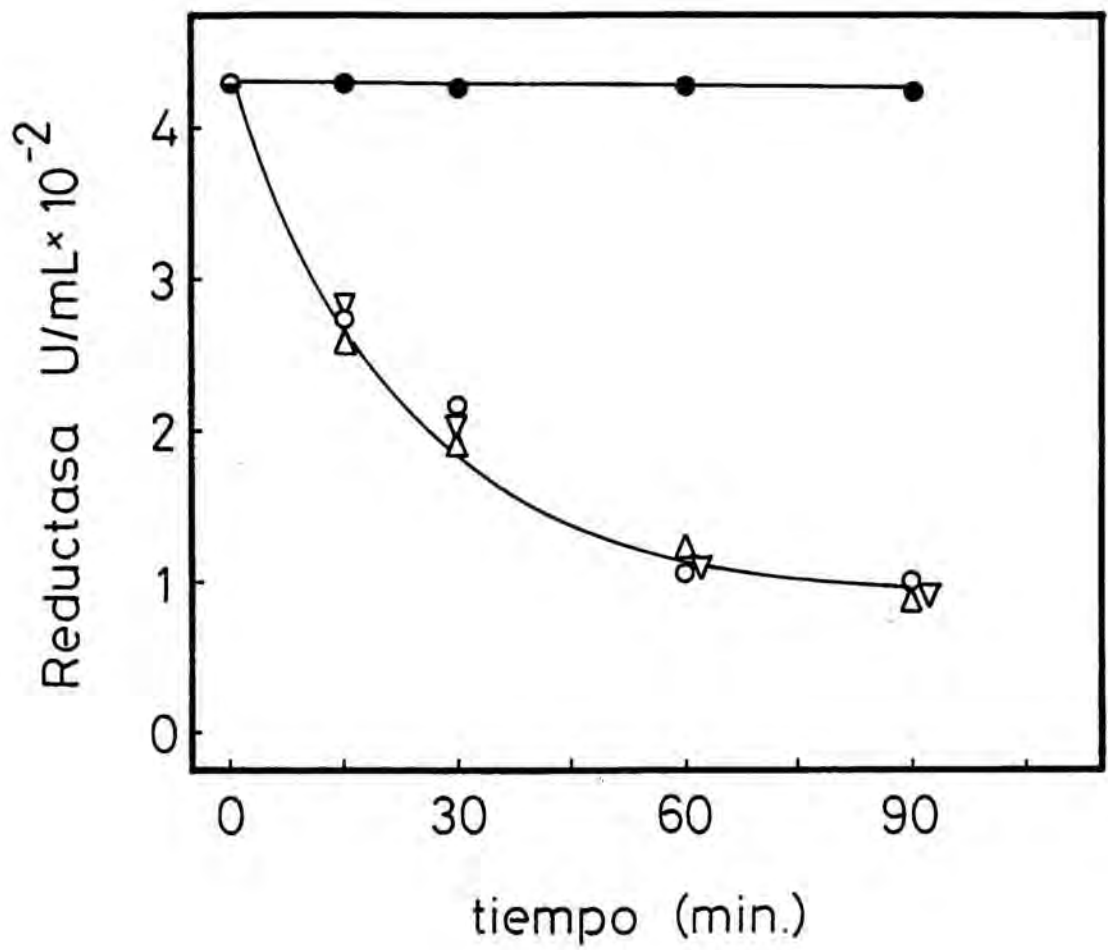
La figura 29 muestra los resultados obtenidos y en ella se puede observar, en primer lugar y como era previsible, que el porcentaje de inactivación de la reductasa no se modifica por la acción simultánea de ambas quinasas en relación con el obtenido con cada una de ellas por separado y, en segundo lugar, que la velocidad de la reacción de inactivación permanece invariable cuando actúan simultáneamente ambas reductasa quinasas.

FIGURA 29 INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR ACCION SIMULTANEA DE AMBAS QUINASAS

Tres alícuotas de HMG-CoA reductasa (1,28  $\mu\text{g}$ , 16 U) se incubaron a 37°C con: 0,6 unidades de reductasa quinasa de citosol (O), 0,6 unidades de reductasa quinasa de microsomas ( $\Delta$ ) y 0,3 unidades de reductasa quinasa de citosol + 0,3 unidades de reductasa quinasa de microsomas ( $\nabla$ ), en un volumen total de 40  $\mu\text{L}$  y en las condiciones descritas en 3.9.8.

A los distintos tiempos indicados en abcisas se tomaron alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  en las que se determinó la actividad reductasa, tal como se explica en 2.4.2. Esta se expresa en ordenadas en U/mL.

Se representan también los valores medios de los controles efectuados en cada condición, en ausencia de  $\text{MgCl}_2$ .



### 3.12. FRAGMENTACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA CON TRIPSINA

Son realmente pocos los trabajos publicados en la literatura, referentes al número de centros de fosforilación que presenta la molécula de HMG-CoA reductasa fosforilada "in vitro". Font y col.(159) y Keith y col.(160) en trabajos distintos, comunicaron que la digestión total con tripsina de la HMG-CoA reductasa fosforilada por la(s) quinasa(s) endógena(s) de microsomas, en el extracto soluble obtenido como en 2.3.2.2., o en los propios sedimentos microsomales respectivamente, producía dos péptidos fosforilados. Este hecho sugería la existencia de, por lo menos, dos centros de fosforilación estructuralmente distintos en la subunidad de la molécula de reductasa.

A la vista de que estudios análogos, no habían sido llevados a cabo con la reductasa fosforilada por la reductasa quinasa de citosol y que, por otra parte, la fosforilación en medios tan heterogéneos como los microsomas o los extractos solubles derivados de ellos, puede deberse a la acción simultánea de más de una reductasa quinasa (172), procedimos a fosforilar HMG-CoA reductasa homogénea, con ambas reductasa quinasa por separado para seguidamente, someterla a la digestión exhaustiva con tripsina y al análisis de los fosfopéptidos resultantes.

Dos alícuotas de HMG-CoA reductasa (21,6  $\mu$ g) se

incubaron a 37°C durante 75 minutos, con ambas reductasa quinasa por separado (7,5 U) en un volumen total de 120 µL en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 0,5 mM (800 cpm/pmol) y AMP 0,5 mM. Las reacciones de fosforilación se detuvieron por precipitación de las proteínas con TCA al 20%. Los precipitados fueron lavados como se describe en 2.5. y una vez preparados adecuadamente se repartieron en seis alícuotas (3,6 µg), que se sometieron a electroforesis (2.8.1.). El gel, sin haber sido teñido previamente, fue secado y analizado por autorradiografía. Los fragmentos del gel que contenían la reductasa fosforilada con ambas quinasa, se repartieron en dos grupos de tres, respectivamente. En ellos la fosfo-reductasa fue sometida a digestión exhaustiva con tripsina, en presencia y ausencia de urea 2 M, en idénticas condiciones a las descritas en el apartado 2.7.1. de Métodos.

Transcurrido el tiempo de tripsinización (144 horas), se recuperaba alrededor de un 90 % de la radioactividad contenida en el gel, en ambas condiciones, en la solución de incubación. Resulta difícil establecer claramente si la digestión trípica se produce en el interior de la matriz del gel y son los péptidos resultantes los que difunden al medio de incubación, o bien si la reacción tiene lugar en la solución de incubación, previa difusión de las moléculas de la subunidad de la reductasa. En cualquier caso el proceso no parece verse influenciado por la presencia de urea en el medio de reacción dado que como hemos dicho, la radioactividad recuperada es porcentualmente similar.

La técnica elegida para la separación de los fragmentos trípticos de la HMG-CoA reductasa, fue la electroforesis en presencia de SDS y urea, en placa, propuesta por Burr y Burr (334). Sus ventajas con respecto a la anteriormente empleada en nuestro laboratorio por Font y col.(159) fueron considerables, especialmente en lo relativo a la sensibilidad de detección y en consecuencia a las cantidades

de reductasa fosforilada requeridas.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30. Tal como puede observarse los patrones obtenidos a partir de reductasa fosforilada con ambas quinasas son muy similares. Como se puede apreciar, los fosfopéptidos resultantes, se localizan en aquella zona del gel en que se pierde la relación de proporcionalidad existente entre la movilidad y el peso molecular; en consecuencia, se han definido en función de sus  $R_f$  como: I (1,36), II (1,21), III (1,00) y IV (0,85). Se sembró una alícuota de ortofosfato radioactivo que tras el desarrollo de la electroforesis se localizó en una posición correspondiente a un  $R_f$  de 2.

Cuando la tripsinización se realiza en presencia de urea se identifican claramente dos fosfopéptidos mayoritarios, I y III, acompañados de una minoritaria colección de péptidos de mayor peso molecular. Habitualmente la radioactividad contenida por el péptido III es de 2,5 a 3 veces mayor que la contenida en el péptido I. Por otro lado, cuando se omite la urea en el medio de reacción, el patrón resultante es notablemente distinto, identificándose hasta cuatro fosfopéptidos distintos, de los cuales el III y el IV son los que se encuentran en mayor proporción, mientras que el I y el II son minoritarios. Ambos patrones se mantienen constantes aún cuando el tiempo de actuación de la tripsina se prolongue hasta 240 horas.

A modo de resumen, podemos afirmar que la HMG-CoA reductasa es fosforilada "in vitro" por reductasa quinasa de citosol o de microsomas en dos centros de fosforilación estructuralmente distintos (I y III), que sólo se definen claramente cuando la tripsinización se realiza en presencia de urea 2 M, para desnaturalizar la proteína. En ausencia de urea, el producto tríptico exhibe cuatro fosfopéptidos. Los resultados sugieren la posibilidad de que el péptido IV sea precursor de los péptidos I y III, siendo el II una etapa intermedia en la producción del péptido I.

FIGURA 30 FRAGMENTACION TRIPTICA DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFORILADA POR LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

HMG-CoA reductasa fosforilada independientemente por ambas reductasa quinasas hasta un total de 0,8 moles de  $^{32}\text{P}$  por mol de subunidad y aislada en las condiciones descritas en el texto, fue sometida a digestión con tripsina, según se describe en el apartado 2.7.1., en presencia y ausencia de urea 2 M en el medio de reacción.

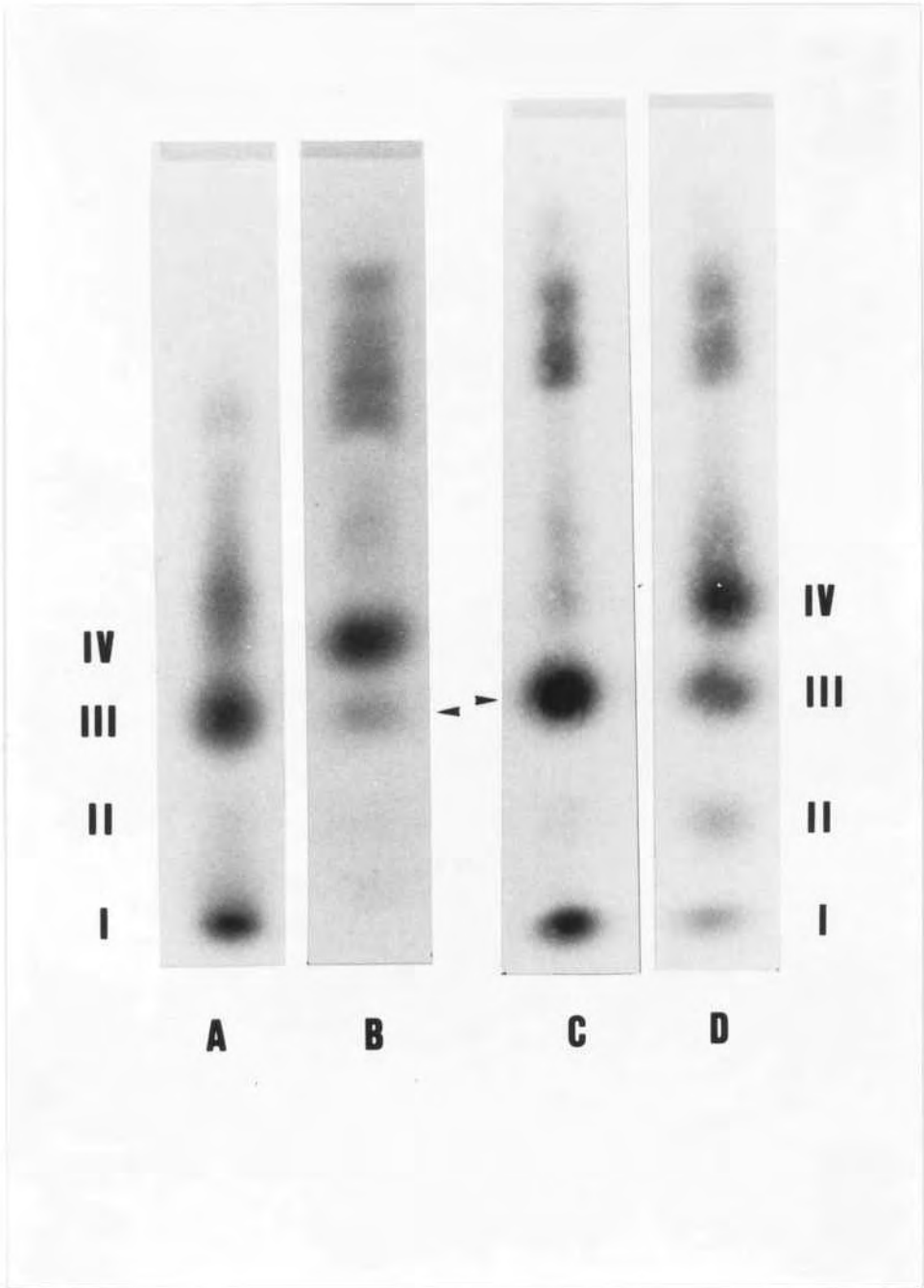
Tras 144 horas de actuación de la proteasa, los péptidos resultantes se separaron por electroforesis en presencia de SDS y urea, según lo descrito en 2.8.2. y los fosfopéptidos presentes fueron identificados por autorradiografía indirecta del gel húmedo, sin teñir.

Debido a la elevada cantidad de urea presente en las muestras procedentes de la tripsinización en su presencia, solamente se pudo aplicar al gel entre un 65 y un 75 % del total de la muestra.

Digestión triptica de la HMG-CoA reductasa fosforilada por reductasa quinasa de citosol, A (+urea), B (-urea), y por reductasa quinasa de microsomas, C (+urea), D(-urea).

La flecha señala la posición del frente formado por el azul de bromofenol.







### 3.13. ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS DE LA HMG-CoA REDUCTASA

La hidrólisis parcial de la enzima, se llevó a cabo sobre los fragmentos del gel de poliacrilamida que contenían la subunidad de la enzima, previamente fosforilada por ambas quinasas por separado, para tener la completa seguridad de que los fosfoaminoácidos detectados, correspondían exclusivamente a la reductasa fosforilada.

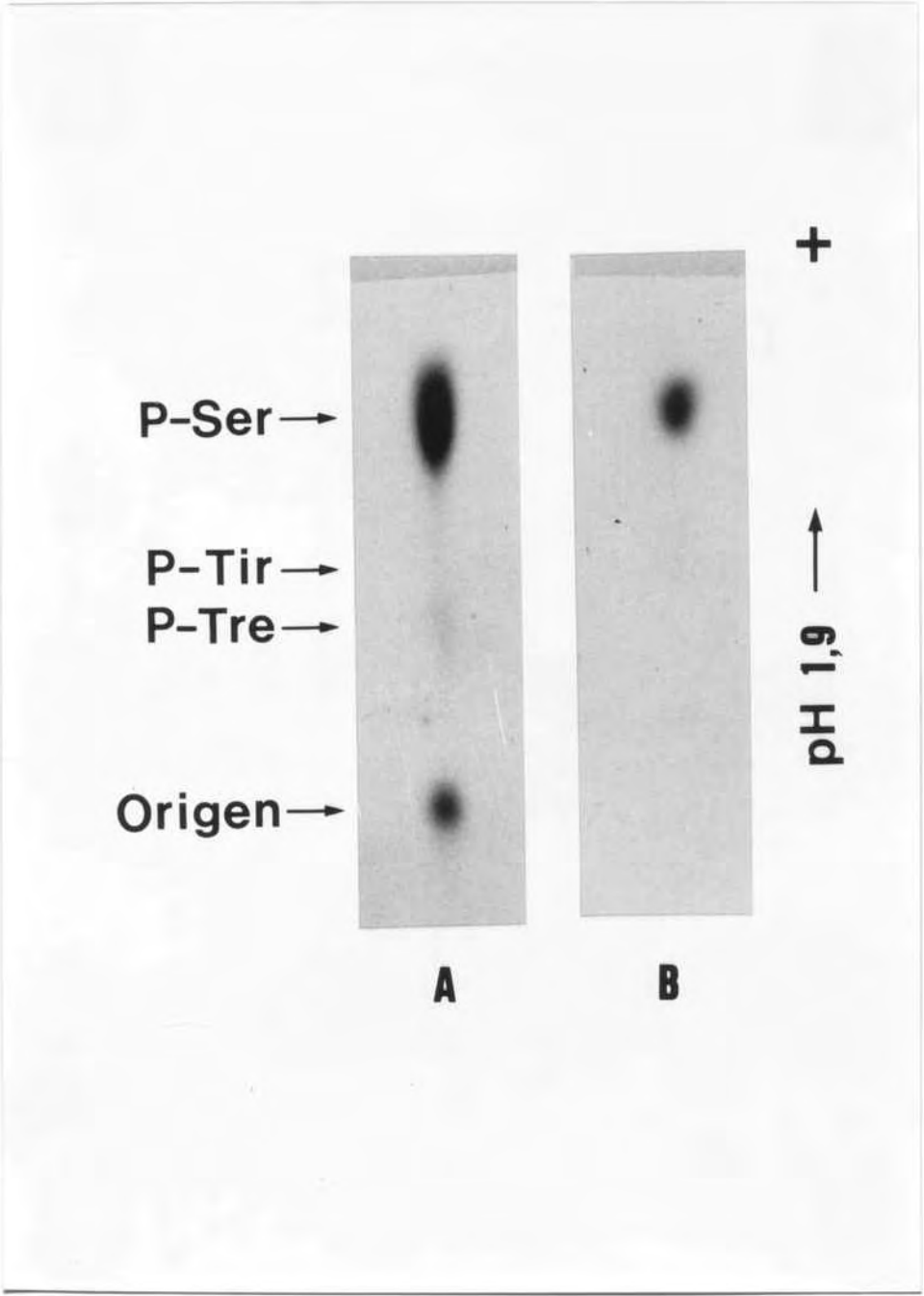
La hidrólisis ácida se efectuó tal como se describe en el apartado 2.7.2.1. El hidrolizado resultante, después de ser purificado parcialmente por medio de una cromatografía en resina de intercambio iónico, fue sometido a electroforesis monodimensional de alto voltaje sobre soporte de celulosa, según se explica en el apartado 2.8.3.

El resultado de las autorradiografías obtenidas mostrado en la figura 31, indica claramente que ambas reductasa quinasas fosforilan a la HMG-CoA reductasa exclusivamente en residuos de serina. No se detectó radioactividad en la zona correspondiente a los patrones de fosfotreonina y fosfotirosina. Con el fin de investigar la posible presencia de fosfotirosina en la molécula de reductasa, que se hidroliza en buena parte en las condiciones de hidrólisis ácida, fragmentos del gel que contenían HMG-CoA reductasa fosforilada por ambas quinasas, se sometieron a hidrólisis alcalina en las condiciones descritas en 2.7.2.2. En estas

FIGURA 31 ANALISIS DE FOSFOAMINOACIDOS DE LA HMG-CoA  
REDUCTASA FOSFORILADA POR LAS REDUCTASA QUINASAS

Autorradiografía del análisis de fosfoamino-  
ácidos de la HMG-CoA reductasa fosforilada por  
reductasa quinasa de citosol (A) y reductasa qui-  
nasa de microsomas (B).

Las flechas señalan las posiciones de los  
patrones de fosfotirosina, fosfotreonina y fos-  
foserina.



condiciones, la fosfoserina y la fosfotreonina son destruídas, permaneciendo estable la fosfotirosina. El análisis por electroforesis monodimensional revela la total desaparición de la radioactividad debida a la fosfoserina, sin que se observe radioactividad debida a fosfotirosina.

A modo de resumen, podemos afirmar que ambas HMG-CoA reductasa quinasas, fosforilan exclusivamente residuos de serina de la molécula de HMG-CoA reductasa.

### 3.14. EFECTO DE NUCLEOTIDOS Y NUCLEOSIDOS SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS HEPATICAS

Se procedió a estudiar el efecto que sobre ambas reductasa quinasas producían toda una serie de nucleótidos, algunos de los cuales podían actuar como posibles sustratos y otros como posibles activadores. El conocimiento de la respuesta de ambas enzimas frente a los distintos efectores, proporcionaría sin duda información valiosa referente a la posible identidad de ambas proteínas y además, aportaría datos de interés sobre la especificidad estructural de los sitios de unión de los nucleótidos, bien en su función de activadores, bien en su función de sustratos. La comparación de estos datos, podría incluso permitir formular la hipótesis de la existencia de dos centros distintos, uno activador y otro catalítico, en la molécula de las HMG-CoA reductasa quinasas.

#### 3.14.1. EFECTO DE LOS NUCLEOSIDOS DIFOSFATO

Se estudió el efecto producido por diferentes nucleósidos difosfato, ADP, GDP, UDP, CDP e IDP, a una concentración constante de 2 mM, sobre la actividad reductasa quinasa de ambas preparaciones.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura

32 y en la tabla VI. Como puede observarse, el comportamiento de las dos quinasas en presencia de los diversos nucleósidos difosfato es muy similar. Como se ha demostrado sobradamente con anterioridad, el mejor activador es el ADP pues incrementa la actividad basal entre 5 y 6 veces. Por el contrario, los otros dos nucleótidos derivados de purinas, GDP e IDP, no producen activación significativa en ningún caso. Es notoria sin embargo, la acción de los nucleótidos derivados de pirimidinas, UDP y CDP, que producen una activación muy similar de algo más de 2,5 veces en ambas quinasas.

#### 3.14.2. EFECTO DE LOS NUCLEOSIDOS MONOFOSFATO

Se estudió el efecto causado por una serie de nucleósidos monofosfato, AMP, GMP, UMP, CMP e IMP, sobre la actividad reductasa quinasa de ambas procedencias, siempre a la concentración de 2 mM.

La figura 33 y la tabla VI muestran los resultados obtenidos, pudiéndose comprobar como en el caso de los nucleósidos monofosfato, la especificidad estructural es mucho más estricta. Tan solo el AMP es capaz de activar a las reductasa quinasas, como hemos expuesto anteriormente, entre 5 y 6 veces con respecto a la actividad basal de las enzimas. Los demás nucleósidos monofosfato ensayados, no ejercen ningún efecto activador sobre las reductasa quinasas.

#### 3.14.3. EFECTO DE 2'-AMP, 3'-AMP Y 2'-dAMP

Se llevaron a cabo reacciones de inactivación de HMG-CoA reductasa por ambas reductasa quinasas, en presencia de 2'-AMP, 3'-AMP y 2'-dAMP como posibles activadores, a la concentración final de 2 mM.

Los perfiles de inactivación de la reductasa en

FIGURA 32 EFECTO DE LOS NUCLEOSIDOS DIFOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Los ensayos se efectuaron en las condiciones descritas en el apartado 3.9.8. en ausencia de AMP, en un volumen total de 40  $\mu$ L y en presencia de los diferentes nucleósidos difosfato a una concentración 2 mM. Estos se incorporaron al medio de reacción formando parte de la solución que contenía el ATP y el  $MgCl_2$ . También se realizó una inactivación en presencia de ATP solo (●).

Ninguno de los nucleósidos difosfato causó efecto sobre la reductasa cuando ésta se incubó en las condiciones descritas, pero en ausencia de  $MgCl_2$ .

Nucleótidos añadidos: ADP (○)  
GDP (△)  
UDP (▽)  
CDP (◁)  
IDP (×)

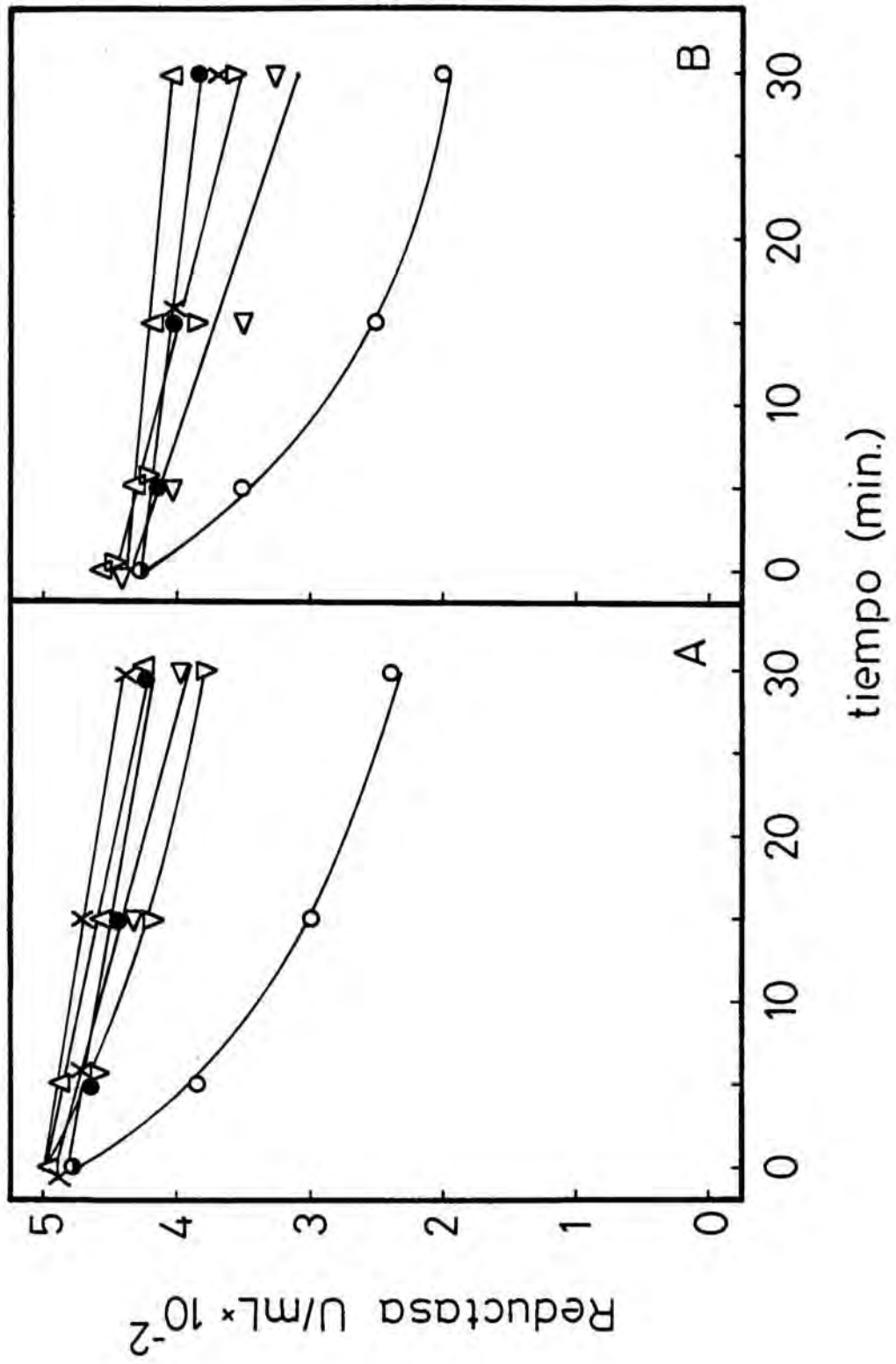




FIGURA 33 EFECTO DE LOS NUCLEOSIDOS MONOFOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Los ensayos se efectuaron en presencia de una concentración 2 mM de cada uno de los nucleótidos empleados, en las condiciones descritas en el prólogo de la figura 32.

Paralelamente se efectuó un ensayo de inactivación en presencia de ATP solo (●).

Ninguno de los nucleósidos monofosfato causó efecto sobre la reductasa cuando ésta se incubó en las condiciones descritas, pero en ausencia de  $MgCl_2$ .

Nucleótidos añadidos: AMP (○)  
GMP (△)  
UMP (▽)  
CMP (◁)  
IMP (×)

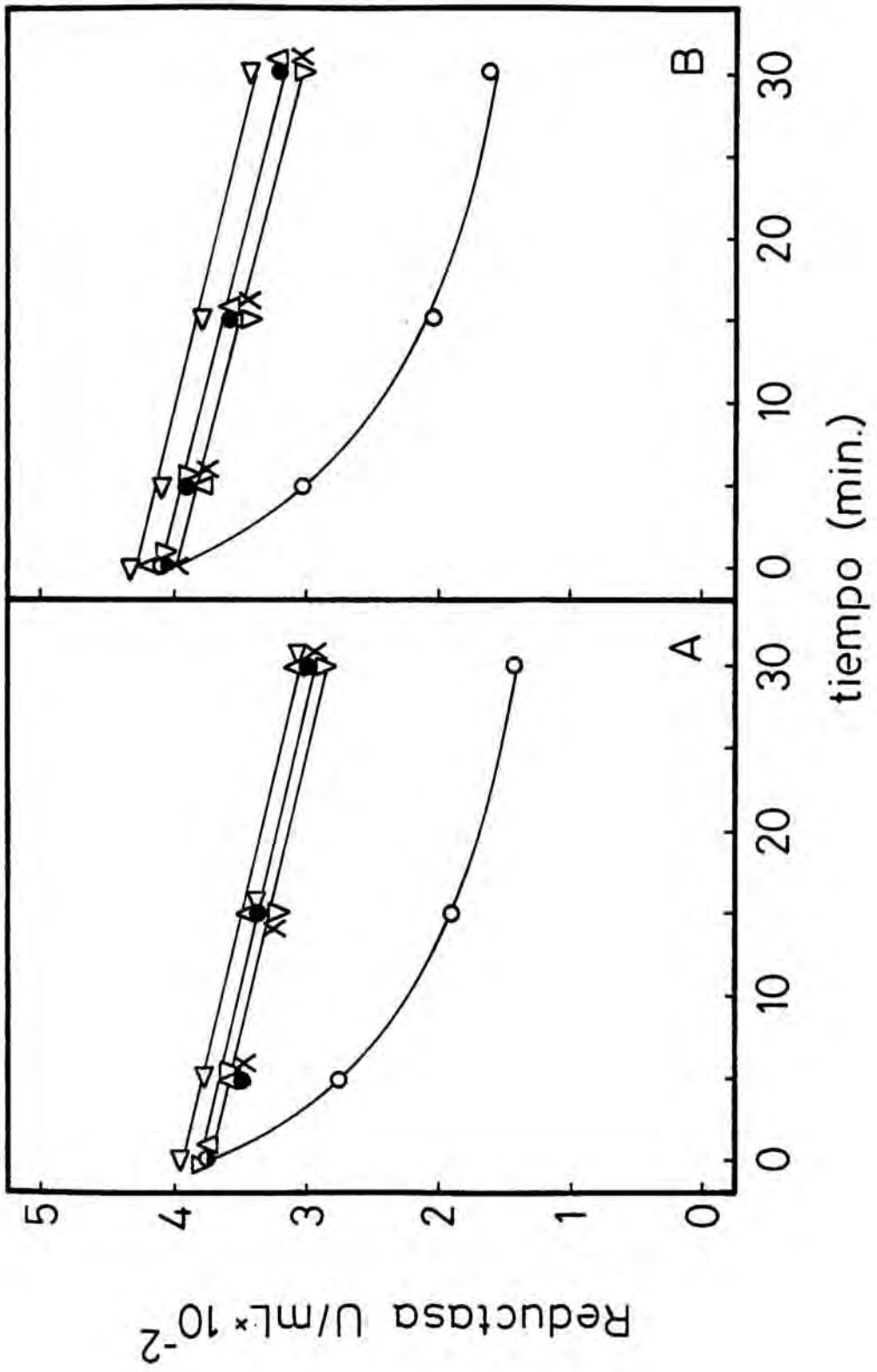


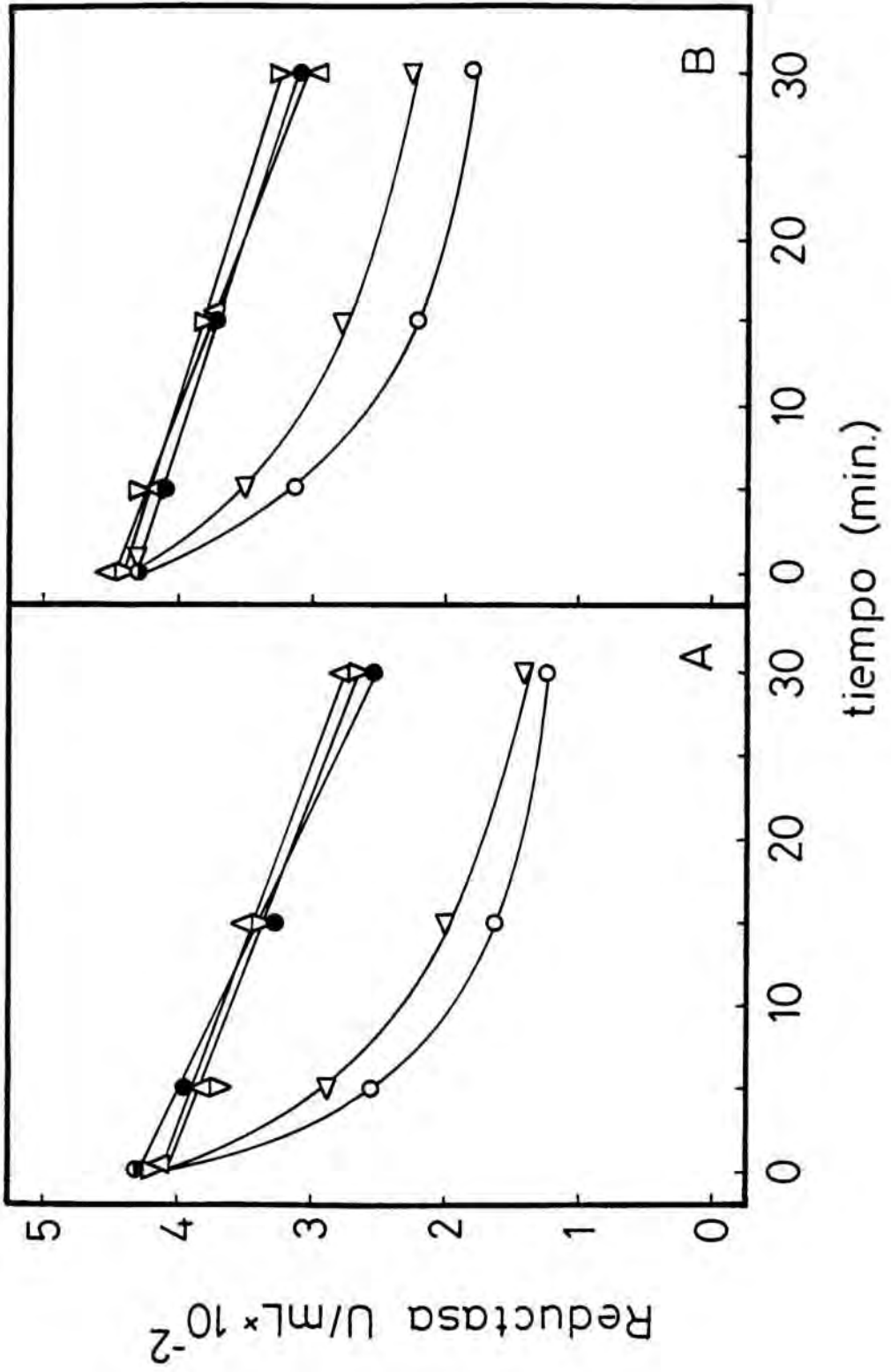
FIGURA 34 EFECTO DE 2'-AMP, 3'-AMP Y 2'-dAMP SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Los ensayos se realizaron en presencia de 2 mM de cada uno de los nucleótidos, en las condiciones previamente descritas.

Paralelamente se efectuaron ensayos de inactivación en presencia de ATP (●) y de ATP/AMP (○), a modo de controles.

Ninguno de los nucleósidos monofosfato causó efecto sobre la HMG-CoA reductasa.

Nucleótidos añadidos: 2'-AMP (△)  
3'-AMP (▽)  
2'-dAMP (◁)



función del tiempo de incubación, se muestran en la figura 34 y los resultados numéricos derivados de ella, en la tabla VI. Resulta evidente que la capacidad activadora de los isómeros del 5'-AMP, es decir, del 2'-AMP y del 3'-AMP, es absolutamente nula. Por otro lado, es notable la capacidad activadora de las reductasa quinasa mostrada por el 2'-dAMP, que incrementa alrededor de 4,5 veces la actividad basal. Estos resultados muestran claramente, que la existencia de un ester fosfato en la posición 5' de la adenosina, es absolutamente crítica para la conservación de la capacidad de activación, mostrando esta propiedad una cierta independencia respecto a modificaciones no excesivamente drásticas en otras posiciones del anillo de ribosa.

#### 3.14.4. EFECTO DE ADENOSINA, RIBOSA-5-FOSFATO Y $\text{NADP}^+$

Se estudió el efecto producido por los tres compuestos mencionados a la concentración de 2 mM, como en los casos anteriores, sobre la actividad de nuestras reductasa quinasa.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 35 y están resumidos en la tabla VI. Ninguno de ellos presenta capacidad activadora de las reductasa quinasa, si bien al contrario, levemente inhibidora. Este efecto inhibitor es más acusado en el caso de la adenosina y del  $\text{NADP}^+$ , pues disminuyen la actividad quinasa hasta un 60-70% de la actividad basal. El efecto producido por la ribosa-5-fosfato en este sentido, es menos acusado.

#### 3.14.5. CAPACIDAD DE DIVERSOS NUCLEOSIDOS TRIFOSFATO PARA ACTUAR COMO SUSTRATOS DE LAS REDUCTASA QUINASAS

Se estudió la capacidad que presentaron los siguientes nucleósidos trifosfato, GTP, UTP, CTP e ITP, para actuar como donadores de grupos fosfato en la reacción ca-

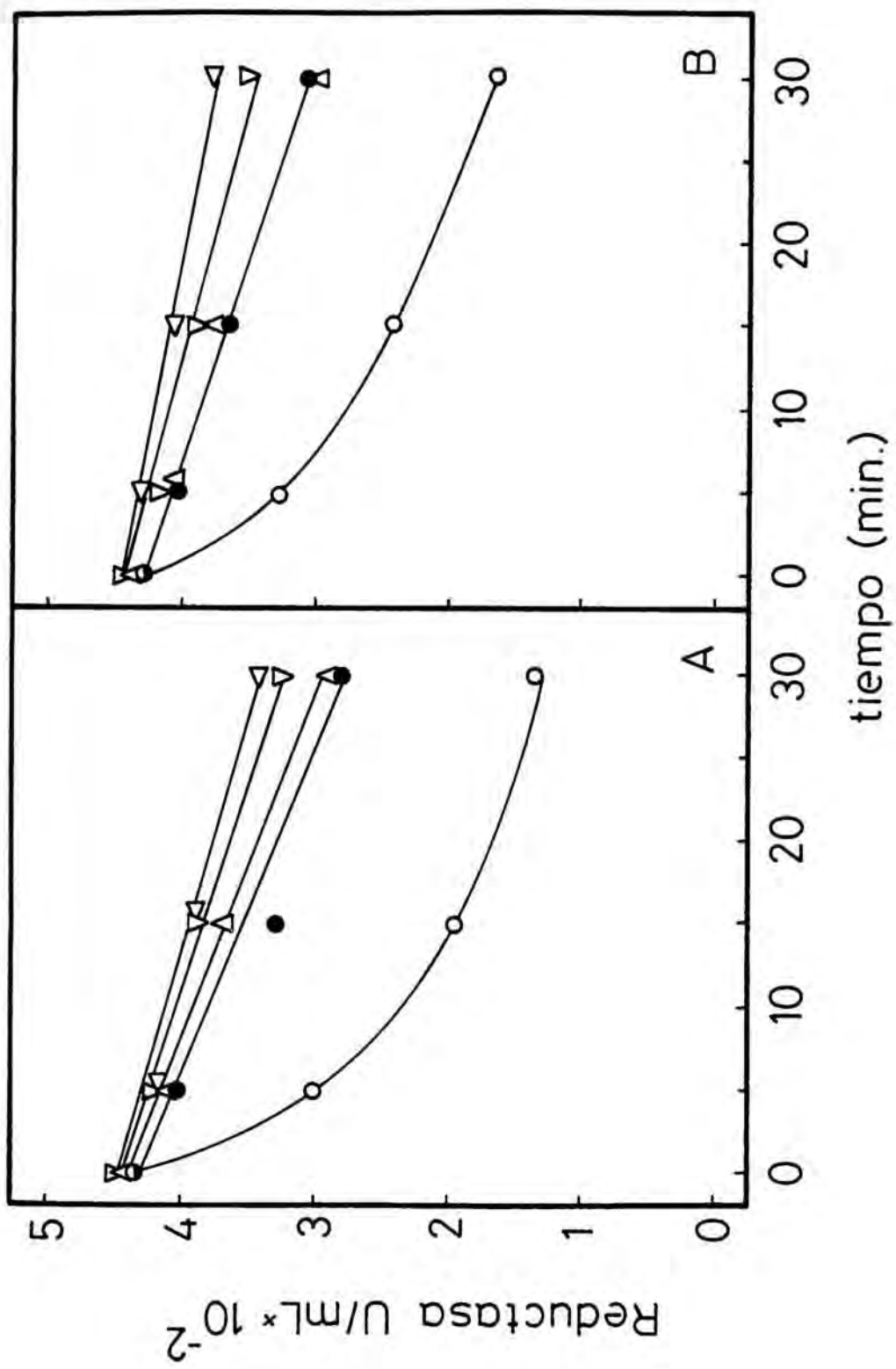
FIGURA 35 EFECTO DE ADENOSINA, RIBOSA-5-FOSFATO Y  $\text{NADP}^+$   
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS HMG-CoA REDUCTASA  
QUINASAS

Los ensayos se realizaron en presencia de 2 mM de cada uno de los efectores considerados, en las condiciones previamente descritas.

Paralelamente se efectuaron ensayos de inactivación en presencia de ATP (●) y de ATP/AMP (○), a modo de controles.

Ninguno de los compuestos ensayados mostró efecto sobre la HMG-CoA reductasa.

Efactor añadido: Rib-5-P (△)  
Adenosina (▽)  
 $\text{NADP}^+$  (◁)



talizada por las reductasa quinasas. Todos ellos se probaron a la concentración constante de 2 mM, en comparación con el ATP a la misma concentración y siempre en presencia de AMP como activador.

La figura 36 muestra los perfiles de inactivación y en la tabla VI se resumen los resultados obtenidos. Ambas reductasa quinasas presentan una especificidad de sustrato similar sobre los diferentes nucleósidos trifosfato. Solamente el GTP puede ser empleado como sustrato alternativo, aunque con una menor eficiencia puesto que las velocidades de reacción disminuyen 2 y 3 veces con las quinasas citosólica y microsomal respectivamente. Los otros tres nucleósidos trifosfato muestran una muy reducida capacidad para actuar como sustratos, obteniéndose velocidades comprendidas entre un 5% y un 17% de la velocidad máxima alcanzada en presencia de ATP. Estas velocidades de reacción son incluso inferiores a las obtenidas con ATP como sustrato en ausencia de activador.

Es preciso poner de manifiesto en este punto, como las reductasa quinasas reconocen al GTP como sustrato alternativo, mientras que no lo hacen con el UTP, CTP e ITP, cuando por el contrario, el GDP no muestra capacidad activadora y sí lo hacen el UDP y el CDP. Es decir, existe una especificidad de reconocimiento distinta de los nucleótidos activadores con respecto a los que actúan como sustrato. El fenómeno se hace más patente en el caso de los nucleósidos monofosfato, de los que tan solo el 5'-AMP y su derivado el 2'-dAMP son reconocidos como activadores.



FIGURA 36 CAPACIDAD DE LOS NUCLEOSIDOS TRIFOSFATO PARA ACTUAR COMO SUSTRATO DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Los ensayos se realizaron en presencia de una concentración 2 mM de cada uno de los nucleótidos probados, siempre en presencia de AMP y en las condiciones descritas previamente.

Paralelamente se efectuó un control en presencia de ATP solo (●)

Ninguno de los nucleótidos ensayados mostró efecto por sí solo sobre la HMG-CoA reductasa.

Nucleótidos añadidos: ATP (○)  
GTP (△)  
UTP (▽)  
CTP (◁)  
ITP (×)

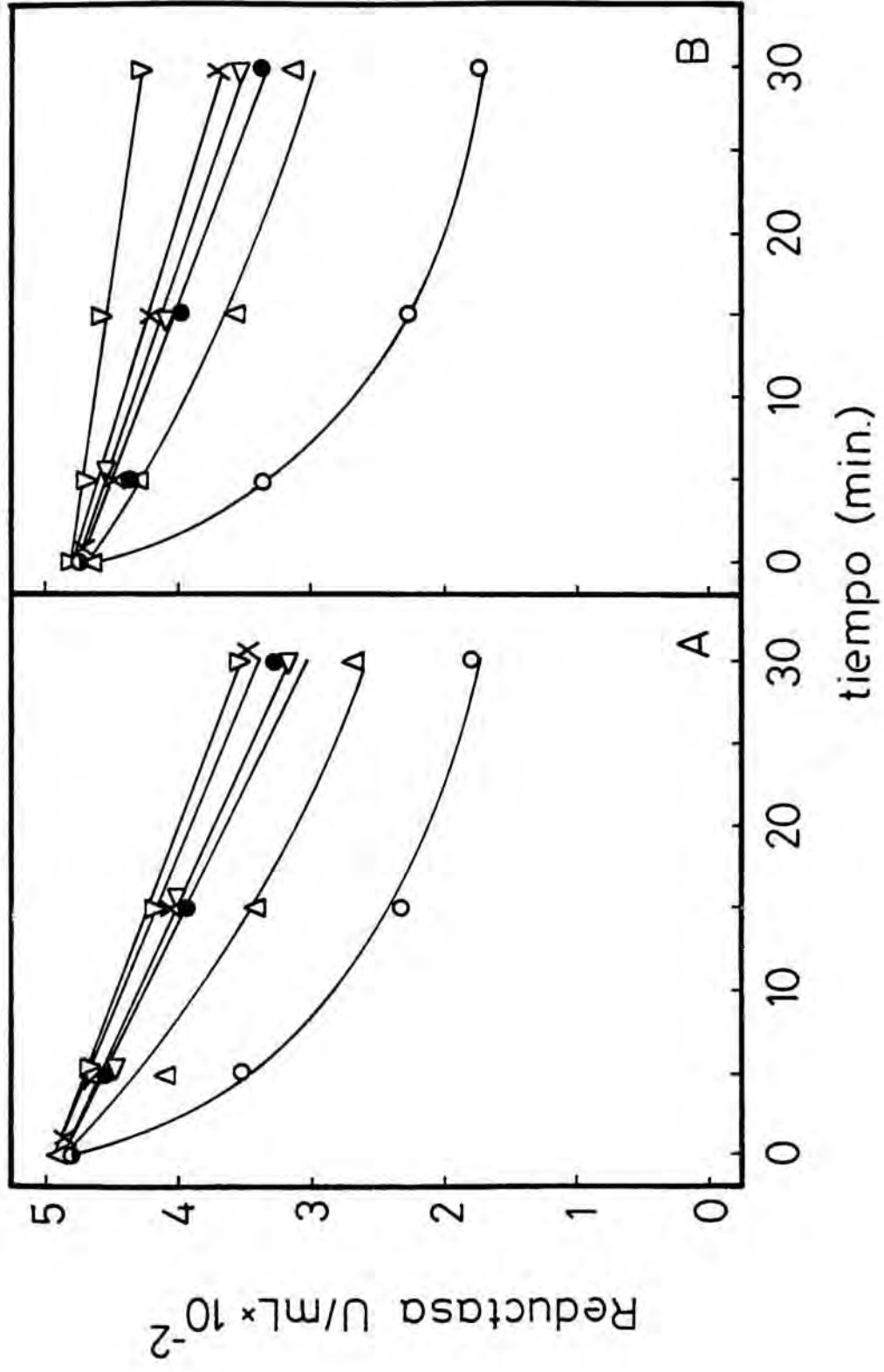


TABLA VI EFECTO DE NUCLEOTIDOS Y NUCLEOSIDOS SOBRE LA  
ACTIVIDAD DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Los ensayos se realizaron siempre en las condiciones descritas en el texto.

A la actividad de las reductasa quinasas medida con ATP como sustrato, en ausencia de activador se le dio el valor 100.

En el apartado inferior el valor 100 se asignó a la actividad reductasa quinasa medida en presencia de ATP y AMP.

Adición (2 mM)	Reductasa quinasa de citosol	Reductasa quinasa de microsomas
ATP	100	100
ATP/ADP	616	590
ATP/GDP	120	90,5
ATP/UDP	263	286
ATP/CDP	293	298
ATP/IDP	137	100
ATP/AMP	612	579
ATP/GMP	102	102,5
ATP/UMP	111,5	117
ATP/CMP	116,5	128
ATP/IMP	101,5	101
ATP/2'-AMP	99,5	106,5
ATP/3'-AMP	90	86,5
ATP/2'-dAMP	498	429
ATP/adenosina	64	69
ATP/Rib-5-P	72	80
ATP/NADP <sup>+</sup>	63	64
ATP/AMP	100	100
GTP/AMP	51	33
UTP/AMP	14	5
CTP/AMP	17	11
ITP/AMP	12	10

### 3.15. EFECTO DEL AMPc Y DE LA HEPARINA SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

La posible dependencia de AMPc de las reductasa quinasas ha sido desde hace tiempo un tema de controversia, como se ha comentado previamente en la Introducción.

Con el fin de comprobar si alguna de las dos reductasa quinasas objeto de estudio en esta Memoria era activada por el AMPc, se procedió a ensayar ambas reductasa quinasas tras preincubación en presencia de 50  $\mu$ M y 0,5 mM de este efector. Como se puede ver en la tabla VII, el AMPc incluso a concentraciones tan elevadas como 0,5 mM, no produce ninguna estimulación de la actividad reductasa quinasas de nuestras preparaciones.

Por otro lado, se procedió a ensayar el efecto que producía la heparina sobre nuestras reductasa quinasas, puesto que es conocida la existencia de proteína quinasas que responden, en uno u otro sentido, a la presencia de este efector.

Como se puede ver en la tabla VII, la presencia de heparina en el ensayo, a concentraciones de 10  $\mu$ g/mL y 40  $\mu$ g/mL, no produce ningún efecto significativo. Ninguno de los dos efectores manifiesta efecto alguno sobre la actividad reductasa cuando se ensayan a las mismas concentraciones.

TABLA VII EFECTO DEL AMPc Y DE LA HEPARINA SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

El ensayo se llevó a cabo en las condiciones descritas en el apartado 3.9.8., pero en ausencia de activador.

Las concentraciones del efector empleadas en cada ocasión están expresadas en la tabla.

El valor de la actividad reductasa quinasa se ha expresado en porcentaje respecto a un control de actividad reductasa quinasa basal, medida en ausencia de AMP.

Adición	Reductasa quinasa de citosol	Reductasa quinasa de microsomas
AMPc 50 $\mu$ M	106	100
AMPc 0,5 mM	98	104
Heparina 10 $\mu$ g/mL	117	99
Heparina 40 $\mu$ g/mL	122	115

### 3.16. EFECTO DEL CALCIO, CALMODULINA Y FOSFOLIPIDOS SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Es conocida la existencia en hígado de proteína quinasas dependientes de calcio, calcio y calmodulina y calcio y fosfolípidos, como se ha expuesto en la Introducción de la presente Memoria.

En primer lugar se procedió a ensayar el efecto que producía el calcio a las concentraciones totales de 0,5 mM y 1,5 mM, sobre las dos reductasa quinasas. Como se puede ver en la tabla VIII el calcio solo, en términos generales, no produce ningún efecto activador sobre las reductasa quinasas.

Se ensayó asimismo el efecto que producía la calmodulina 10  $\mu\text{g/mL}$ , en presencia de las dos concentraciones de calcio reseñadas anteriormente comprobándose como, de nuevo, no hay efecto significativo sobre ninguna de las dos actividades reductasa quinasa.

Finalmente, se investigó la posible activación por calcio y fosfolípidos, así como el efecto producido por la dioleína. Se ensayaron ambas reductasa quinasas en presencia de calcio y fosfatidilserina a unas concentraciones finales de 1,5 mM y 25  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, y en presencia de calcio, fosfatidilserina y dioleína a unas concentracio-



TABLA VIII EFECTO DE CALCIO, CALCIO/CALMODULINA, CALCIO/  
FOSFATIDILSERINA Y CALCIO/FOSFATIDILSERINA/  
DIOLEINA SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

El ensayo se llevó a cabo en las condiciones descritas en el apartado 3.9.8. pero en ausencia de activador.

Las concentraciones de los efectores empleados en cada caso están expresadas en la tabla.

El valor de la actividad reductasa quinasa se ha expresado en porcentaje respecto a un control de actividad reductasa quinasa basal, medida en ausencia de AMP.

Adición	Reductasa quinasa de citosol	Reductasa quinasa de microsomas
Calcio 0,5 mM	64,5	89
Calcio 1,5 mM	105	94
Calcio 0,5 mM/ Calmodulina 10 µg/mL	80,5	95
Calcio 1,5 mM/ Calmodulina 10 µg/mL	114	103
Calcio 1,5 mM/ Fosfatidilserina 25 µg/mL	89	107
Calcio 1,5 mM/ Fosfatidilserina 25 µg/mL/ Dioleína 5 µg/mL	83	93

nes 1,5 mM, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. La actividad de nuestras preparaciones no se vio afectada significativamente por ninguno de los efectores ensayados, como puede verse en la tabla VIII.

Controles realizados paralelamente con cada uno de los efectores, en ausencia de  $\text{MgCl}_2$ , pusieron de manifiesto que ninguno de ellos actuaba sobre la HMG-CoA reductasa.

De lo expuesto anteriormente podemos concluir que ninguna de nuestras reductasa quinasas es dependiente de calcio, calcio y calmodulina o calcio y fosfolípidos.

### 3.17. REACCION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS CON EL COMPUESTO 5'-p-FLUOROSULFONILBENZOILADENOSINA

Una buena parte de los resultados presentados hasta el momento demuestra claramente que las HMG-CoA reductasa quinatas de citosol y de microsomas de hígado de rata son activables por AMP y aunque con menor potencia activadora, también por ADP.

Harwood y col.(137) en base a la diferente especificidad mostrada por la reductasa quinasa de citosol con respecto a los nucleósidos di y trifosfato, en su función de activadores y sustratos, respectivamente (el GDP no puede sustituir como activador al ADP, mientras que el GTP sí puede sustituir al ATP como sustrato y por otro lado, el CDP puede sustituir al ADP, mientras que el CTP no puede hacer lo mismo con el ATP) establecieron el carácter alostérico de la activación de la quinasa de citosol por nucleósidos difosfato.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con las dos reductasa quinatas purificadas a partir de citosol y de microsomas de hígado de rata, relativos a la activación por nucleósidos difosfato y especialmente por nucleósidos monofosfato, permiten obtener una conclusión semejante. Sin embargo y con objeto de aportar evidencias mucho más concluyentes respecto a la existencia de por lo me-

nos, dos centros distintos, uno catalítico y otro activador, en la molécula de las reductasa quinasas, procedimos a investigar el proceso de reacción de ambas enzimas con el análogo sintético de los nucleótidos de adenina, 5'-p-fluoro-sulfonilbenzoiladenosina.

Este compuesto, como se ha comentado en la Introducción del presente trabajo, puede ser considerado como un análogo de los nucleótidos derivados de la adenina (AMP, ADP, ATP, etc.) porque su molécula contiene la estructura de la adenosina, con un grupo carbonilo adyacente a la posición 5' del anillo de ribosa, que mimetiza estructuralmente al primer radical fosforilo de los nucleótidos de adenina. Además, en su molécula posee un grupo fluorosulfonilo, que actúa como un agente electrofílico capaz de reaccionar covalentemente con diversos aminoácidos tales como, serina, tirosina, lisina e histidina (339). Estas características le confieren capacidad para reaccionar covalentemente con restos de aminoácidos presentes en los sitios de unión de los nucleótidos a las proteínas, bloqueándolos, con la consiguiente pérdida del efecto derivado de la unión de los mencionados nucleótidos. En consecuencia, el estudio de los cambios de actividad experimentados por una enzima al reaccionar con éste u otros análogos, proporciona información relativa al número y función de los centros de la enzima capaces de interaccionar con nucleótidos

### 3.17.1. EFECTO DE LA N,N'-DIMETILFORMAMIDA SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Debido a su hidrofobicidad, el 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, antes de ser añadido a una mezcla de reacción acuosa, debe ser disuelto en un solvente orgánico miscible con el agua. Entre los más adecuados se encuentran el etanol y la N,N'-dimetilformamida; sin embargo, es fundamental comprobar previamente que la actividad enzimática de la proteína objeto de estudio

no resulta afectada por ellos. El 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo es bastante más soluble en DMF que en etanol, pues mientras con el primero de ellos pueden prepararse disoluciones hasta una concentración 50 mM, con el segundo no es posible alcanzar concentraciones superiores a 7-8 mM (340).

La conveniencia de añadir volúmenes pequeños del disolvente orgánico a la mezcla de reacción, unido al desconocimiento previo de la concentración de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo requerida para llevar a cabo el presente estudio, aconsejaron emplear como solvente orgánico a la DMF.

Se determinó la actividad reductasa quinasa en presencia de concentraciones crecientes de DMF comprendidas entre 0 y 10 % (v/v). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 37. Se aprecia como la actividad de ambas reductasa quinasa no se ve afectada significativamente hasta concentraciones de 5 % DMF (v/v) en el medio de ensayo, puesto que se conserva alrededor de un 90 % de la actividad medida en ausencia de DMF. Concentraciones superiores provocan una rápida pérdida de la actividad que se reduce a un 50 % de la inicial cuando la concentración final de DMF es del 10 %. Ambas reductasa quinasa presentan un comportamiento igual frente a las concentraciones crecientes de DMF probadas.

Simultáneamente se efectuaron controles que contenían idénticos componentes, pero que carecían de MgCl<sub>2</sub>, con objeto de analizar la influencia del solvente orgánico sobre la HMG-CoA reductasa, no apreciándose efecto significativo en ningún caso. A la vista de los resultados obtenidos la concentración de DMF seleccionada fue de 5 % (v/v).

### 3.17.2. EFECTO DEL 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo SOBRE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL

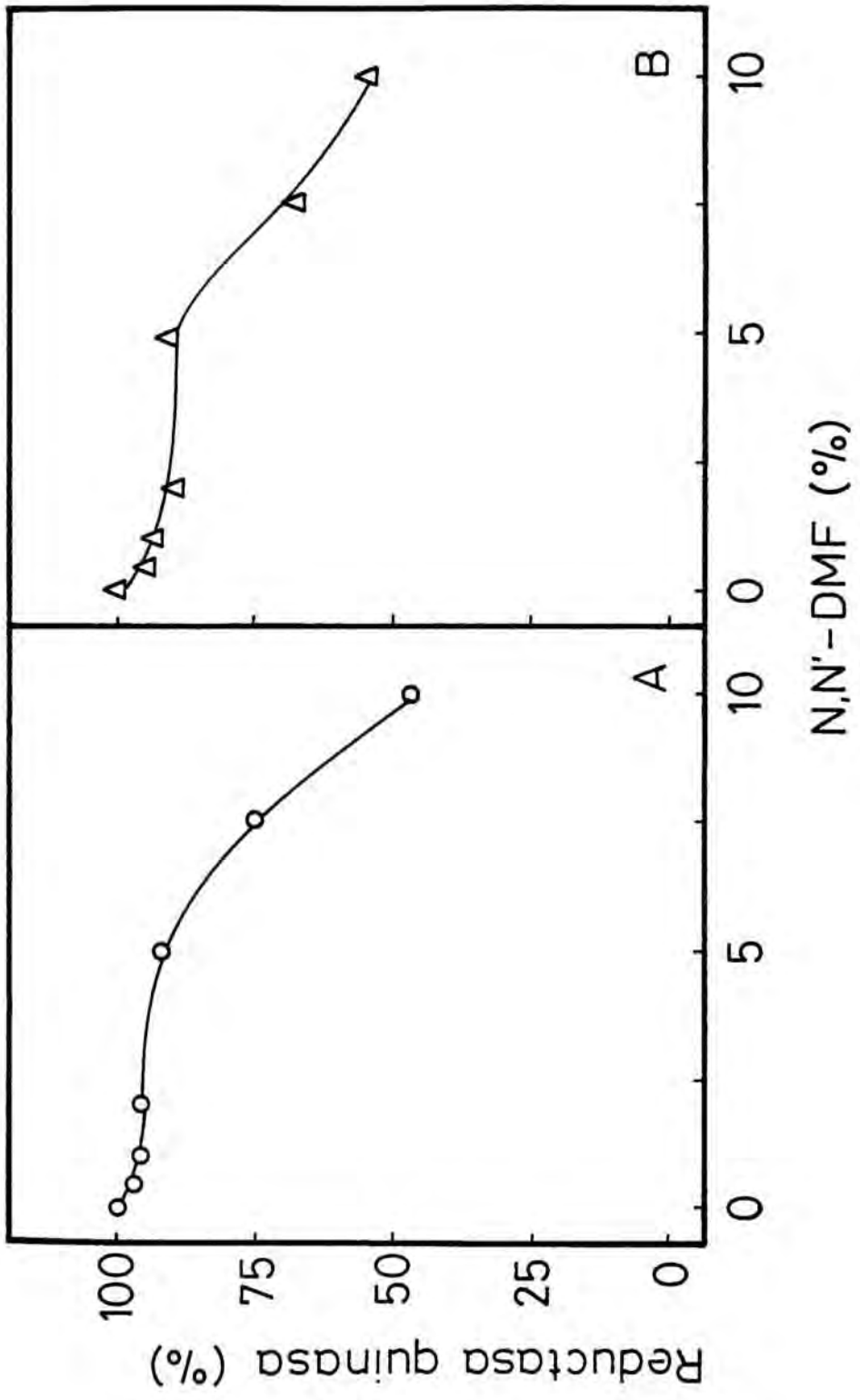
Las concentraciones de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo utilizadas por

FIGURA 37 EFECTO DE LA N,N'-DIMETILFORMAMIDA SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Los ensayos se efectuaron en las condiciones descritas en el apartado 3.9.8.

A la actividad de reductasa quinasa medida en ausencia de DMF se le dio el valor 100.

- A) Reductasa quinasa de citosol.
- B) Reductasa quinasa de microsomas.





los diversos grupos de investigación son considerablemente variables, oscilando desde 106  $\mu\text{M}$ , en experimentos realizados con fosfofructoquinasa de músculo de conejo (341) hasta 2,1 mM en experimentos desarrollados con piruvato quinasa de la misma procedencia (307), ambas a idéntica concentración.

Con objeto de comprobar si las reductasa quinasa podían ser inactivadas, como era previsible, por el 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, así como de establecer las condiciones adecuadas de concentración del análogo empleado, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se incubaron a 25°C idénticas cantidades de reductasa quinasa de citosol con concentraciones crecientes de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo comprendidas entre 0 y 0,5 mM, durante un tiempo establecido arbitrariamente en 30 minutos. Seguidamente se determinó la actividad reductasa quinasa residual tal como se describe en 3.9.8. En todas las mezclas de inactivación la concentración final de DMF fue de 5 % (v/v).

Los resultados obtenidos, representados en la figura 38, indican que la reductasa quinasa de citosol resulta inactivada en presencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, dependiendo la velocidad de la inactivación de la concentración del análogo empleada. Por otra parte, la actividad reductasa quinasa de la misma preparación, tratada en idénticas condiciones excepto la adición de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, se mantuvo constante tras los 30 minutos de incubación. El análisis de los resultados presentados nos indujo a establecer como concentración más adecuada de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, 250  $\mu\text{M}$ , puesto que en 30 minutos de incubación, tiempo durante el cual la actividad quinasa permanecía inalterada, ésta quedaba reducida a alrededor de un 12 % de la inicial.

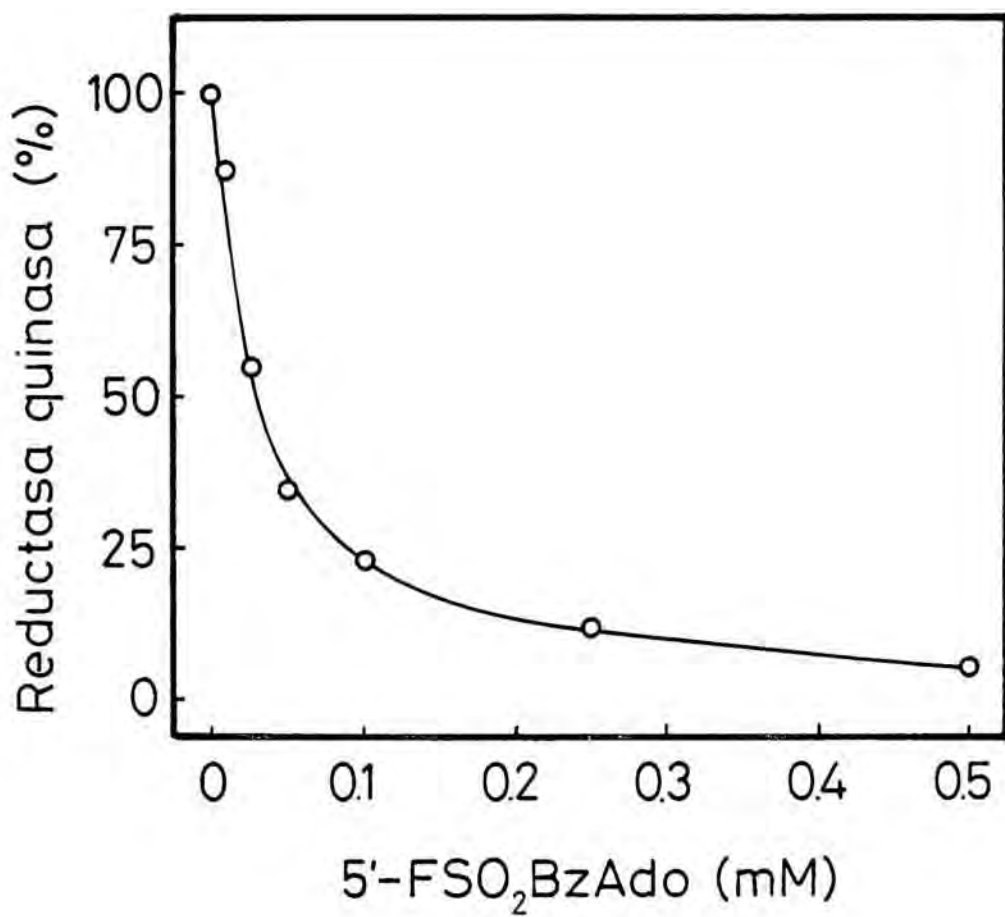
### 3.17.3. INACTIVACIÓN DEPENDIENTE DEL TIEMPO DE INCUBACION EN PRESENCIA DE 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo

Una alícuota de cada reductasa quinasa fue incuba-

FIGURA 38 EFECTO DEL 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo SOBRE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL

Alícuotas conteniendo 2 unidades de reductasa quinasa se incubaron con concentraciones crecientes de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo en un volumen total de 10  $\mu$ L, en las condiciones descritas en el apartado 2.10. de Métodos. Transcurridos 30 minutos de incubación a 25°C se midió la actividad reductasa quinasa restante, tal como se explica en 2.4.4.

El valor de la actividad reductasa quinasa se ha expresado en porcentaje respecto a la actividad medida en ausencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo.



da en las condiciones descritas previamente en el apartado 2.10. de Métodos en presencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo 250 μM, durante un tiempo de 45 minutos. A los distintos tiempos se tomaron alícuotas de 5 μL en las que se determinó la actividad máxima de la reductasa quinasa, tal como se ha explicado, en presencia de AMP 2 mM. Simultáneamente otras dos alícuotas fueron tratadas exactamente igual con la salvedad de que la actividad reductasa quinasa medida a los diferentes tiempos, lo fue en ausencia de activador (AMP 2 mM); dicho en otras palabras, en condiciones basales.

Por último, a modo de controles, una alícuota de cada una de las reductasa quinasa se incubó en iguales condiciones, pero en ausencia de 5-FSO<sub>2</sub>BzAdo. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, en las que tras la dilución apropiada, se determinó la actividad reductasa quinasa existente, en condiciones basal y máxima o lo que es lo mismo, en ausencia y presencia de AMP 2 mM.

Es importante destacar que en las condiciones del medio de ensayo de la actividad reductasa quinasa, la reacción de las quinasa con el 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo no puede proseguir por las razones siguientes: La dilución a que se somete la alícuota en la que se pretende determinar la actividad quinasa, reduce la concentración del análogo a niveles mínimos y la presencia en el medio de incubación de ATP 2 mM, AMP 2 mM y MgCl<sub>2</sub> 15,6 mM, como se verá más adelante, protege a ambas quinasa de la inactivación debida al análogo. Tampoco se observó influencia alguna sobre la actividad de la HMG-CoA reductasa.

Los resultados obtenidos se hallan representados en la figura 39, para la reductasa quinasa de citosol y en la figura 40 para la reductasa quinasa de microsomas, pudiéndose apreciar como ambas resultan inactivadas en función del tiempo de incubación. La línea B muestra el efecto producido por el 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo sobre la actividad enzimática medida en

ausencia de activador. Se observa una disminución progresiva y relativamente lenta de la actividad enzimática, que sigue una cinética de primer orden, puesto que al representar los valores de  $\log E/E_0$  (siendo  $E$  la actividad enzimática a cada tiempo y  $E_0$  la actividad inicial) en función del tiempo, se obtiene una línea recta. Su pendiente proporciona una constante de velocidad que tiene las dimensiones de un tiempo inverso y que constituye una buena aproximación a la velocidad con que se desarrolla la reacción. La constante de velocidad para la pérdida de actividad enzimática medida en ausencia de activador, a la que en adelante nos referiremos como "inactivación total", se identifica como  $K_2$  y tiene unos valores de  $0,0106 \text{ min}^{-1}$  y  $0,0094 \text{ min}^{-1}$  para las reductasa quinasas citosólica y microsomal, respectivamente.

Cuando la actividad reductasa quinasa se mide en presencia de AMP como activador, el perfil de inactivación obtenido es bifásico. La adición de AMP al ensayo de actividad reductasa quinasa provoca un incremento de la misma de 4 a 5 veces, lo cual se pone de manifiesto al comparar los valores del  $\log E/E_0$  de los tiempos cero de las líneas A y B. A medida que el tiempo de incubación con 5'-FSO<sub>2</sub>Bz Ado progresa, la línea A se aproxima a la línea B hasta coincidir con ella, aproximadamente al cabo de 12 minutos de reacción. A partir de este momento ambas rectas pueden superponerse, lo cual significa que a partir de este instante la enzima ha perdido su "capacidad de activación por AMP".

Para calcular la correcta constante de velocidad de la pérdida de la capacidad de activación por AMP, es preciso tener en cuenta que la inactivación representada por la recta A corresponde realmente a la coexistencia de las reacciones de inactivación total y de pérdida de la capacidad de activación por AMP. Por lo tanto, dado que a partir de los 12 minutos las rectas A y B se superponen, los valores de  $\log E/E_0$  de la línea A deben corregirse, restándoles los valores de  $\log E/E_0$  de la línea B. La representación

## FIGURAS 39 y 40

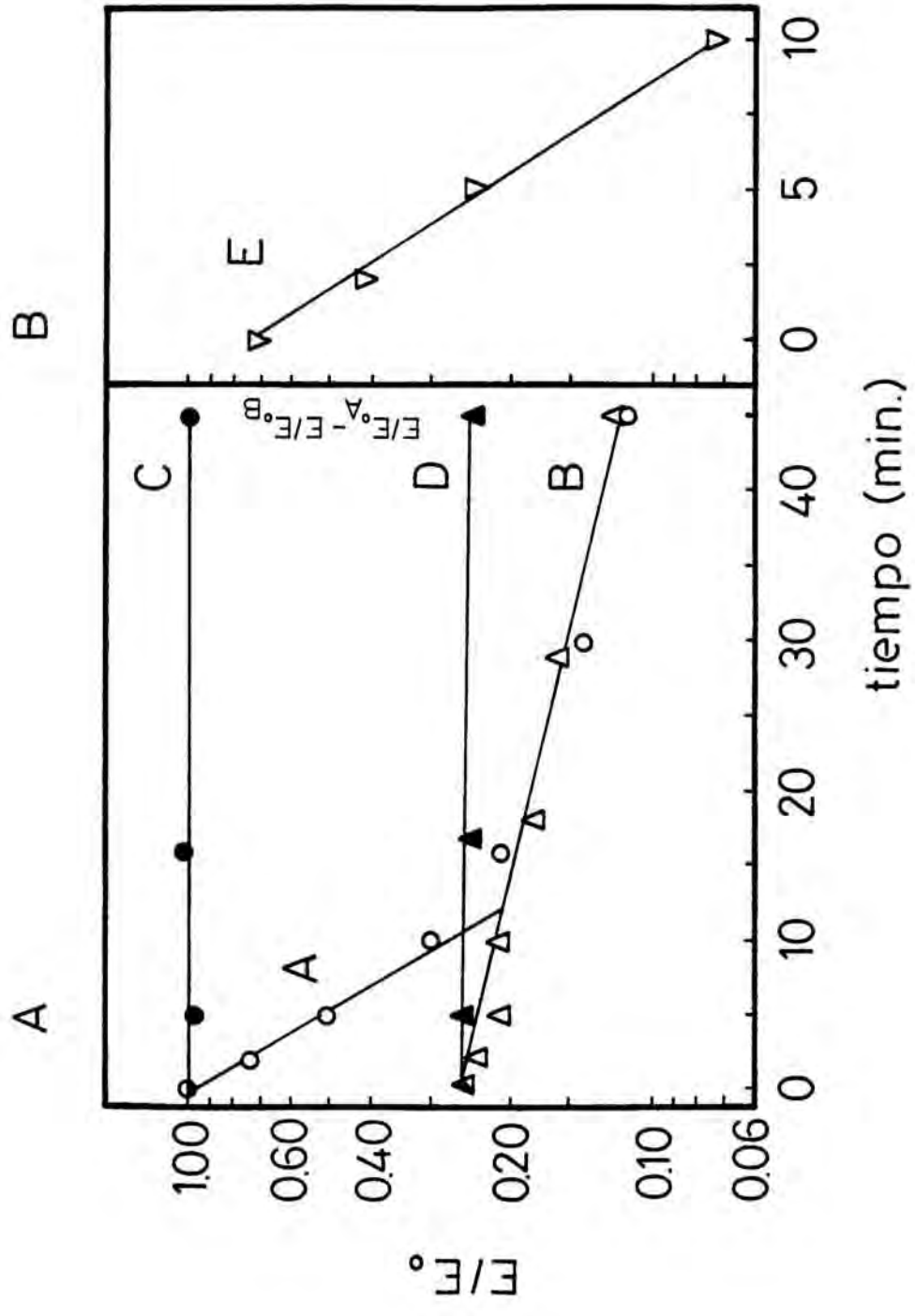
INACTIVACION DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS  
DEPENDIENTE DEL TIEMPO DE INCUBACION CON 5'-  
FSO<sub>2</sub>BzAdo.

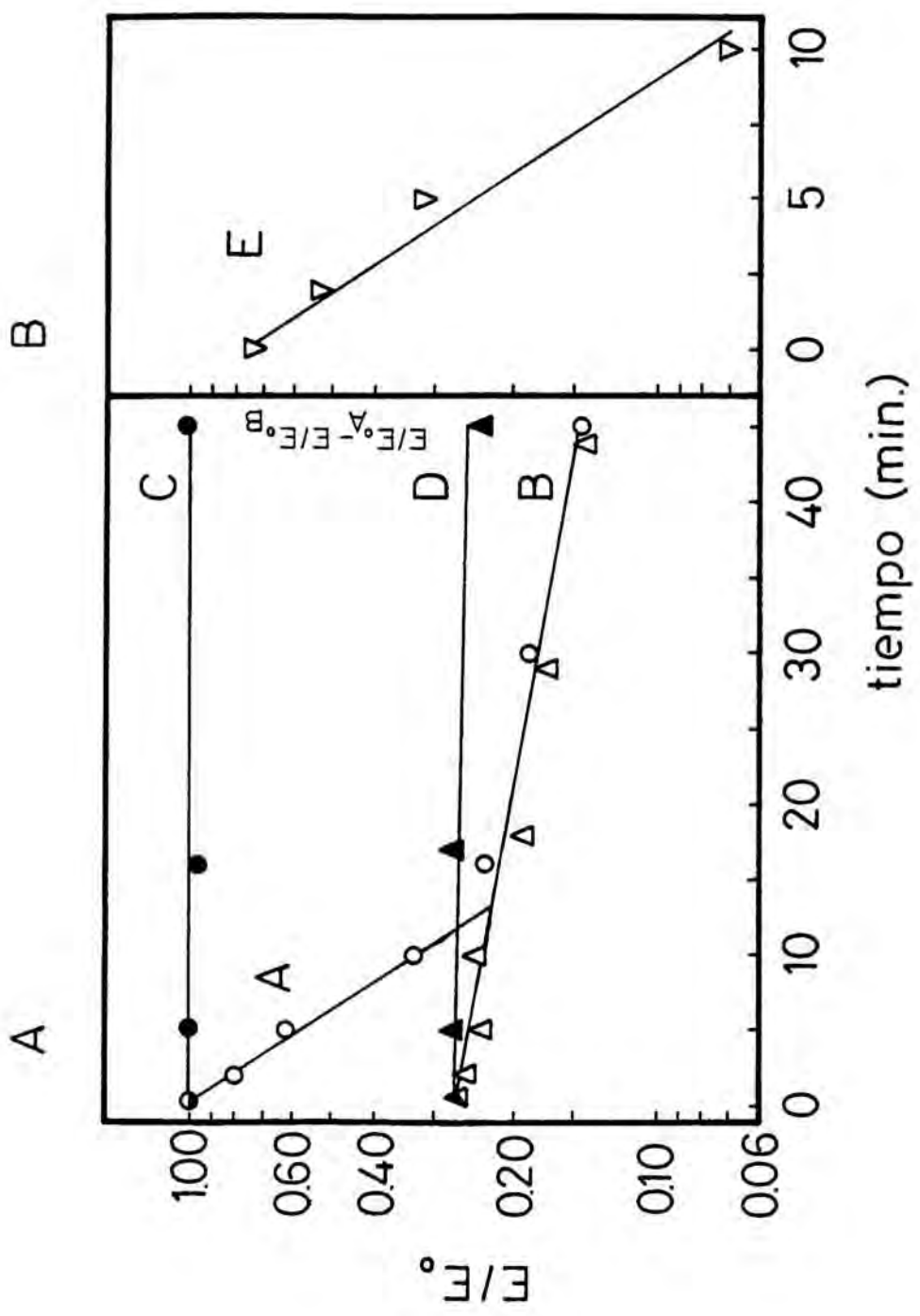
Alícuotas de reductasa quinasa de citosol y de microsomas (8 y 3 U. respectivamente) se incubaron en presencia de 5'-FSBA 250  $\mu$ M, en un volumen de 40  $\mu$ L, en las condiciones descritas en 2.10. A los distintos tiempos indicados en abscisas se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L en las que se determinó la actividad reductasa quinasa remanente, tras dilución, en presencia de AMP 2 mM (línea A,  $\circ$ ) o en su ausencia (línea B,  $\Delta$ ) según lo descrito en 2.4.4. Al mismo tiempo se incubaron mezclas de reacción con idénticos componentes a excepción de 5'-FSBA, en las que no se observó disminución de la actividad reductasa quinasa, cuando ésta se midió en presencia (línea C,  $\bullet$ ) o ausencia (línea D,  $\blacktriangle$ ) de AMP.

En la gráfica A se representa en ordenadas  $\log E/E_0$  y en abscisas el tiempo de incubación.

En la gráfica B se representa en ordenadas  $\log (E/E_{0A} - E/E_{0B})$  y en abscisas el tiempo de incubación. Las rectas fueron calculadas por regresión lineal de los datos.

Las figuras 39 y 40 muestran respectivamente los resultados obtenidos con las quinasas de citosol y de microsomas.







semilogarítmica de los nuevos valores obtenidos frente al tiempo, proporciona la línea E, cuya pendiente es la auténtica constante de velocidad de la pérdida de la capacidad de activación por AMP, que se identifica por  $K_1$ . Los valores de  $K_1$  son  $0,112 \text{ min}^{-1}$  y  $0,107 \text{ min}^{-1}$  para las quinasas citosólica y microsomal, respectivamente.

Cuando las enzimas se incuban en ausencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo en idénticas condiciones, no se observa variación en la actividad enzimática basal ni en la capacidad de activación por AMP (líneas D y C).

A modo de resumen podemos afirmar que el perfil bifásico de inactivación obtenido es característico de una reacción del 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo con dos centros concretos de la molécula de la enzima, uno responsable del proceso de activación por AMP y otro, menos reactivo, que es absolutamente imprescindible para el desarrollo del proceso catalítico. Esta afirmación está avalada por el hecho de que en nuestras condiciones de ensayo, la pérdida de la capacidad de activación por AMP se produce alrededor de 11 veces más rápidamente que la inactivación total de la enzima. Los cocientes  $K_1/K_2$  tienen unos valores de 10,5 y 11,4 para las quinasas citosólica y microsomal, respectivamente.

#### 3.17.4. EFECTO DE DIVERSOS LIGANDOS SOBRE LAS VELOCIDADES DE INACTIVACION DE LAS REDUCTASA QUINASAS POR 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo

Se estudió el efecto producido por diversos ligandos sobre las constantes de velocidad de la inactivación total ( $K_2$ ) y de la pérdida de la capacidad de activación por AMP ( $K_1$ ), producidas por 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, con objeto de confirmar la reacción del análogo de los nucleótidos de adenina en dos centros distintos de la molécula de las reductasa quinasas y obtener información concerniente a la función

concreta de los dos mencionados centros y de los ligandos que interaccionan con ellos.

#### 3.17.4.1. Protección con $MgCl_2$

En primer lugar se investigó el patrón de protección de la inactivación, producido por  $MgCl_2$  7,5 mM, para lo cual se incubaron alícuotas de ambas reductasa quinasa en presencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo 250  $\mu$ M y  $MgCl_2$  7,5 mM. La actividad reductasa quinasa residual se determinó a distintos tiempos de la incubación a 25°C. Al mismo tiempo se prepararon dos experimentos control en idénticas condiciones, pero en ausencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo. Todas las operaciones se efectuaron en las condiciones descritas en 2.10. y la actividad reductasa quinasa se determinó en presencia de AMP 2 mM.

Los resultados obtenidos se muestran para la quinasa de citosol en la figura 41 y para la de microsomas en la figura 42. Resulta notorio el efecto protector producido por el  $Mg^{2+}$  sobre ambas fases de la inactivación. Los valores de las constantes de velocidad obtenidos de las gráficas, para las quinasa de citosol y de microsomas son, respectivamente:  $K_1 = 0,051 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,0047 \text{ min}^{-1}$  y  $K_1 = 0,077 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,0045 \text{ min}^{-1}$ .

El efecto producido sobre las velocidades de inactivación total de las enzimas es idéntico, pues en ambos casos ésta se reduce a la mitad de la obtenida en ausencia de  $MgCl_2$ . Por otro lado, también se observa un efecto protector sobre la velocidad de pérdida de la capacidad de activación por AMP, significativo en ambos casos, aunque en medida algo distinta, pues mientras la constante de velocidad  $K_1$  disminuye 2,2 veces en el caso de la reductasa quinasa de citosol, lo hace tan solo 1,4 veces, en el de la reductasa quinasa de microsomas. Esta diferencia se traduce gráfi-

## FIGURAS 41 y 42

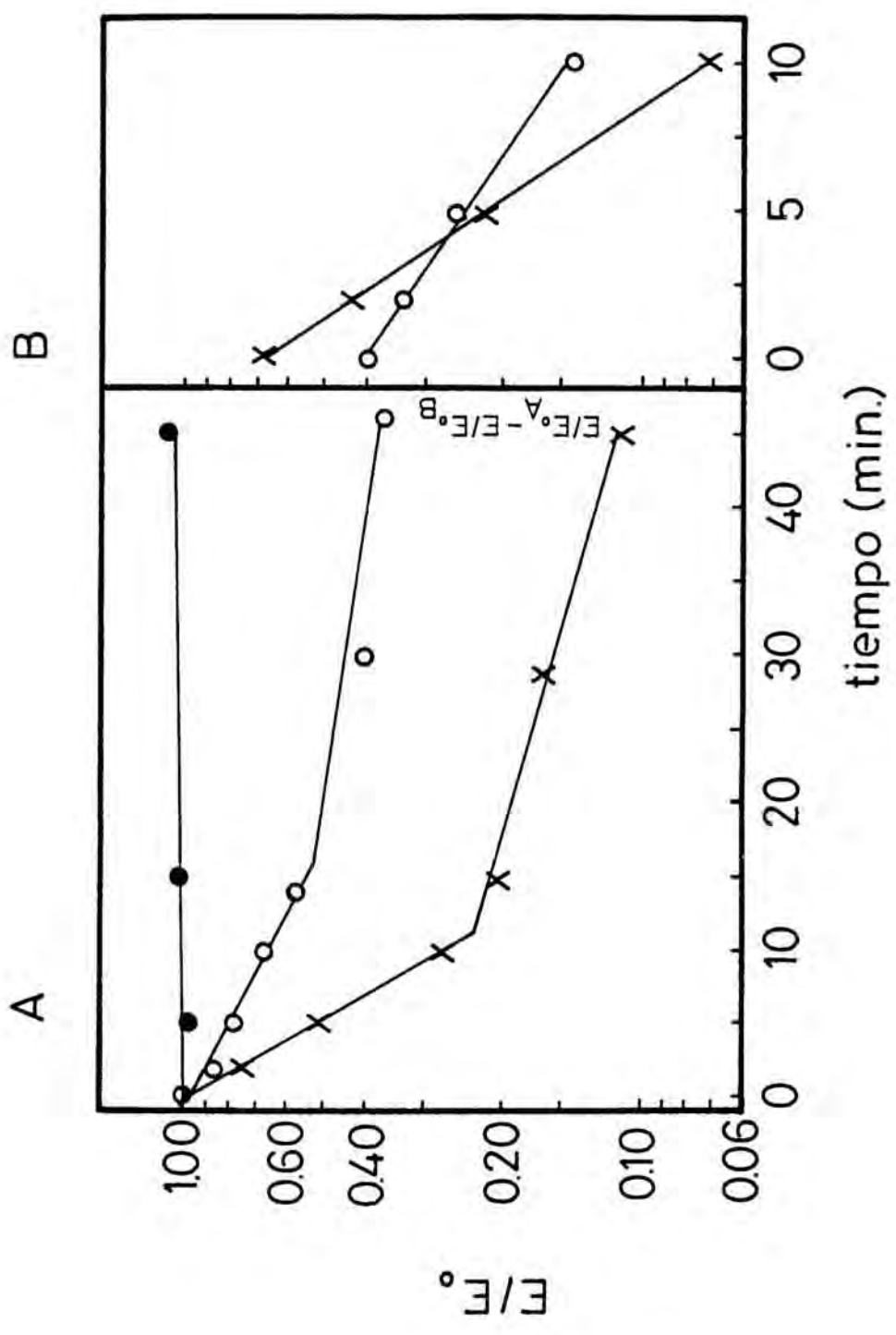
PROTECCION CON  $MgCl_2$  FRENTE A LA INACTIVACION  
POR 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo

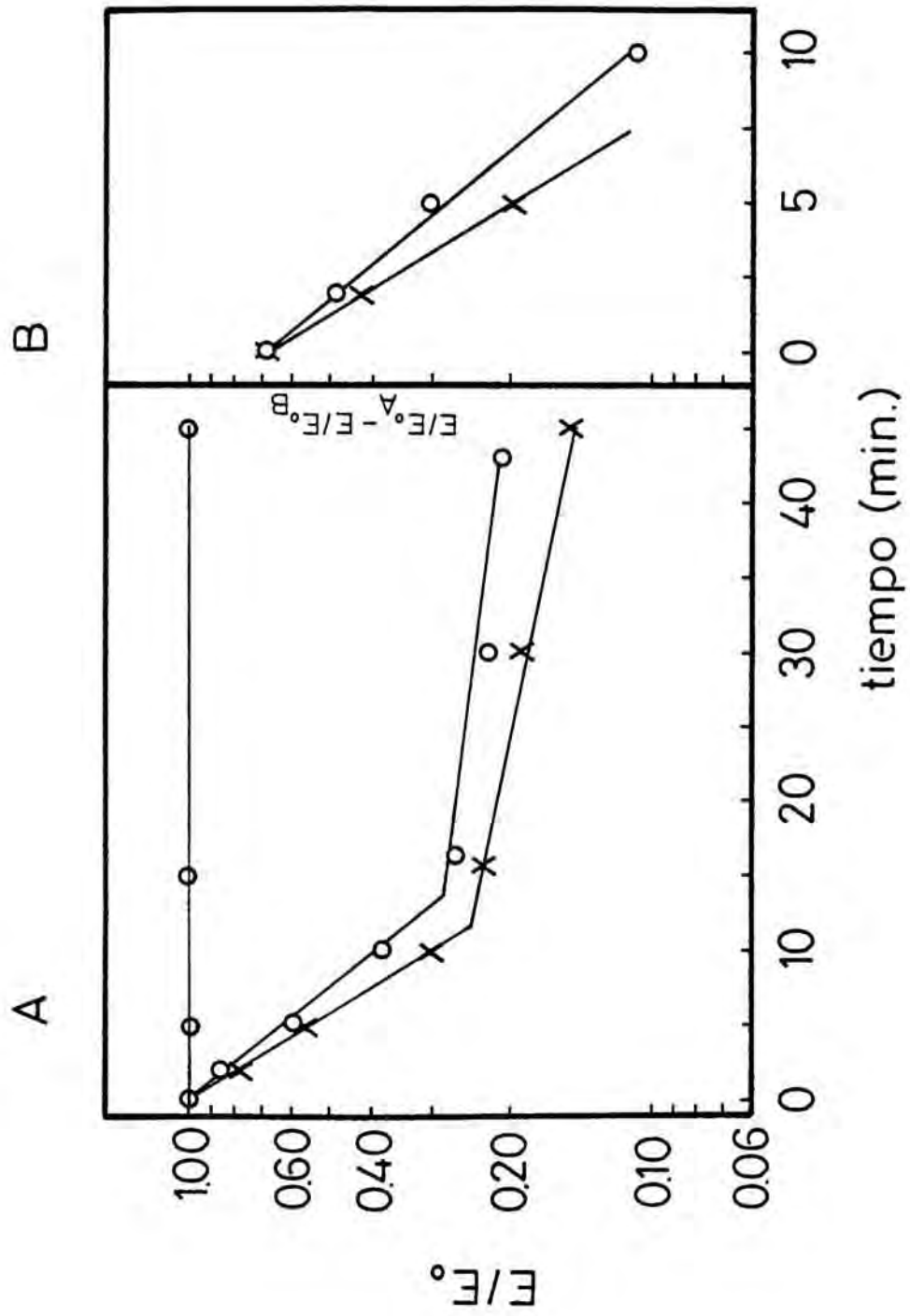
Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones descritas en 2.10., con 5'-FSBA 250  $\mu$ M, en presencia (○) y ausencia (×) de  $MgCl_2$  7,5 mM. Simultáneamente se efectuaron controles de actividad reductasa quinasa en ausencia de 5'-FSBA (●). La actividad reductasa quinasa se midió en presencia de AMP 2 mM.

En la gráfica A se representa en ordenadas  $\log E/E_0$  y en abcisas el tiempo de incubación.

En la gráfica B se representa en ordenadas  $\log (E/E_{0A} - E/E_{0B})$  y en abcisas el tiempo de incubación.

Las figuras 41 y 42 muestran respectivamente, los resultados obtenidos con las quinasas de citosol y de microsomas.





camente en la obtención de una línea B más elevada en el caso de la quinasa de citosol, cuya proyección presenta un valor de la ordenada en el origen superior en el primer caso. De lo expuesto se deduce que el  $Mg^{2+}$  presenta una cierta capacidad para interaccionar con los dos centros reactivos de las reductasa quinasa hepáticas.

#### 3.17.4.2 Protección con ATP y $MgCl_2/ATP$

El posible efecto protector ejercido por ATP y  $MgCl_2/ATP$  se estudió para intentar averiguar cual era el auténtico sustrato dador de grupos fosfato, ATP o  $MgCl_2/ATP$  y comprobar si como era previsible de acuerdo con el modelo propuesto (existencia de dos centros distintos, uno activador y otro catalítico), la protección suministrada modificaba preferentemente la velocidad de la segunda fase de la reacción de inactivación.

Las reacciones de inactivación se llevaron a cabo en presencia de  $5'-FSO_2BzAdo$  con ATP 2,5 mM y  $MgCl_2/ATP$  7,5/2,5 mM. Simultáneamente se realizaron controles de actividad reductasa quinasa en ausencia del análogo sintético y en ausencia de ligandos añadidos.

El ATP sólo, añadido a una concentración 10 veces mayor que la  $5'-FSO_2BzAdo$ , no proporciona ningún tipo de protección en ninguna de las dos fases de la inactivación. Las constantes de velocidad obtenidas son respectivamente,  $K_1 = 0,102 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,012 \text{ min}^{-1}$  y  $K_1 = 0,106 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,0107 \text{ min}^{-1}$ , para las reductasa quinasa de citosol y de microsomas; estos valores son análogos a los obtenidos en ausencia del nucleótido. La mezcla  $MgCl_2/ATP$  a las concentraciones 7,5/2,5 mM ejerce un efecto de protección completo en la fase de inactivación total de ambas enzimas, como lo demuestran las constantes de velocidad  $K_2$ , cuyo valor pasa a ser 0. La acción ejercida sobre la velocidad de pérdida de la

## FIGURAS 43 Y 44

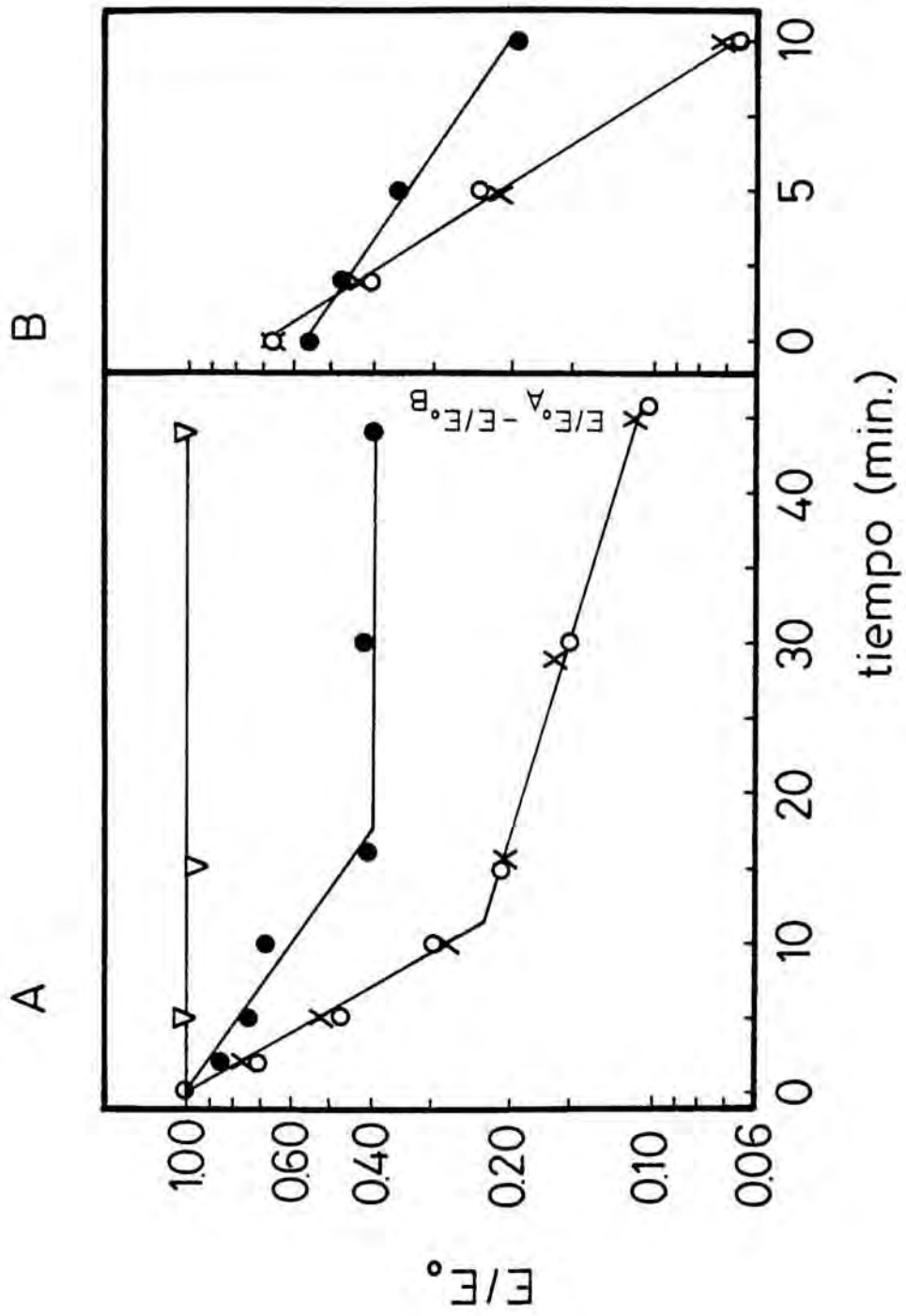
PROTECCION CON ATP Y  $MgCl_2/ATP$  FRENTE A LA  
INACTIVACION POR  $5'-FSO_2BzAdo$ 

Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones descritas en 2.10., con  $5'-FSBA$   $250 \mu M$  y las adiciones de  $ATP$   $2,5 mM$  ( $\circ$ ) y  $MgCl_2/ATP$   $7,5/2,5 mM$  ( $\bullet$ ). Simultáneamente se efectuaron experimentos control, en presencia de  $5'-FSBA$  solo ( $\times$ ) y de  $ATP$  y  $MgCl_2$  en ausencia del análogo, representándose en la gráfica la media de los valores obtenidos dada su similitud ( $\nabla$ ). La actividad reductasa quinasa se midió en presencia de  $AMP$   $2 mM$ .

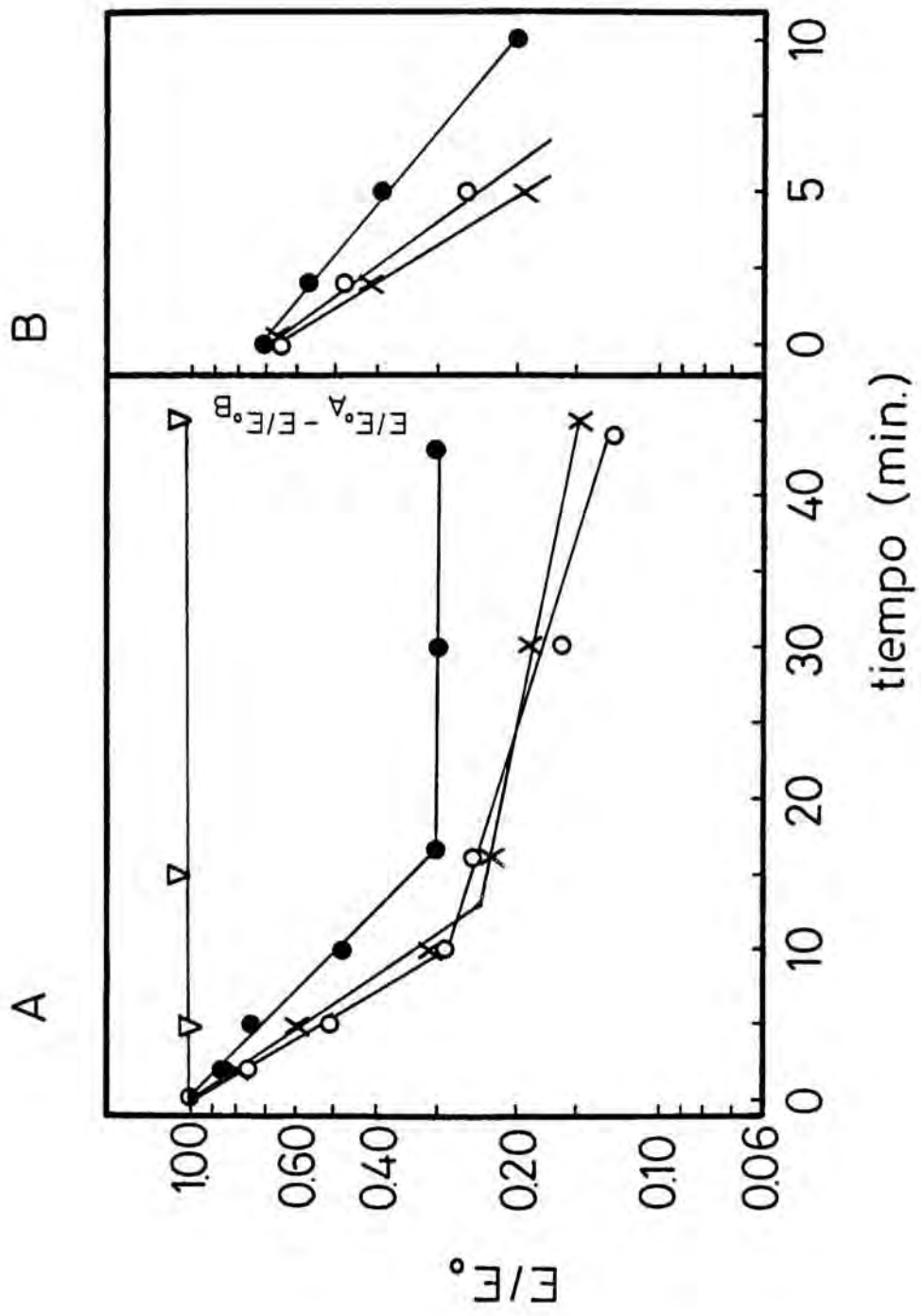
En la gráfica A se representa en ordenadas  $\log E/E_0$  y en abcisas el tiempo de incubación.

En la gráfica B se representa en ordenadas  $\log (E/E_{0A} - E/E_{0B})$  y en abcisas el tiempo de incubación.

Las figuras 43 y 44 muestran respectivamente los resultados obtenidos con las quinasas de citosol y de microsomas.







capacidad de activación por AMP es mucho menor, siendo los valores de  $K_1 = 0,048 \text{ min}^{-1}$  y  $0,058 \text{ min}^{-1}$ . La comparación de estos valores de  $K_1$  con los obtenidos en el experimento realizado con  $\text{MgCl}_2$  7,5 mM, sugiere que la protección parcial observada en este caso se debe fundamentalmente al catión libre existente, más que a propia existencia de la especie Mg-ATP. Es posible descartar también la concurrencia de un efecto protector aditivo debido al  $\text{Mg}^{2+}$  y al ATP por separado, puesto que el nucleótido aislado manifiesta una total incapacidad para ocupar los centros reactivos de las enzimas.

Consecuentemente, los resultados deducidos de las figuras 43 y 44 identifican al Mg-ATP como verdadero sustrato de las reductasa quinasas a la vez que ponen de manifiesto que dicha especie y no el ATP solo, se liga exclusivamente al centro catalítico.

#### 3.17.4.3. Protección con AMP y $\text{MgCl}_2/\text{AMP}$

Se estudió la posible modificación de las velocidades de inactivación  $K_1$  y  $K_2$  de ambas reductasa quinasas, en presencia de AMP 2,5 mM y de  $\text{MgCl}_2/\text{AMP}$  a las concentraciones de 7,5/ 2,5 mM y 7,5/0,05 mM. En paralelo se efectuaron controles de inactivación en presencia de 5'-FSO<sub>2</sub>Bz Ado exclusivamente, así como en presencia de AMP y de  $\text{MgCl}_2/\text{AMP}$  a las mismas concentraciones, en ausencia del análogo sintético. En este último caso no se apreció efecto significativo sobre la actividad de las reductasa quinasas.

Se observa en las figuras 45 y 46 como de manera un tanto sorprendente, la protección suministrada por una concentración de AMP 2,5 mM (diez veces superior a la de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo) frente a la pérdida de la capacidad de activación por AMP, resulta ser considerablemente débil ( $K_1 = 0,060 \text{ min}^{-1}$  y  $0,064 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente) si tenemos en

## FIGURAS 45 Y 46

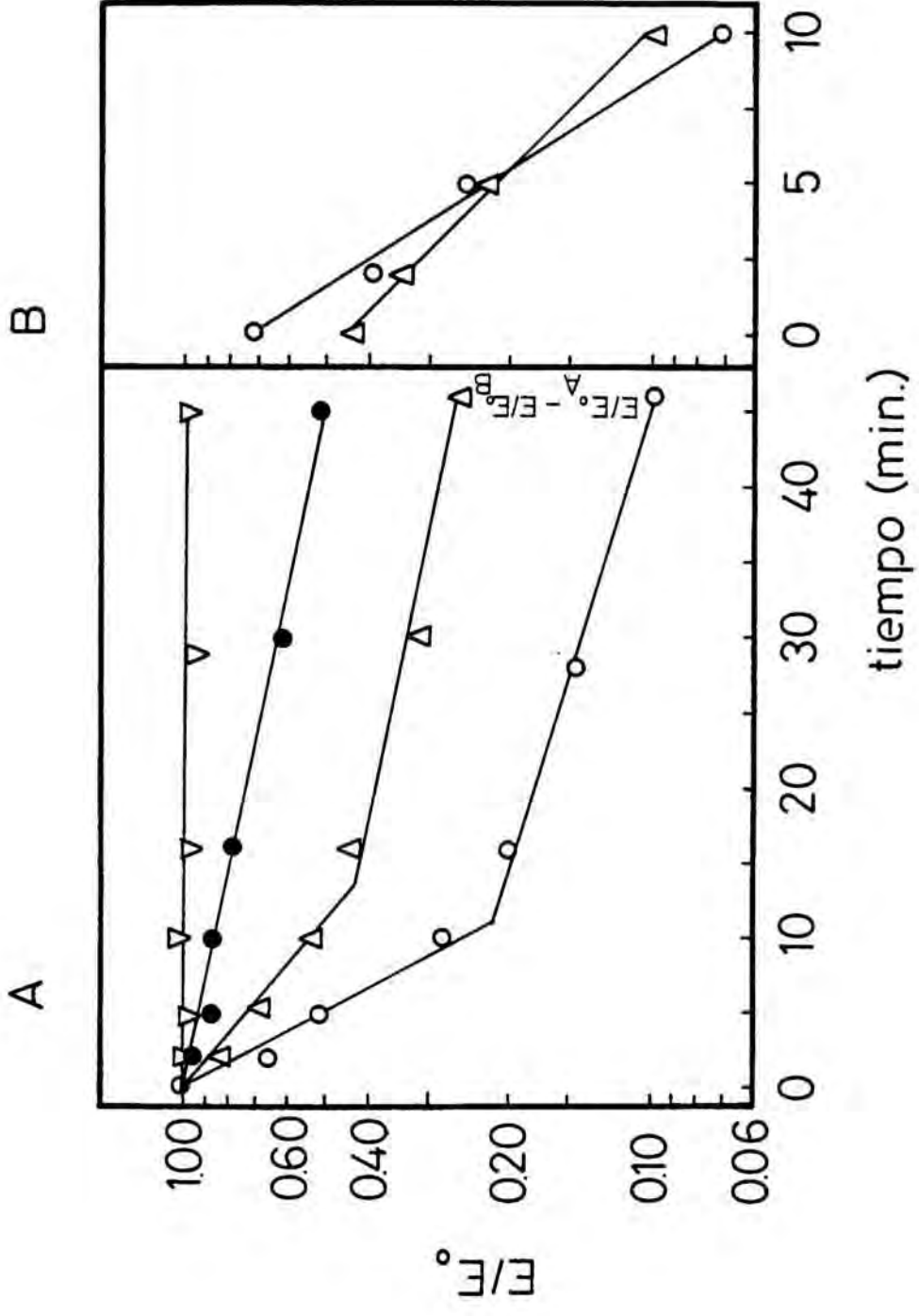
PROTECCION CON AMP Y  $MgCl_2$ /AMP FRENTE A LA  
 INACTIVACION POR 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo

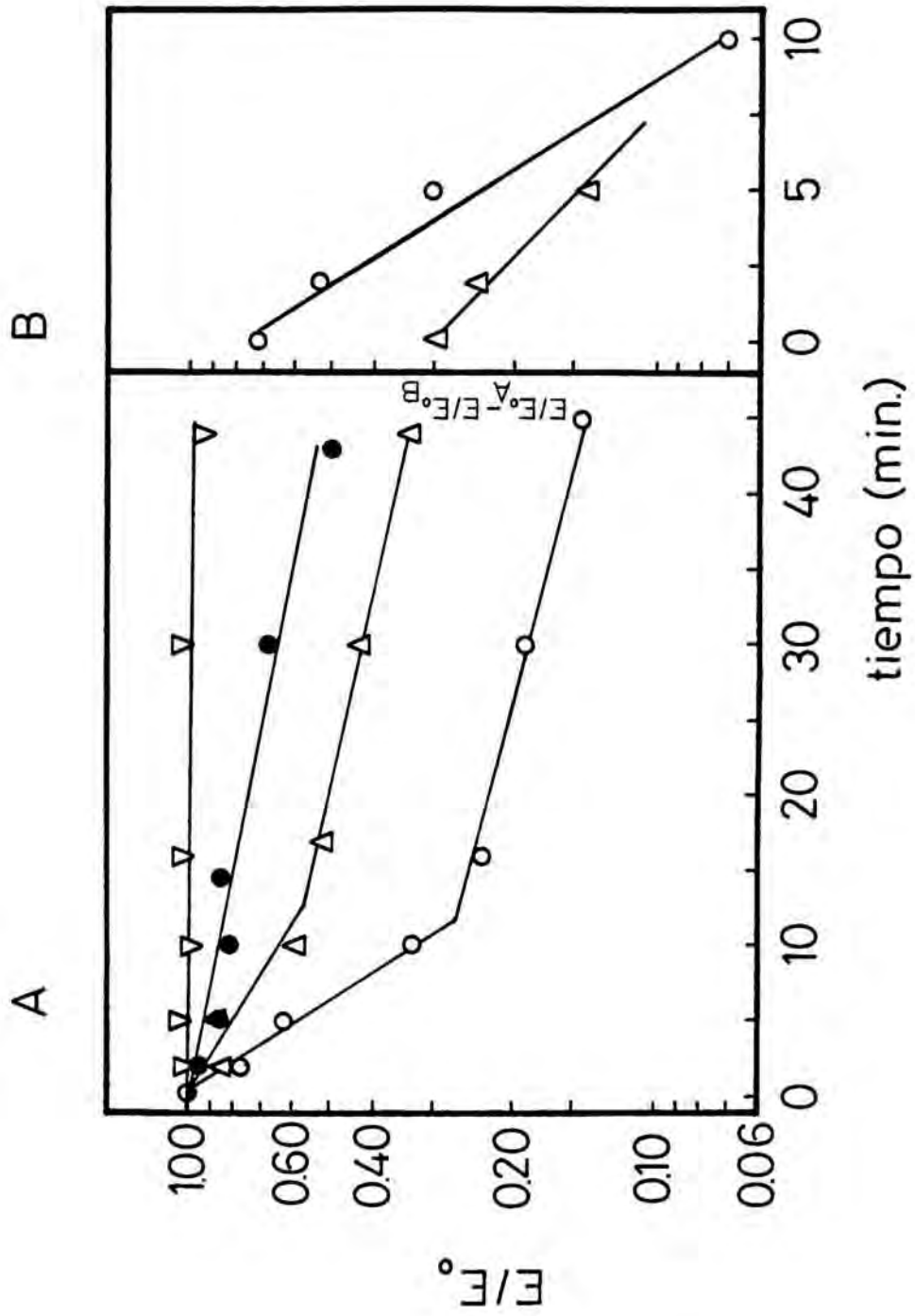
Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones descritas en el apartado 2.10., con 5'-FSBA 250  $\mu$ M y las adiciones de AMP 2,5 mM ( $\Delta$ ),  $MgCl_2$ /AMP 7,5/2,5 mM ( $\nabla$ ) y  $MgCl_2$ /AMP 7,5/0,05 mM ( $\bullet$ ). Simultáneamente se efectuaron experimentos control en presencia de 5'-FSBA solo ( $\circ$ ) y de AMP y  $MgCl_2$  a las concentraciones señaladas, pero en ausencia del análogo sintético. La actividad reductasa quinasa se midió en presencia de AMP 2 mM.

En la gráfica A se representan en ordenadas  $\log E/E_0$  y en abcisas el tiempo de incubación.

En la gráfica B se representa en ordenadas  $\log (E/E_{0A} - E/E_{0B})$  y en abcisas el tiempo de incubación.

Las figuras 45 y 46 muestran respectivamente los resultados obtenidos con las quinasas de citosol y de microsomas.





cuenta que es similar a la producida por la presencia exclusiva de  $Mg^{2+}$  ( $K_1 = 0,051 \text{ min}^{-1}$  y  $0,077 \text{ min}^{-1}$ ) y que el AMP es el activador principal de las reductasa quinasas, con unas constantes de activación de  $20 \mu\text{M}$  y  $17,2 \mu\text{M}$ .

Por el contrario, el nucleósido monofosfato no disminuye significativamente la velocidad de inactivación total de ambas reductasa quinasas, como se deduce de los valores de  $K_2$  que son respectivamente,  $0,0094 \text{ min}^{-1}$  y  $0,0088 \text{ min}^{-1}$ . Ambos resultados sugieren una interacción selectiva del AMP con el centro activador, aunque más débilmente de lo esperado en un principio.

Los resultados obtenidos en presencia de  $MgCl_2/$  AMP  $7,5/2,5 \text{ mM}$  son por el contrario, absolutamente distintos. Se aprecia como, con ambas quinasas, se consigue una protección total frente a las dos fases de la inactivación mediada por  $5'\text{-FSO}_2\text{BzAdo}$  ( $K_1 = K_2 = 0$ ).

En un intento de sensibilizar el efecto protector de la mezcla  $MgCl_2/$ AMP en ambos centros de las reductasa quinasas, la concentración de AMP se rebajó hasta  $50 \mu\text{M}$ , manteniendo constante la concentración de  $MgCl_2$  en  $7,5 \text{ mM}$ . Se observa claramente como en ambos casos, se obtiene una línea recta única, carente de punto de inflexión, cuya pendiente corresponde a  $K_2$ . Los valores obtenidos son  $0,0075 \text{ min}^{-1}$  y  $0,0061 \text{ min}^{-1}$ . Por otro lado los valores de  $K_1$  son  $0 \text{ min}^{-1}$  en ambos casos.

El conjunto de resultados indica que la especie Mg-AMP a bajas concentraciones interacciona preferentemente con uno de los centros reactivos de la molécula de las reductasa quinasas, siendo éste el responsable de su activación. No obstante, también puede interaccionar, aunque más débilmente, con el centro catalítico. Esta última propiedad se acentúa al máximo cuando se incrementa la concentración de AMP hasta  $2,5 \text{ mM}$  ( $K_2 = 0$ ). La especie Mg-AMP, más que el

AMP en solitario, es pues la responsable de la activación de las reductasa quinasas.

#### 3.17.4.4. Protección con $MgCl_2/ADP$

Resultados previos presentados en la presente Memoria han puesto de manifiesto la superior potencia activadora del AMP con respecto al ADP. Experimentos de protección frente a la inactivación por  $5'$ - $FSO_2BzAdo$  en presencia de ADP  $50 \mu M$  han confirmado los resultados precedentes.

Se procedió a analizar los perfiles de inactivación de ambas reductasa quinasas en presencia de  $5'$ - $FSO_2BzAdo$   $250 \mu M$  y  $MgCl_2/ADP$  a las concentraciones  $7,5/2,5$  mM y  $7,5/0,05$  mM. Las figuras 47 y 48 muestran los resultados obtenidos y como en el caso anterior, a concentraciones elevadas del activador, en este caso ADP  $2,5$  mM, se consigue una protección inespecífica y total frente a las dos fases de la inactivación por  $5'$ - $FSO_2BzAdo$  ( $K_1 = K_2 = 0$ ). Sin embargo, cuando la concentración se rebaja hasta  $50 \mu M$ , para sensibilizar el ensayo, manteniendo constante la concentración de  $MgCl_2$  en  $7,5$  mM, se observa un perfil de inactivación bifásico.

En estas condiciones la velocidad de pérdida de la capacidad de activación por AMP se modifica ligeramente ( $K_1 = 0,082 \text{ min}^{-1}$  y  $0,075 \text{ min}^{-1}$ ) respecto a la velocidad de inactivación en ausencia de ligandos, indicando una escasa capacidad de protección del centro activador, debida posiblemente al catión libre. Cabe recordar que  $MgCl_2/AMP$  a igual concentración, produce protección total ( $K_1 = 0$ ). La velocidad de inactivación total en cambio, se ve notablemente modificada ( $K_2 = 0,0023 \text{ min}^{-1}$  y  $0,0043 \text{ min}^{-1}$ ) respecto a la velocidad de inactivación en ausencia de ligandos.

Estos resultados confirman la mayor afinidad del

## FIGURAS 47 Y 48

PROTECCION CON  $MgCl_2/ADP$  FRENTE A LA INACTIVACION  
CON 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo

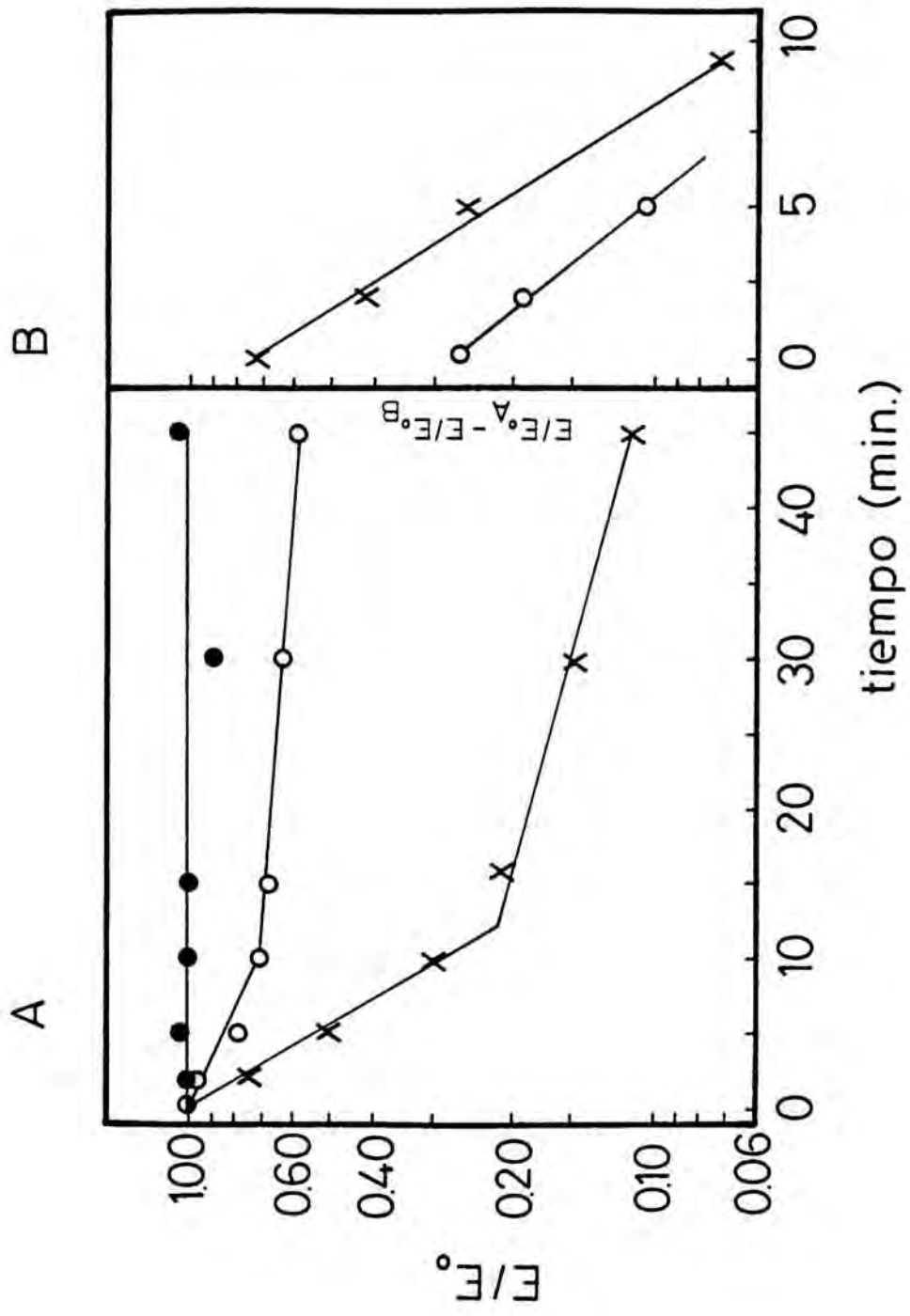
Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones descritas en 2.10., con 5'-FSBA 250  $\mu$ M y la adición de  $MgCl_2/ADP$  a las concentraciones 7,5/2,5 mM (●) y 7,5/0,05 mM (○). Simultáneamente se realizaron experimentos control en presencia de 5'-FSBA solo (×) y de  $MgCl_2/ADP$  a las concentraciones señaladas, pero en ausencia del análogo, no observándose efecto sobre la actividad quinasa. La actividad reductasa quinasa se midió en presencia de AMP 2 mM.

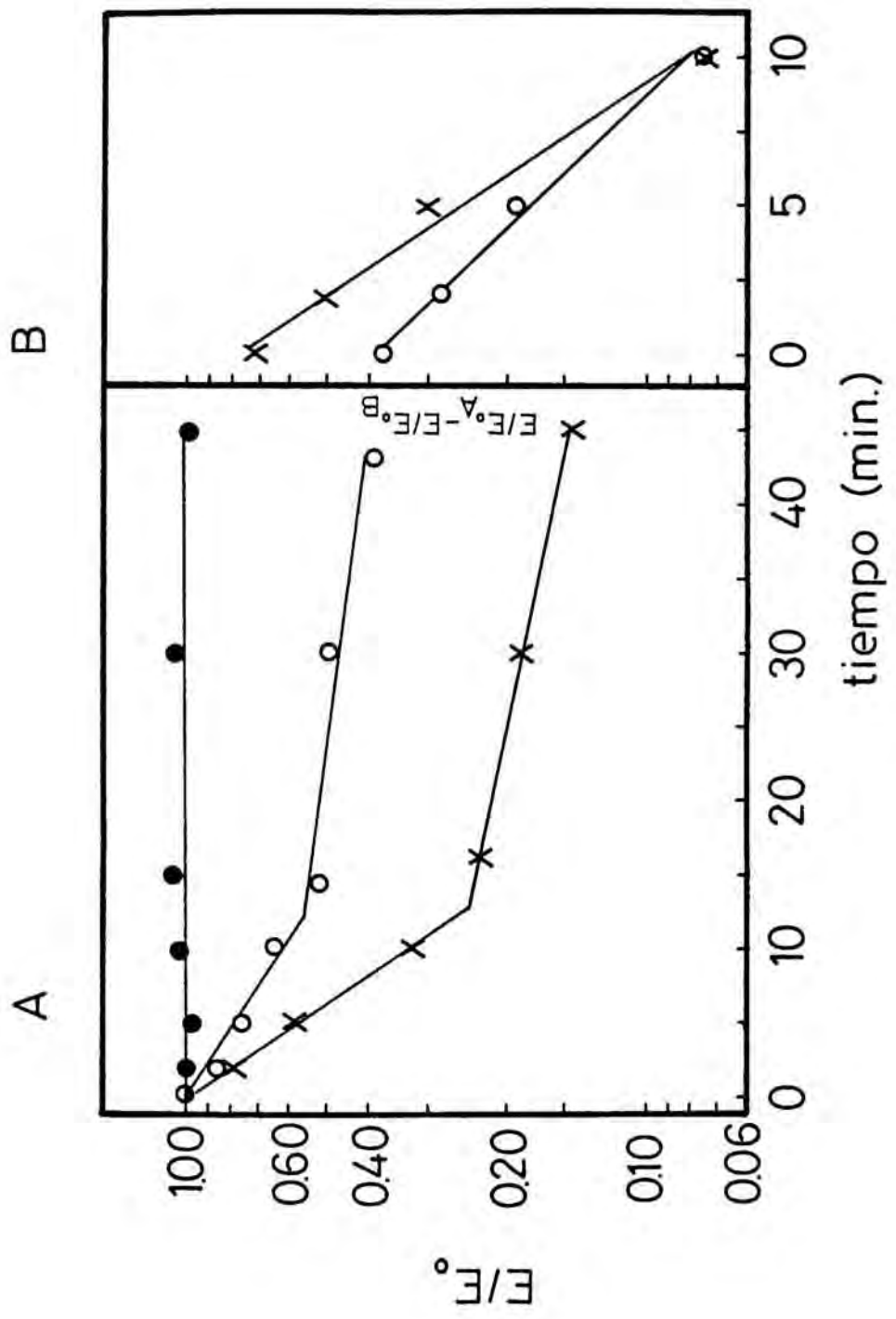
En la gráfica A se representa en ordenadas  $\log E/E_0$  y en abcisas el tiempo de incubación.

En la gráfica B se representa en ordenadas  $\log (E/E_{0A} - E/E_{0B})$  y en abcisas el tiempo de incubación.

Las figuras 47 y 48 muestran respectivamente los resultados obtenidos con las quinasas de citosol y de microsomas.







$$E/E_0^A - E/E_0^B$$

B

A

tiempo (min.)

$F/F_0$

Mg-AMP respecto al Mg-ADP, por el centro activador de la molécula de las reductasas quinasas. La superior capacidad de interacción del Mg-ADP frente al Mg-AMP con el centro catalítico puede entenderse dada la mayor proximidad estructural de la molécula de ADP con respecto a la de ATP.

#### 3.17.4.5. Protección con 2'-AMP, 3'-AMP, MgCl<sub>2</sub>/2'-AMP y MgCl<sub>2</sub>/3'-AMP

Los resultados presentados en el apartado 3.14.3. ponen de manifiesto la incapacidad del 2'-AMP y del 3'-AMP para activar a las reductasa quinasas. Seguidamente se muestran los resultados obtenidos al incubar reductasa quinasa de citosol en presencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo 250 μM y las adiciones de los siguientes ligandos por separado: 2'-AMP 2,5 mM; 3'-AMP 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub>/2'-AMP 7,5/2,5 mM y MgCl<sub>2</sub>/3'-AMP 7,5 mM/2,5 mM. Los resultados obtenidos están expuestos en la figura 49.

Los valores de las constantes de velocidad para los diversos efectores añadidos fueron los siguientes:  
 2'-AMP,  $K_1 = 0,076 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,0105 \text{ min}^{-1}$ ; 3'-AMP,  $K_1 = 0,081 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,0096 \text{ min}^{-1}$ ; MgCl<sub>2</sub>/2'-AMP,  $K_1 = 0,063 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,007 \text{ min}^{-1}$ ; MgCl<sub>2</sub>/3'-AMP,  $K_1 = 0,058 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,006 \text{ min}^{-1}$ .

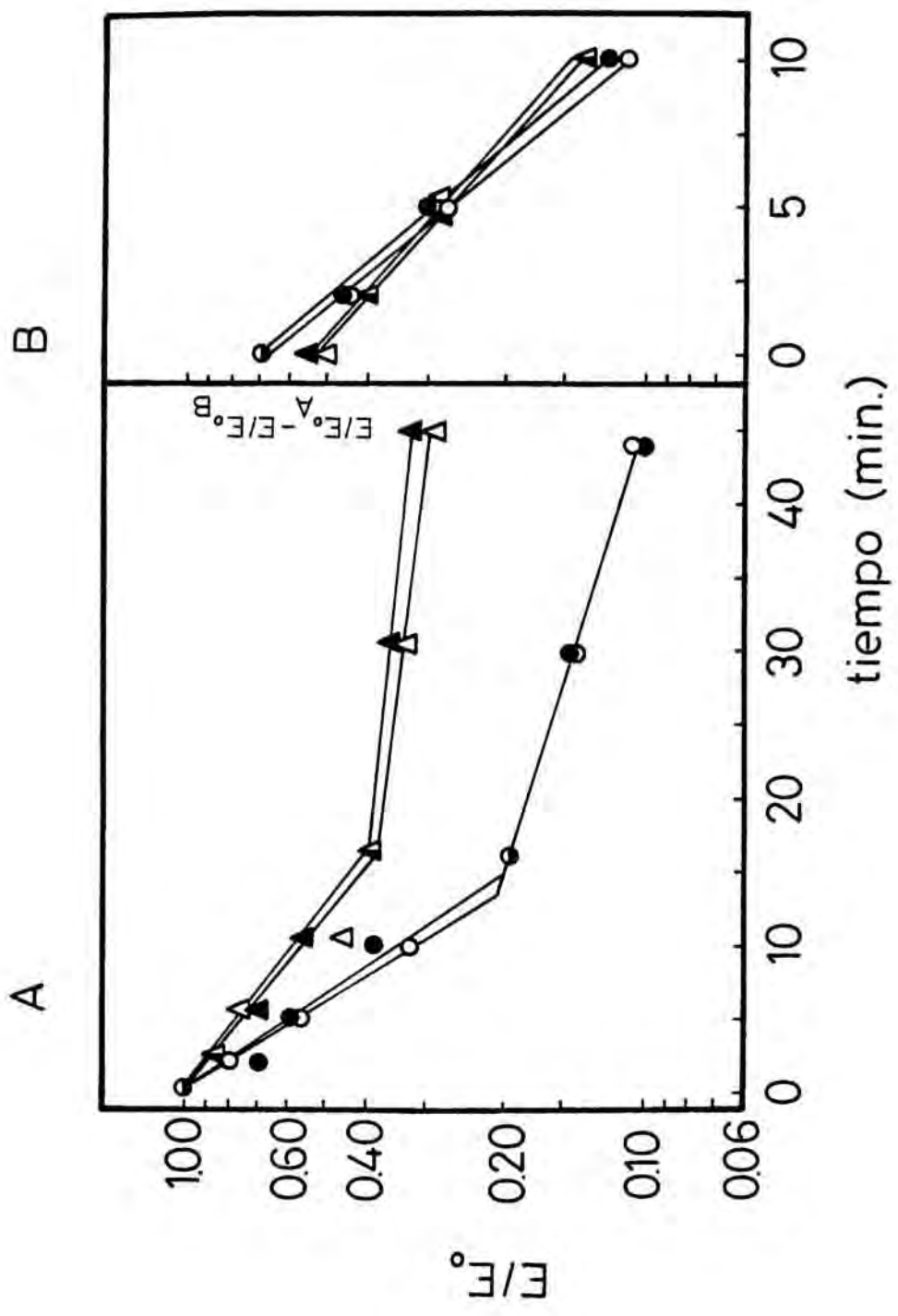
Se pone de manifiesto que los dos nucleósidos monofosfato individualmente proporcionan una relativamente débil protección frente a la pérdida de la capacidad de activación por AMP, que en cualquier caso es menor que la proporcionada por el 5'-AMP solo ( $K_1 = 0,060 \text{ min}^{-1}$ ). El efecto producido sobre la velocidad de inactivación total es prácticamente nulo y está en la misma línea del producido por su isómero 5'-AMP ( $K_2 = 0,0094 \text{ min}^{-1}$ ). Sin embargo la condición que realmente establece la muy diferente facultad activadora de dichos isómeros es la adición de MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM

FIGURA 49 PROTECCION CON 2'-AMP, 3'-AMP,  $MgCl_2/2'$ -AMP Y  $MgCl_2/3'$ -AMP FRENTE A LA INACTIVACION POR 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo

Los ensayos con reductasa quinasa de citosol se realizaron en las condiciones descritas en el apartado 2.10., con 5'-FSBA 250  $\mu$ M y las adiciones de 2'-AMP 7,5 mM (●), 3'-AMP 7,5 mM (○),  $MgCl_2/2'$ -AMP 7,5/2,5 mM (▲) y  $MgCl_2/3'$ -AMP 7,5/2,5 mM (△). Simultáneamente se realizaron experimentos control en presencia de los efectores mencionados, en ausencia del análogo. La actividad reductasa quinasa se midió en presencia de AMP 2 mM.

En la gráfica A se representa en ordenadas  $\log E/E_0$  y en abcisas el tiempo de incubación.

En la gráfica B se representa en ordenadas  $\log (E/E_{0A} - E/E_{0B})$  y en abcisas el tiempo de incubación.



Los valores de  $K_1$  en ambos casos, disminuyen levemente aunque solamente se aproximan algo al valor de  $K_1$  obtenido en presencia de 5'-AMP en solitario, mientras los valores de  $K_2$  se reducen 1,5 veces en ambas condiciones. Tales efectos bien pueden ser atribuidos al catión libre. Debemos tener presente que  $MgCl_2/5'$ -AMP a iguales concentraciones produce unos valores de  $K_1 = K_2 = 0$ .

Estos resultados descartan la posibilidad de que el drástico efecto protector obtenido en presencia de  $MgCl_2/AMP$  sea debido a la suma de los efectos de ambos componentes por separado y confirman de nuevo que la especie  $Mg-AMP$  es realmente la responsable de la activación, como lo demuestra su específica y elevada afinidad por el centro activador de las reductasa quinasa. Además, están en perfecto acuerdo con la superior capacidad activadora manifestada por  $Mg-5'$ -AMP frente a  $Mg-2'$ -AMP y  $Mg-3'$ -AMP, previamente demostrada en el apartado 3.14.3.

Experimentos control demostraron la ausencia de cualquier efecto por parte de los ligandos, en ausencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, sobre la reductasa quinasa.

#### 3.17.4.6. Protección con $MgCl_2/ATP/AMP$

Cuando ambas reductasa quinasa fueron incubadas en presencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo 250  $\mu$ M y  $MgCl_2/ATP/AMP$ , 7,5/2,5/2,5 mM se obtuvo, como era previsible por resultados anteriormente expuestos, un patrón de protección total frente a la reacción del análogo sintético con ambos centros de las reductasa quinasa ( $K_1 = K_2 = 0$ ). La actividad de las reductasa quinasa permaneció inalterada cuando se incubaron en iguales condiciones, pero en ausencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo.

Los valores de las constantes de velocidad se hallan expuestos conjuntamente con los obtenidos en los expe-

rimentos reseñados anteriormente, en la tabla IX.

#### 3.17.4.7. Protección con HMG-CoA reductasa

A fin de estudiar el efecto protector del sustrato proteico de las reductasa quinazas, frente a la reacción del 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo en los dos centros comentados, se analizaron los perfiles de inactivación en presencia de HMG-CoA reductasa 0,135 mg/mL.

Puesto que la HMG-CoA reductasa debe ser conservada en presencia de albúmina, previamente se analizó el efecto producido por la presencia de dicha proteína en el medio de incubación. No se observó variación significativa de las velocidades de modificación por 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, indicando que dicha proteína no actúa sobre los centros reactivos estudiados y que por otra parte, la interacción con el análogo sintético de los nucleótidos, caso de producirse, no reduce de manera apreciable la concentración del mismo disponible en el medio de ensayo.

Las constantes de velocidad calculadas en presencia de HMG-CoA reductasa a la concentración reseñada anteriormente, fueron respectivamente, para las quinazas de citosol y de microsomas:  $K_1 = 0,086 \text{ min}^{-1}$  y  $0,090 \text{ min}^{-1}$ ;  $K_2 = 0,0078 \text{ min}^{-1}$  y  $0,0086 \text{ min}^{-1}$ . Estos resultados, resumidos en la tabla IX, sugieren la existencia de un muy ligero efecto protector proporcionado por la HMG-CoA reductasa. Por otra parte, no se detectó ningún efecto sobre la actividad reductasa cuando esta enzima fue incubada en iguales condiciones con 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo 250  $\mu\text{M}$ , pero en ausencia de reductasa quinasa.

#### 3.17.5. IDENTIFICACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL DE HIGADO DE RATA

TABLA IX EFECTO DE LOS LIGANDOS SOBRE LAS VELOCIDADES DE PERDIDA DE LA CAPACIDAD DE ACTIVACION POR AMP Y DE INACTIVACION TOTAL DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Los ensayos fueron realizados en las condiciones descritas en el apartado 2.10, en presencia de 5'-FSBA 250  $\mu$ M y de los diversos efectores añadidos a las concentraciones indicadas en la tabla.

Los valores de  $K_1$  y  $K_2$  se calcularon tal como se ha explicado anteriormente en el apartado 3.17.3.



Adición	Reductasa quinasa de citosol		Reductasa quinasa de microsomas	
	$K_1 \times 10^3$ $\text{min}^{-1}$	$K_2 \times 10^3$ $\text{min}^{-1}$	$K_1 \times 10^3$ $\text{min}^{-1}$	$K_2 \times 10^3$ $\text{min}^{-1}$
1 Nada	112	10,6	107	9,4
2 $\text{MgCl}_2$ 7,5 mM	51	4,7	77	4,5
3 ATP 2,5 mM	102	12	106	10,7
4 $\text{MgCl}_2/\text{ATP}$ 7,5/2,5 mM	48	0	58	0
5 AMP 2,5 mM	60	9,4	64	8,8
6 $\text{MgCl}_2/\text{AMP}$ 7,5/2,5 mM	0	0	0	0
7 $\text{MgCl}_2/\text{AMP}$ 7,5/0,05 mM	0	7,5	0	6,1
8 $\text{MgCl}_2/\text{ADP}$ 7,5/2,5 mM	0	0	0	0
9 $\text{MgCl}_2/\text{ADP}$ 7,5/0,05 mM	82	2,3	75	4,3
10 2'-AMP 2,5 mM	76	10,5	-	-
11 3'-AMP 2,5 mM	81	9,6	-	-
12 $\text{MgCl}_2/2'$ -AMP 7,5/2,5 mM	63	7,0	-	-
13 $\text{MgCl}_2/3'$ -AMP 7,5/2,5 mM	58	6	-	-
14 $\text{MgCl}_2/\text{ATP}/\text{AMP}$ 7,5/2,5/ 2,5 mM	0	0	0	0
15 HMG-CoA reductasa 0,135 mg/mL	86	7,8	90	8,6

Los resultados presentados en el apartado 3.17.4.3. indican que la adición al medio de ensayo de  $MgCl_2/AMP$  a las concentraciones 7,5/2,5 mM, protege completamente a la reductasa quinasa de la inactivación por 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo.

A fin de poder poner de manifiesto que la pérdida de actividad reductasa quinasa por acción del 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo estaba asociada a una unión covalente del mencionado compuesto a la proteína, fue preciso identificarla previamente con exactitud. Esto fue posible realizarlo gracias a la peculiar propiedad de activación por Mg-AMP. Se planteó la hipótesis de que, dado que se trataba de una preparación relativamente purificada y la capacidad de activación por Mg-AMP es una propiedad relativamente específica, la reductasa quinasa podía ser la única proteína que resultara marcada radioactivamente en presencia de 5'-p-[adenina-8-<sup>14</sup>C] fluorosulfonilbenzoiladenosina y que no lo fuera cuando la incubación se llevase a cabo en presencia de Mg-AMP y el análogo radioactivo.

Una alícuota de reductasa quinasa de citosol procedente de la fracción cromatográfica de Ultrogel AcA 34 se incubó en las condiciones descritas en el apartado 2.11. de Métodos, durante 60 minutos. Otra alícuota fue tratada en iguales condiciones, pero con la adición de  $MgCl_2/AMP$  7,5/2,5 mM. Transcurrido el tiempo de incubación las proteínas fueron precipitadas con TCA al 20 % (v/v) y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. Una vez sometido a fijación y tinción de las proteínas, el gel fue tratado según la metodología descrita en 2.9.1., procediéndose a obtener su imagen fluorográfica tras 20 días de exposición a -80°C.

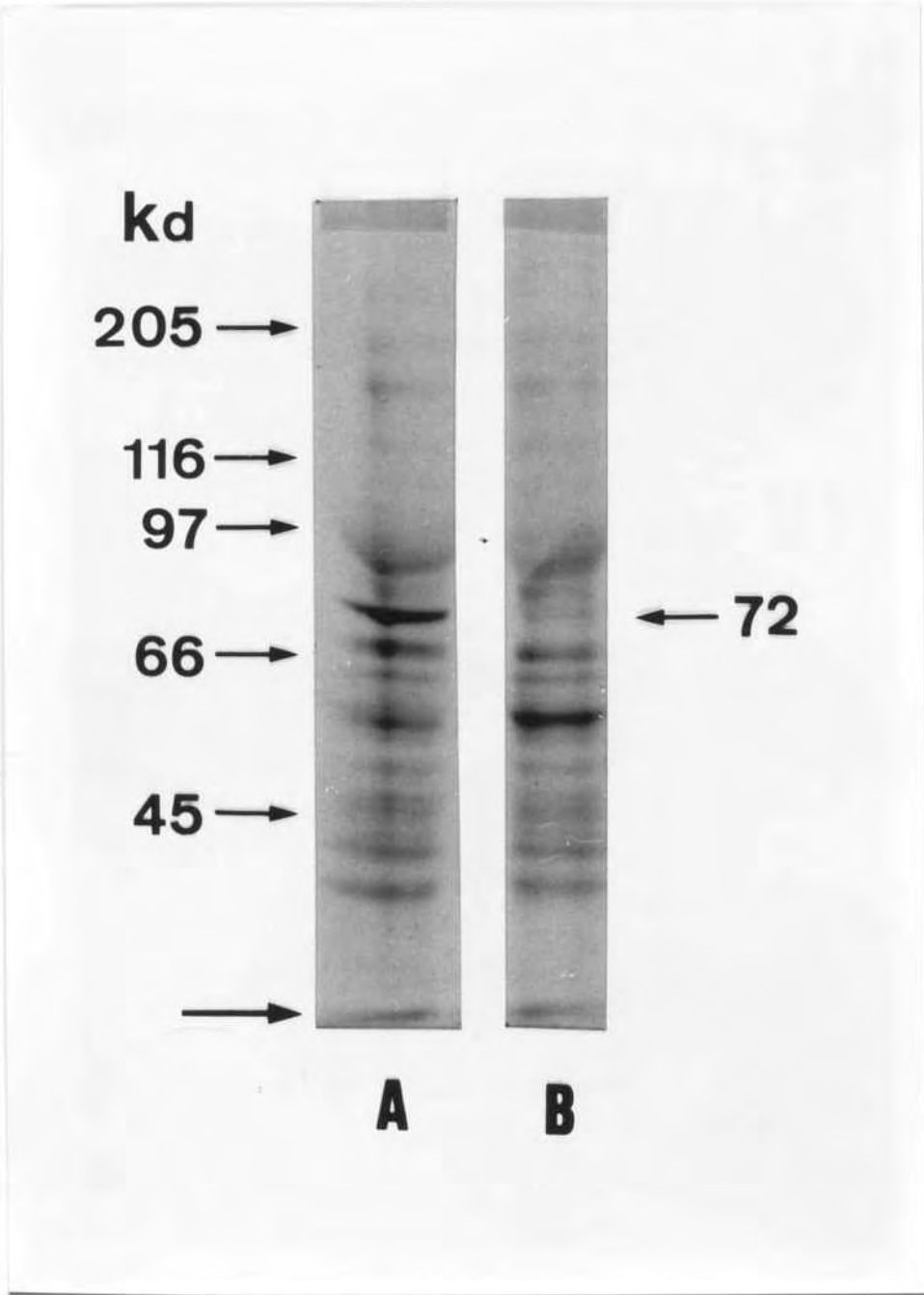
A pesar de que el enlace éster del 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo libre es susceptible de sufrir hidrólisis ácida (340) el 5'-SO<sub>2</sub>BzAdo covalentemente ligado a la proteína es estable frente a la hidrólisis ácida y no resulta afectado por las

FIGURA 50 IDENTIFICACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL POR MARCAJE COVALENTE CON 5'-SO<sub>2</sub>Bz Ado

Dos alícuotas de reductasa quinasa de citosol (350 µg) fueron incubadas a 25°C con 5'-FSO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado 250 µM (45 mCi/mmol) en ausencia (A) y presencia (B) de MgCl<sub>2</sub>/AMP 7,5/2,5 mM, durante 60 minutos.

La reacción se detuvo por precipitación ácida de las proteínas. Los precipitados se analizaron electroforéticamente y se obtuvieron las correspondientes imágenes fluorográficas del gel una vez teñido. Todas las operaciones se desarrollaron según lo descrito en 2.11.

Las cifras laterales indican los pesos moleculares de las proteínas empleadas como patrón. La flecha señala la posición del frente formado por el azul de bromofenol.



condiciones empleadas.

El resultado obtenido se muestra en la figura 50, observándose como de todas las bandas de proteína capaces de reaccionar covalentemente con el análogo radioactivo, solamente una de ellas, de peso molecular aparente 72 Kd, no resulta marcada radioactivamente en presencia de Mg-AMP. De ello se infiere que dicha banda se corresponde con la de la subunidad de la molécula de la reductasa quinasa o cuando menos, con la de alguna de sus subunidades en el caso de que su composición molecular fuese heterogénea.

### 3.17.6. INCORPORACION DE 5'-SO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado A LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL

Alícuotas de reductasa quinasa de citosol fueron incubadas en presencia de 5'-FSO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado durante distintos tiempos, en las condiciones descritas en el apartado 2.11. Transcurridos los distintos tiempos de incubación la reacción se detuvo por precipitación ácida de las proteínas con TCA al 20 % (v/v). Los precipitados proteicos fueron manipulados y analizados tal como se describe en el apartado precedente, con la salvedad de que el gel, una vez desarrollado, no fue teñido.

Las bandas proteicas correspondientes a la HMG-CoA reductasa quinasa, una vez identificadas por comparación con la imagen fluorográfica, fueron recortadas y la radioactividad contenida en ellas, determinada tal como se explica en 2.11.

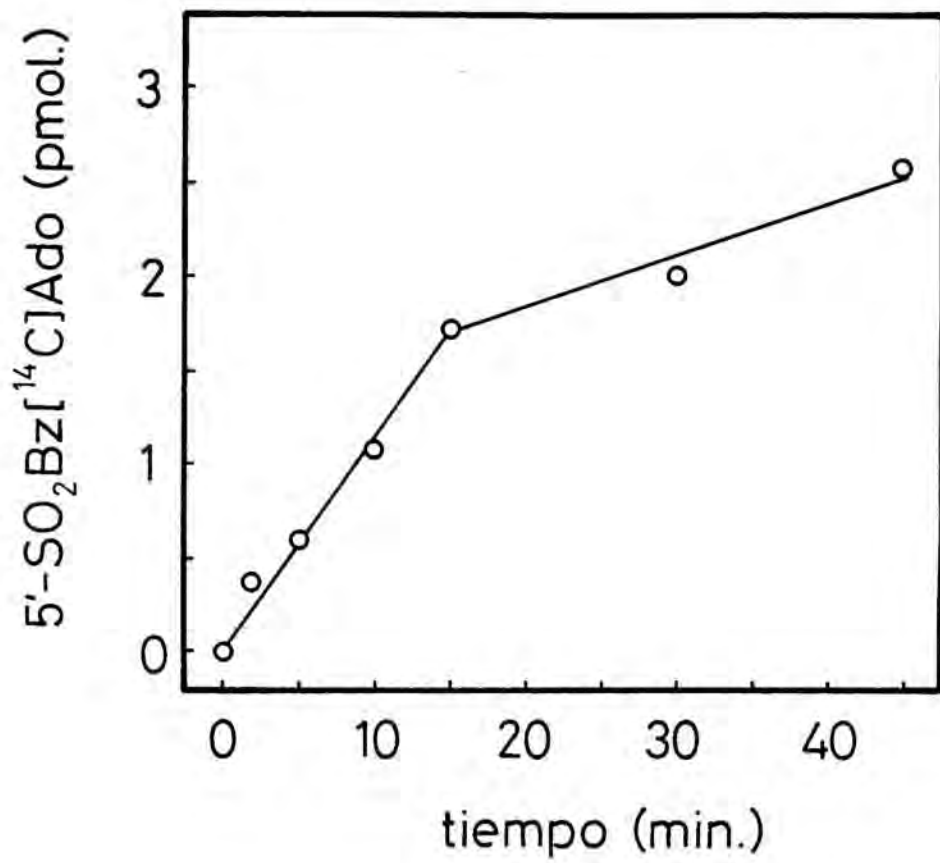
El resultado obtenido se muestra en la figura 51. Al representar los pmoles de 5'-SO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado incorporados en función del tiempo, se obtiene una representación bifásica con una primera etapa en la que se produce una rápida incorporación de radioactividad (pérdida de la capacidad

FIGURA 51 INCORPORACION DE 5'-SO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado A LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL

Alicuotas de reductasa quinasa de citosol (350 µg) fueron incubadas a 25°C con 5'-FSO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado 250 µM (45 mCi/mmol) durante los tiempos indicados en abscisas, en las condiciones descritas en el apartado 2.11.

La reacción se detuvo por precipitación ácida de las proteínas. Estas se analizaron electroforéticamente y se obtuvieron las correspondientes imágenes fluorográficas del gel sin teñir. La radioactividad de los segmentos del gel que contenían la banda de reductasa quinasa se determinó tal como se explica en 2.11.

En la gráfica se representa la radioactividad incorporada, expresada en pmoles de 5'-SO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado, frente al tiempo de incubación.



de activación por AMP), seguida de una segunda fase en que la incorporación de 5'-SO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado se hace más lenta (inactivación total). Se observa pues una buena correlación entre la pérdida de la actividad enzimática y la incorporación a su molécula de 5'-SO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado.



## 4. DISCUSSION

#### 4.1. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE DOS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS DE HIGADO DE RATA

Desde que la actividad reductasa quinasa fue identificada por primera vez en 1973 por Beg y col.(125) en los microsomas y en el citosol de hígado de rata, hasta el momento de inicio de la presente Tesis, no había sido descrito ningún método de purificación de las HMG-CoA reductasa quinasa que rindiese preparaciones con un aceptable grado de pureza. El primer intento en este sentido fue llevado a cabo por Nordstrom y col.(136), quienes a partir de citosol de hígado de rata purificaron, con un bajo rendimiento, una proteína a la que denominaron inactivador de la HMG-CoA reductasa.

Ingebritsen y col.(167) orientaron sus esfuerzos hacia la separación de las actividades reductasa quinasa y reductasa quinasa presentes en el citosol hepático y para ello recurrieron a la cromatografía de intercambio iónico, con lo que indirectamente purificaron parcialmente la reductasa quinasa de citosol.

Tal como se ha planteado previamente, los objetivos perseguidos en el presente trabajo eran básicamente dos. Por un lado, confirmar y profundizar en la medida de lo posible, en el conocimiento del proceso de inactivación por fosforilación covalente de la HMG-CoA

reductasa y por otro, caracterizar a las enzimas que catalizan dicho proceso. Para cumplir tales objetivos era preciso disponer de preparaciones de HMG-CoA reductasa quinasa con el suficiente grado de pureza y de actividad.

Los resultados expuestos previamente demuestran la existencia de dos HMG-CoA reductasa quinasas. La primera de ellas en la fracción citosólica y la segunda en la microsomal, del hígado de rata. El método de purificación de la reductasa quinasa de citosol comprende sucesivas cromatografías en DEAE-celulosa, Affi-Gel Blue, Ultrogel AcA 34, DEAE-celulosa y ATP-hexano-agarosa, detectándose en todos los procesos cromatográficos la existencia de una única forma molecular de peso aparente, determinado por filtración molecular en gel (Ultrogel AcA 34), 210 Kd.

La reductasa quinasa de microsomas se purifica a través de cromatografías en Affi-Gel Blue, DEAE-celulosa, Ultrogel AcA-34 y ATP-hexano-agarosa. La proteína exhibe en todos los casos, como la anterior, una única forma molecular cuyo peso aparente determinado en idénticas condiciones, es de 210 Kd. La reductasa quinasa de microsomas no está asociada al precipitado de glucógeno, puesto que la purificación se inicia a partir de la fracción microsomal previamente desprovista del glucógeno, mediante el proceso de decantación descrito en el capítulo de Métodos. Su origen tampoco es debido a contaminación por restos de citosol o por membranas plasmáticas, dadas las condiciones de trabajo empleadas en la obtención de los sedimentos microsomales (181). Por lo tanto, esta HMG-CoA reductasa quinasa proviene de las membranas que constituyen la fracción microsomal.

La extracción de la reductasa quinasa de las membranas microsomales se efectúa mediante un tratamiento suave, empleando una solución amortiguadora adicional-

da de NaCl 250 mM con la que se realizan lavados sucesivos. Habitualmente, alrededor de un 10 % de la actividad reductasa quinasa permanece asociada a los microsomas de partida. Este porcentaje no disminuye ni aumentando la concentración salina, ni empleando como técnica alternativa la usada para la solubilización de la HMG-CoA reductasa, que se basa en favorecer la actuación de determinadas proteasas al congelar y descongelar los microsomas e incubarlos con solución amortiguadora adicionada de glicerol 50 % (74). Tampoco se altera por la adición u omisión de inhibidores de proteasas al medio de extracción. Estos hechos sugieren que la extracción de la reductasa quinasa de los microsomas no involucra un proceso de proteolisis como en el caso de la reductasa y que la casi totalidad de la enzima de origen microsomal se halla debilmente asociada a las membranas.

La persistencia de una pequeña fracción de actividad reductasa quinasa en los microsomas, ha sido descrita también por Ingebritsen y col.(167). Beg y col. (172) informaron de la total extracción de la reductasa quinasa de microsomas mediante cinco lavados sucesivos con una solución amortiguadora similar a la empleada en nuestro caso. Los autores detectaron la existencia de una segunda actividad reductasa quinasa en los extractos solubles, sensiblemente distinta a la que resultaba ser mayoritaria. De todas formas parece evidente que en el caso de existir esta segunda actividad quinasa, se halla en una proporción notablemente pequeña.

Paralelamente a la realización de este trabajo fue descrito un método de purificación de HMG-CoA reductasa quinasa de microsomas (172), que rendía una preparación aparentemente homogénea. La comparación con la metodología empleada resulta difícil, dado que los autores omiten cualquier referencia a los resultados globales del proceso de purificación, así como la presenta-

ción de resultados relativos a los comportamientos cromatográficos de la proteína. Muy recientemente, Harwood y col.(137) han descrito la purificación de una reductasa quinasa de citosol de hígado de rata. La preparación obtenida no es homogénea. A modo de resumen podemos decir que, junto con los métodos descritos en la presente Memoria, son los únicos trabajos de purificación realizados hasta el momento presente.

Ambas reductasa quinasas son particularmente inestables a la temperatura de 4°C. Este hecho se traduce en la obtención de bajos rendimientos de purificación, recuperándose preparaciones que aunque muy purificadas, presentan una relativamente escasa actividad. Por el contrario, las enzimas aisladas en cualquiera de las etapas del proceso se conservan activas durante varios meses si se mantienen congeladas a -80°C.

Las condiciones de purificación han sido cuidadosamente estudiadas con objeto de mejorar los rendimientos obtenidos y de tener la certeza de que durante el aislamiento de las enzimas, no se produjeran fenómenos proteolíticos o de otro tipo. Así, para la obtención tanto del citosol como de los microsomas, se utilizaron soluciones conteniendo sacarosa 500 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, PPI 3 mM, DTT 5 mM, PMSF 0,5 mM, benzamidina 1 mM y glicerol 10 %, en una proporción de 3 mL de disolución por cada gramo de hígado. Se tuvo además la precaución adicional de incorporar el DTT, el PMSF y la benzamidina, a todas las soluciones amortiguadoras, de manera extemporánea, para garantizar el efecto deseado. Las vesículas lisosomales se eliminaron por centrifugación a 15.000 x g durante 30 minutos, con el fin de evitar toda posible acción de las proteasas de los lisosomas, y los cationes divalentes fueron neutralizados por la adición de EDTA y EGTA.

Como quiera que la reductasa quinasa es una en-

zima que puede resultar inactivada por acción de protefina fosfatasas de microsomas (134,136,139) o de citosol (139,167), era preciso prevenir su actuación durante el proceso de purificación. A tal fin se dispuso la presencia permanente en las disoluciones amortiguadoras de NaF y pirofosfato sódico, que son conocidos inhibidores de fosfatasas. La omisión conjunta o por separado del DTT, el PMSF, del glicerol, de la benzamidina o de los inhibidores de fosfatasas, se traduce en la obtención de rendimientos extraordinariamente bajos, que en la mayoría de las ocasiones impiden completar el proceso de purificación. Idénticas observaciones han sido realizadas por Harwood y col.(137), quienes además aconsejan completar la purificación en el menor tiempo, omitiendo las determinaciones de la actividad reductasa quinasa en las fracciones eluidas de las diferentes cromatografías. Beg y col.(139) destacan también la alta inestabilidad de la reductasa quinasa.

A pesar de las precauciones tomadas, las preparaciones muy purificadas presentan una baja actividad que aconseja emplearlas solamente en experimentos seleccionados, como por ejemplo aquellos encaminados a demostrar la fosforilación de la HMG-CoA reductasa. Los demás experimentos se realizan habitualmente con preparaciones menos purificadas pero más activas. Una vez más hay que poner de manifiesto que ésta es la práctica común empleada por los dos equipos de trabajo que también disponen de preparaciones purificadas de HMG-CoA reductasa quinasa (137,172).

Las reductasa quinasa de citosol y de microsomas exhiben un peso molecular aparente de 210 Kd. Cuando la purificación se realiza sin añadir los inhibidores de proteasas y homogeneizando los hígados con una disolución amortiguadora en la que la concentración de sacarosa se reduce a 100 mM, en la proporción de 2 mL por gramo de



hígado, se observa disminución de la actividad pero el peso molecular no sufre variación alguna.

Existe una cierta discrepancia entre los pesos moleculares obtenidos y los reportados por algunos autores. Nordstrom y col.(136) asignaron al inactivador de citosol un peso molecular superior a 150 Kd, mientras que Kleinsek y col.(83) precisaron más y afirmaron que el inactivador citosólico exhibía un peso molecular de 230 Kd, en clara concordancia con nuestros resultados. Sin embargo, la discrepancia se produce al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Beg y col.(172), puesto que su reductasa quinasa de microsomas muestra un peso molecular de 380 Kd al cromatografiarla en Sepharosa 6B. Sin embargo, Ness y col.(252), reproduciendo la metodología propuesta por los autores anteriores (172), describen un peso molecular de 95-100 Kd para la reductasa quinasa de microsomas, empleando tanto Sepharosa 6B como Sephadex G-200. Igual peso molecular fue asignado a la reductasa quinasa de citosol.

Una posible explicación a la obtención de un peso molecular tan elevado como 380 Kd (172), es la baja fuerza iónica de su solución amortiguadora, en comparación con la empleada por nosotros, lo cual puede favorecer la formación de agregados de formas moleculares de menor peso o el establecimiento de interacciones entre la proteína y la matriz de Sepharosa, obteniéndose pesos moleculares anormalmente elevados. En ambos casos los extractos crudos se obtienen empleando disoluciones amortiguadoras exentas de inhibidores de proteasas y con concentraciones de sacarosa insuficientes para prevenir la fractura de los lisosomas, aunque resulta difícil interpretar en qué medida este hecho puede justificar la obtención de formas moleculares tan distintas. Igual que nosotros, Ness y col.(252) atribuyen idéntico peso molecular a las reductasa quinasas de citosol y microsomas, aunque con la diferencia ya reseñada.

La actividad reductasa quinasa presente en los extractos crudos de hígado de rata está distribuída entre la fracción citosólica y la microsomal. Aproximadamente un 85 % de la actividad total se localiza en el citosol, mientras que un 10 % de la misma se halla asociada a la fracción microsomal. Estas observaciones inducen a pensar que la HMG-CoA reductasa quinasa hepática es una enzima mayoritariamente citosólica, como también sugieren otros autores (167). Por el momento se desconoce la naturaleza exacta de las fuerzas que la mantienen asociada a las membranas, aunque se acepta que son de naturaleza débil.

La definición de una actividad enzimática como de proteína quinasa presupone la demostración de que dicha enzima es capaz de incorporar grupos fosfato a la proteína sustrato, a partir de ATP. En el caso concreto de la HMG-CoA reductasa, ha sido y continua siendo motivo de discusión, su carácter de proteína fosforilable por las reductasa quinasas y si el nivel de la fosforilación resulta significativo.

Ambas reductasa quinasas una vez purificadas, muestran su capacidad para fosforilar e inactivar, de manera específica, a la HMG-CoA reductasa homogénea. En ambos casos la reacción es dependiente del tiempo de incubación. La estequiometría de la fosforilación es de 0,8 moles de fosfato por mol de subunidad de HMG-CoA reductasa (55 Kd), tanto si se realiza con reductasa quinasa de microsomas como de citosol y la reductasa se inactiva simultáneamente hasta un 20 % de la actividad inicial. Cabe pensar que la incorporación de fosfato puede ser incluso algo mayor, si aceptamos la hipótesis de que alrededor de un 20 % de las moléculas de HMG-CoA reductasa son refractarias a la inactivación, mientras que el 80 % restante se inactivan en su totalidad (134).

Estos resultados mejoran los obtenidos por



Keith y col.(153), quienes fosforilaron HMG-CoA reductasa en los microsomas con una estequiometría muy variable, comprendida entre 0,25 y 1 moles de fosfato incorporados por mol de subunidad de 52 Kd. Font y col.(159) fosforilando reductasa con la(s) quinasa(s) de microsomas existente en los extractos solubles, informaron de una incorporación máxima no superior a 0,3 moles de fosfato.

Resultados comparables a los obtenidos, fueron presentados por Beg y col.(172) empleando reductasa quinasa de microsomas purificada. La reductasa homogénea fue fosforilada con alrededor de 0,9 moles de fosfato por mol de subunidad de reductasa. Aparentemente la estequiometría de fosforilación de la reductasa en su forma nativa (90-100 Kd) no es superior (162), no siendo éste un fenómeno difícil de comprender puesto que el fragmento hidrofóbico de la reductasa se encuentra en su mayor parte integrado en la membrana de los microsomas (47,57), siendo poco accesible a las reductasa quinasas. No obstante, no había que descartar la posibilidad de un incremento en el número de fosfatos incorporados, puesto que la estructura espacial de la porción hidrofílica de la reductasa nativa, con toda probabilidad, es distinta a la del fragmento soluble. Buena prueba de ello es la dificultad existente para inactivar a la reductasa soluble en comparación con la forma nativa (76).

Absolutamente originales son los resultados de fosforilación de la reductasa, empleando reductasa quinasa de citosol, pues Harwood y col.(137) tan sólo demuestran la actividad quinasa de su preparación de citosol, empleando albúmina como único sustrato proteico.

Algunos autores (82,255) han informado de la incapacidad de incorporar  $^{32}\text{P}$  a partir de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  a la reductasa homogénea, sugiriendo incluso que en los experimentos en donde se demuestra este hecho, es una protei-

na contaminante de las preparaciones de reductasa la que se fosforila realmente. Su argumentación se fundamenta en la relativamente baja actividad específica de las preparaciones de HMG-CoA reductasa empleadas. En el presente trabajo hemos utilizado HMG-CoA reductasa completamente exenta de proteínas contaminantes, con una elevada actividad específica (12,500 U/mg) y se ha comprobado que la proteína fosforilada específicamente es la HMG-CoA reductasa de 55 Kd.

La imposibilidad de demostrar la fosforilación puede deberse con toda probabilidad al empleo de [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP de muy baja radioactividad específica (90 cpm/pmol) (255). Asimismo, la concentración de HMG-CoA reductasa, sensiblemente inferior a la  $K_M$  de las reductasa quinasa para este sustrato y la temperatura de ensayo (25°C), pueden justificar la reducida o nula actividad de la reductasa quinasa.

Una vez demostrada la fosforilación de la HMG-CoA reductasa era preciso poner de manifiesto su carácter reversible. Al incubar HMG-CoA reductasa fosforilada independientemente con ambas reductasa quinasa, con HMG-CoA reductasa fosfatasa II de citosol de hígado de rata (202), se produce la liberación de más de un 80 % del fosfato incorporado, restaurándose completamente la actividad inicial. En todo el proceso se observa una correlación entre el estado de fosforilación de la reductasa y su actividad.

Así pues, disponemos de dos preparaciones de HMG-CoA reductasa quinasa, de microsomas y de citosol de hígado de rata, capaces de inactivar y fosforilar de manera reversible a la HMG-CoA reductasa, con una estequiometría cuantitativamente significativa.

#### 4.2. HMG-CoA REDUCTASA QUINASA Y MEVALONATO QUINASA

Algunos autores (252,253) comunicaron que la actividad reductasa quinasa no existía como tal, sino que su observación era consecuencia de la conversión del mevalonato en 5-fosfomevalonato, por acción de la enzima mevalonato quinasa. La disminución de la actividad reductasa no sería debida a inactivación por fosforilación, sino a una cuantificación por defecto del mevalonato radioactivo producido por la HMG-CoA reductasa.

Sin duda, la mejor evidencia de la existencia real de la reductasa quinasa es la fosforilación de la HMG-CoA reductasa a partir de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. Sin embargo, con objeto de averiguar si en alguna de nuestras preparaciones se hallaba presente también la enzima mevalonato quinasa, se procedió a medir su actividad empleando un método específico. A excepción del citosol, ninguna otra fracción manifiesta tal actividad. La mevalonato quinasa citosólica se separa de la reductasa quinasa en la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, puesto que la primera se excluye, mientras que la segunda queda retenida en la columna. Esta es la razón que aconseja emplear esta cromatografía como primera etapa de purificación de la reductasa quinasa de citosol, puesto que ambas actividades coeluyen en cromatografía de afinidad en Affi-Gel Blue (250,252).

La mevalonato quinasa es eminentemente citosólica (239), por lo tanto aún cuando ambas actividades se separan durante el proceso de purificación, en la fracción citosólica coexisten. Con objeto de averiguar si las determinaciones de actividad reductasa quinasa en el citosol se veían afectadas por la mevalonato quinasa, se midió dicha actividad en las condiciones de ensayo existentes en la determinación de la actividad reductasa residual. En nuestras condiciones se expresa menos del 1% de la actividad mevalonato quinasa. Ello se debe a factores como la elevada concentración de EDTA, 45 mM (250), la existencia de una relación ATP/MgCl<sub>2</sub> de 0,13, cuando la relación óptima para la mevalonato quinasa es 1,5-2 (342) y finalmente, la presencia de una concentración de catión magnesio libre superior a 4 mM. Estas condiciones, aún en ausencia de EDTA, son suficientes para inhibir a la mevalonato quinasa (250).

Así pues, nuestras preparaciones contienen exclusivamente reductasa quinasa y aún en las muestras donde ambas actividades coexisten, la mevalonato quinasa no puede expresar su actividad y por lo tanto, no interfiere en las determinaciones de la actividad reductasa quinasa.

#### 4.3. PROPIEDADES CINÉTICAS DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Se ha determinado el pH óptimo de ambas reductasa quinasas actuando sobre la HMG-CoA reductasa como sustrato. El pH óptimo se halla en la zona neutra puesto que para ambas enzimas resulta ser 7,5. La actividad de las dos preparaciones se ve considerablemente disminuída cuando el pH del medio es inferior a 7,0 o superior a 8,5 por lo que podemos concluir que los requerimientos de pH de las HMG-CoA reductasa quinasas son bastante estrictos.

La puesta a punto de nuestras condiciones de ensayo aconsejó determinar la concentración óptima de  $MgCl_2$ . La actividad reductasa quinasa de ambas preparaciones resultó ser máxima cuando la concentración de  $MgCl_2$  fue de 15,6 mM. El comportamiento de las dos enzimas frente a las diferentes condiciones ensayadas es totalmente idéntico, viéndose un incremento progresivo de la actividad hasta alcanzar un valor máximo a la concentración señalada, para después disminuir lentamente hasta un 70-75 % de la actividad máxima cuando la concentración de  $MgCl_2$  es de 62,5 mM.

Los valores de  $K_M$  calculados para ambas enzimas, con respecto al sustrato HMG-CoA reductasa son, para la quinasa de citosol 204 U/mL y para la de microsomo-



mas 244 U/mL. Semejantes resultados no han sido comunicados previamente para la reductasa quinasa de microsomas, mientras que estudiando la quinasa de citosol, se ha informado de que 885 miliunidades de HMG-CoA reductasa proporcionan una velocidad de la reacción catalizada por la reductasa quinasa que es la mitad de la máxima (137).

Aparentemente los valores de  $K_M$  se pueden considerar elevados, indicando que la afinidad por la HMG-CoA reductasa soluble no es excesivamente alta. Este dato concuerda con observaciones precedentes acerca de la menor sensibilidad de la reductasa soluble frente a la inactivación (136,137). Habitualmente la actividad de la reductasa quinasa sobre la reductasa soluble es el 4-6 % de la actividad exhibida sobre la reductasa en microsomas.

Siguiendo con la línea de trabajo encaminada a la caracterización de las reductasa quinasa, se determinaron las  $K_M$  de ambas enzimas para el sustrato ATP, estableciéndose unos valores para la reductasa quinasa de citosol de 360  $\mu\text{M}$  y para la reductasa quinasa de microsomas de 330  $\mu\text{M}$ . Resulta evidente la similitud entre ambos valores. Brown y col.(134) comunicaron que la  $K_M$  de la reductasa quinasa de fibroblastos humanos oscilaba alrededor de 400  $\mu\text{M}$ , empleando reductasa en microsomas como sustrato proteico, mientras que Bové y Hegardt (138) informaron de que el valor de la  $K_M$  para la reductasa quinasa de microsomas de hígado de rata, empleando también reductasa en microsomas, era de 1,2 mM. Muy recientemente Harwood y col.(137) han descrito una  $K_M$  de 140  $\mu\text{M}$  para la reductasa quinasa de citosol, aunque en este caso emplearon como sustrato proteico HMG-CoA reductasa soluble. En general y teniendo en cuenta las diferentes condiciones de las preparaciones enzimáticas empleadas, se observa una relativa concordancia entre los diferentes valores obtenidos.

#### 4.4. INACTIVACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA POR LA ACCION COMBINADA DE LAS REDUCTASA QUINASAS

Está generalmente aceptado que la HMG-CoA reductasa en su forma soluble se inactiva con más dificultad que la reductasa en microsomas. Nuestras observaciones, como ya se ha expuesto, señalan la imposibilidad de inactivar a la reductasa soluble por debajo del 20-25 % de la actividad inicial, independientemente de la reductasa quinasa empleada.

Los resultados obtenidos al intentar aumentar el porcentaje de inactivación de la reductasa previamente inactivada, añadiendo una cantidad adicional de reductasa quinasa procedente de la misma fracción hepática o de la complementaria, indican que la HMG-CoA reductasa no es susceptible de ser inactivada en mayor grado. En todos los casos se añadieron los nucleótidos necesarios para la reacción de inactivación, en cantidades suficientes para restablecer las condiciones iniciales. Esta precaución descarta la posibilidad de que el efecto sea debido al agotamiento del ATP en el medio de reacción, durante la primera inactivación.

Los resultados permiten asegurar que, independientemente de que ambas reductasa quinasa sean o no la

misma enzima, el fenómeno observado tampoco se debe a la inactivación de las reductasa quinasas durante la incubación a 37°C. En ningún caso una cantidad adicional de cualquiera de ambas enzimas aumenta significativamente la extensión de la reacción de inactivación. Por otra parte, si aceptamos la hipótesis de que se trata de enzimas diferentes, los resultados indican que ambas reductasa quinasas son capaces de inactivar en igual extensión a la HMG-CoA reductasa, no existiendo evidencias de que actúen separadamente, de manera distinta o aditiva. Además la presencia simultánea de las dos reductasa quinasas no incrementa ni la velocidad ni la extensión de la inactivación de la reductasa.

Consecuentemente, la imposibilidad de inactivar a la reductasa por debajo de un cierto valor, parece deberse a alguna causa inherente al propio sustrato, cuya auténtica naturaleza es desconocida por el momento. Es posible que la presencia de las membranas microsomales actúe aumentando la susceptibilidad de la enzima a la inactivación, al inducir determinados cambios conformacionales en la molécula. Otra posibilidad a considerar es que durante el proceso de proteólisis que permite la solubilización de la reductasa, se genere una pequeña población de moléculas desprovistas de la secuencia de aminoácidos que contiene los centros de fosforilación. Esta última hipótesis concuerda con la observación hecha por Kennelly y col.(76) acerca de la análoga capacidad de inactivación presentada por la reductasa nativa solubilizada con detergentes y la reductasa en microsomas.

En cualquier caso parece claro que el efecto no es atribuible a una inactivación de las reductasa quinasas durante la incubación. Ambas proteína quinasas actúan aparentemente sobre los mismos centros de la molécula de HMG-CoA reductasa, independientemente de su posible identidad o diferencia.



#### 4.5. FOSFORILACION MULTIPLE DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Los estudios estructurales relativos a los centros que se fosforilan durante la inactivación de la HMG-CoA reductasa se ven dificultados por tres factores fundamentales: La pequeña cantidad de proteína HMG-CoA reductasa presente en los diferentes tejidos y por tanto también en el hígado, la existencia en las membranas microsomales de numerosas proteínas fosforilables además de la propia reductasa, y la presencia de reductasa quinasa y reductasa fosfatasa microsomales (181,203), que con facilidad pueden alterar el contenido de fosfato de la proteína.

Los únicos intentos previos de caracterización del número de centros fosforilables en la molécula de la HMG-CoA reductasa, han sido llevados a cabo inactivando y fosforilando la reductasa con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en los mismos microsomas (160) o bien en sus extractos solubles (159), purificando posteriormente la reductasa fosforilada hasta homogeneidad y analizándola. El empleo de esta metodología, obligado al no disponer de preparaciones purificadas de HMG-CoA reductasa quinasa, no permite asegurar que la fosforilación de la reductasa se lleve a cabo por una proteína quinasa concreta y única, dada la complejidad del sistema microsomal. Por otra parte, durante la purificación posterior de la reductasa puede variar

su contenido en fosfato. Así, Keith y col.(160) obtienen preparaciones de reductasa fosforilada, cuyas actividades específicas varían hasta tres veces entre los diferentes experimentos. Anteriormente estos autores (153) comunicaron la existencia de variaciones considerables del estado de inactivación de la reductasa durante su purificación, así como incorporaciones de fosfato con un margen de variación de hasta cuatro veces. En esta misma línea Font y col.(159) obtuvieron preparaciones de HMG-CoA reductasa que, aunque inactivadas hasta un 16 %, presentaban una incorporación máxima de 0,3 moles de fosfato por mol de subunidad de reductasa.

Por todo lo dicho, nuestras condiciones experimentales resultaban especialmente favorables para establecer con exactitud el número de centros de fosforilación de la reductasa, puesto que evitábamos los factores mencionados. Asimismo, nunca antes habían sido presentados resultados de estudios análogos sobre HMG-CoA reductasa fosforilada con reductasa quinasa de citosol. Cabe destacar el empleo para la detección de los fosfopéptidos de una técnica más sensible que la empleada anteriormente (159), como es la de autorradiografía indirecta, lo que permite además, trabajar con cantidades más reducidas de reductasa fosforilada.

En nuestras condiciones de fosforilación se observa la existencia de únicamente dos fosfopéptidos trípticos, denominados I y III, de muy reducido peso molecular. Cuando la digestión tríptica se realiza en ausencia de urea 2 M, el número de fosfopéptidos se incrementa a cuatro. Ello sugiere que la molécula de HMG-CoA reductasa es altamente resistente a la tripsina, debiendo ser previamente desnaturalizada antes de ser digerida, puesto que el patrón resultante es completamente distinto. En ambas condiciones, el patrón tríptico obtenido es constante aún prolongando el tiempo de tratamiento con la protea-

sa hasta diez días.

Resulta interesante el hecho de que el patrón triptico obtenido es el mismo tanto si la reductasa es fosforilada por la reductasa quinasa de citosol o de microsomas. Ello confirma nuestra hipótesis previa de que ambas reductasa quinasas actúan fosforilando los mismos centros en la molécula de reductasa.

En todas las ocasiones el péptido de mayor peso molecular aparente (III), contiene entre 2,5 y 3 veces más fosfato que el péptido I, independientemente de la quinasa empleada en la fosforilación. Este resultado concuerda con observaciones de Keith y col.(160) empleando preparaciones enzimáticas microsomales.

Nuestros resultados establecen definitivamente que la HMG-CoA reductasa fosforilada separadamente por nuestras reductasa quinasas hasta 0,8 moles de fosfato y sometida a digestión exhaustiva con tripsina, presenta dos fosfopéptidos estructuralmente distintos. En ambos casos el fosfato está covalentemente ligado a residuos de serina.

Algunos autores (176), en base a sus propias observaciones y a las de otros grupos (150,177), sugieren una diferente función de ambos centros, puesto que la reductasa fosforilada puede ser reactivada en su totalidad liberándose tan sólo la mitad del  $^{32}\text{P}$  incorporado. Nuestros propios resultados, así como otros obtenidos en nuestro laboratorio (180,181,156), no parecen apoyar esta hipótesis puesto que la reactivación de la reductasa se acompaña de la liberación de más del 80 % del fosfato.

Más difícil de interpretar, en base a los resultados disponibles hasta el momento, es la distribu-

ción de aproximadamente un mol de fosfato entre dos centros de fosforilación estructuralmente distintos. Se observa con frecuencia que la purificación de la HMG-CoA reductasa solubilizada por congelación y descongelación, produce dos polipéptidos con una diferencia de peso molecular comprendida entre 1.000 y 2.000 daltons. La detección de más de un fosfopéptido tríptico podría ser el reflejo de una cierta heterogeneidad de la preparación original de HMG-CoA reductasa. Así por ejemplo, en el supuesto de existir un único centro de fosforilación próximo al extremo carboxilo o amino terminal, la aparición de más de un fosfopéptido podría reflejar la existencia de más de un extremo carboxilo o amino terminal, en lugar de la existencia de varios centros de fosforilación. Tal hipótesis puede ser tenida en cuenta, si bien es cierto que en la actualidad no se dispone de evidencias sólidas que la sostengan. Así por ejemplo, los fosfopéptidos trípticos son considerablemente pequeños; se aísla un único fosfopéptido cuando la enzima se digiere con bromuro de cianógeno (159) y no se observa la mencionada heterogeneidad de la HMG-CoA reductasa cuando la enzima fosforilada se analiza electroforéticamente. En cualquier caso lo anterior no afecta a la observación de que ambas reductasa quinasas actúan de manera idéntica cuando fosforilan a la HMG-CoA reductasa.

#### 4.6. ACTIVACION DE LAS REDUCTASA QUINASAS POR NUCLEOTIDOS

Desde hace varios años ha existido una cierta controversia sobre la posible dependencia de AMPc de las reductasa quinasas, aún cuando actualmente parece prevalecer la idea de que ambas enzimas son independientes de nucleótidos cíclicos (136-138,167,172). Asimismo, la proteína quinasa dependiente de AMPc no puede inactivar a la HMG-CoA reductasa (136,170).

Nuestros resultados confirman que la actividad de ninguna de nuestras preparaciones es dependiente del nucleótido cíclico.

Brown y col.(134) y Nordstrom y col.(136) fueron quienes, empleando extractos de fibroblastos humanos y reductasa quinasa en microsomas o de citosol parcialmente purificada, respectivamente, comunicaron por primera vez que la inactivación de la reductasa era absolutamente dependiente de ADP.

El interés de tales observaciones aconsejó emprender el estudio del fenómeno pero empleando las preparaciones purificadas de reductasa quinasa y utilizando como sustrato HMG-CoA reductasa homogénea, en lugar de reductasa en microsomas.



Previamente se tomaron una serie de precauciones en la preparación y manejo de las soluciones de nucleótidos, puesto que es bien conocida su tendencia a experimentar hidrólisis espontánea de los enlaces anhídrido que unen entre sí a los diferentes grupos fosfato. Este proceso se acelera cuando se hallan en disolución y cuando ésta se somete a repetidos procesos de congelación y descongelación. En concreto, nunca se emplearon soluciones de tales nucleótidos descongeladas previamente y en el caso del ADP, dada su especial facilidad para escindirse en AMP y Pi, se emplearon siempre soluciones extemporáneas. Estas precauciones garantizaron, como se explica en Métodos, la homogeneidad de nuestras preparaciones de nucleótidos.

Ambas reductasa quinasas son activadas entre 5 y 6 veces en presencia de concentraciones saturantes de ADP y de AMP, ninguno de los cuales puede actuar a su vez como donador de radicales fosforilo en la reacción de inactivación. Además, a diferencia de observaciones previas (134,136,137), ambas reductasa quinasas son activas en presencia de ATP sólo. La obtención de análogos resultados en presencia de  $Ap_5A$ , que actúa como inhibidor de la adenilato quinasa (338), garantiza que los efectos observados en cada caso, son debidos única y exclusivamente al nucleótido añadido y no a productos derivados de su posible transformación enzimática. La enzima adenilato quinasa está presente en la fracción microsomal y actúa interconvirtiendo los diferentes nucleósidos fosfato (134, 182).

Hay que poner de manifiesto que es la primera vez que se demuestra que las HMG-CoA reductasa quinasas pueden ser activadas por AMP, puesto que nunca antes el nucleósido monofosfato en cuestión había sido estudiado como posible activador. Tan sólo se había estudiado su posible función como sustrato de las HMG-CoA reductasa

quinasas (134,136,137). Únicamente Beg y col. en 1973 (125) investigaron su efecto sobre la velocidad de síntesis de esteroides y la actividad reductasa, en homogenados hepáticos, no observando variación alguna de ambos parámetros, a diferencia de lo ocurrido en presencia de AMPc.

La lógica duda respecto a la auténtica capacidad del ADP como activador fue desvelada al calcular las constantes de activación del ADP y del AMP. Las constantes de activación para el ADP son  $420 \mu\text{M}$  y  $431 \mu\text{M}$  para las reductasa quinasas de citosol y de microsomas respectivamente. Este experimento se realizó con soluciones extemporáneas de ADP y a tiempos de ensayo relativamente cortos, previniéndose la producción de AMP. Así pues, hemos confirmado la capacidad activadora del ADP sobre la reductasa quinasa de citosol, notándose que la constante de activación resulta ser 3,3 veces inferior a la descrita por Harwood y col.(137), y hemos demostrado que tal efecto activador se produce también sobre la reductasa quinasa de microsomas, siendo la constante de activación muy similar.

Las constantes de activación para el AMP son respectivamente, para las quinasas de citosol y de microsomas,  $20 \mu\text{M}$  y  $17,2 \mu\text{M}$ . De tales resultados se deduce que el AMP es un activador mucho más potente que el ADP, puesto que sus constantes de activación para las dos quinasas son alrededor de 20 veces más bajas; las velocidades máximas de las reacciones catalizadas por las dos enzimas, en presencia de concentraciones saturantes de los activadores por separado, son iguales.

La distinta potencia activadora de ambos nucleótidos se pone de manifiesto una vez más al analizar las velocidades y los perfiles de inactivación y fosforilación de la HMG-CoA reductasa, en presencia de una concentración  $100 \mu\text{M}$  de los activadores, comparándolos con

los resultados obtenidos en presencia de ATP sólo. Se eligió esta concentración de los activadores para poner de manifiesto su diferente capacidad, ya que es saturante para el AMP al estar cinco veces por encima de su  $K_a$  y subsaturante para el ADP, puesto que es alrededor de cuatro veces inferior a su  $K_a$ . Las velocidades iniciales de inactivación y de fosforilación de la HMG-CoA reductasa son alrededor de 5 a 6 veces y 1,5 a 2 veces mayores, respectivamente, en presencia de AMP y ADP, con respecto a la velocidad en presencia de ATP sólo.

Queda pues claramente establecido que la diferente capacidad activadora de ambos nucleótidos se manifiesta no sólo sobre la velocidad de inactivación de la HMG-CoA reductasa, sino también y en perfecta correlación, sobre la velocidad de fosforilación. En un trabajo paralelo Harwood y col.(137) ponen de manifiesto la capacidad activadora del ADP sobre la reductasa quinasa de citosol, empleando albúmina como sustrato proteico de la reductasa quinasa.

Las numerosas evidencias aportadas permiten afirmar que las reductasa quinasa son enzimas activables y no dependientes de nucleótidos, como afirman Harwood y col., siendo el AMP su principal activador.

A excepción de la información previa suministrada por Nordstrom y col.(136), tal dependencia de nucleótidos no ha sido descrita ni en la reductasa quinasa de microsomas de hígado de rata (167,172), ni en la de microsomas de diferentes especies de vertebrados (148). A nuestro juicio parece poco probable pensar que dichos autores manejan proteínas diferentes, aunque en el caso concreto de Beg y col.(172) el peso molecular de la reductasa quinasa de microsomas difiere sensiblemente del de nuestra preparación. Otra posibilidad a considerar es la no detección del fenómeno al emplear preparaciones de ATP con-



taminadas con nucleósidos mono y difosfato, dadas las concentraciones de activador requeridas y las concentraciones de ATP usadas habitualmente.

El estudio de la capacidad de otros nucleósidos difosfato para sustituir al ADP en sus funciones activadoras, pone de manifiesto que los otros dos nucleótidos derivados de purinas, GDP e IDP, son absolutamente incapaces de estimular la actividad de ambas quinasas, mientras que UDP y CDP, ambos derivados de pirimidinas, activan alrededor de 2,5 veces a ambas quinasas. El requerimiento para los nucleósidos difosfato parece exhibir una relativamente baja especificidad de reconocimiento.

Un estudio análogo empleando diversos nucleósidos monofosfato revela que la especificidad de reconocimiento es muy alta, puesto que ninguno de los nucleósidos monofosfato derivados de purinas o pirimidinas muestra la menor capacidad activadora sobre ninguna de las dos reductasa quinasas.

En un intento de conocer mejor los requerimientos estructurales del principal activador de las reductasa quinasas, estudiamos la capacidad activadora de algunos isómeros del AMP así como de otros compuestos relacionados estructuralmente, al contener determinados fragmentos de su molécula. Así, la presencia de un grupo fosfato esterificado en la posición 5' de la ribosa es una característica determinante de la molécula activadora. Su ausencia anula la capacidad activadora de la molécula resultante, en este caso la adenosina. La esterificación del grupo fosfato en una posición distinta, como en el caso del 2'-AMP y del 3'-AMP, también anula la capacidad de inactivación. La alteración del fosfato esterificado en 5' al formar un enlace fosfodiéster, se traduce en la obtención de una molécula inactiva, como es el AMP cíclico, mientras que la formación de un enlace anhídrido, rindiendo

5'-ADP, disminuye la actividad como se deduce de la comparación de las respectivas constantes de activación. El  $\text{NADP}^+$  carece de propiedades activadoras debido al impedimento estérico que supone la voluminosa estructura unida al fosfato en 5'.

La presencia de la base nitrogenada también es una característica absolutamente imprescindible de la molécula activadora, como se demuestra por el hecho de que la ribosa-5-fosfato es totalmente inerte. Concretamente, la adenosina, la ribosa-5-fosfato y el  $\text{NADP}^+$  ejercen una ligera acción inhibitoria. Una modificación en la posición 2', como en el caso del 2'-dAMP disminuye, aunque no anula la capacidad activadora.

Los datos presentados indican que los requerimientos estructurales del activador 5'-AMP son altamente específicos, siendo absolutamente decisiva la existencia de un grupo fosfato en la posición 5' de la ribosa. Asimismo, es imprescindible la estructura de la adenosina. Estas exigencias estructurales se ponen de manifiesto por igual sobre las dos HMG-CoA reductasa quinasas estudiadas.

Por lo que respecta a la especificidad mostrada por las reductasa quinasas hacia los nucleósidos trifosfato que pueden actuar como sustrato, se aprecia que el GTP es el único que puede servir como dador alternativo de grupos fosfato, aunque con menor eficacia que el ATP, puesto que la velocidad de reacción disminuye entre 2 y 3 veces con las dos quinasas. Los tres nucleótidos restantes (UTP, CTP e ITP) no son capaces de sustituir al ATP.

La diferente especificidad de reconocimiento mostrada por las reductasa quinasas hacia los nucleótidos que actúan como sustrato, con respecto a los nucleótidos activadores, sugiere que ambos tipos de compuestos se li-

gan a centros diferentes de las enzimas. Así por ejemplo, mientras el GTP puede sustituir al ATP, ni el GMP ni el GDP pueden sustituir al AMP y al ADP, respectivamente. La hipótesis viene reforzada por el hecho de que, puesto que ninguno de los activadores puede ejercer funciones como donador de fosfato, en caso de unirse al mismo centro que los nucleósidos trifosfato, deberían provocar un efecto inactivador más que activador, lo cual no se produce.

#### 4.7. CARACTER ALOSTERICICO DE LA ACTIVACION POR NUCLEOTIDOS DE LAS REDUCTASA QUINASAS

Los resultados comentados en el apartado anterior relativos a la diferente especificidad de reconocimiento mostrada por ambas quinasas con respecto a los nucleótidos, en función de su carácter de sustrato o de activador, permiten proponer un mecanismo de activación de tipo alostérico. Sin embargo, la confirmación de tal hipótesis se ha obtenido al estudiar el proceso de inactivación de las reductasa quinasas, dependiente del tiempo, con el análogo de los nucleótidos de adenina 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl-adenosina. Asimismo se ha establecido la función de los centros que reaccionan con el análogo, analizando los patrones de inactivación en presencia del sustrato y los activadores. Un estudio similar ha confirmado el carácter alostérico de la activación por ADP de la isocitrato deshidrogenasa de corazón de cerdo (318), empleando como análogo reactivo el compuesto 6-(4-bromo-2,3-dioxobutil)tioadenosina-5'-difosfato.

La metodología de trabajo seguida es similar a la empleada previamente por Huang y Colman (318), pero empleando como análogo de nucleótidos de adenina el compuesto 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo. Se ha seleccionado este compuesto puesto que, como se ha comentado en la Introducción del presente trabajo, presenta ventajas importantes en cuanto a

la especificidad de su reacción con las proteínas, en comparación con otros análogos de estructura más compleja (303), menos próxima a los nucleótidos de adenina (301) o excesivamente reactivos (302,304,305). También resulta apreciable la sencillez del proceso de síntesis así como la facilidad de su manejo (312).

Con anterioridad al inicio del estudio propuesto, fue preciso poner a punto las condiciones en que se iba a desarrollar. Dada la hidrofobicidad del 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo es preciso incorporarlo al medio de reacción disuelto en un disolvente orgánico miscible en agua. El disolvente orgánico empleado fue la N,N'-dimetilformamida, puesto que con él es posible preparar soluciones más concentradas del análogo que con etanol (340). La máxima concentración de dicho disolvente que no afecta significativamente a la actividad de ambas reductasa quinasa es del 5 % (v/v). Otras enzimas como la piruvato quinasa o la fosfofructoquinasa de músculo de conejo admiten concentraciones de hasta un 15 % de DMF (312,343), mientras que la hexoquinasa de levadura se inactiva con la sola presencia de un 1 % de DMF (312). La concentración seleccionada para realizar los sucesivos experimentos fue 250 μM 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, puesto que en 30 minutos se conseguía inactivar a la reductasa quinasa de citosol hasta un 12 % de la actividad inicial, sin aparentes dificultades derivadas de la solubilidad del compuesto. Asimismo se comprobó que la reductasa quinasa de citosol resultaba efectivamente inactivada por 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo.

Cuando se incuban ambas reductasa quinasa con 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, los perfiles de inactivación en función del tiempo son bifásicos. Se observa una rápida pérdida de actividad hasta aproximadamente un 20-25 % de la actividad inicial, seguida de una inactivación mucho más lenta, cuando la actividad enzimática se mide en presencia del activador AMP. Si la actividad se mide en ausencia del



activador, se obtiene una inactivación de tipo monofásico cuyo perfil coincide con el de la segunda fase de la inactivación observada en las condiciones descritas en primer lugar.

Las evidencias sugieren que el 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo reacciona por lo menos en dos sitios diferentes de la molécula de las reductasa quinasas. Se observa una rápida pérdida de la capacidad de las enzimas para ser activadas por AMP y una pérdida mucho más lenta de la actividad enzimática, independientemente de la presencia o ausencia del activador en el ensayo, a la que llamamos inactivación total. El hecho de que las constantes de velocidad calculadas para ambas fases de la inactivación (pérdida de la capacidad de activación por AMP e inactivación total) sean muy diferentes, sugiere que efectivamente el 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo reacciona en dos centros de la molécula. Concretamente, la velocidad de pérdida de la capacidad de activación, definida por  $K_1$ , es alrededor de once veces mayor que la velocidad de inactivación total, definida por  $K_2$ . Los dos centros reactivos en cuestión, parecen mostrar diferentes afinidades por el análogo, así como cumplir misiones distintas en la función de las enzimas.

Con objeto de confirmar la reacción del 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo en dos centros diferentes de la molécula de las reductasa quinasas y averiguar la función ejercida por ellos, procedimos a estudiar los patrones de protección frente a la inactivación por 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, proporcionados por los sustratos y los activadores de las reductasa quinasas.

Por lo que hace referencia al sustrato no proteico de las reductasa quinasas, se observa que el ATP por sí sólo a una concentración 2,5 mM no proporciona ningún tipo de protección sobre las dos fases de la inac-

tivación, puesto que las constantes  $K_1$  y  $K_2$  son iguales a las calculadas en ausencia del nucleótido. Ambas reductasa quinasas se comportan de igual forma.

El catión magnesio, necesario para que tenga lugar la inactivación de la HMG-CoA reductasa catalizada por las reductasa quinasas, a una concentración 7,5 mM, proporciona una protección significativa sobre ambas fases de la inactivación. Para ambas quinasas, la velocidad de inactivación total ( $K_2$ ) se reduce a la mitad, mientras que la pérdida de la capacidad de activación por AMP ( $K_1$ ), disminuye 2,2 veces en el caso de la reductasa quinasa de citosol y 1,4 veces en el de la reductasa quinasa de microsomas. Independientemente de esta diferencia observada en  $K_2$ , resulta evidente que el 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo reacciona en ambos centros con determinados aminoácidos involucrados en la unión del magnesio. Dicho en otras palabras, que el catión magnesio muestra capacidad para unirse a ambos centros de las moléculas de las reductasa quinasas.

La presencia de MgCl<sub>2</sub>/ATP a las mismas concentraciones que por separado, impide completamente, como hasta cierto punto era previsible según la hipótesis formulada, la inactivación total de ambas enzimas puesto que el valor de  $K_2$  es cero. La protección ejercida por la mezcla sobre la pérdida de la capacidad de activación por AMP, se corresponde con la proporcionada por el catión magnesio en solitario e induce a pensar que es debida fundamentalmente al catión libre y no al complejo Mg-ATP.

La conclusión inmediata que se deduce de los tres resultados anteriores, es que el auténtico sustrato no proteico de las reductasa quinasas, es el complejo Mg-ATP y que tal sustrato se une de manera específica a uno solo de los dos centros de la molécula, que con toda probabilidad es el que desempeña las funciones catalíticas de transferencia de grupos fosfato. No puede pensarse en la existencia de un efecto protector aditivo del ATP,

al del catión magnesio, puesto que el nucleótido como tal no ejerce protección alguna. Así pues, el efecto parece ser específico del complejo Mg-ATP.

Del cumplimiento de la hipótesis formulada al principio, cabría esperar que la protección ejercida por el AMP se dirigiese de manera selectiva hacia la reacción del 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, con el centro responsable de la activación de las reductasa quinasas. Sin embargo, la presencia de AMP 2,5 mM, si bien es cierto que no modifica prácticamente las velocidades de inactivación total de ambas enzimas (K<sub>2</sub>) sorprendentemente, la protección que suministra contra la pérdida de la capacidad de activación, no es mejor que la proporcionada por el catión magnesio en solitario. Efectivamente se detecta una interacción selectiva del AMP hacia su centro, pero más débil de lo esperado en un principio.

La presencia simultánea de AMP 2,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, acentúa al máximo la protección ejercida por el AMP sobre la reacción del 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo con el centro activador, puesto que K<sub>1</sub> adquiere valor cero, lo que sugiere de nuevo que el auténtico activador puede ser el complejo Mg-AMP. Sin embargo, resulta sorprendente la observación de una protección total ejercida por el complejo Mg-AMP frente a la inactivación del centro catalítico. Ello demuestra que dicho complejo es capaz de unirse al centro catalítico de ambas enzimas, en ausencia de Mg-ATP.

Ante la posibilidad de que el efecto observado fuese debido únicamente al empleo de una elevada concentración de AMP, tal como 2,5 mM y con objeto de sensibilizar el efecto, se analizó el fenómeno en presencia de AMP 50 μM, manteniendo constante la concentración de magnesio.

En estas condiciones se pone claramente de manifiesto que el auténtico activador de las dos reductasa



quinasas, es el complejo Mg-AMP y no el nucleótido libre y que el complejo activador interacciona de manera específica con un solo centro distinto al catalítico, que en este caso es el responsable de la activación de las enzimas, puesto que las velocidades de inactivación total se ven escasamente modificadas, pudiéndose atribuir el efecto al catión magnesio libre.

A nuestro juicio, la unión del Mg-AMP al centro catalítico, cuando está presente a concentraciones tan elevadas, puede explicarse por la relativa similitud estructural con el complejo Mg-ATP. No obstante, cuando ambos complejos se hallan presentes simultáneamente, la mayor afinidad del centro catalítico por el Mg-ATP, hace que la especie Mg-AMP no pueda ocupar dicho centro. Si esto no fuera así el Mg-AMP produciría un efecto inhibitorio y no activador sobre las reductasa quinasas, puesto que no puede actuar como donador de grupos fosfato.

La superior afinidad de las reductasa quinasas por el activador AMP con respecto al activado ADP, se pone también de manifiesto al estudiar el perfil de inactivación por 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo en presencia de ADP 50  $\mu$ M y MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM. En estas condiciones, se observa un débil efecto protector frente a la pérdida de la capacidad de activación por AMP, en comparación con la protección total ejercida por el AMP en iguales condiciones. Por contra, la protección suministrada al centro catalítico, es entre 2 y 3 veces superior a la del Mg-AMP en iguales condiciones. Ello es comprensible dada la mayor similitud estructural del complejo Mg-ADP hacia el complejo Mg-ATP. Como era previsible, la adición de ADP 2,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM proporciona una completa protección a ambos centros reactivos. La interpretación dada es la misma que en el caso del Mg-AMP y está basada en los mismos argumentos, con el factor adicional de que la superior proximidad es-

tructural existente entre el ADP y el ATP, favorece el acceso del Mg-ADP al centro catalítico incluso a concentraciones tan bajas como las empleadas.

En el caso de los nucleósidos monofosfato solamente el isómero 5'-AMP tiene capacidad para proteger los centros reactivos, puesto que aún cuando el 2'-AMP y el 3'-AMP en solitario, ejercen una muy ligera protección sobre el centro activo, el efecto no se incrementa significativamente en presencia de  $\text{MgCl}_2$  7,5 mM. El ligero y general efecto protector observado en esta última condición, es debido probablemente al catión magnesio, libre del complejo con los nucleótidos. La superior protección suministrada por el 5'-AMP frente a sus isómeros 2'-AMP y 3'-AMP, coincide con la observación ya comentada acerca de la incapacidad de estos isómeros para activar a las reductasa quinasas.

Finalmente, se analizó el patrón de inactivación obtenido en presencia del sustrato proteico de las reductasa quinasas. La enzima HMG-CoA reductasa no parece interaccionar de manera significativa con ninguno de los centros de las reductasa quinasas con capacidad para unirse a los diferentes nucleótidos.

La comprobación de que la inactivación de las reductasa quinasas en presencia de 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo estaba asociada a la unión del mencionado compuesto, pudo realizarse previa identificación con certeza de la subunidad de la molécula de la reductasa quinasa de citosol. Ello fue posible gracias a la propiedad de activación por Mg-AMP. La hipótesis propuesta fue que, dado que se trabajaba con preparaciones relativamente purificadas y que la capacidad de activación por Mg-AMP es una propiedad relativamente específica, era probable que la reductasa quinasa fuese la única proteína que mostrase variaciones en cuanto al marcaje radioactivo por 5'-p-[adeni-

na-8- $^{14}\text{C}$ ]fluorosulfonilbenzoiladenosina, en presencia y ausencia de Mg-AMP como agente protector. Efectivamente, de acuerdo con la hipótesis planteada, de las varias proteínas capaces de reaccionar covalentemente con el 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, tan sólo una de ellas, de peso molecular 72 Kd, además de mostrar una significativa capacidad de unión al análogo radioactivo, pierde esta capacidad en presencia de concentraciones de Mg-AMP capaces de prevenir totalmente la inactivación de la reductasa quinasa. Análogo experimento con la reductasa quinasa de microsomas, no se ha realizado dado su baja concentración en las preparaciones habitualmente manejadas.

La incorporación de 5'-SO<sub>2</sub>Bz [ $^{14}\text{C}$ ]Ado a la subunidad de 72 Kd, presuntamente correspondiente por lo menos a una subunidad de la molécula de reductasa quinasa, muestra también un perfil de incorporación bifásico, en correspondencia con la inactivación dependiente del tiempo. La estequiometría de incorporación de 5'-SO<sub>2</sub>Bz [ $^{14}\text{C}$ ]Ado no puede establecerse dada la imposibilidad de conocer exactamente la cantidad de HMG-CoA reductasa quinasa.

A nuestro juicio y a la luz del conjunto de resultados presentados, podemos afirmar que las HMG-CoA reductasa quinasa hepáticas, poseen en su molécula por lo menos dos centros capaces de interaccionar con nucleótidos de adenina. Uno de ellos reconoce como ligando específico al complejo Mg-AMP, cuya unión se traduce en una activación de las enzimas. El segundo centro cumple funciones catalíticas de transferencia de radicales fosforilo, reconociendo de manera también específica al complejo Mg-ATP como sustrato. Así pues, creemos disponer de evidencias originales y concluyentes que demuestran por vez primera, el carácter alostérico de la activación de la reductasa quinasa hepática por Mg-AMP.

#### 4.8. INFLUENCIA DE OTROS EFECTORES SOBRE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

La actividad de las HMG-CoA reductasa quinasas no es estimulable ni dependiente del catión calcio, así como tampoco es dependiente de la presencia simultánea de calcio y calmodulina. Por otra parte ambas enzimas no son dependientes en su actividad de la presencia de calcio y fosfolípidos ni son activables por diacilgliceroles. Finalmente, tampoco la heparina manifiesta efecto alguno sobre la actividad reductasa quinasa de nuestras preparaciones.

Estas observaciones y otras anteriores relativas a la inercia del AMP cíclico, sugieren que las HMG-CoA reductasa quinasas son proteína quinasas distintas a las proteína quinasas dependientes del calcio y a la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

Además, su respuesta frente a la inclusión de heparina en el ensayo, así como la peculiar propiedad de la activación por AMP dificulta su asimilación a alguna de las proteína quinasas descritas por el momento en hígado de rata. En este mismo sentido, hasta la fecha la HMG-CoA reductasa, solamente ha podido ser fosforilada e inactivada por la proteína quinasa C de cerebro de rata (162), además de por las HMG-CoA reductasa quina-

sas, no existiendo ninguna comunicación acerca de su función como sustrato de otras proteína quinasas descritas.

#### 4.9. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS HMG-CoA REDUCTASA QUINASAS

Está generalmente aceptado que existen por lo menos dos formas de HMG-CoA reductasa quinasa en hígado de rata, presentes en la fracción citosólica (125,136,204) y en la fracción microsomal (125,136,172,204). Aún cuando algunos autores sugieren la posibilidad de que ambas actividades correspondan a la misma enzima, el hecho cierto es que hasta la fecha no se dispone de evidencias suficientemente sólidas para sostener tal afirmación. Así, Ingebritsen y col.(167), atendiendo a la distribución subcelular de ambas actividades y al análogo comportamiento en cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, afirman que la reductasa quinasa es una enzima citosólica de la que una pequeña fracción no superior al 20% de la actividad total, se halla asociada a las membranas microsomales de manera relativamente debil. Otros autores (155,172), han desarrollado importantes trabajos empleando reductasa quinasa purificada a partir de microsomas, lo que implícitamente confiere identidad a la enzima de procedencia microsomal.

Una visión global de nuestros resultados, obtenidos con cada una de las dos reductasa quinasas, creemos que permite afirmar la hipótesis de que en hígado de rata existe una única forma molecular de HMG-CoA reductasa qui-



nasa. Son varios los datos que apuntan en tal dirección. Ambas actividades muestran unos comportamientos cromatográficos muy similares, como se deduce de la comparación de los resultados obtenidos en los diferentes pasos cromatográficos. Asimismo, tanto el peso molecular de la holoenzima como las constantes cinéticas para sustratos y activadores, son prácticamente coincidentes. No se han apreciado diferencias en cuanto al patrón de fosforilación e inactivación de la HMG-CoA reductasa, así como tampoco en la respuesta a distintos efectores (calcio, calmodulina, fosfolípidos, heparina). Y por último, ambas enzimas presentan la propiedad de ser activadas alostéricamente por el complejo Mg-AMP y en menor medida por Mg-ADP, siendo los requerimientos relativos a la estructura molecular del activador, idénticos por parte de ambas proteínas. Los estudios estructurales empleando una molécula de estructura análoga a los nucleótidos de adenina, 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo, han confirmado las observaciones precedentes.

Así pues y a falta de análisis estructurales más profundos que obligan a disponer de preparaciones homogéneas de las proteínas, creemos poder afirmar que en hígado de rata existe una única especie de HMG-CoA reductasa quinasa, que en una proporción pequeña se halla asociada de manera inespecífica y débil a las membranas de los microsomas.

## 5. CONCLUSIONES



- 1.- Se han purificado dos HMG-CoA reductasa quinasas de hígado de rata procedentes respectivamente, del citosol y de los microsomas hepáticos.
- 2.- Las dos reductasa quinasas exhiben una única forma molecular cuyo peso aparente, determinado por filtración molecular en gel, es de 210 Kd.
- 3.- Se ha estudiado la distribución subcelular de la actividad reductasa quinasa hepática, concluyéndose que alrededor de un 85 % de la actividad total se localiza en el citosol, mientras que tan sólo un 10 % permanece asociada a las membranas microsomales.
- 4.- La HMG-CoA reductasa quinasa de microsomas no está asociada al sedimento de glucógeno y procede realmente de las membranas microsomales, a las que se encuentra ligada por fuerzas de naturaleza débil. Su extracción no involucra un proceso de proteólisis.
- 5.- Cada una de las dos reductasa quinasas incorpora  $^{32}\text{P}$  a partir de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  a la HMG-CoA reductasa soluble y purificada a homogeneidad, hasta un valor máximo de 0,8 moles de fosfato por mol de subunidad de reductasa, en un proceso dependiente del tiempo. Simultáneamente y en correlación con el proceso anterior, la reductasa se inactiva hasta un 20 % de su actividad inicial.
- 6.- El proceso de fosforilación e inactivación de la HMG-CoA reductasa por las reductasa quinasas de citosol y de microsomas, es reversible. La HMG-CoA reductasa es reactivada y desfosforilada de manera simultánea y total por una reductasa fosfatasa de citosol de hígado de rata, en un proceso también dependiente del tiempo.
- 7.- Las HMG-CoA reductasa quinasas son enzimas diferentes a la mevalonato quinasa y en aquellas preparaciones

en que coexisten, ésta última no puede expresar su actividad debido a las condiciones inhibitorias presentes en el ensayo.

8.- El pH óptimo de las actividades de HMG-CoA reductasa quinasa está localizado en 7,5.

9.- En presencia de concentraciones saturantes de activador, las dos reductasa quinasas exhiben un comportamiento dependiente de la concentración del sustrato HMG-CoA reductasa, característico del modelo de Michaelis-Menten. Los valores de  $K_M$  para las reductasa quinasas de citosol y de microsomas son, respectivamente, 204 U/mL y 244 U/mL.

10.- En presencia de concentraciones saturantes de activador, las dos reductasa quinasas exhiben un comportamiento dependiente de la concentración del sustrato ATP, característico del modelo de Michaelis -Menten. Los valores de  $K_M$  para las reductasa quinasas de citosol y de microsomas son, respectivamente, 360  $\mu$ M y 330  $\mu$ M.

11.- La HMG-CoA reductasa soluble a diferencia de la microsomal, no puede ser inactivada por debajo del 20 % de su actividad inicial, siendo ésta una característica probablemente atribuible a la naturaleza de la reductasa.

12.- Las dos HMG-CoA reductasa quinasas de hígado de rata, inactivan con igual velocidad y extensión a la HMG-CoA reductasa. En ningún caso la inactivación previa por una de las dos quinasas, permite que la reductasa quinasa de la fracción hepática complementaria, incremente el porcentaje de inactivación de la reductasa.

13.- La velocidad y la extensión de la inactivación de la HMG-CoA reductasa no se modifica cuando la inactivación se verifica en presencia simultánea de ambas HMG-coA reductasa quinasas.

14.- El análisis de los productos de degradación triptíca de la HMG-CoA reductasa fosforilada con 0,8 moles de fosfato/mol de subunidad, revela la existencia de dos fosfopéptidos estructuralmente distintos de muy reducido peso molecular, que pueden separarse por electroforesis en presencia de SDS y urea. La fragmentación de la reductasa en ausencia de urea se traduce en la obtención de un patrón triptíco distinto, pero también constante.

15.- Las HMG-CoA reductasa quinasas de citosol y de microsomas fosforilan los dos centros estructuralmente distintos de la subunidad de la molécula de HMG-CoA reductasa. El fosfopéptido denominado III incorpora alrededor de 2,5 a 3 veces más fosfato que el fosfopéptido I, cuyo peso molecular es aparentemente más pequeño.

16.- La fosforilación de la HMG-CoA reductasa se produce exclusivamente en residuos de serina.

17.- Las HMG-CoA reductasa quinasas de citosol y de microsomas no son dependientes sino activables por nucleósidos monofosfato y nucleósidos difosfato. La actividad enzimática se incrementa entre 5 y 6 veces en presencia de concentraciones saturantes del activador, siendo la velocidad máxima alcanzada igual en ambos casos. Los activadores no pueden actuar como dadores de grupos fosfato.

18.- El AMP es un activador veinte veces más potente que el ADP. Las constantes de activación de las reductasa quinasas de citosol y de microsomas para el AMP son, respectivamente, 20  $\mu\text{M}$  y 17,2  $\mu\text{M}$ , mientras que para el ADP son, respectivamente, 420  $\mu\text{M}$  y 431  $\mu\text{M}$ . Esta diferente potencia activadora se pone de manifiesto tanto sobre la inactivación como sobre la fosforilación de la HMG-CoA reductasa.

19.- La especificidad de reconocimiento de los nucleósi-

dos difosfato es similar y relativamente baja para ambas reductasa quinasas. A excepción del ADP, los demás nucleótidos derivados de purinas, GDP e IDP, no tienen capacidad activadora, mientras que los derivados de pirimidinas, UDP y CDP, activan alrededor de 2,5 veces a las reductasa quinasas.

20.- Las HMG-CoA reductasa quinasas hepáticas exhiben una muy elevada especificidad en el reconocimiento de los nucleósidos monofosfato como activadores, pues tan sólo el 5'-AMP puede cumplir tal función. La molécula del nucleósido monofosfato activador debe contener únicamente la estructura de la adenosina y un grupo fosfato libre esterificado en la posición 5' del anillo de la ribosa. La modificación (GMP, UMP, CMP, IMP) o ausencia (ribosa-5-fosfato) de la base nitrogenada anula la propiedad activadora. Asimismo, la ausencia (adenosina), posición distinta (2'-AMP, 3'-AMP) o sustitución (AMPc, NADP<sup>+</sup>) del grupo fosfato en 5', también anula dicha propiedad.

21.- La especificidad de reconocimiento de los nucleósidos trifosfato que actúan como sustrato, es idéntica para ambas quinasas. Tan sólo el GTP puede suplir al ATP, aunque con menor eficiencia. Por otra parte, otros nucleótidos como UTP, CTP e ITP son absolutamente incapaces de ser empleados como sustrato.

22.- Ambas reductasa quinasas se inactivan de manera irreversible y dependiente del tiempo, en presencia del compuesto de estructura análoga a la de los nucleótidos de adenina, 5'-p-fluorosulfonilbenzoiladenosina. Este compuesto reacciona con distinta afinidad en dos sitios diferentes de la molécula de las reductasa quinasas que afectan a la expresión de su actividad. La pérdida de la capacidad de activación por AMP se produce alrededor de once veces más rápidamente que la inactivación de las enzimas.

23.- Estudios de protección frente a la inactivación por 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo de las reductasa quinasa, confirman la existencia y diferente función de los dos centros capaces de ligar nucleótidos. Así, ambas enzimas contienen un centro alostérico que cumple únicamente funciones activadoras y un centro catalítico que cumple funciones de transferencia de grupos fosfato a la proteína HMG-CoA reductasa.

24.- El sustrato no proteico de las HMG-CoA reductasa quinasa es el complejo Mg-ATP y no el ATP sólo. Este sustrato se une selectivamente al centro catalítico, protegiéndole de la inactivación por 5'-FSO<sub>2</sub>BzAdo.

25.- El activador de las HMG-CoA reductasa quinasa es el complejo Mg-AMP y no el AMP sólo. El complejo Mg-AMP muestra una mayor afinidad que el complejo Mg-ADP, por el centro alostérico, en correlación con la diferente potencia activadora y la distinta protección ofrecida por ambas especies. Este efecto tan sólo se manifiesta a bajas concentraciones de los activadores, así como también la interacción selectiva del Mg-AMP con el centro alostérico. Los nucleósidos monofosfato que no tienen capacidad para incrementar la actividad reductasa quinasa, tampoco presentan capacidad para interactuar con el centro alostérico (Mg-2'-AMP, Mg-3'-AMP).

26.- La enzima HMG-CoA reductasa no interacciona directamente con los centros alostérico y catalítico para nucleótidos de las moléculas de HMG-CoA reductasa quinasa.

27.- La subunidad o al menos una de las posibles subunidades de la HMG-CoA reductasa quinasa de citosol, exhibe un peso molecular de 72 Kd. Esta subunidad proteica resulta selectivamente protegida por el Mg-AMP frente al marcaje covalente con 5'-SO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado.



28.- La incorporación de 5'-SO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado a la subunidad de 72 Kd de la reductasa quinasa de citosol en función del tiempo, muestra un perfil bifásico en correspondencia con la pérdida de actividad dependiente del tiempo.

29.- Ninguna de las dos preparaciones es dependiente de AMPc, calcio, calmodulina y fosfolípidos, ni es activada por diacilgliceroles. Asimismo, tampoco la heparina las afecta en ningún sentido. Ello sugiere, conjuntamente con las observaciones anteriores, que las reductasa quinasa pueden ser distintas a las demás proteína quinasa hepáticas.

30.- El análisis del conjunto de resultados indica la existencia entre ambas preparaciones de importantes analogías de comportamiento cinético y de tipo estructural, lo que unido a la distribución subcelular de las mismas, nos permite afirmar que en el hígado de rata existe una única especie de HMG-CoA reductasa quinasa.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. CHOCK, P.B., RHEE, S.G. y STADTMAN, E.R. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49, 813-843.
2. KREBS, E.G. y FISHER, E.H. (1956) Biochim. Biophys. Acta 20, 150-157.
3. KREBS, E.G., GRAVES, D.J. y FISHER, E.H. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2867-2873
4. FRIEDMAN, D.L. y LARNER, J. (1963) Biochemistry 2, 669-675.
5. WALSH, D.A., PERKINS, J.P. y KREBS, E.G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3763-3765.
6. KREBS, E.G. y BEAVO, J.A. (1979) Annu. Rev. Biochem. 49, 921-956.
7. ADELSTEIN, R.S. y EISENBERG, E. (1980) Annu. Rev. Biochem. 49, 921-956.
8. LENGYEL, P. (1982) Annu. Rev. Biochem. 51, 251-282.
9. COLLET, M.S. y ERIKSON, R.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2021-2024.
10. LENINSON, A.D., OPPERMAN, H., LEVINTOW, L., VARMUS, H.E. y BISHOP, J.N. (1978) Cell 15, 561-572.
11. COHEN, P. (1982) Nature (Lond.) 296, 613-620.
12. STADTMAN, E.R. y CHOCK, P.B. (1978) Curr. Top. Cell. Regul. 13, 53-95.
13. STADTMAN, E.R. y CHOCK, P.B. (1979) en "The Neurosciences Fourth Study Program (Schmidt, F.O. ed.) p. 801-817. MIT Press.
14. SHACTER, E., CHOCK, P.B. y STADTMAN, E.R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 12260-12264.
15. COHEN, P. (ed.) (1980) en "Molecular Aspects of Cellular Regulation" Vol. 1 pp.1-268. Elsevier-Biomedical. Amsterdam.
16. STEINBERG, D. (1976) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 7, 157-198.
17. LEE, K.H. y KIM, K.H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1450-1453.
18. RAZIN, S. y ROTTEM, S. (1978) Trends. Biochem. Sci. 3, 51-55.
19. SABINE, J.R. y JAMES, J.J. (1976) Life Science 18, 1185-1192.



20. MITROPOULOS, K.A. y VENKATESAN, S. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 489, 126-142.
21. SHINITSKY, M. y BARENHOLZ, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 367-394.
22. GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 897-930.
23. GLOMSET, J.A. y NORUM, K.R. (1973) *Adv. Lipid Res.* 11, 1.
24. HELGERUD, P.K., SAAREM, P.K. y NORUM, K.R. (1981) *J. Lipid Res.* 22, 271-277.
25. KOELZ, H.R., SHERRILL, B.C. TURLEY, S.D. y DIETSCHY, J.M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8061-8072.
26. PITTMAN, R.C., CAREW, T.E., ATTIE, A.D. WITZTUM, J. L., WATANABE, Y. y STEINBERG, D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7994-8000.
27. BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1983) *J. Clin. Invest.* 72, 743-747.
28. BUTTERWORTH, P.H.W., DRAPER, H.H., HEMMING, F.W. y MORTON, R.A. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 646-653.
29. LAWSON, D.E.M., THREFOILL, D.R., GLOVER, J. y MORTON, R.A. (1961) *Biochem. J.* 79, 201-208.
30. PETROFSKY, A. (1968) *Biochemistry* 7, 472-482.
31. BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1975) *Cell* 6, 307-312.
32. BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 788-792.
33. GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5153-5162.
34. ANDERSON, R.G.W., GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2434-2438.
35. GOLDSTEIN, J.L., BRUNSCHEDE, G.Y. y BROWN, M.S. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7854-7862.
36. GOLDSTEIN, J.L., DANA, S.E. y FAUST, J.R. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8487-8495.
37. BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1980) *J. Lipid Res.* 21, 505-507.
38. CHANG, T-Y. y LIMANEK, J.S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7787-7795.

39. SCHNITZER-POLOKOFF, R., TORGET, R., LOGEL, J. y SINENSKY, M. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 227, 71-80.
40. FAUST, J.R., GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5018-5022.
41. SLAKEY, L.L., GRAIG, M.C., BEYTIA, E., BRIEDIS, A., FELDBRUEGGE, D.H., DUGAN, R.E., QURESHI, A.A., SUBBARAYAN, C. y PORTER, J.W. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3014-3022.
42. GONZALEZ, R., CARLSON, J.P. y DEMPSEY, M.E. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 574-580.
43. GAYLOR, J.L. (1981) en "Biosynthesis of isoprenoid compounds" (Porter, J.W. y Spurgeon, S.L. eds.) Vol. I pp. 481-543. John Wiley and Sons, New York.
44. FEINGOLD, D.S. y FRANZEN, J.S. (1981) *Trends Biochem. Sci.* 6, 103-105.
45. SHERBAN, D.G., KENNELLY, P.J., BRANDT, K.G. y RODWELL, V.W. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 12579-12585.
46. BROWN, D.A. y SIMONI, R.D. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1674-1678.
47. LISCUM, L., CUMMINGS, R.D., ANDERSON, R.G.W., DE MARTINO, J.L., GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7165-7169.
48. PHILLIPS, C.E. y NESS, G.C. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 772-778.
49. CHIN, D.J., GIL, G., RUSSELL, D.W., LISCUM, L., LUSKEY, K.L., BASU, S.K., OKAYAMA, H., BERG, P., GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1984) *Nature* 308, 613-617.
50. CHIN, D.J., LUSKEY, K.L., FAUST, J.R., MacDONALD, R. J., BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7704-7708.
51. EDWARDS, P.A., LAN, F.S., TANAKA, R.D. y FOGELMAN, A.M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 7272-7275.
52. HARDEMAN, E.C., JENKE, H.S. y SIMONI, R.D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1516-1520.
53. NESS, G.C., MacCREERY, M.J., SAMPLE, C.E., SMITH, M. y PENDLETON, L.C. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 16395-16399.
54. EDWARDS, P.A., KEMPNER, E.S., LAN, S.F. y ERICKSON, S.K. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10278-10282.

55. CHIN, D.J., LUSKEY, K.L., ANDERSON, R.G.W., FAUST, J.R., GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1185-1189.
56. BROWN, M.S., FAUST, J.R., GOLDSTEIN, J.L., KANEKO, I. y ENDO, A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1121-1128.
57. LISCUM, L., FINER-MOORE, J., STROUD, R.M., LUSKEY, K.L., BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 522-530.
58. OKADA, Y., FREY, A.B., GUENTHNER, T.M., OESCH, F., SABATINI, D.D. y KREIBICH, G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 393-402.
59. RODWELL, V.W., NORDSTRON, J.L. y MITSCHELEN, J.J. (1976) *Adv. Lipid Res.* 14, 1-74.
60. DURR, I.F. y RUDNEY, H. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2572-2578.
61. SIDDIQI, M.A. y RODWELL, V.W. (1967) *J. Bacteriol.* 93, 207-214.
62. TURLEY, S.D., ANDERSEN, J.M. y DIETSCHY, J.M. (1981) *J. Lipid Res.* 22, 551-569.
63. SINGER, I.I., KAWKA, D.W., KAZAZIS, D.M., ALBERTS, A.W., CHEN, J.S., HUFF, J.W. y NESS, G.C. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 5556-5560.
64. KAWACHI, T. y RUDNEY, H. (1970) *Biochemistry* 9, 1700-1705.
65. HELLER, R.A. y GOULD, R.G. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 859-865.
66. BROWN, M.S., DANA, S.E., DIETSCHY, J.M. y SIPERSTEIN, M.D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4731-4738.
67. EDWARDS, P.A., LEMONGELLO, D. y FOGELMAN, A.M. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 574, 123-135.
68. EDWARDS, P.A., LEMONGELLO, D. y FOGELMAN, A.N. (1979) *J. Lipid Res.* 20, 2-7.
69. KLEINSEK, D.A., RANGANATHAN, S. y PORTER, J.W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1431-1435.
70. NESS, G.C., SPINDLER, C. y MOFFLER, M.H. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 493-499.
71. SRIKANTIAIAH, M.V., TORMANEN, C.D., REDD, W.L., HARD-GRAVE, J.E. y SCALLEN, T.J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6145-6150.

72. BEG, Z.H., STONIK, J.A. y BREWER, H.B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1013-1020.
73. TANAKA, R., EDWARDS, P.A., LAN, S.F., KNOPPEL, E.M. y FOGELMAN, A.M. (1982) *J. Lipid Res.* 23, 523-530.
74. NESS, G.C., WAY, S. y WICKHAM, P.S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 81-85.
75. KLEINSEK, D.A., DUGAN, R.E., BAKER, T.A. y PORTER, J.W. (1981) *Methods Enzymol.* 71, 462-479.
76. KENNELLY, P.J., BRANDT, K.G. y RODWELL, V.W. (1983) *Biochemistry* 22, 2784-2788.
77. ACKERMAN, M.E., REDD, W.L. y SCALLEN, T.J. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 29-35.
78. HELLER, R.A. y GOULD, R.G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5254-5260.
79. HELLER, R.A. y GOULD, R.G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 388, 254-259.
80. BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. y DIETSCHY, J.M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 5144-5149.
81. DUGAN, R.E., SLAKEY, L.L., BRIEDS, A.V. y PORTER, J. W. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 21-27.
82. JENKE, H.E., LOWEL, M y BERNDT, J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9622-9625.
83. KLEINSEK, D.A., JABALQUINTO, A.M. y PORTER, J.W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3918-3923.
84. HIGGINS, M. y RUDNEY, H. (1973) *Nature (Lond.) New Biol.* 246, 60-61.
85. HIGGINS, M., BRADY, D. y RUDNEY, H. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 271-282.
86. EDWARDS, R.G. y GOULD, R.G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2891-2896.
87. DUGAN, R.E., NESS, G.C., LAKSHMANAN, M.R., NEPOKROEFF, C.M. y PORTER, J.W. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 499-504.
88. LAKSHMANAN, M.R., NEPOKROEFF, C.M., NESS, G.C., DUGAN, R.E. y PORTER, J.W. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 704-710.
89. LAKSHMANAN, M.R., DUGAN, R.E., NEPOKROEFF, C.M., NESS, G.C. y PORTER, J.W. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 89-95.

90. EDWARDS, P.A., LEMONGELLO, D., KANE, J., SHECTER, I. y FOGELMAN, A.M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3715-3725.
91. EASOM, R.A. y ZAMMIT, V.A. (1984) *Biochem. J.* 220, 739-745.
92. FAUST, J.R., LUSKEY, K.L., CHIN, D.J., GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5205-5209.
93. BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7306-7314.
94. LUSKEY, K.L., FAUST, J.R., CHIN, D.J., BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8462-8469.
95. LISCUM, L., LUSKEY, K.L., CHIN, D.J., HO, Y.K., GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8450-8455.
96. CLARKE, C.F., EDWARDS, P.A., LAN, S., TANAKA, R.D. y FOGELMAN, A.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3305-3308.
97. CHANG, T.Y., LIMANEK, J.S. y CHANG, C.C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6174-6180.
98. KOIZUMI, J.H., MABUCHI, H. y TAKEDA, R. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 240-246.
99. NEPOKROEFF, C.M., LAKSHMANAN, M.R., NESS, G.C., DUGAN, R.E. y PORTER, J.W. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 704-710.
100. GEELEN, M.J.H. y GIBSON, D.M. (1975) *FEBS Lett.* 58, 334-339.
101. BATHENA, S.J., AVIGAN, J. y SCHREINER, M.E. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2174-2178.
102. KNOX, A.M., STURTON, R.G., COOLING, J. y BRINDLEY, D.N. (1979) *Biochem. J.* 180, 441-443.
103. PERET, J., MACAIRE, J. y CHANEZ, M. (1973) *J. Nutr.* 103, 866-874.
104. NESS, G.C., DUGAN, R.E., LAKSHMANAN, M.D., NEPOKROEFF, C.M. y PORTER, J.W. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3839-3842.
105. EDWARDS, P.A. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 188-203.
106. KANDUTSCH, A.A. y PACKIE, R.M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 122.



107. VOLPE, J.J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2568-2571.
108. VOLPE, J.J. y OBERT, K.A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 2016-2021.
109. VENKATESAN, S. y MITROPOULOS, K.A. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 710, 446-455.
110. MITROPOULOS, K.A., VENKATESAN, S., REEVES, B.E.A. y BALASUBRAMANIAM, S. (1981) *Biochem. J.* 194, 265-271.
111. SIPAT, A. y SABINE, J.R. (1981) *Biochem. J.* 194, 889-893.
112. FINKEL, R.S. y VOLPE, J.J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 572, 461-471.
113. RICHERT, L. CASTAGNA, L.M., BECK, J-P., RONG, S., LUN, B. y OURISSON, G. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 192-198.
114. LEHRER, G., PANINI, S.R., ROGERS, D.H. y RUDNEY, H. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5612-5619.
115. RAMASARMA, T., PATON, B. y GOLDFARB, S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 170-176.
116. MENON, A.S., DEVI, S.U. y RAMASARMA, Y (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 619-625.
117. DOTAN, I. y SHECHTER, I. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 713, 427-434.
118. DOTAN, I. y SHECHTER, I. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 226, 401-410.
119. ROITELMAN, J. y SHECHTER, I. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 870-877.
120. ROITELMAN, J. y SHECHTER, I. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14029-14032.
121. ROITELMAN, J. y SHECHTER, I. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 902-907.
122. NESS, G.C., EALES, S.J., PENDLETON, L.C. y SMITH, M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 12391-12393.
123. GIBBONS, G.F., BJÖRNSSON, O.G. y PULLINGER, C.R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14399-14405.
124. GIBBONS, G.F. y PULLINGER, C.R. Comunicación 14 al "4th International Meeting on HMG-CoA Reductase" Breukelen, 1985 (Holanda).

125. BEG, Z.H., ALLMAN, D.W. y GIBSON, D.M. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1362-1369.
126. BEG, Z.H., ALLMAN, D.W., ANDERSON, P.J., PRUDEN, E. y GIBSON, D.M. (1974) *Fed. Proc.* 33, 1428.
127. GOODWIN, C.D. y MARGOLIS, S. (1973) *Fed. Proc.* 32, 671.
128. GOODWIN, C.D. y MARGOLIS, S. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7610-7613.
129. GOODWIN, C.D. y MARGOLIS, S. (1975) *Fed. Proc.* 34, 548.
130. GOODWIN, C.D. y MARGOLIS, S. (1978) *J. Lipid Res.* 19, 747-756.
131. BERNDT, J. y GAUMERT, R. (1974) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 905-910.
132. BERNDT, J., HEGARDT, F.G., BOVE, J., GAUMERT, J., STILL, J. y CARDO, M-T. (1976) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1277-1282.
133. HIZUKURI, S. y LARNER, J. (1964) *Biochemistry* 3, 1783-1788.
134. BROWN, M.S., BRUNSCHEDE, G.Y. y GOLDSTEIN, J.L. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2502-2509.
135. BROWN, M.S., DANA, S.E. y SIPERSTEIN, M.D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6585-6589.
136. NORDSTROM, J.L., RODWELL, V.W. y MITSCHELEN, J.J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8924-8934.
137. HARWOOD, H.J., BRANDT, K.G. y RODWELL, V.W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2810-2815.
138. BOVE, J. y HEGARDT, F.G. (1978) *FEBS Lett.* 90, 198-202.
139. INGEBRITSEN, T.S., LEE, H.S., PARKER, R.A., y GIBSON, D.M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1268-1277.
140. BRANDT, H. CAPULONG, Z.L. y LEE, E.Y.C. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8038-8044.
141. SHAH, S.N. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 439-446.
142. HARWOOD, H.J., SCHNEIDER, M. y STACPOOLE, P.W. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 805, 245-251.

143. PANINI, S.R. y RUDNEY, H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11633-11636.
144. FIELD, F.J., ERICKSON, S.K., SHREWSBURY, M.A. y COOPER, A.D. (1982) *J. Lipid Res.* 23, 105-113.
145. OKU, H. IDE, T. y SUGANO, M. (1984) *J. Lipid Res.* 25, 254-261.
146. FIELD, F.J., HENNING, B y MATHUR, S.N. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 802, 9-16.
147. GEBHARD, R.L., STONE, B.G. y PRIGGE, W.F. (1985) *J. Lipid Res.* 26, 47-53.
148. HUNTER, C.F. y RODWELL, V.W. (1980) *J. Lipid Res.* 21, 399-405.
149. BROWN, K. HAVEL, C.M. y WATSON, J.A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8512-8518.
150. BEG, Z.H., STONIK, J.A. y BREWER, H.B. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 488-498.
151. CHOW, J.C., HIGGINS, M.J.P. y RUDNEY, H. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 1077-1084.
152. BEG, Z.H., STONIK, J.A. y BREWER, H.B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3678-3682.
153. KEITH, M.L., RODWELL, V.W., ROGERS, D.H. y RUDNEY, H. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 969-975.
154. GIL, G., SITGES, M., BOVE, J. y HEGARDT, F.G. (1980) *FEBS Lett.* 110, 195-199.
155. BEG, Z.H., STONIK, J.A. y BREWER, H.B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8541-8545.
156. GIL, G., SITGES, M. y HEGARDT, F.G. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 224-229.
157. GIL, G., SITGES, M. y HEGARDT, F.G. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 663, 211-221.
158. KHANDELWAL, R.L. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 191, 764-773.
159. FONT, E., SITGES, M. y HEGARDT, F.G. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 705-710.
160. KEITH, M.L., KENNELLY, P.J. y RODWELL, V.W. (1983) *J. Protein. Chem.* 2, 209-220.
161. ROGERS, D.H., PANINI, S.R. y RUDNEY, H. (1980) *Anal. Biochem.* 101, 107-111.



162. BEG, Z.H., STONIK, J.A. y BREWER, H.B. (1985) J. Biol. chem. 260, 1682-1687.
163. KIKKAWA, U., TAKAI, Y., MINAKUCHI, R., INOHARA, S. y NISHIZUKA, Y. (1982) J. Biol. chem. 257, 13341-13348.
164. CASTAGNA, M., TAKAI, Y., KAIBUCHI, K., SAN0, K. KIKKAWA, U. y NISHIZUKA, Y. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7847-7851.
165. NIEDEL, J.E., KUHN, L. y VANDERBANK, G.R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 36-40.
166. ROACH, P.J. y GOLDMAN, M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7170-7172.
167. INGEBRITSEN, T.S., PARKER, R.A. y GIBSON, D.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1138-1144.
168. CHEN, L-J. y WALSH, D.A. (1971) Biochemistry 10, 3614-3621.
169. INGEBRITSEN, T.S., PARKER, R.A. y GIBSON, D.M. (1979) Fed. Proc. 38, 481.
170. BEG, Z.H. y BREWER, H.B. (1981) Curr. Top. Cell. Regul. 20, 139-183.
171. NIMMO, G.A. y COHEN, P. (1978) Eur. J. Biochem. 87, 341-351.
172. BEG, Z.H., STONIK, J.A. y BREWER, H.B. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4375-4379.
173. BEG, Z.H. y STONIK, J.A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 559-566.
174. RYLATT, D.B., AITKEN, A., BILHAM, T., CONDON, G.D., EMBI, N. y COHEN, P. (1980) Eur. J. Biochem. 107, 529-537.
175. RAMAKRISHNA, S. PUCCI, D.L. y BENJAMIN, W.B. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10213-10216.
176. KENNELLY, P.J. y RODWELL, V.W. (1985) J. Lipid Res. 26, 903-914.
177. BROWN, W.E. y RODWELL, V.W. (1983) Biochim. Biophys. Acta 751, 218-229.
178. PARKER, R.A., MILLER, S.J. y GIBSON, D.M. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 2, 629-635.
179. PARKER, R.A., MILLER, S.J. y GIBSON, D.M. (1985) Fed. Proc. 44, 657.

180. ESSER, V. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. (1985).
181. SITGES, M., GIL, G. y HEGARDT, F.G. (1984) *J. Lipid Res.* 25, 497-506.
182. NESS, G.C. (1979) Abstract, *J. Lipid Res.* 20, 1048.
183. NEWSHOLME, W.A. y START, C. (1979) en "Regulation in Metabolism", p. 323. John Wiley and Sons, New York.
184. GIBSON, D.M. y INGEBRITSEN, T.S. (1978) *Minireview. Life Sci.* 23, 2649-2664.
185. INGEBRITSEN, T.S., BLAIR, J., GAY, J., WITTERS, L. y HARDIE, D.G. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 275-281.
186. INGEBRITSEN, T.S., STEWART, A.A. y COHEN, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 297-307.
187. BEG, Z.H., REZNIKOV, D.C. y AVIGAN, J. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 244, 310-322.
188. NIMMO, G.A. y COHEN, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 353-365.
189. HUANG, F.L. y GLINSMANN, W.H. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3004-3008.
190. GORIS, J., DEFREYN, G., VANDENHEEDE, J.R. y MERLEVEDE, W. (1978) *Eur. J. Biochem.* 91, 457-464.
191. KHANDELWAL, R.L. y ZINMAN, S.M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 560-565.
192. INGEBRITSEN, T.S. Tesis Doctoral. Universidad de Indiana (1979).
193. SITGES, M., GIL, G. y HEGARDT, F.G. (1979) Abstract, *J. Lipid Res.* 20, 1049.
194. PHILLIP, B.W. y SHAPIRO, D.J. (1979) *J. Lipid Res.* 20, 588-593.
195. SAUCIER, S.E. y KANDUTSCH, A.A. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 572, 541-556.
196. WILLIAMSON, D.H. y BROSNAN, J.T. (1974) en "Methods in Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H.V. ed.) Vol. 4, 2266-2302. Verlag Chemie, Weinheim.
197. NORDSTROM, J.L. Tesis Doctoral. Universidad de Purdue (1976).
198. BURCH, H.B., BRADLEY, M.E. y LOWRY, O.H. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 4546-4554.

199. GIL, G., CALVET, V.E., FERRER, A. y HEGARDT, F.G. (1982) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1217-1224.
200. GIL, G. y HEGARDT, F.G. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214, 192-198.
201. HEGARDT, F.G., GIL, G. y CALVET, V.E. (1983) J. Lipid Res. 24, 821-830.
202. CALVET, V.E., GIL, G. y HEGARDT, F.G. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 236, 753-765.
203. FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., MOSER, A.H., LEAR, S.R. y SIPERSTEIN, M.D. (1983) J. Lipid Res. 24, 290-296.
204. INGEBRITSEN, T.S., GEELLEN, M.J.H., PARKER, R.A., EVENSON, K.J. y GIBSON, D.M. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9986-9989.
205. PARKER, R.A., INGEBRITSEN, T.S., GEELLEN, M.J.H. y GIBSON, D.M. (1981) Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation. Vol, 8, 609-624.
206. PARKER, R.A., EVENSON, K.J. y GIBSON, D.M. (1982) Fed. Proc. 41, 881.
207. HENNENBERG, R. y RODWELL, V.W. (1981) Fed. Proc. 40, 1604.
208. HENNENBERG, R. y RODWELL, V.W. (1985) Physiol. Chem. Phys. 17, 35-40.
209. HAYDEN, L.J., COHEN, S., LEVIN, K. y MARGOLIS, S. (1983) Can. J. Biochem. Cell. Biol. 61, 207-213.
210. ILLIANO, G., TELL, G.P.E., SIEGEL, M.I. y CUATRE-CASAS, P. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2443-2447.
211. DUGAN, R.E., BAKER, T.A. y PORTER, J.W. (1982) Eur. J. Biochem. 125, 497-503.
212. GOODMAN, M.W., MICHELLS, L.D. y KEAN, W.F. (1982) Proc. Soc. Biol. Med. 170, 286-290.
213. YOUNG, N.L., SAUDEK, C.D. y CRAWFORD, S.A. (1982) J. Lipid Res. 23, 266-275.
214. EASOM, R.A. y ZAMMIT, V.A. (1985) Biochem. J. 230, 747-752.
215. EASOM, R.A. y ZAMMIT, V.A. (1984) Biochem. J. 220, 733-738.
216. ROSEN, O.M. y KREBS, E.G. (1981) Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation. Vol. 8.

217. ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W. (1971) en "Cyclic AMP". Academic Press, New York.
218. GIBSON, D.M., PARKER, R.A, STEWART, C.S. y EVENSON, K.J. (1982) Adv. Enzyme Regul. (Weber, G. ed.) Vol. 20, pp. 263-283. Pergamon Press, Oxford.
219. COHEN, P. (1978) Curr. Top. Cell. Regul. 14, 117-196.
220. LEE, E.Y.C., MELLGREN, R.L., KILLILEA, S.D. y AYLWARD, J.H. (1977) en "Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism" (Esmann, V. ed.) FEBS Symposium, Vol. 42, pp. 327-346. Pergamon Press, New York.
221. COHEN, P., NIMMO, G.A. y ANTONIW, J.F. (1977) Biochem. J. 162, 435-444.
222. TAO, S., HUANG, F.L., LYNCH, A. y GLINSMANN, W.M. (1978) biochem. J. 176, 347-350.
223. FOULKES, G.J. y COHEN, P. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 251-256.
224. FOULKES, G.J., JEFFERSON, L. y COHEN, P. (1980) FEBS Lett. 112, 21-24.
225. NEMENOFF, R.A., BLACKSHEAR, P.J. y AVRUCH, J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 9437-9443.
226. COHEN, P., PARKER, P.J. y WOODGET, J.R. (1985) en "Molecular Basis of Insulin Action (Czech, M.P. ed.) pp. 213-233, Plenum Press, New York.
227. FOULKES, G.J. y COHEN, P. (1980) Eur. J. Biochem. 105, 195-203.
228. HEMMINGS, B.A., RESINK, T.J. y COHEN, P. (1982) FEBS Lett. 150, 319-324.
229. KHANDELWAL, R.L., ZINMAN, S.M. y ZEBROSWKI, E.J. (1977) Biochem. J. 168, 541-548.
230. MICHELL, R.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 81-147.
231. BERRIDGE, M.J. (1981) Mol. Cell. Endocrinol. 24, 115-140.
232. EDWARDS, P.A., POPJAK, G. FOGELMAN, A.M. y EDMOND, J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1057-1063.
233. KITA, T., BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1980) J. Clin. Invest. 66, 1094-1100.
234. ERICKSON, S.K., SHREWSBURY, M.A. y GOULD, R.G. (1980) Biochim. Biophys. Acta 620, 70-79.

235. AREBALO, R.D., HARDGRAVE, J.E. NOLAND, B.J. y SCALLEN, T.J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6429-6433.
236. AREBALO, R.E., TORMANEN, C.D., HARDGRAVE, J.E., NOLAND, B.J. y SCALLEN, T.J. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 51-55.
237. AREBALO, R.E., HARDGRAVE, J.E. y SCALLEN, T.J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 571-574.
238. BEG, Z.H. y BREWER, H.B. (1982) Fed. Proc. 41, 2634-2638.
239. BEYTIA, E.D. y PORTER, J.W. (1976) Annu. Rev. Biochem. 45, 113-142.
240. MITCHELL, E.D. y AVIGAN, J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6170-6173.
241. BEG, Z.H., STONIK, J.A. y BREWER, H.B. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7293-7297.
242. HOLLOWAY, D.E., PETERSON, F.J., PRIGGE, W.F. y GEBHARD, R.L. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 1283-1289.
243. PANINI, S.R. y RUDNEY, H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 11633-11636.
244. STACPOOLE, P.W., HARWOOD, H.J., VARNADO, C.E. y SCHNEIDER, M. (1983) J. Clin. Invest. 72, 1575-1585.
245. LEONI, S., SPAGNUOLO, S., CONTI-DEVIRGILIIS, L., DINI, L., MANGIANTINI, M.T. y TRENTALANCE, A. (1984) J. Cell. Physiol. 118, 62-66.
246. GREGG, R.G. y WILCE, P.A. (1983) en "3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase" (Sabine, J.R. ed.) pp. 245-257. CRC Press Inc., Boca Ratón, FL.
247. FEINGOLD, K.R., WILEY, M.H., MOSER, A.H. y SIPERSTEIN, M.D. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 226, 231-241.
248. MONGER, D.J. y LAW, J.H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1921-1923.
249. SEXTON, R.C., PANINI, S.R. y RUDNEY, H. (1982) Fed. Proc. 41, 1388.
250. HARWOOD, H.J. y RODWELL, V.W. (1982) J. Lipid Res. 23, 754-761.
251. INGEBRITSEN, T.S. y GIBSON, D.M. (1981) Methods Enzymol. 71, 486-497.



252. NESS, G.C., BENTON, G.A., DEITER, S.A. y WICKHAM, P.S. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, 214, 705-713.
253. NESS, G.C. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* 53/54, 299-305.
254. DORSEY, J.K. y PORTER, J.W. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 4667-4670.
255. NESS, G.C., SPINDLER, C.D. y BENTON, G.A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 9013-9016.
256. CLEGG, R.J., MIDDLETON, B., BELL, G.D. y WHITE, D. A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2294-2299.
257. AREBALO, R.E., HARDGRAVE, J.E. y SCALLEN, T.J. (1982) *Fed. Proc.* 41, 1398.
258. ANGELIN, B., EINARSSON, K. LILJEQVIST, L., NILSELL, K. y HELLER, R. (1984) *J. Lipid Res.* 25, 1159-1165.
259. DUGAN, R.E. y PORTER, J.W. (1984) *J. Bioenergetics and Biomembranes* 76, 551-560.
260. ROGERS, D.H. y RUDNEY, H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10650-10658.
261. WHITEHEAD, T.R., VLAHCEVIE, Z.R., BEG, Z.H. y HYLEMON, P.B. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 230, 483-491.
262. SCALLEN, T.J. y SANGHVI, A. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2477-2480.
263. GOODWIN, C.D., COOPER, B.W. y MARGOLIS, S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 4469-4472.
264. SCHLENDER, K.K., WEI, S.H. y VILLAR-PALASI, C. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 272-278.
265. WALSH, D.A., ASHBY, C.D., GONZALEZ, C., CALKINS, D., FISCHER, E.H. y KREBS, E.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1977-1981.
266. CARMICHAEL, D.F., GEAHLEN, R.L., ALLEN, S.M. y KREBS, E.G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10440-10445.
267. HEMMINGS, B.A., AITKEN, A., COHEN, P., RYMOND, M. y HOFMANN, F. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 473-478.
268. DELANGE, R.J., KEMP, R.G., RILEX, W.D., COOPER, R. A. y KREBS, E.G. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2200-2208.
269. HUANG, T.S., BYLUND, D.B., STULL, J.T. y KREBS, E. G. (1974) *FEBS Lett.* 42, 249-252.

270. CHRISMAN, T.D., JORDAN, J.E. y EXTON, J.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10798-10801.
271. SINGH, T.J., AKATSUKA, A, HUANG, K-P., SHARMA, R. K., TAM, S.W. y WANG, J.H. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 676-683.
272. WANG, S.H., STULL, J.T., HUANG, T.S. y KREBS, E.G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4521-4527.
273. HAYAKAWA, T, PERKINS, T.P. y KREBS, E.G. (1973) *Biochemistry* 12, 574-580.
274. DEPAOLI-ROACH, A.A., ROACH, P.J. y LARNER, J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4212-4219.
275. AHMAD, Z., DEPAOLI - ROACH, A.A., y ROACH, P.J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8348-8355.
276. WOODGET, J.R., TONKS, N.K. y COHEN, P. (1982) *FEBS Lett.* 148, 5-11.
277. TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., IWASA, Y., KAWAHARA, Y., MORI, T. y NISHIZUKA, Y. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3692-3695.
278. KUO, J.F., ANDERSON, W.B., WISE, B.C., MACKERLOWA, L., SALOMONSON, I., BRACKE, N.L., KATOH, N., SHOTI, N. y WRENN, R.W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7039-7043.
279. MINAKUCHI, R., TAKAI, Y., YU, B. y NISHIZUKA, Y. (1981) *J. Biochem. (Tokyo)* 89, 1651-1654.
280. KIKKAWA, U., TAKAI, Y., MINAKUCHI, R., INOHARA, S. y NISHIZUKA, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13341-13348.
281. WISE, B.C., RAYNOR, R.L. y KUO, J.F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8481-8488.
282. WISE, B.C., GLASS, D.B., CHOU, C-H, J., RAYNOR, R.L., KATOH, N., SCHATZMAN, R.C., TURNER, R.S., KIBLER, R. F. y KUO, J.F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8489-8495.
283. TAKAI, Y., YAMAMOTO, M., INOUE, M., KISHIMOTO, A. y NISHIZUKA, Y. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
284. TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., INOUE, M., YAMAMOTO, M. y NISHIZUKA, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7603-7609.
285. TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., KIKKAWA, U., MORI, T. y NISHIZUKA, Y. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 1218-1224.
286. NISHIZUKA, Y. (1984) *Nature* 308, 693-698.

287. KATOH, N., WISE, B.C. y KUO, J.F. (1983) *Biochem. J.* 209, 189-195.
288. VULLIET, P.R., WOODGET, J.R., FERRARI, S. y HARDIE, D.G. (1985) *FEBS Lett.* 182, 335-339.
289. HOFFER, A.W., SCHATTER, S. y GRAEFE, M. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129, 892-897.
290. ZWUILLER, J., REVEL, M-O, y MALVIYA, A.N. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 1350-1353.
291. WITTERS, L.A., VATER, C.A. y LIENHARD, G.E. (1985) *Nature (Lond.)* 315, 777-778.
292. IMAZU, M., STRICKLAND, W.G. y EXTON, J.H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 789, 285-293.
293. ITARTE, E. y HUANG, K-P. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4052-4057.
294. HATHAWAY, G.M., TUAZON, P.T. y TRAUGH, J.A. (1984) *Methods in Enzymol.* 99, 308-316.
295. HATHAWAY, G.M. y TRAUGH, J.A. (1984) *Methods in Enzymol.* 99, 317-321.
296. EMBI, N., RYLATT, D.B. y COHEN, P. (1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 519-527.
297. HEMMINGS, B.A. y COHEN, P. (1984) *Methods in Enzymol.* 99, 337-345.
298. COHEN, P., YELLOWLESS, D., AITKEN, A, DORELLA-DEANA, A., HEMMINGS, B.A. y PARKER, P.J. (1982) *Eur. J. Biochem.* 124, 21-35.
299. AHMAD, Z., DEPAOLI-ROACH, A.A. y ROACH, P.J. (1985) *FEBS Lett.* 179, 96-100.
300. RAMAKRISHNA, S. y BENJAMIN, W.B. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 12280-12286.
301. SHAFFNER, H.J. y ODIN, E. (1966) *J. Med. Chem.* 9, 576.
302. GUTHROW, C.C., RASMUSSEN, H., BRUNSWICK, D.J. y COOPERMAN, B.S. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3344.
303. HULLA, F.W. y FASOLD, H. (1972) *Biochemistry* 11, 1056-1061.
304. POMERANTZ, A.H., RUDOLPH, S.A., HALEY, B.E. y GREEN-GARD, P. (1975) *Biochemistry* 14, 3858-3862.



305. HALEY, B.E. y HOFFMAN, J.F. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3367.
306. CRAIG, D.W. y HAMMES, G.G. (1980) Biochemistry 19, 330-334.
307. ANNAMALAI, A.E. y COLMAN, R.F. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10276-10283.
308. ESCH, F.S. y ALLISON, W.S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6100-6106.
309. ROY, S. y COLMAN, R.F. (1979) Biochemistry 18, 4683-4690.
310. PINKOFSKY, H.B., GINSBURG, A., REARDON, I. y HEINRIKSON, R.L. (1984) J. Biol. Chem. 259, 9616-9622.
311. PAL, P.K., WECHTER, W.J. y COLMAN, R.F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8140-8147.
312. WYATT, J.L. y COLMAN, R.F. (1977) Biochemistry 16, 1333-1342.
313. MANSOUR, T.E. y COLMAN, R.F. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1370-1376.
314. COLMAN, R.F. (1983) Annu. Rev. Biochem. 52, 67
315. BUHROW, S.A. y STAROS, J.V. (1985) Methods in Enzymol. 109, 816-826.
316. BENNET, J.S., COLMAN, R.F. y COLMAN, R.W. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7346-7354.
317. FIGURES, W.R., NIEWIAROWSKI, S., MORINELLI, T.A., COLMAN, R.F. y COLMAN R.W. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7789-7795.
318. HUANG, Y-CH, y COLMAN, R.F. (1984) J. Biol. Chem. 259, 12481-12488.
319. GOLDFARB, S. y PITOT, H.C. (1971) J. Lipid Res. 12, 512-515.
320. KNAPPE, J. (1974) en "Methods in Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H.U. ed.) Vol. 4, pp. 2026-2030. Verlag Chemie, Weinheim.
321. WALSETH, T.F. y JOHNSON, R.A. (1979) Biochim. Biophys. Acta 526, 11-13.
322. PALMER, J.L. y AVRUCH, J. (1981) Anal. Biochem 116, 372-373.

323. GOLDFARB, S. y PITOT, H.C. (1972) *J. Lipid Res.* 13, 797-801.
324. GEORGE, R., MENON, A.S. y RAMASARMA, T. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 544-549.
325. BEG, Z.H., STONIK, J.A. y BREWER, H.B. (1978) *Anal. Biochem.* 86, 531-538.
326. PHILIPP, B.W. y SHAPIRO, D.J. (1979) *J. Lipid Res.* 20, 588-593.
327. SHAPIRO, D.J., NORDSTROM, J.L., MITSCHELEN, J.J., RODWELL, V.W. y SCHIMKE, R.T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370, 369-377.
328. JAMES, G.T. (1978) *Anal. Biochem.* 86, 574-579.
329. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, P.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
330. BESADOUN, A. y WEINSTEIN, D. (1976) *Anal. Biochem.* 70, 241-250.
331. HUANG, K.P. y ROBINSON, J.C. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 593-599.
332. COOPER, J.A., BARTHOLOMEW, M.S. y HUNTER, T. (1983) *Methods in Enzymol.* 99, 387-402.
333. LAEMMLI, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
334. BURR, F.A. y BURR, B. (1983) *Methods in Enzymol.* 96, 239-245.
335. HAMES, B.D. y RICKWOOD, D. (1981) en "Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach" p. 52. IRL Press Limited, Oxford and Washington D.C.
336. LASKEY, R.A. y MILLS, A.D. (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 335-341.
337. LASKEY, R.A. y MILLS, A.D. (1977) *FEBS Lett.* 82, 314-316.
338. LIEMHARD, G.E. y SECEMSKI, I.I. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1121-1123.
339. POULOS, T.L. y PRICE, P.A. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1453-1457.
340. COLMAN, R.F., PAL, P.K. y WYATT, J.L. (1977) *Methods in Enzymol.* 46, 240-249.
341. OGILVIE, J.W. (1983) *Biochemistry* 22, 5908-5914.

342. POPJAK, G. (1969) *Methods in Enzymol.* 15, 393-454.
343. PETTIGREW, D.W. y FRIEDEN, C. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3623-3627.