

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

PURIFICACION A HOMOGENEIDAD Y
PROPIEDADES DEL ENZIMA 3-HIDROXI
3-METIL GLUTARIL COENZIMA A
REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL DE
HIGADO DE RATA

Memoria presentada para
optar al Grado de
Licenciada en Farmacia
por

Ma CARMEN CAELLES FRANCH

Barcelona, Junio de 1985

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701738977

A mis padres

*A todas y cada una de las
personas que integran el
Departamento de Bioquímica*

Quisiera agradecer a todos aquellos quienes me han prestado su ayuda de forma totalmente altruista en la realización de este trabajo. Aunque me va a resultar imposible citar a cada uno de ellos, quisiera que cuando leyesen estas líneas viesen su nombre en ellas.

En primer lugar agradezco al Dr. Fausto García Hegardt, Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y que ha dirigido esta Tesina, por su orientación y consejo sin los que la realización de este trabajo hubiese sido imposible.

A Albert Ferrer por su apoyo y por no escatimar en ningún momento su interés hacia mi trabajo, enseñándome a dar mis primeros pasos en el camino de la investigación.

A Nuria Massot por su alegría y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas.

A Victoria Esser por su asesoramiento y ayuda incondicionada hasta el último momento.

A Diego Haro y Pedro Marrero por haber seguido de cerca y con interés mi trabajo.

A Dolores Serra por su ayuda en todo momento.

A Joaquín Ariño por todos sus buenos consejos.

En general, a todos los compañeros del Departamento de Bioquímica por haber hecho real el significado de la palabra compañerismo.

Y a todas aquellas personas que durante este año me han prestado su apoyo y amistad. Particularmente a mi hermana Neus, a Mapi y a M^{re} Prado.

PRESENTACION Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO

En los trabajos publicados en la bibliografía internacional durante los últimos años, se ha comunicado la purificación hasta homogeneidad aparente de una actividad Reductasa quinasa procedente de la fracción microsomal de hígado de rata. Se han comunicado también purificaciones parciales de actividad Reductasa quinasa procedente de la fracción citosólica.

En nuestro propio laboratorio se ha purificado parcialmente Reductasa quinasa citosólica que ya manifestó capacidad para fosforilar e inactivar a la HMG-CoA Reductasa homogénea, aunque se precisaba de una etapa final de inmunoprecipitación para aislar a la Reductasa de otras proteínas fosforiladas.

Con objeto de poder estudiar el proceso de fosforilación en condiciones óptimas se consideró necesario purificar la Reductasa quinasa a homogeneidad. Esto permite omitir la etapa de inmunoprecipitación y obtener evidencias más directas del mecanismo de fosforilación de la Reductasa.

Disponer de una preparación homogénea permitirá en un futuro emprender estudios estructurales de este enzima y obtener anticuerpos contra el mismo que harán posible estudios "in vivo" de la actividad reguladora de la Reductasa quinasa.

ABREVIATURAS

a.m.	De la mañana
ADP	Adenosin-5'-difosfato
AMP _C	Adenosin-3',5'-monofosfato
ATP	Adenosin-5'-trifosfato
¹⁴ C	Carbono 14
cpm	Cuentas por minuto
CoA	Coenzima A
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen-diamino-tetracetato
EGTA	Etilenglicol-bis-(-aminoetil)eter
x g	Gravedades
G-6-P	Glucosa-6-fosfato
G-6-P dH.	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HMG Ac.	Acido 3-hidroxi-3-metilglutárico
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
³ H	Tritio
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MVA	Acido mevalónico
MVL	Mevalonolactona
NADP ⁺	Nicotin-adenin-dinucleótido
NADPH	Nicotin-adenin-dinucleótido reducido
³² P	Fósforo 32
p.m.	De la tarde
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoruro
PPO	2,5-Difeniloxazol
SDS	Dodecilsulfato sódico
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	N,N',N'-Tetrametilendiamida
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
1.- INTRODUCCION	
1.1. El colesterol.....	1
1.2. Biosíntesis del colesterol.....	2
1.2.1. Conversión del acetato en mevalonato.	3
1.2.2. Conversión del mevalonato en escualeno.....	4
1.2.3. Conversión del escualeno en colesterol.....	4
1.3. Transporte del colesterol en el organismo...	5
1.4. Regulación de los niveles de colesterol del organismo.....	6
1.4.1. HMG-CoA Reductasa, enzima regulador de la biosíntesis de colesterol.....	7
1.4.2. Tipos de regulación de la HMG-CoA Reductasa.....	9
1.4.2.1. Regulación a largo plazo....	9
1.4.2.2. Regulación a corto plazo....	13
1.4.3. Caracterización de la HMG-CoA Reductasa quinasa.....	15
1.4.4. Caracterización de la HMG-CoA Reductasa fosfatasa.....	18
2.- MATERIALES Y METODOS	
2.1. Productos y reactivos utilizados.....	20
2.2. Condiciones de los animales utilizados.....	22
2.3. Obtención de microsomas.....	22
2.3.1. Hepatectomía.....	23
2.3.2. Homogenización.....	23
2.3.3. Centrifugación y obtención de la fracción microsomal.....	23
2.3.4. Conservación de los microsomas.....	24
2.4. Purificación ha homogeneidad del enzima HMG-Coa Reductasa.....	25

2.4.1.	Obtención del soluble microsomal.....	25
2.4.2.	Concentración con sulfato amónico y calentamiento a 64°C.....	26
2.4.3.	Cromatografía en columna de Affi-Gel Blue.....	26
2.4.4.	Cromatografía en columna de HMG-CoA Agarosa.....	27
2.5.	Determinación de la actividad enzimática de enzima HMG-CoA Reductasa.....	29
2.5.1.	Ensayo de actividad enzimática según el método del sustrato marcado con ^{14}C	29
2.5.2.	Separación cromatográfica de (^{14}C)MVL del (^{14}C)HMG Ac.....	31
2.5.3.	Cuantificación de la (^{14}C)MVL formada..	32
2.5.4.	Ensayo de la actividad enzimática según el método del sustrato marcado con ^3H ..	32
2.5.5.	Separación y cuantificación de la (^3H)MVL formada.....	33
2.5.6.	Cálculo de las unidades de actividad Reductasa.....	33
2.6.	Determinación de la actividad enzimática del enzima HMG-CoA Reductasa quinasa.....	34
2.6.1.	Ensayo de actividad Reductasa quinasa sobre microsomas.....	35
2.6.2.	Prueba de microsomas.....	36
2.6.3.	Ensayo de actividad Reductasa quinasa sobre Reductasa homogénea.....	37
2.6.4.	Cálculo de las unidades de actividad Reductasa quinasa.....	38
2.7.	Ensayo de actividad Mevalonato quinasa.....	39
2.8.	Técnicas electroforéticas.....	40
2.8.1.	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de tipo placa.....	40
2.8.2.	Tratamiento de las muestra.....	42
2.8.3.	Marcadores de peso molecular.....	43
2.8.4.	Tinción del gel.....	44
2.8.5.	Electroforesis en geles de poliacrilamida de tipo cilíndrico.....	44

2.9. Ensayos de fosforilación con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	46
2.10. Determinación de la concentración de proteína	47
2.10.1. Método de Bradford.....	47
2.10.1. Medida directa de la absorbancia a 280 nm.....	48

3.- RESULTADOS

3.1. Purificación a homogeneidad aparente del en- zima HMG-CoA Reductasa quinasa de la fracción de citosol de hígado de rata.....	49
3.1.1. Obtención del citosol.....	49
3.1.2. Cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa.....	50
3.1.3. Concentración por precipitación con sulfato amónico.....	51
3.1.4. Cromatografía de afinidad en columna de Affi-Gel Blue.....	51
3.1.5. Cromatografía de filtración en gel en columna de Ultrogel AcA 34.....	52
3.1.6. Cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa.....	53
3.1.7. Cromatografía de afinidad en columna de ATP-Hexano agarosa.....	53
3.1.8. Cromatografía de adsorción en columna de Hidroxilapatita.....	54
3.2. Purificación rápida del HMG-CoA Reductasa qui- nasa de citosol de hígado de rata.....	55
3.2.1. Purificación a homogeneidad aparente del enzima HMG-CoA Reductasa quinasa modificada en función de los criterios que se exponen en el apartado (3.2.)..	56
3.2.1.1 Obtención del citosol.....	56
3.2.1.2 Cromatografía en "batch" de DEAE-celulosa.....	56
3.2.1.3 Concentración por precipita- ción con sulfato amónico.....	57
3.2.1.4 Cromatografía en columna de Affi-Gel Blue.....	57

3.2.1.5.	Concentración por precipitación con sulfato amónico.....	57
3.2.1.6.	Cromatografía en columna de <u>U</u> ltrogel ACA TM 34.....	58
3.2.1.7.	Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	58
3.2.1.8.	Cròmatografía en columna de ATP-hexano agarosa.....	58
3.2.1.9.	Cromatografía en columna de <u>H</u> idroxilapatita.....	59
3.3.	Electroforesis al 7,5% de poliacrilamida con SDS en geles tipo placa de alícuotas de la distintas epapas de la purificación.....	59
3.4.	Resultados globales del proceso de purificación del enzima HMG-CoA Reductasa quinasa de citosol de hígado de rata.....	59
3.5.	Determinación de la homogeneidad del enzima HMG-CoA Reductasa quinasa purificado.....	60
3.6.	Determinación del peso molecular del enzima HMG-CoA Reductasa quinasa.....	60
3.7.	Determinación del peso molecular de la subunidad del enzima HMG-CoA Reductasa quinasa citosólica.....	61
3.8.	Fosforilación e inactivación de HMG-CoA Reductasa homogénea por HMG-CoA Reductasa quinasa citosólica.....	61
3.9.	Efectos de los distintos nucleósidos difosfato sobre la actividad Reductasa quinasa.....	63
4.-	DISCUSION.....	65
5.-	CONCLUSIONES.....	69
6.-	BIBLIOGRAFIA.....	70

1.- INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. EL COLESTEROL

El colesterol es un metabolito presente prácticamente en todas las células eucariotas. Se trata de un compuesto esteroide incluido dentro del grupo de los menos polares. Su molécula, de 27 átomos de carbono, tiene la estructura básica del ciclopentanoperhidrofenantreno con una cadena lateral de 8 átomos de carbono. Como grupos funcionales presenta un doble enlace entre los átomos 5-6 y un grupo hidroxilo en el carbono 3.

En las células se encuentra en forma no esterificada como componente imprescindible de sus membranas, asociado a fosfolípidos y esfingolípidos. Participa en la configuración de las características físico-químicas de las membranas de forma que, variaciones en la concentración de colesterol en las mismas, influyen la capacidad catalítica de los enzimas unidos a esta estructura, el transporte de metabolitos, etc. Es un metabolito necesario tanto para el mantenimiento y reparación de las membranas de células estables como para la síntesis neta de estas estructuras en células proliferativas.

También determinadas células lo almacenan en su interior en forma esterificada con ácidos grasos de cadena larga.

Se halla en plasma unido a proteínas plasmáticas y otros lípidos en forma de complejos macromoleculares. Esterificado se sitúa en la parte central o "core" del complejo lipoproteico y en forma libre en la superficie externa del mismo. Este tipo de complejos actúan como medio de transporte de colesterol de unos órganos a otros en función de las necesidades.

El colesterol es imprescindible para la síntesis de hormonas de tipo esteroide: adrenocorticoides y hormonas sexuales. Los órganos destinados a la síntesis de estos compuestos tienen una alta demanda de colesterol que llega a ellos, unido a las proteínas plasmáticas, procedente de los órganos que lo sintetizan como el hígado.

El colesterol es igualmente precursor de la síntesis hepática de sales biliares, emulgentes importantes en la digestión intestinal de lípidos de la dieta, que tienen un papel en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol del organismo.

1.2. BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL

El colesterol es sintetizado por una vía metabólica constituida por unas 45 reacciones enzimáticas que partiendo del acetyl-CoA llegan a colesterol. A través de esta vía no sólo se puede obtener colesterol, sino también una serie de compuestos poliisoprenoides esenciales para las funciones celulares.

Los primeros trabajos fueron llevados a cabo por Bloch y col. en 1940 demostrando que todos los átomos de carbono de la molécula de colesterol procedían del acetato. Esto fue deducido por técnicas de marcaje con radioisótopos. Los animales de experimentación eran alimentados con acetato marcado con ^{14}C , bien en el átomo del grupo metilo o en el del grupo carboxilo. Se determinaba la radiactividad incorporada al colesterol por degradación química del mismo en cada caso. Se observó que prácticamente era la misma, concluyendo con ello, que ambos carbonos se incorporaban por igual a la molécula de colesterol. Por otra parte, mediante los productos obtenidos de la degradación sistemática, se pudo saber qué carbonos procedían del grupo metilo y cuales del grupo carboxilo del acetato.

Observaciones posteriores permitieron ir completando cada uno de los pasos de la ruta de biosíntesis del colesterol. Un hecho importante fue el descubrimiento, por parte de Langdom y Bloch, de que el escualeno, un hidrocarburo isoprenoide de cadena abierta (concretamente un dihidrotriterpeno), era un producto intermedio de esta ruta. Cuando se administraba acetato marcado, la radioactividad se incorporaba con un rendimiento muy elevado a la cadena abierta del escualeno. Administrando escualeno marcado, gran parte del isótopo aparecía incorporada al colesterol. Se llegó a la conclusión de que los cuatro anillos condensados del colesterol se formaban

por ciclación de la cadena abierta del escualeno.

Debido a la estructura isoprenoide del escualeno se dedujo que el colesterol se formaba a partir de unidades de isopreno. El paso de acetato a isopreno se realiza mediante la síntesis de un metabolito intermedio de gran relevancia en esta ruta: el ácido mevalónico.

Tradicionalmente la biosíntesis del colesterol se divide en tres etapas, que a su vez engloban varias reacciones enzimáticas:

- Conversión del acetato en mevalonato
- Conversión del mevalonato en escualeno
- Reacciones de ciclación que desde el escualeno rinden colesterol.

Las dos primeras etapas transcurren de forma anaeróbica, mientras que el paso de escualeno a colesterol requiere la presencia de oxígeno molecular.

1.2.1. CONVERSION DEL ACETATO EN MEVALONATO

La molécula del ácido mevalónico consta de 6 átomos de carbono y se forma por condensación de tres moléculas de acetato en forma activada de acetyl-CoA. El producto intermedio clave de este proceso es el HMG-CoA.

La primera reacción catalizada por el enzima tiolasa condensa dos moléculas de acetyl-CoA rindiendo acetoacetyl-CoA. Seguidamente se une una tercera molécula de acetyl-CoA por acción de la HMG-CoA sintasa, formándose el HMG-CoA.

En la mitocondria el HMG-CoA puede escindirse en acetoacetato y acetyl-CoA para la formación de cuerpos cetónicos, por acción enzimática de la HMG-CoA liasa. Sin embargo, este enzima no está presente en citosol donde el HMG-CoA sufre una reducción del grupo carbonilo esterificado con el coenzima A rindiendo mevalonato. Este proceso es catalizado por el enzima HMG-CoA Reductasa que utiliza como fuente de poder reductor NADPH.

Esta última reacción es un paso irreversible y constituye un importante aunque no único, punto de control de la biosíntesis del colesterol. Como se verá en apartados posteriores,

el enzima HMG-CoA Reductasa es modulable por numerosos efectos entre los que se encuentran el mevalonato y el colesterol.

1.2.2. CONVERSION DEL MEVALONATO EN ESCUALENO

La conversión de mevalonato a escualeno se realiza a través de sucesivos productos intermedios activados por fosforilación.

El mevalonato se convierte en una primera fosforilación, catalizada por la mevalonato quinasa, en 5-fosfomevalonato. Posteriormente, por la acción de la fosfomevalonato quinasa en 5-pirofosfomevalonato y el resultado de una tercera fosforilación rinde 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato. Este último compuesto es muy inestable y por descarboxilación y pérdida de un fosfato, rinde 3-isopentenil-pirofosfato. Esta reacción es llevada a cabo por la acción enzimática de la pirofosfo-mevalonato-descarboxilasa.

Por acción de una isomerasa el 3-isopentenil-pirofosfato se encuentra en equilibrio con su forma isomérica: 3,3-dimetilalilpirofosfato.

La unión cabeza-cola, catalizada por la dimetil-alil-transferasa, de estos dos isómeros forma geranyl-pirofosfato. Este mismo enzima une una tercera molécula de 3-isopentenil-pirofosfato rindiendo farnesil-pirofosfato de 15 átomos de carbono.

Dos moléculas de este mismo compuesto experimentan una condensación y posterior reducción formando finalmente escualeno.

1.2.3. CONVERSION DEL ESCUALENO EN COLESTEROL

En la última etapa de la biosíntesis del colesterol, el escualeno experimenta un ataque por el oxígeno molecular formando el 2,3-epoxi-escualeno, reacción catalizada por el enzima escualeno-monooxigenasa.

Por acción de una ciclasa, el epóxido del escualeno experimenta ciclación dando lanosterol. En esta reacción se producen una serie de desplazamientos electrónicos a través de

4 dobles enlaces que dan lugar a un desplazamiento concertado 1:2 de grupos metilo e hidruro, que termina produciendo el cierre de los cuatro anillos.

Finalmente el lanosterol se convierte en colesterol por eliminación de tres grupos metilo (dos del átomo de carbono 4 y uno del átomo de carbono 14), saturación del doble enlace de la cadena lateral y desplazamiento del doble enlace de la posición 8-9 a la 5-6.

1.3. TRANSPORTE DE COLESTEROL EN EL ORGANISMO

Para abastecer las necesidades de colesterol de las células del organismo éste debe ser transportado desde el hígado, principal órgano productor y receptor del colesterol de la dieta, a otros tejidos por vía plasmática.

El colesterol y sus ésteres, debido a su insolubilidad, viajan en plasma unidos a proteínas y otros lípidos, tales como triglicéridos y fosfolípidos, formando complejos macromoleculares denominados lipoproteínas.

Parte del colesterol utilizado por el organismo procede de la propia síntesis que tiene lugar principalmente en el hígado. A este órgano también llega el colesterol exógeno transportado por los quilomicrones, que una vez han perdido los triglicéridos, son captados por el tejido hepático por procesos de endocitosis. Si el aporte de colesterol de la dieta es elevado se frena la síntesis hepática del mismo y viceversa (1) incrementando la actividad del enzima HMG-CoA Reductasa.

El colesterol sale del hígado incorporado, junto a triglicéridos, a proteínas formando un complejo denominado VLDL que es el encargado primario de la distribución de colesterol y triglicéridos a las células del organismo (2).

En los capilares las VLDL interaccionan con la Lipoproteínlipasa liberando la mayor parte de los triglicéridos, que ingresan mayoritariamente en el tejido adiposo. A causa de esta pérdida, el complejo lípido-proteína aumenta su densidad y disminuye su tamaño transformándose en IDL. Ya en la circulación, acaban de perder los triglicéridos res-

tantes y algunas apoproteínas, convirtiéndose en LDL cuya composición lipídica es esencialmente colesterol y ésteres de colesterol. Estas son las encargadas de la distribución de colesterol a los tejidos extrahepáticos (3).

Las LDL son captadas por las células que necesitan colesterol a través de receptores específicos de LDL, descubiertos por Anderson, Goldstein y Brown (4), con los que forman complejos de gran afinidad y se internalizan por endocitosis (5,6).

Las LDL en la célula sufren procesos de degradación de las proteínas que llevan en los lisosomas liberando así el colesterol y sus ésteres. Estos últimos son hidrolizados por una lipasa ácida (6,7).

Debido a la oportunidad de captar colesterol exógeno en cantidad suficiente por parte de las células extrahepáticas, éstas tienen inhibida la síntesis de este metabolito mediante la disminución de la actividad HMG-CoA Reductasa (8,9).

Cuando en la célula se produce un exceso de colesterol libre, entran en juego varios mecanismos para evitar que la concentración intracelular de este metabolito siga aumentando: represión de la actividad HMG-CoA Reductasa, represión en la formación de receptores de LDL y estimulación de la actividad del enzima Acil-CoA-colesterol-acil transferasa (ACAT) que esterifica al colesterol libre (3).

1.4. REGULACION DE LOS NIVELES DE COLESTEROL DEL ORGANIS

MO

El principal órgano de mantenimiento de la homeostasis de colesterol es el hígado. Este órgano tiene tres fuentes de colesterol:

- Biosíntesis "de novo" por una vía metabólica regulada principalmente por la actividad del enzima HMG-CoA Reductasa.

- Obtención a partir de las LDL circulantes; este proceso está regulado por el número de receptores de LDL

hepáticos.

- Captación de colesterol de la dieta que viene regulada por los hábitos dietarios del individuo.

La salida del colesterol hepático puede realizarse por dos vías:

- Síntesis de VLDL para su exportación a tejidos extrahepáticos.

- Síntesis hepática de sales biliares que serán excretadas por vía biliar al intestino. Esta ruta de síntesis está regulada por el enzima Colesterol 7- α -hidrolasa.

La regulación coordinada de todos estos factores influye directamente en los niveles plasmáticos de LDL.

1.4.1. HMG-CoA REDUCTASA, ENZIMA REGULADOR DE LA BIOSINTE- TESIS DE COLESTEROL

Tanto "in vivo" como "in vitro" el mevalonato es convertido a colesterol más rápidamente que el HMG-CoA por lo que se aceptó, y otros hechos lo han confirmado posteriormente, que el enzima HMG-CoA Reductasa es el enzima limitante, aunque no el único, en la biosíntesis de colesterol (10).

El enzima HMG-CoA Reductasa (Mevalonato:NADP oxidorreductasa, E.C.1.1.1.34) es una proteína de transmembrana localizada en el retículo endoplasmático y cataliza la reacción de reducción, dependiente de NADPH, del HMG-CoA a mevalonato.

Para proceder a su estudio tradicionalmente se ha solubilizado de los microsomas, para ello se han descrito distintas técnicas como solubilización por deoxicolato (11), congelación y descongelación de los microsomas (11,12), congelación y descongelación en presencia de glicerol al 50% (12), incubación de los microsomas con KCl 4 M (11)...

La Reductasa microsomal es un enzima estable tanto al frío como al calor. Cuando está solubilizada es sensible al frío y se inactiva reversiblemente a temperaturas bajas. La actividad es restaurada por calentamiento a 37 grados

(13,14).

Por otra parte es estable a temperaturas elevadas, propiedad que se aprovecha durante la purificación del enzima en el método propuesto por Ness y col. (15).

En la bibliografía han sido aportados datos muy heterogéneos acerca del peso molecular del holoenzima y de sus subunidades. Esta diversidad era debida a la técnica de solubilización empleada. En 1982, Beg y Osborne (16) aislaron a una aparente forma holoenzimática de la Reductasa, cuyo peso molecular determinado por gel filtración y por equilibrio de sedimentación correspondía a 320.000 daltons. El peso molecular de sus subunidades determinado en SDS-PAGE fue de 52.000 y 54.000 daltons.

Otros autores como Heller y col (17) y Kleisek y col. (18) propusieron como peso molecular del holoenzima 200.000 daltons, determinado por gel filtración.

Por otra parte Ness y col. (19) observaron que las técnicas de solubilización del enzima por congelación y descongelación eran dependientes de tior-proteasas. Esto implicaba que el enzima obtenido por dichas técnicas era una forma proteolizada del nativo.

En 1982 Chin y col. (20) solubilizando Reductasa con detergentes y en presencia de leupeptina y PMSF, inhibidores de tior-proteasas, encontraron un peso molecular de la subunidad de 62.000 daltons.

Estos mismos autores (21) han conseguido inmunoprecipitar Reductasa obteniendo un peso molecular de la subunidad de 90.000 daltons. La forma de 62.000 daltons aparecía a partir de la de 90.000 daltons por acción de proteasas dependientes de calcio.

Actualmente se ha establecido el peso molecular de la subunidad, por secuenciación de aminoácidos, en 97.000 daltons para la Reductasa de células de ovario de hamster (22).

Ness y Mc Creery (23) han aportado un peso molecular del holoenzima de 1.200.000 daltons, utilizando técnicas de radiación de la Reductasa microsomal en un acelerador lineal. Esta forma holoenzimática sería un decámero.

1.4.2. TIPOS DE REGULACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Como figura en el esquema I, propuesto por Gibson, el enzima HMG-CoA Reductasa está sometido a dos tipos de regulación a través de señales endocrinas y de tipo "feed back":

- Regulación a largo plazo que afecta a la cantidad de enzima.

- Regulación a corto plazo que afecta a la capacidad catalítica del enzima.

Los primeros muestran sus efectos a largo plazo actuando sobre la síntesis y degradación del enzima, mientras que los segundos tienen efectos más rápidos actuando sobre el nivel de fosforilación del enzima.

1.4.2.1. REGULACION A LARGO PLAZO

En la regulación a largo plazo o sobre la cantidad de enzima pueden diferenciarse tres tipos de mecanismos:

- Ciclo circadiano de la HMG-CoA Reductasa.

La actividad HMG-CoA Reductasa está sometida a una amplia variación diurna, siendo de hasta diez veces la relación de actividad en el máximo respecto al mínimo.

Esta variación de la actividad está asociada a la pauta de alimentación y no al ciclo de luz-oscuridad al que se encuentran sometidos los animales (24).

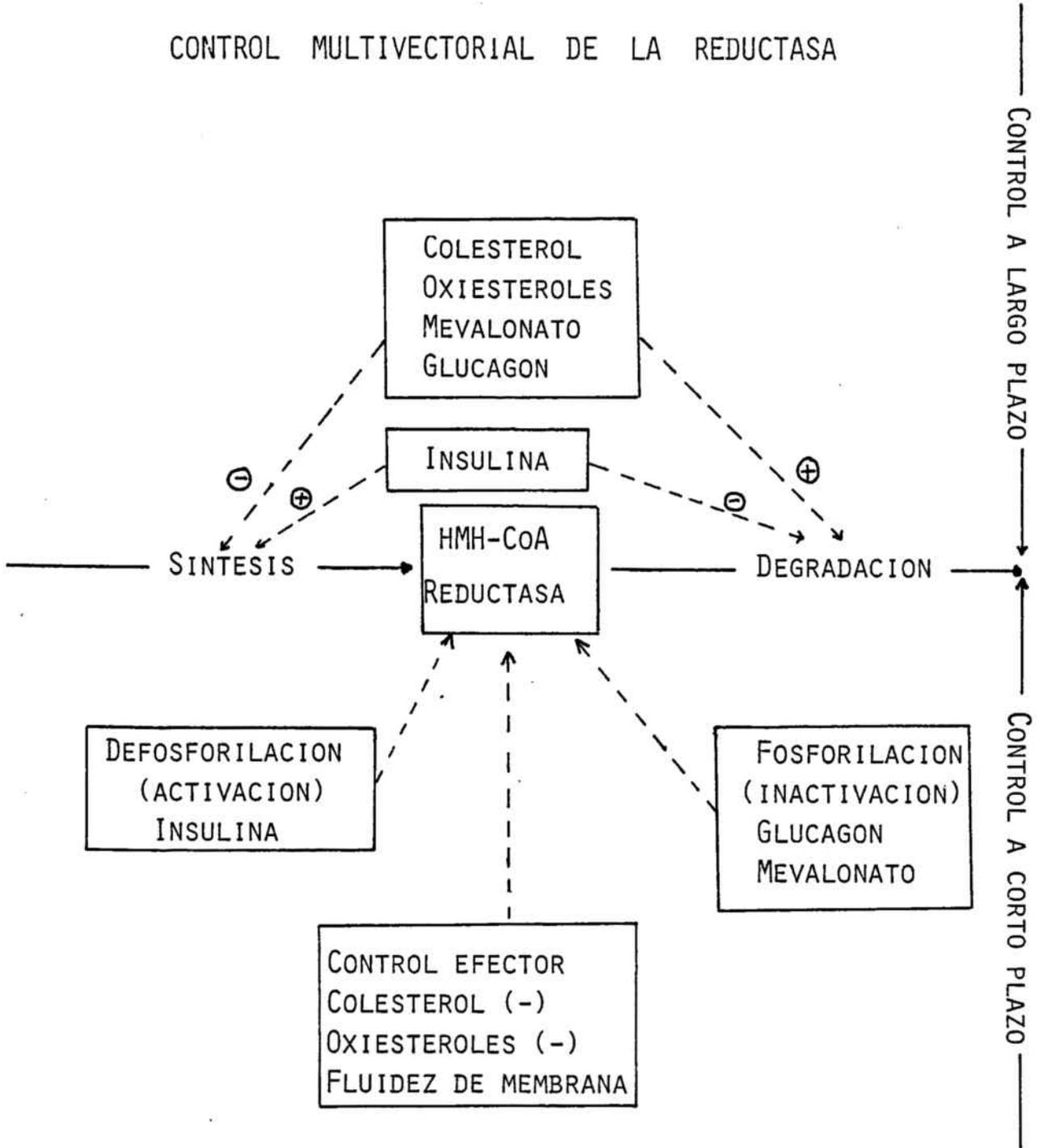
En ratas mantenidas a periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad controladas, y debido a los hábitos alimentarios nocturnos de estos animales, la actividad Reductasa alcanza un máximo a las seis horas de haberse iniciado la fase oscura y cae al mínimo seis horas después del comienzo de la fase iluminada (25,24).

Gran número de trabajos (26,24,27) apoyan la idea de que los cambios de actividad Reductasa, que se producen durante el ciclo, son debidos a variaciones de su velocidad de síntesis, pues pueden inhibirse por sustancias como puromicina y cicloheximida. Higgins y col. (24) demostraron estas variaciones en la velocidad de síntesis

E S Q U E M A I

CONTROL MULTIVECTORIAL DEL ENZIMA
HMG-CoA REDUCTASA

CONTROL MULTIVECTORIAL DE LA REDUCTASA



de la Reductasa midiendo la incorporación de leucina-tritiada a la HMG-CoA Reductasa purificada.

Edwards y Gould (28) demostraron la existencia de este ciclo "in vivo" y observaron que el incremento de actividad Reductasa era inhibido por actinomicina D, sugiriendo que este incremento era debido a la síntesis de mRNA. Posteriormente Edwards (29) demostró que el ritmo cíclico al que estaba sometida la actividad de la Reductasa coincidía con el ritmo que sufría la Reductasa como proteína y los niveles de mRNA para la Reductasa.

Es importante tener en cuenta que este fenómeno en los procesos de purificación de este enzima puesto que, la cantidad que se obtiene puede variar mucho en función de la hora del ciclo a la que se sacrifican las ratas.

- Señales tipo "feed-back".

Gran variedad de esteroides oxigenados, alguno de los cuales se producen durante la biosíntesis de colesterol, el mismo colesterol y productos no esteroideos como el mevalonato y derivados de su metabolismo, son potentes inhibidores de la actividad HMG-CoA Reductasa.

Ha sido descrito por varios autores (25,30) que la actividad Reductasa disminuye cuando los animales son alimentados con una dieta rica en colesterol.

Goldstein y Brown (31) en cultivos de fibroblastos conseguían disminuciones de un 98% de la actividad Reductasa cuando añadían al medio LDL. Sin embargo no se conseguía anular totalmente dicha actividad enzimática, por lo que estos autores concluyeron que otros productos derivados del mevalonato eran también importantes para la célula y que, sólo se anulaba la actividad Reductasa cuando la célula estaba totalmente abastecida de estos metabolitos.

Esto fue probado posteriormente, por estos mismos autores, añadiendo compactina, un inhibidor competitivo de la Reductasa descubierto por Endo y col. (32), y LDL. En estas condiciones la producción residual de

mevalonato se suprimía y la célula respondía aumentando la cantidad de Reductasa para vencer dicha inhibición. Por otra parte pequeñísimas cantidades de mevalonato eran capaces de inhibir la actividad residual de Reductasa que quedaba en las células en presencia de LDL.

Estos autores concluyeron que la regulación por "feed-back" de la Reductasa se llevaba a cabo por lo menos por dos tipos de mediadores: el colesterol y derivados y los productos derivados del mevalonato. En este tipo de regulación por "feed-back" multivalente cada uno de los productos finales puede inhibir parcialmente al enzima, pero sólo la actuación simultánea de todos ellos lo anula totalmente.

Ha sido muy discutido el mecanismo de esta inhibición por "feed-back". El colesterol parece que actúa inhibiendo la síntesis del enzima (33,34). Generalmente con la administración de colesterol se observan dos tipos de fenómenos, un primer efecto a corto plazo de inactivación del enzima y otro a largo plazo de disminución de la síntesis del enzima (35,36,37). Este efecto también se observa con la administración de mevalonolactona (38).

Edwards y col. (40) demostraron que la administración de mevalonolactona inhibía la actividad Reductasa y paralelamente los niveles de su mRNA. Estos mismos datos fueron aportados por Goldstein y Brown (31) y por Sinensky y col. (41).

Por otra parte Sinensky y Logel (42) describieron que una serie de oxisteroles disminuían la vida media de la Reductasa, que en condiciones normales es de 3 horas aproximadamente (28), incrementando su velocidad de degradación. Esto ha sido confirmado por otros autores (43).

El mecanismo directo de como pueden estos productos interferir en las velocidades de síntesis y/o degradación de la Reductasa no se ha dilucidado todavía. Hay evidencias (44) de que el colesterol no esterificado

se une a cromatina. Otros autores como Kandutsch (45) proponen que los oxisteroles transportados por una proteína "carrier" citosólica específica (7,5 s) son la señal que puede actuar reprimiendo la síntesis de Reductasa a nivel de traducción o de transcripción.

También se ha de considerar que el colesterol y otros esteroides pueden afectar directamente a la Reductasa por modificación de la naturaleza fisico-química de la membrana donde se halla inmersa. Este hecho podría afectar a la conformación de la Reductasa y consecuentemente a su actividad catalítica (46).

- Efectos hormonales sobre la HMG-CoA Reductasa.

Las hormonas que tienen efecto sobre el enzima HMG-CoA Reductasa pueden englobarse en dos categorías:

- Factores mitogénicos que dan lugar a la proliferación celular.

- Hormonas reguladoras de las funciones celulares.

Los factores mitogénicos que estimulan la proliferación celular producen aumentos en la demanda de colesterol, por parte de la célula, para la formación de nuevas membranas. Recientemente algunos trabajos indican que la Reductasa tendría un papel importante en estos procesos (47,48).

El grupo de Porter (49,50) estudió la importancia de la insulina en el mantenimiento del ciclo circadiano de la Reductasa. Demostraron que la administración de esta hormona, independientemente a la administración de comida, aumentaba la síntesis de Reductasa. Estos autores sugirieron que la presencia de insulina era necesaria para mantener la fluctuación normal de la actividad Reductasa.

El glucagón y el AMPc disminuyen marcadamente el aumento normal de la actividad Reductasa durante el ciclo (51,52).

Estudios realizados por Lacksnann y col (49) sobre el efecto de la insulina en la actividad Reductasa, pu-

sieron de manifiesto un aumento en la actividad de este enzima como resultado de la administración de la hormona, tanto en ratas normales como en ratas diabéticas. También observaron que la respuesta a la insulina era totalmente contrarrestada por el glucagón cuando éste se administraba antes que la insulina.

La inducción de la actividad Reductasa producida por la insulina no va acompañada de cambios en los niveles de colesterol hepático, aunque dietas ricas en colesterol impiden la estimulación insulínica no parece probable que el mecanismo de acción de la insulina tenga como señal al colesterol (50).

La insulina y el glucagón pueden tener efecto a corto plazo favoreciendo la defosforilación (53) o la fosforilación de la Reductasa respectivamente.

Efectos estimuladores mucho menores se observan bajo la acción de las hormonas tiroideas (54).

En cuanto a otras hormonas como las sexuales, estrógenos, progestágenos y andrógenos, tienen efectos inhibitorios de la actividad Reductasa (55,) sin embargo, no se sabe si es por su capacidad hormonal o por ser análogos del colesterol.

Los datos publicados acerca de los efectos de las hormonas adrenocorticales son altamente contradictorios.

1.4.2.2. REGULACION A CORTO PLAZO

Además de los mecanismos de regulación a largo plazo descritos en los apartados precedentes, la actividad del enzima HMG-CoA Reductasa es también modulable en un plazo más breve por mecanismos de fosforilación y defosforilación que conllevan inactivación y activación respectivamente.

Los primeros indicios de este fenómeno fueron aportados por Beg y col. (56) que observaron inactivaciones rápidas de la actividad HMG-CoA Reductasa en microsomas tratados con ATP/Mg. Este cambio en el estado de activi

dad Reductasa no era revertida por lavado posterior de los microsomas con la consecuente eliminación del ATP y del Mg del medio. Tampoco se perdía durante el tiempo de almacenamiento.

Una actividad inactivadora de la Reductasa, dependiente de ATP/Mg fue detectada posteriormente en citosol.

En ausencia de ATP/Mg la actividad Reductasa microsomal inactivada podía reactivarse en presencia de fracciones protéicas procedentes del citosol.

Esta posible modulación de la Reductasa por fosforilación reversible fue confirmada por Rodwell y col. (10) quienes utilizando enzimas semipurificados vieron que la reactivación de la Reductasa era inhibida en presencia de fluoruro, conocido inhibidor de protein fosfatasas.

Más evidencias a este fenómeno fueron aportadas por distintos autores; Berndt y col. (58,59) reportaron que la activación era dependiente de tiempo y de temperatura, y que cuando la fuente de activador se trataba con tripsina, la activación no tenía lugar.

Los primeros trabajos de Beg y col. con hígado de rata fueron confirmados por Brown y col. en extractos de fibroblastos (60).

Posteriormente, Bové y Hegardt (61) consiguieron inactivaciones de la Reductasa microsomal en ausencia de factores citosólicos y después de haber lavado los microsomas varias veces. La inactivación era revertida por incubación con citosol. Este proceso era inhibido en presencia de fluoruro sódico.

Estos mismos autores demostraron que la incorporación de ^{32}P a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a microsomas iba paralela a la inactivación del enzima HMG-CoA Reductasa. La adición de citosol restauraba la actividad y simultáneamente liberaba ^{32}P ligado a proteína.

Gil y col. (62) obtuvieron evidencias más directas cuando inactivando Reductasa en microsomas con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP/Mg}$, solubilizándola, purificándola y someténdola a

electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, observaron que el ^{32}P comigraba con la banda de Reductasa. Por otra parte cuando el enzima marcado con ^{32}P y purificado se incubaba con fosfatasa parcialmente purificada, se producía la liberación de ^{32}P de la banda de Reductasa y esto era paralelo a la recuperación de la actividad enzimática.

Esto fue confirmado por Rodwell y Rudney (63,64) que obtuvieron Reductasa homogénea unida covalentemente unida a ^{32}P . También Beg y col. (65) detectaron ^{32}P unido a inmunoprecipitados obtenidos utilizando un antisuero anti-Reductasa sobre microsomas incubados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y Mg.

Fue descrito un método para obtener Reductasa homogénea con una elevada radioactividad específica por fosforilación de la Reductasa una vez solubilizada (66). Esto permitía realizar estudios de fosforilación y defosforilación con mayor sensibilidad.

Por tripsinización de la Reductasa marcada con ^{32}P , Font y col. (67) demostraron que el fosfato se incorporaba al menos en dos centros. Estos datos fueron confirmados por Keith (68) que además aportó que la fosforilación era sobre residuos de serina.

Todos estos resultados permiten concluir que la HMG CoA Reductasa es un enzima interconvertible por fosforilación y defosforilación, siendo su forma activa la defosforilada y su forma inactiva la fosforilada. La existencia de este proceso necesita de actividades enzimáticas que lo lleven a cabo: Reductasa quinasa y Reductasa fosfatasa.

1.4.3. CARACTERIZACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA

Debido a que la capacidad de inactivar a la Reductasa fue detectada tanto en microsomas como en citosol (57), ambas fracciones celulares eran posibles fuentes de actividad Reductasa quinasa.

Beg y col. (69) purificaron a homogeneidad aparente

una actividad Reductasa quinasa de microsomas de hígado de rata. El peso molecular del holoenzima era de 380.000 daltons y de 58.000 daltons el de sus subunidades. Sin embargo no demostraron que esta proteína purificada fosforilase a la Reductasa.

Posteriormente Ferrer y Hegardt (70) purificaron a homogeneidad aparente una Reductasa quinasa microsomal. El peso molecular correspondiente al holoenzima era de 205.000 daltons y el de la subunidad de 105.000. Esta preparación incorporaba ^{32}P a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y Mg a la Reductasa homogénea. La tripsinización de esta Reductasa marcada daba lugar a la aparición de un único péptido fosforilado que coincidía con uno de los descritos por Font y col. (67).

Nordstrom y col. (71) purificaron parcialmente, por precipitación con sulfato amónico y cromatografía en DEAE Sephadex, una actividad Reductasa quinasa a partir de citosol y obtuvieron un peso molecular del holoenzima de 200.000 daltons.

Segun estudios de distribución subcelular de la actividad Reductasa quinasa, llevados a cabo por Ingebritsen y col. (72), la Reductasa quinasa sería un enzima citosólico y la actividad que aparece en microsomas sería debida a la unión inespecífica de este enzima a las membranas del retículo endoplásmico. Sin embargo estos datos son contradictorios con los trabajos de Bové y Hegardt (61) en los que se encontraban con actividad Reductasa quinasa en microsomas lavados tres veces.

Se examinaron los requerimientos de nucleótidos (71, 60) para la inactivación de la Reductasa. El ADP y el ATP fueron casi igualmente activos debido a que rápidamente pueden interconvertirse por acción de la adenilato quinasa. Sin embargo cuando se añadía ATP o ADP y el sistema regenerador correspondiente para cada nucleótido, la inactivación era bloqueada (73).

Estos y otros estudios indican que la inactivación requiere de la presencia de ambos nucleótidos, ATP y ADP. Nordstrom y col. (71) demostraron que la inactivación era

más efectiva cuando la relación ATP/ADP era equimolecular. Postularon que el ADP actuaba inhibiendo las fosfatasa del medio.

Recientemente se ha descrito al ADP como un activador alostérico de la Reductasa quinasa citosólica (74).

Ness y col. reportaron que la inactivación de la Reductasa no era tal (75), sino que este fenómeno se debía a la presencia del enzima mevalonato quinasa en las preparaciones de Reductasa quinasa. Este consumía el mevalonato transformado por la Reductasa, rindiendo fosfomevalonato lo cual daba lugar a una aparente descenso de la actividad Reductasa. Beg y col. (76) demostraron que ambas actividades, Mevalonato quinasa y Reductasa quinasa, eran distintas y separables por procesos cromatográficos. Ferrer y Hegardt (70) demostraron que su preparación de Reductasa quinasa microsomal estaba exenta de actividad Mevalonato quinasa.

La preincubación de los microsomas a 37 °C durante dos horas (71) daba lugar a una disminución de la capacidad inactivadora de la Reductasa quinasa microsomal sobre la Reductasa. Esta inactivación de la Reductasa quinasa no se producía si en la preincubación a 37 °C se añadía fluoruro potásico 100 mM (77). Todo ello apuntaba a que la Reductasa quinasa era también un enzima interconvertible por fosforilación y defosforilación. En este caso la forma activa sería la fosforilada y la inactiva la defosforilada. Los enzimas encargados de la interconversión de las formas de la Reductasa quinasa eran una protein fosfatasa y la Reductasas quinasa quinasa. Datos similares se encontraron para la Reductasa quinasa citosólica.

Ingebritsen (77) y también Beg (78) purificaron Reductasa quinasa quinasa a partir de citosol de hígado de rata. El grupo de Beg demostró que la incubación de Reductasa quinasa con Reductasa quinasa quinasa y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ daba lugar a un aumento de la actividad Reductasa quinasa y paralelamente a un aumento de ^{32}P ligado a proteína. En ambos casos existía una dependencia de tiempo. La incuba-

ción de Reductasa quinasa fosforilada con protein fosfatasa daba lugar a una disminución del ^{32}P ligado a proteína simultáneamente a la pérdida de actividad Reductasa quinasa.

Datos aportados por Ingebritsen y col. (72) apuntan a que ambas protein quinasas, Reductasa quinasa y Reductasa quinasa quinasa son independientes de AMPc.

Recientemente se ha descrito (79) que la administración de mevalonolactona a ratas "in vivo" y va asociada a una inactivación de la HMG-CoA Reductasa en los primeros 20 minutos después de la administración. Esto parece ser debido a dos hechos, a un aumento de la fosforilación de la Reductasa y de la Reductasa quinasa por incremento de la actividad Reductasa quinasa quinasa, y a una disminución de la defosforilación de la Reductasa y de la Reductasa quinasa por una inhibición de las protein fosfatasas. El mecanismo de activación "in vivo" de la Reductasa quinasa quinasa es todavía desconocido.

Beg y col. (80) han descrito la fosforilación y consecuente inactivación de la HMG-CoA Reductasa por la protein quinasa C purificada de cerebro de rata.

Se ha sugerido, por relación con otras proteínas como la Piruvato quinasa (81), que la fosforilación de la Reductasa podría incrementar su susceptibilidad a la degradación. Recientes trabajos (82) realizados "in vitro" indican que la forma de 97.000 daltons fosforilada es más fácilmente proteolizable que la defosforilada.

1.4.4. CARACTERIZACION DE LA HMG-CoA REDUCTASA FOSFATASA

Los primeros investigadores que purificaron una actividad Reductasa fosfatasa a partir de citosol de hígado de rata fueron Nordstrom y col. (71). La preparación obtenida era capaz de restablecer, en un proceso dependiente de tiempo, la actividad Reductasa de microsomas inactivados previamente con ATP/Mg. Esta actividad era inhibida en presencia de fluoruro sódico 50 mM.

En nuestro laboratorio fueron aisladas dos Reductasa

fosfatasas de alto peso molecular, denominadas Ia y IIa, que por tratamiento con etanol daban lugar a dos fosfatasas de bajo peso molecular (35.000 daltons), Ib y IIb respectivamente (83). Se comprobó su actividad Reductasa fosfatasa por su capacidad de defosforilar a Reductasa homogénea marcada con ^{32}P al mismo tiempo que la activaba.

Fue sugerido por estos autores que dichas Reductasa fosfatasas tenían un caracter metaloenzimático debido a que eran inhibidas por pirofosfato, fluoruro, ácidos policarboxílicos y azúcares fosforilados y reactivadas por cationes divalentes como Mg y Mn. La presencia de estos cationes activaba a las Reductasa fosfatasas (84,85,86).

Tres actividades Reductasa fosfatasa fueron aisladas a partir de microsomas de hígado de rata (87).

En estudios realizados posteriormente (88) se comprobó que las Reductasa fosfatasas aisladas por Gil y col. presentaban también actividad sobre otras fosfoproteínas del metabolismo del glucógeno (glucógeno fosforilasa, glucógeno sintasa y fosforilasa b quinasa) identificándolas con las protein fosfatasas descritas por Cohen (89, 90,91).

Por todo lo descrito en la literatura internacional se ha comprobado que las protein fosfatasas son enzimas con una amplia especificidad de sustrato.

A la vista de los resultados expuestos se ha sugerido que la HMG-CoA Reductasa estaría regulada por un sistema bicíclico (65,77) basado en la interconversión por fosforilación y defosforilación de este enzima por la acción de la Reductasa quinasa y la Reductasa fosfatasa. El mismo proceso sufriría la Reductasa quinasa con la participación de la Reductasa quinasa quinasa y protein fosfatasas.

2.- MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. PRODUCTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS

Los productos y reactivos utilizados para la confección de esta memoria vienen detallados a continuación, agrupados bajo el nombre de las firmas comerciales que los han suministrado:

- "BIO-RAD"

Affi-Gel Blue
Acrilamida
Coomassie Blue Brilliant R- 250
Hidroxilapatita (Bio-Rad-HT)
Persulfato amónico
SDS
TEMED

- "BOEHRINGER MANNHEIN"

Alcohol deshidrogenasa de levadura
Aldolasa de músculo de conejo
Catalasa de hígado de buey
DTT

- "DIFCO"

Agar noble

- "MERCK"

Cloruro de sodio
Cloruro de potasio
Fluoruro de sodio
Fosfato monosódico
Glicina
2- Mercaptoetanol
Pirofosfato de sodio
Sacarosa
Silicagel 60 HF₂₅₄₊₃₆₆
Sulfato amónico
TCA

-"KOCH-LIGHT"

Acetona
Benceno
Metoxietanol
Naftaleno
Tolueno

-"LKB"

Ultrogel AcA 34

-"P-L BIOCHEMICALS"

ATP-Hexano Agarosa

-"SIGMA"

Benzamidina
EDTA
EGTA
Glicerol
G-6-P
G-6-P Dh.
HMG-Ac.
MVL
NADP
Ovoalbúmina
PMSF
PPO
Seroalbúmina
Tris

-"WHATMAN"

DEAE-celulosa (DE-32)

2.2.CONDICIONES DE LOS ANIMALES UTILIZADOS

Las ratas que se utilizaban tanto para la obtención de Reductasa como de Reductasa quinasa eran de la raza Sprague-Dawley y su peso oscilaba entre 200 y 250 g.

Las ratas que se destinaban a la obtención de Reductasa quinasa eran alimentadas "ad libitum" con una dieta de pienso "rata ratón cría", suministrada por Panlab, y agua potable. Eran distribuídas en jaulas con un máximo de cinco animales en cada una de ellas.

A los animales destinados a ser fuente de HMG-CoA Reductasa, cinco días antes de ser sacrificados se les sustituía la dieta normal por una que contenía además un 5% de colestiramina. Paralelamente eran distribuidos en jaulas de una en una para evitar cualquier tipo de excitación que da lugar a una disminución del rendimiento en la solubilización del enzima Reductasa.

Las ratas se mantenían en condiciones de temperatura y humedad adecuadas y se sometían a un ciclo constante de luz artificial por periodos de doce horas de luz, comprendidas entre las 3 p.m. y las 3 a.m., y las doce horas restantes de oscuridad. Esta ciclación evitaba que sobre los animales influyesen las variaciones estacionales de los periodos de luz--oscuridad, parámetro importante en el caso de enzimas que sufren variaciones de tipo circadiano como es el caso de la Reductasa.

2.3. OBTENCION DE MICROSOMAS

La Reductasa, sustrato de la Reductasa quinasa, es un enzima que se halla inserto en las membranas del retículo endoplasmático. Estas membranas por el proceso de obtención forman artefactos denominados microsomas.

La fracción microsomal, rica en Reductasa, se ha empleado para seguir y medir la actividad Reductasa quinasa que eluia de las distintas etapas de purificación.

La Reductasa es un enzima, como ya se ha descrito, que puede hallarse en dos formas: fosforilada (inactiva) y de-

fosforilada (activa). Como en este trabajo se trataba de poner de manifiesto la actividad del enzima que le une fosfatos, era necesario obtener Reductasa defosforilada. Esto se conseguía omitiendo la presencia de inhibidores de fosfatasas durante los procesos de obtención, bien sea de microsomas o de Reductasa homogénea.

2.3.1. HEPATECTOMIA

Las ratas eran sacrificadas por decapitación con una guillotina a las 9 a.m.. Esta hora correspondía con el punto del ciclo en que las células tenían una mayor cantidad de Reductasa.

Se procedía a la disección del animal y se le extirpaba el hígado que se sumergía en solución amortiguadora I manteniéndose a 4 °C en un baño de hielo. A partir de este punto todas las operaciones se realizaron a 4°C.

La solución amortiguadora I estaba compuesta por:

KH_2PO_4	40 mM	pH 7,2
Sacarosa	100 mM	
KCl	50 mM	
EDTA	30 mM	
DTT	5 mM	
Agua dest.	c.s.	

A continuación el hígado se secaba sobre un papel de filtro y se pesaba.

2.3.2. HOMOGENIZACION

La homogeneización se llevaba a cabo durante 30 seg. en un homogeneizador "Potter-Elvehjem" con pistilo de teflón. El medio de homogeneización era la solución amortiguadora I que se añadía en una relación de 3 ml por cada gramo de hígado.

2.3.3. CENTRIFUGACION Y OBTENCION DE LA FRACCION MICROSO MAL

El homogeneizado obtenido se sometía a centrifugación

a 30,000 x g durante 30 minutos, en una centrífuga Sorvall modelo RC-2B equipada con un rotor angular tipo SS-34.

Esta operación eliminaba por precipitación células enteras, núcleos, membranas y lisosomas.

El sobrenadante, después de filtrado a través de lana de vidrio para eliminar la materia grasa, se sometía a ultracentrifugación a 105,000 x g durante 120 minutos en una centrífuga Beckman modelo L5-65B equipada con un rotor angular tipo Ty-35. El precipitado formado estaba compuesto de retículo endoplasmático y ribosomas y constituía la fracción microsomal.

El precipitado era resuspendido y homogeneizado en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 2.3.2. con solución amortiguadora I en proporción de 2 ml por cada gramo de hígado inicial.

El nuevo homogeneizado se sometía a ultracentrifugación a 105,000 x g durante 60 minutos.

2.3.4. CONSERVACION DE LOS MICROSOMAS

El precipitado obtenido en la última ultracentrifugación era resuspendido y homogeneizado en un homogeneizador manual de vidrio con pistilo del mismo material. El medio de homogeneización era la solución amortiguadora de microsomas que estaba compuesta por:

Tris-HCl	50 mM	pH 7,2
Sacarosa	100 mM	
KCl	50 mM	
DTT	5 mM	
Agua dest.	c.s.	

El volumen de esta solución que se empleaba en la homogeneización guardaba la relación de 1 ml por cada 5 gramos de hígado, de forma que la concentración de proteína era de alrededor de 25-30 mg/ml.

El homogeneizado era repartido en alicuotas de 0,1 ml que se guardaban congeladas a -20 °C hasta el momento de usarlas.

2.4. PURIFICACION A HOMOGENEIDAD DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA

La Reductasa homogénea se ha utilizado en este trabajo para correlacionar cinéticas de inactivación de este enzima con la incorporación al mismo de ^{32}P a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ por catálisis en ambos casos de la Reductasa quinasa citosólica.

Para la obtención de Reductasa homogénea se siguió parcialmente el método descrito por Ness y col (15) y parte del propuesto por Brown y col. (92). La conjugación de ambos métodos, con la introducción de modificaciones en nuestro laboratorio, permitió establecer el método de purificación a homogeneidad de la Reductasa, que a continuación se detalla.

2.4.1. OBTENCION DEL SOLUBLE MICROSOMAL

Las ratas destinadas a la purificación de la HMG-CoA Reductasa, cinco días antes de su sacrificio, eran distribuidas individualmente en jaulas y alimentadas con una dieta de pienso que contenía un 5% de colestiramina (93). El sacrificio era por decapitación con guillotina a las seis horas del periodo de oscuridad, que correspondía a las 9 a.m. A esta hora del ciclo la actividad y la cantidad de Reductasa que contenían los hepatocitos era máxima.

El primer paso de la purificación era la obtención de microsomas y para ello se seguía una pauta análoga a la descrita en el apartado 2.3.

Una vez obtenidos los precipitados de la fracción microsomal se congelaban directamente en nitrógeno líquido.

Seguidamente se homogeneizaban con solución amortiguadora I a la que se había adicionada un 50% de glicerol. Esta operación se realizaba a temperatura ambiente con un homogeneizador de vidrio con pistilo del mismo material. La cantidad de solución amortiguadora empleada era de 1 ml por cada 9 gramos de hígado.

El homogeneizado se incubaba una hora a temperatura

ambiente; transcurrido este tiempo se diluía con solución amortiguadora I hasta llegar a una relación 1:1 con respecto al peso de hígado. Seguidamente se centrifugaba a 105,000 x g durante 120 minutos a 15 °C.

El soluble obtenido se guardaba congelado a -80 °C.

El nuevo precipitado de microsomas era congelado con nitrógeno líquido y se repetía el proceso para la obtención de un segundo soluble, según la misma metodología ya descrita en párrafos anteriores, salvo que este caso la incubación a temperatura ambiente se prolongaba 12 horas.

2.4.2. CONCENTRACION CON SULFATO AMONICO Y CALENTAMIENTO

A 64 °C

Se reunían ambos solubles y se concentraban por precipitación, a temperatura ambiente, con sulfato amónico. Este se añadía lentamente en forma sólida hasta llegar al 50% de saturación. En todo el proceso se mantenía una agitación suave.

El precipitado se recuperaba por centrifugación a 30,000 x g durante 15 minutos en una centrífuga Sorvall modelo RC-2B equipada con un rotor angular tipo SS-34. El precipitado se resuspendía en el mínimo volumen posible de solución amortiguadora I que además contenía un 33% de glicerol y KCl 1 molar.

El resuspendido se incubaba en baño de agua termostático durante 10 minutos a 64 °C. Transcurrido este tiempo se enfriaba rápidamente en un baño de hielo. Con este tratamiento precipitaban numerosas proteínas acompañantes por desnaturalización. Estas se eliminaban por ultracentrifugación a 105,000 x g durante 30 minutos. Se recogía el sobrenadante y se guardaba congelado en nitrógeno líquido.

En todo este proceso se conservaba perfectamente la actividad Reductasa.

2.4.3. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AFFI-GEL BLUE

El sobrenadante congelado se descongelaba por calenta-

miento en b.m. a 37 °C y se diluía con un volumen de solución amortiguadora I sin KCl, suficiente para que la concentración final de KCl fuese de 200 mM.

Esta muestra diluída era introducida en una columna de Affi-Gel Blue de 10 ml de lecho que había sido previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora en la que se encontraba la muestra.

La cromatografía se desarrollaba a temperatura ambiente. La velocidad de flujo de la columna era de 60 ml/h y se recogían fracciones de 7,5 ml.

Una vez la muestra se hallaba dentro de la columna, esta se lavaba con solución amortiguadora I 200 mM KCl hasta que no eluía proteína.

La elución de la proteína que quedaba aún unida a la columna se realizaba por aplicación de un gradiente lineal de KCl de 0,2 M hasta 2 M en un volumen total de 200ml.

Se reunían las fracciones con actividad Reductasa y se concentraban con un concentrador marca "Amicon" modelo 202 con una membrana "Diaflo" model "PM-10 de 62 mm de diámetro, hasta un volumen aproximado de 10 ml. Seguidamente se añadían 40 ml de solución amortiguadora I sin KCl y se concentraba nuevamente hasta 10 ml. Se repetía una vez más esta operación de desalado. El concentrado final se completaba a un volumen doble con glicerol. Con estas operaciones se conseguía obtener una muestra desalada y con un 50% de glicerol, que se guardaba congelada a -80 °C.

2.4.4. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE HMG-CoA AGAROSA

La muestra se descongelaba en b.m. a 37 °C y se diluía con agua destilada hasta un volumen doble del inicial para que la concentración final de glicerol fuese del 25%.

Esta muestra se aplicaba a una columna de HMG-CoA Agarosa de 4 ml de lecho, equilibrada previamente con la solución amortiguadora siguiente: sol. amortiguadora I : glicerol : agua, 1:1:2 (v/v/v).

La cromatografía se desarrollaba a temperatura ambiente. La velocidad de flujo de la columna era de 20 ml/h y se re-

cogían fracciones de 2 ml. El lavado de la columna hasta que no eluía proteína se realizaba con la misma solución amortiguadora que el equilibrado y seguidamente se procedía a una elución secuencial con las siguientes soluciones amortiguadoras:

-20 ml de solución amortiguadora I:glicerol:agua (1:1:2) y 70 mM KCl.

-15 ml de solución amortiguadora I:glicerol:agua (1:1:2) con 70 mM KCl y 0,2 mM HMG-CoA.

-20 ml de solución amortiguadora I:glicerol:agua (1:1:2) y 500 mM KCl.

La Reductasa homogénea eluía principalmente con la segunda solución y sólo una pequeña cantidad lo hacía con la tercera.

Las fracciones con actividad Reductasa se reunían y se concentraban por ultrafiltración con un concentrador marca "Amicon" modelo 12 con una membrana de la firma "Diaflo" modelo "PM-10" de 25 mm de diámetro hasta un volumen aproximado de 1,5 ml.

A este concentrado se le añadía una cantidad de albúmina suficiente para que la concentración final de la misma estuviese comprendida entre 0,3 y 0,4 mg/ml.

Esta preparación se dializaba contra un volumen mil veces mayor de solución amortiguadora de diálisis de la Reductasa cuya composición era de:

Tris-HCl	50 mM	pH 7,4
EDTA	1 mM	
DTT	5 mM	
Agua dest.	c.s.	

La diálisis se prolongaba un mínimo de cuatro horas. Terminada la misma la preparación de Reductasa homogénea distribuida en alícuotas se guardaba congelada a -80°C .

Rutinariamente se comprobaba la homogeneidad del enzima mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5% en SDS según el método de Laemmli (39).

La actividad específica de la preparación final usualmente era alrededor de 7.500 u/mg proteína.

2.5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA

El enzima HMG-CoA Reductasa cataliza la reacción de reducción del HMG-CoA a mevalonato. El sustrato dador de electrones es el NADPH. La reacción necesita de cuatro equivalentes de reducción, por lo que son necesarias dos moléculas de NADPH por molécula de mevalonato formada.

Los ensayos enzimáticos llevados a cabo en los experimentos que figuran en esta memoria han sido realizados según dos métodos distintos que se detallan a continuación.

2.5.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA SEGUN EL METODO DEL SUSTRATO MARCADO CON ^{14}C

Este método se basa en el propuesto por Berndt y col., modificado por Shapiro y col. (94) y por Bové y Hegardt (61), que permite la medida de la (^{14}C)mevalonolactona formada a partir del (^{14}C)HMG-CoA.

El sustrato de esta reacción, R,S- [$3-^{14}\text{C}$] HMG-CoA, se sintetizaba a partir de ácido [$3-^{14}\text{C}$]-hidroxi-3-metilglutárico, el mismo ácido no marcado y Coenzima A, según el método de Goldfarb y Pitot (95). El producto de la síntesis se valoraba utilizando el método de Knappe (96).

La mezcla de reacción tenía un volumen final de 0,11 ml con la siguiente composición; a 0,05 ml de la muestra con distintas cantidades de Reductasa se añadían 0,06 ml de la solución de ensayo de Reductasa, que llevaba los siguientes componentes cuyas concentraciones finales eran:

[$3-^{14}\text{C}$]-HMG-CoA	0,12 mM 3.600 cpm/nmol
Tris-HCl	200 mM pH 7,2
EDTA	43 mM
Albúmina	0,45 mg/ml
G-6-P	30 mM
G-6-P dH	2,2 u/ml
NADP ⁺	0,32 mM
DTT	4,6 mM

El medio de reacción se diseñó para que las condicio-

nes fuesen óptimas para el desarrollo de la reacción enzimática. Cada uno de los componentes tenía la misión que se detalla a continuación:

--Tris-HCl, agente tamponante que mantenía el pH a 7,2.

--EDTA, agente quelante de metales pesados que podían interferir en la reacción.

- DTT, agente reductor y protector de grupos sulfhidrilo del enzima HMG-CoA Reductasa.

--G-6-P, G-6-P dH, NADPH, constituyen un sistema regenerador de NADPH de forma que permiten mantener la concentración de este sustrato constante durante toda la reacción.

- Albúmina, se añade a concentración elevada actuando como sustrato de posibles proteasas que de no estar ésta dañarían a la Reductasa.

- $[3-^{14}\text{C}]$ -HMG-CoA, sustrato de la Reductasa.

La reacción se iniciaba por la adición de 0,06 ml de la solución de ensayo de Reductasa sobre los 0,05 ml de la preparación de Reductasa y la mezcla se incubaba en un baño termostatzado a 37 °C durante un tiempo adecuado. Transcurrido este tiempo la reacción se detenía por la adición de 0,06 ml de una solución que contenía:

HCl	3,33	N
MVL	26,6	mg/ml
HMG Ac.	33,3	mg/ml

La acidificación del medio que comportaba la adición de ácido clorhídrico daba por terminada la reacción por desnaturalización de las proteínas. Los otros dos productos tenían una importancia en etapas posteriores del ensayo para permitir visualizar la $[3-^{14}\text{C}]$ MVL y el $[3-^{14}\text{C}]$ HMG Ac.

Acabada la reacción la mezcla se incubaba a 50 °C durante 10 minutos con el fin de que se formase la lactona del ácido mevalónico y se hidrolizase el HMG-CoA a HMG Ac.. Esto permitía una mayor facilidad para separar el sustrato del producto en función de la diferencia de polaridad que presentan las dos moléculas de los dos com

puestos formados, MVL y HMG Ac..

Después de este calentamiento a 50 °C, la mezcla se mantenía durante 5 minutos a 0 °C tras lo cual se sometía a centrifugación a 12.000 x g durante dos minutos en una centrífuga Eppendorf modelo 5414 S. Con este tratamiento se conseguía la precipitación de la proteína presente en el ensayo que podía interferir en la separación de la (¹⁴C) MVL y (¹⁴C) HMG Ac.

2.5.2. SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LA (¹⁴C) MVL DEL (¹⁴C) HMG Ac.

Para la separación del (¹⁴C) HMG Ac. de la (¹⁴C) MVL se empleó la cromatografía en capa fina en placas cromatográficas de Silicagel 60 HF₂₅₄₊₃₆₆ de 0,5 mm de espesor.

Las placas de vidrio, soporte de la capa de Silicagel debían estar perfectamente limpias y secas. La extensión de la fase sólida se realizaba con un extensor de la firma "Desaga-Heidelberg" y se trataba de una suspensión compuesta por:

Silicagel 60 HF ₂₅₄₊₃₆₆	50 g.
Agua destilada	110 ml

Una vez realizada la extensión se dejaba secar a temperatura ambiente aproximadamente durante 8 horas para después proceder a su activación, eliminando la humedad por calentamiento a 100 °C durante una hora.

Una vez activadas se sembraban 0,1 ml del sobrenadante libre de proteínas en la base de la placa, a unos 3 cm del borde inferior. La siembra se realizaba en forma de pequeñas manchas que se secaban antes de desarrollar la cromatografía.

El desarrollo cromatográfico se llevaba a cabo en una cubeta cerrada herméticamente que contenía una mezcla de acetona-benceno en proporción 1:1 (v/v) que saturaba el ambiente de la cubeta.

Una vez la fase líquida había ascendido hasta unos 3 cm antes del borde superior de la placa, la cromatogra-

fía se daba por finalizada. Se sacaban las placas de la cubeta y se dejaban secar a temperatura ambiente.

Seguidamente se procedía a la visualización de la (^{14}C) MVL exponiendo la placa a la luz de una lámpara de ultravioleta de longitud de onda de 366 nm. Debido a las características del Silicagel empleado, toda la placa aparecía fluorescente salvo las zonas ocupadas por la MVL y el HMG Ac..

En las condiciones del solvente utilizado, la MVL presentaba un Rf mayor que el HMG Ac.

2.5.3. CUANTIFICACION DE LA (^{14}C) MVL FORMADA

Sobre la placa se marcaba la mancha correspondiente a la (^{14}C) MVL y se rascaba. El polvo resultante era introducido en viales a los que se añadían 10 ml de líquido de centelleo. Este líquido tenía la siguiente composición:

Naftaleno	80 g
PPO	7 g
Metoxietanol	400 ml
Tolueno	600 ml

La radiactividad de los viales era cuantificada en un contador de radiactividad de centelleo líquido de la firma "Nuclear Chicago" modelo ISOCAP-300.

2.5.4. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA SEGUN EL METODO DEL SUSTRATO MARCADO CON ^3H .

Esta técnica se basa fundamentalmente en el método propuesto por Philipp y Shapiro (94).

El sustrato marcado con tritio, R,S- $[3-^3\text{H}]$ hidroxi-3-metilglutarilCoA, era sintetizado basándose en el método de síntesis del mismo compuesto marcado con ^{14}C pero modificado para obtener el mismo producto en este caso marcado con ^3H . La valoración se llevaba a cabo por el mismo método que el $[3-^{14}\text{C}]\text{-HMG-CoA}$.

Tanto el volumen como la composición final de la mezcla

de ensayo eran los mismos que los descritos para el ensayo de ^{14}C , con la salvedad de que en este caso el sutrato estaba marcado con ^3H .

La reacción se detenía por adición de 0,04 ml de HCl 0,2 N.

A partir de este punto se seguía el mismo protocolo que para el ensayo de ^{14}C hasta la obtención del sobrenadante exento de proteínas.

2.5.5. SEPARACION Y CUANTIFICACION DE LA (^3H) MVL FORMADA

Después de la centrifugación, 0,1 ml del sobrenadante eran introducidos en viales a los que se añadían 5 ml de líquido de centelleo cuya composición era la siguiente:

PPO	8 g
Tolueno	1 l.

En este caso en el vial coexistían el (^3H) HMG Ac. y la (^3H) MVL, y su separación se basaba en su distinto coeficiente de partición que presentaban ambos compuestos entre las dos fases, agua y tolueno. La mevalonolactona es un compuesto hidrofóbico al contrario del HMG Ac., de forma que el primero tenía tendencia a pasar a la fase orgánica mientras que el segundo permanecía en la fase acuosa. El paso de la MVL al tolueno venía además favorecido por una relación de volúmenes entre el tolueno y el agua de 50 a 1. El HMG Ac. que permanecía mayoritariamente en la fase acuosa veía a la vez bloqueadas sus radiaciones por la acción apagadora del agua.

Los viales se sometían a enérgica agitación para favorecer el reparto. La radiactividad era cuantificada al cabe de tres horas de reposo en que el equilibrio de partición entre las dos fases se había estabilizado.

2.5.6. CALCULO DE LAS UNIDADES DE ACTIVIDAD REDUCTASA

Se define como una unidad de HMG-CoA Reductasa a la cantidad de enzima que convierte un nanomol de HMG-CoA a mevalonato en un minuto y a 37 °C.

La fórmula utilizada para el cálculo de unidades de actividad Reductasa presentes en el ensayo era:

$$U = \frac{\text{cpm}}{\text{R.E.}} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{V}{V'}$$

- cpm, cuentas por minuto.
- R.E., radiactividad específica del sustrato
- t, tiempo de ensayo expresado en minutos.
- V, volumen final del ensayo.
- V', volumen sembrado en la placa o en el vial.

Para calcular la actividad específica de la Reductasa presente en el ensayo se dividían las unidades obtenidas por la proteína presente en el ensayo expresada en mg.

2.6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA

Como ya se ha descrito en la introducción, el enzima HMG-CoA Reductasa es susceptible de inactivarse en presencia de ATP/Mg, por un proceso de fosforilación que es catalizado por enzimas tipo proteín quinasa. Esta inactivación es revertida por enzimas tipo proteín fosfatasa.

En este apartado se detallan los ensayos de actividad Reductasa quinasa utilizando como fuente de Reductasa la fracción microsomal o el enzima homogéneo.

En todas las incubaciones de Reductasa quinasa con Reductasa, además de ATP y Mg, se añadió ADP que ha sido descrito como activador alostérico de la Reductasa quinasa citosólica (74).

En este tipo de ensayos se diferencian dos partes; la primera tiene como fin la inactivación de la Reductasa por la acción de la Reductasa quinasa. La segunda parte se basa en detener la actividad Reductasa quinasa y simultáneamente poner de manifiesto la actividad Reductasa residual que queda después de la inactivación.

2.6.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD REDUCTASA QUINASA SOBRE MICRO SOMAS

Los microsomas con elevada actividad Reductasa han sido empleados en este trabajo para el seguimiento de la actividad Reductasa quinasa que elufa de las distintas columnas empleadas en el proceso de purificación así como para la confección de las tablas de purificación.

En microsomas existe una actividad Reductasa quinasa que tenía que ser eliminada para evitar interferencias en los ensayos en los que se deseaba medir esta misma actividad pero de una fuente exógena. Se ha descrito que la actividad Reductasa quinasa podía inactivarse por calentamiento de los microsomas durante 10 minutos a 50 °C (97) o a 37 °C durante 2 horas (71,60,77). En nuestro caso se utilizaba la primera condición.

Antes de empezar el ensayo la actividad Reductasa quinasa de los microsomas era inactivada. Para ello se añadían 0,2 ml de solución amortiguadora de microsomas a la alícuota descongelada de microsomas (0,1 ml), y se calentaba a 50 °C durante 10 minutos. Después de la inactivación los microsomas se diluían adecuadamente para obtener una actividad Reductasa comprendida en los límites de linealidad de la reacción.

La mezcla de ensayo se componía de 0,025 ml de la preparación de Reductasa quinasa y 0,025 ml de la solución de inactivación compuesta por:

Tris-HCl	50 mM	0,01 ml	pH 7,4
ADP	80 mM	0,00175 ml	
ATP	80 mM	0,00175 ml	
MgCl ₂	500 mM	0,0015 ml	
Microsomas		0,01 ml	

Esta mezcla se incubaba a 37 °C durante 30 minutos. Se llevaban controles de actividad Reductasa de los microsomas, en los que se sustituía la preparación de quinasa por el mismo volumen de solución amortiguadora en que se encontraba este enzima. Transcurrido este tiempo se determinaba la actividad Reductasa quinasa por adición de 0,06 ml

de la solución de ensayo de Reductasa descrita en el apartado 2.5.1. La concentración final de EDTA después de la adición de esta solución de ensayo era suficiente para que-
 lar todo el magnesio del medio. Simultáneamente se daba
 comienzo a la expresión de la actividad Reductasa. El en-
 sayo seguía la misma pauta que se ha descrito en el apar-
 tado 2.5.

En todos aquellos ensayos en que era preciso diluir la
 muestra de Reductasa quinasa se utilizaba para tal fin la
 solución amortiguadora de dilución de la Reductasa quinasa
 compuesta por:

Tris-HCl	50 mM	pH 7,4
EDTA	1 mM	
EGTA	1 mM	
Albúmina	0,6 mg/ml	
DTT	5 mM	
PMSF	1 mM	
Agua dest.	c.s.	

Estos dos últimos compuestos, DTT y PMSF, se añadían
 extemporáneamente.

La actividad Reductasa quinasa se determinaba como
 diferencia de cpm de mevalonolactona de los controles de
 actividad Reductasa y de cpm de mevalonolactona de activi-
 dad Reductasa residual en aquellos tubos donde había actua-
 do la Reductasa quinasa.

2.6.2. PRUEBA DE MICROSOMAS

Esta prueba se realizaba de forma rutinaria después de
 cada obtención de microsomas. Tenía como fin establecer la
 dilución que había que practicar a los microsomas para po-
 ner en el ensayo entre 150 y 200 miliunidades de Reductasa
 y verificar la inactivación de la Reductasa quinasa microso-
 mal.

Para cumplir simultáneamente ambos objetivos se confec-
 cionaban varias diluciones de los microsomas, ya inactiva-
 dos como se describe en el apartado 2.6.2. con solución
 amortiguadora de microsomas.

La pauta del ensayo era análoga al ensayo de actividad Reductasa quinasa sobre microsomas sustituyendo la preparación de Reductasa quinasa por 0,025 ml de solución amortiguadora de microsomas. La actividad Reductasa de cada dilución se determinaba a 0 y 30 minutos de incubación. Los tiempos 0 minutos se realizaban añadiendo 0,06 ml de la solución de ensayo de Reductasa antes de añadir la mezcla de inactivación.

2.6.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD REDUCTASA QUINASA SOBRE REDUCTASA HOMOGÉNEA

Antes de dar comienzo el ensayo, la Reductasa homogénea era reactivada por calentamiento a 37 °C durante aproximadamente 60 minutos (13,14).

El volumen final de la reacción de inactivación era de 0,04 ml, de los cuales 0,01 ml correspondían a la solución nucleótido que estaba compuesta por:

Sol. amortig. nucleot.		0,01 ml
ATP	80 mM	0,02 ml
ADP	80 mM	0,02 ml
MgCl ₂	500 mM	0,025 ml
Agua dest.		c.s.p. 0,2 ml

(Solución amortiguadora nucleótido: Tris-HCl 100mM pH 7,4, DTT 6 mM, PMSF 1 mM).

Los 0,03 ml restantes se repartían convenientemente entre la preparación de Reductasa quinasa y de Reductasa. La dilución de la Reductasa quinasa se hacía con solución amortiguadora de dilución de Reductasa quinasa descrita en el apartado 2.6.1. La Reductasa reactivada se diluía, justo en el momento de iniciar el ensayo con solución amortiguadora de diálisis de Reductasa, descrita en el apartado 2.4.4., a la que se añadía además 0,2 mg/ml.

La reacción de inactivación daba comienzo por la mezcla de los tres componentes y transcurría a 37 °C durante el tiempo necesario.

Paralelamente se llevaba un control de actividad Reductasa para lo que se confeccionaba una solución nucleótido sin MgCl₂. El resto de componentes de la mezcla de inacti-

vación y el tratamiento durante el ensayo era análogo al descrito para los tubos donde tenía lugar la inactivación.

Para detener la reacción de inactivación de la Reductasa, 0,005 ml de la mezcla se diluían, manteniendo la temperatura a 37 °C, en un volumen adecuado de la solución amortiguadora de dilución de la Reductasa, compuesta por:

KH ₂ PO ₄	40 mM	pH 7,2
Sacarosa	25 mM	
EDTA	45 mM	
NaF	100 mM	
Albúmina	0,59 mg/ml	
DTT	5 mM	

Esta solución detenía la reacción de inactivación por su elevada concentración de EDTA y diluía convenientemente a la Reductasa para ensayar su actividad en condiciones óptimas de medida.

Para determinar la actividad Reductasa se ensayaban 0,01 ml de esta dilución que se completaban a 0,05 ml con solución amortiguadora de Reductasa. El ensayo se realizaba como se ha descrito en el apartado 2.5.

2.6.4. CALCULO DE LAS UNIDADES DE ACTIVIDAD REDUCTASA QUI NASA

Se define como una unidad de actividad HMG-CoA Reductasa quinasa a la cantidad de enzima que produce un descenso de una miliunidad de HMG-CoA Reductasa por minuto a 37 °C, en las condiciones de ensayo descritas.

La fórmula utilizada para el cálculo de unidades de Reductasa quinasa era:

$$U = \frac{cpm_1 - cpm_2}{R.E.} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{t'} \cdot \frac{V}{V'}$$

- cpm₁, cuentas por minuto del control
- cpm₂, cuentas por minuto del ensayo
- R.E., radiactividad específica del sustrato

- t, tiempo de incubación de la reacción de inactivación expresado en minutos.
- t', tiempo de incubación del ensayo de actividad Reductasa expresado en minutos.
- V, volumen final del ensayo.
- V', volumen del ensayo de actividad Reductasa sembrado en la placa o en el vial.

Para obtener la actividad específica se dividían las unidades por los miligramos de proteína que llevaba la preparación de Reductasa-quinasa introducida en el ensayo.

2.7. ENSAYO DE ACTIVIDAD MEVALONATO-QUINASA

Se ha descrito una actividad Mevalonato quinasa, presente tanto en citosol como en microsomas, que de manifestarse podría dar lugar a falsas interpretaciones de los resultados. Esto es debido a que esta actividad transforma el mevalonato, producido por la HMG-CoA Reductasa, a fosfo mevalonato dando lugar a un decremento en la MVL formada, que es la que se mide. Este hecho podría interpretarse como una inactivación de la Reductasa por la Reductasa-quinasa.

Para evitar este hecho, se midió la actividad Mevalonato-quinasa en los distintos pasos de la purificación de la Reductasa-quinasa. El método de ensayo utilizado fue el propuesto por Ness y col. (75) y modificado por Beg y col. (76).

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 0,3 ml, los siguientes componentes:

Hepes	500 mM	pH 7,4
ATP	5 mM	
MgCl ₂	16 mM	
DTT	2 mM	
(2- ¹⁴ C)MVA	0,67mM	(R.E. 325cpm/nmol)

con distintas cantidades de mevalonato quinasa

La reacción se iniciaba por la adición del sustrato radioactivo y se incubaba a 37°C durante 15 minutos. La posterior adición de 0,01 ml de HCl 2,5 N detenía la reacción.

Se procedía a la lactonización del MVA por calentamiento a 37°C durante 20 minutos.

Las proteínas desnaturalizadas se eliminaban por centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos en centrifuga Eppendorf. Para separar la (^{14}C) MVL del (^{14}C) fosfomevalonato se tomaban 0,25 ml del sobrenadante y se aplicaban a columnas de AG -1X8 en forma de Cl^- .

La (^{14}C)MVL se eluía en primer lugar con 6 ml de HCl 0,1 N y posteriormente el (^{14}C) fosfomevalonato con 4 ml de HCl 2,5 N.

Estos 4 ml que contenían el (^{14}C) fosfomevalonato eran introducidos en viales a los que se añadían 10 ml del siguiente líquido de centelleo:

Tritón	100 ml
Tolueno	200 ml
PPO	5 g

Los viales se contaban con una eficacia del 70%.

En los ensayos rutinarios de Reductasa quinasa la concentración de EDTA de la solución de ensayo de Reductasa impedía la expresión de la posible actividad Mevalonato quinasa.

2.8. TECNICAS ELECTROFORETICAS

2.8.1.ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS DE TIPO PLACA

Esta técnica se utilizó para separar las proteínas en función de su peso molecular.

Las proteínas que estaban formadas por más de una subunidad, debido a la presencia de SDS y B-mercaptoetanol, aparecían disociadas en el gel, resolviéndose en tantas bandas como subunidades de distinto peso molecular se encontraban formando parte de la proteína nativa.

El SDS hacía que todas las proteínas estuviesen cargadas negativamente por lo que su recorrido en el gel era función exclusiva de su peso molecular.

Este tipo de geles se emplearon para visualizar el

avance de la purificación de la Reductasa quinasa citosólica en sus distintas etapas. Permitió determinar el peso molecular de la subunidad del enzima homogéneo. También se emplearon para separar a la Reductasa de otras proteínas, principalmente albúmina, en los experimentos de fosforilación de este enzima con $\left[\gamma - ^{32}P \right] \text{ATP}$.

Estos geles constaban de dos partes, el gel apilador que permitía obtener bandas nítidas posteriormente en el gel separador donde las proteínas se separaban en función de su peso molecular.

Las placas de vidrio que iban a contener el gel tenían que estar perfectamente limpias y secas para evitar defectos en la polimerización. Para ello se limpiaban con alcohol etílico y se secaban en estufa a 100 °C.

El grosor del gel venía condicionado por el grosor de las tiras de teflón que separaban las dos placas. Todos los geles realizados eran de 1 mm de espesor.

Una vez colocados los separadores en los bordes de las placas, salvo en el borde superior, la estructura se mantenía fija mediante pinzas que ejercían presión equilibrada sobre las tiras de teflón.

Los bordes eran sellados con una solución de agar al 1,5% (p/v) que se dejaba solidificar a temperatura ambiente.

Con la placa en posición vertical se llenaba hasta altura conveniente con el gel separador (7,5% acrilamida) cuya composición era:

Acrilamida:bis-acrilamida (30:0,8)	5 ml
"Lower buffer"	5 ml
TEMED	0,01 ml
Persulfato amónico (15%)	0,08 ml
Agua destilada	c.s.p. 20 ml

("Lower buffer": Tris-HCl 1,5 M, SDS 0,4%, pH 8,8)

Se mezclaban todos los componentes excepto el TEMED y el persulfato amónico, catalizadores de la polimerización, y que se añadían justo en el momento de llenar las placas.

Una vez se tenía el gel separador entre las placas y para evitar la formación del menisco, se añadía alcohol isopropílico que al ser inmiscible con el gel todavía no polimerizado quedaba formando otra fase en la parte supe-

rior.

Una vez había polimerizado el gel separador se eliminaba el alcohol isopropílico por repetidos lavados con agua destilada. Antes de añadir el gel apilador en la parte superior de la placa se aplicaba un peine de teflón para formar los bolsillos donde se iban a introducir las muestras. Seguidamente se añadía el gel apilador que estaba compuesto de:

Acrilamida:bis-acrilamida	1,16 ml
"Upper buffer"	2,5 ml
TEMED	0,01 ml
Persulfato amónico (15%)	0,04 ml
Agua destilada	c.s.p. 10 ml

("Upper buffer": Tris-HCl 0,5 M, SDS 0,4%, pH 6,8)

Una vez polimerizado se secaba el peine cuidadosamente para no dañar los bolsillos. Estos se limpiaban varias veces con agua destilada con ayuda de una jeringa para eliminar restos de solución no polimerizada.

Antes de colocar la estructura conteniendo el gel en las cubetas de electroforesis se sacaban las pinzas de la parte inferior y se retiraba el separador correspondiente junto con la tira de agar para que el gel quedase en contacto con la solución amortiguadora de recorrido de la electroforesis cuya composición era:

Tris	1,5 g	pH 8,3
Glicina	7,2 g	
SDS	1 g	
Agua dest. csp	500 ml	

Se colocaba la placa en las cubetas y se sellaba con solución de agar al 1,5%. La cubeta inferior se llenaba de solución amortiguadora de recorrido y se eliminaban las burbujas de aire que hubiesen podido quedar entre el gel y la solución amortiguadora.

La placa estaba lista para la introducción de las muestras.

2.8.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El volumen de muestra introducido en cada bolsillo era

fijado por la cantidad de proteína que se deseaba que apareciera en el carril. Cuando este volumen sobrepasaba la capacidad del bolsillo se recurría a evaporar y concentrar la muestra en un "Speed-Vac concentrator" modelo "Savant".

A cada una de las muestras se le añadían 0,02 ml de solución amortiguadora de muestra cuya composición era:

SDS 10%	0,5 ml
B-mercaptoetanol	0,05 ml
"Upper-buffer"	0,084 ml
Agua dest.	0,366 ml

En estas condiciones se incubaban a 100 °C en b.m. durante 5 minutos. Después de este tratamiento se añadían 0,007 ml de BPB-glicerol (BPB 0,025%, glicerol 50%, agua dest. c.s.).

Las muestras eran introducidas en su bolsillo correspondiente que se acababa de llenar con solución amortiguadora de recorrido con el cual también se llenaba la cubeta superior. Se conectaban los electrodos a la fuente de electroforesis y esta se desarrollaba durante 4 horas.

Durante la electroforesis se mantenía el amperaje constante a 15 mA mientras las muestras se encontraban en el gel apilador. Cuando entraban en el gel separador se aumentaba el amperaje a 25 mA.

2.8.3. MARCADORES DE PESO MOLECULAR

Para poder determinar el peso molecular de las proteínas que aparecían en el gel a un determinado Rf, se añadía un carril en el que se introducían proteínas de peso molecular conocido:

Miosina	205.000	daltons
B-Galactosidasa	116.000	"
Fosforilasa B	97.400	"
Seroalbúmina	66.000	"
Ovoalbúmina	45.000	"
Anhidrasa Carb.	29.000	"

El "pool" de marcadores se conservaba en alicuotas en volúmenes de 0,02 ml que contenían 0,005 mg de cada proteína.

En el momento de su uso se añadían 0,005 ml de la mezcla siguiente:

BPB-glicerol	0,05 ml
B-mercaptoetanol	0,025 ml
Agua destilada	0,025 ml

En los geles que aparecen en esta memoria se introdujeron 0,005 ml de marcadores procesados según se ha descrito.

2.8.4. TINCION DEL GEL

Una vez desarrollada la electroforesis el gel se sumergía en la solución de tinción siguiente:

Coomassie brilliant blue R-250	1 g
TCA 100%	250 ml
Agua dest.	c.s.p. 500 ml

Se mantenía en esta solución aproximadamente 30 minutos. Transcurrido este tiempo el líquido de tinción era sustituido por una solución de ácido acético al 7% que actuaba fijando las proteínas al gel. A los 30 minutos esta última se sustituía por la solución de desteñido del gel compuesta por:

Acido acético	70 ml
Metanol	350 ml
Agua destilada	c.s.p.1000 ml

Cuando el gel estaba suficientemente desteñido se cambiaba esta solución por otra de reducción del gel cuya composición era la siguiente:

Glicerol	40 ml
Metanol	550 ml
Agua destilada	c.s.p.1000 ml

Con ello se aumentaba la nitidez de las bandas. Cuando el gel había alcanzado el tamaño deseado se secaba.

2.8.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE TIPO CILINDRICO

Este tipo de geles, en los cuales las proteínas se separaban en función de su peso molecular y de su carga, se

confeccionaron con motivo de verificar la homogeneidad del enzima Reductasa quinasa purificada.

Los tubos que contenían los geles eran de vidrio Pyrex de 5 mm de diámetro y 10 cm de longitud. Tenían que estar perfectamente limpios y secos por lo que se hervían en mezcla crómica aclarándose posteriormente con agua destilada y alcohol etílico y se secaban en estufa a 100 °C.

Para proceder a su llenado se colocaban en una gradilla que los mantenía verticales y a la vez tapaba su parte inferior para que no se saliese el gel.

Al igual que los geles en placa constaban de una gel apilador y un gel separador.

Los tubos se llenaban hasta la mitad con el gel separador compuesto por:

Acrilamida-bis acrilamida (30:0,8)	3,33	ml
"Lower buffer"	2,5	ml
Persulfato amónico 1,5%	1	ml
TEMED	0,01	ml
Agua destilada	c.s.p. 20	ml

("Lower buffer": Tris 36,3 g, Agua destilada c.s.p. 100 ml, pH 8,8).

Se agitaban ligeramente para eliminar las burbujas de aire que hubiesen podido quedar aprisionadas en el fondo y se acababan de llenar hasta la altura deseada. Para evitar la formación del menisco se añadía una capa de agua destilada. Cuando estaba polimerizado se eliminaba el agua y se añadía el gel apilador cuya composición era la siguiente:

Acrilamida -bis acrilamida (30:0,8)	1,25	ml
"Upper buffer"	2,5	ml
Persulfato amónico 1,5%	0,75	ml
TEMED	0,007	
Agua destilada	c.s.p. 10	ml

("Upper buffer": Tris 6 g, agua destilada c.s.p. 100 ml, pH 6,8).

Una vez polimerizado, los tubos se sacaban de la gradilla y se colocaban en la cubeta de electroforesis. Se llenaba la cubeta inferior con la solución amortiguadora de recorrido de la electroforesis compuesta por:

Tris	1,5 g	pH 8,3
Glicina	7,2 g	
Agua dest	c.s.p.	500 ml

A continuación se introducían las muestras en la parte superior del gel a las cuales simplemente se les había añadido 0,005 ml de la solución BPB-glicerol. Se llenaba la cubeta superior con la solución amortiguadora de recorrido y se conectaban los electrodos a la fuente de alimentación. Durante la electroforesis se mantenía el amperaje constante a un mA por tubo mientras las muestras estaban en el gel apilador y a dos mA por tubo cuando ya se hallaban en el gel separador. Una vez terminada la electroforesis el proceso de tinción del gel era análogo al descrito en el apartado 2.8.4.

2.9. ENSAYOS DE FOSFORILACION CON $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP

Estos ensayos se realizaron con el fin de demostrar que la inactivación de la Reductasa por la Reductasa quinasa iba paralela a una incorporación de ^{32}P al primero a partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP .

El $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP se sintetizaba en nuestro laboratorio a partir de ^{32}P y ADP según el método Walseth y Johnson (99)

Las mezclas de reacción serán descritas en el apartado de resultados correspondiente.

La reacción de fosforilación se detenía por adición de TCA y seguidamente de albúmina, como "carrier" de la precipitación. Se añadía una cantidad suficiente de TCA al 20% para que en la mezcla final quedase al 10%; la concentración final de albúmina era de 0,45 mg/ml.

La mezcla se mantenía 15 minutos en hielo y se centrifugaba a 12.000 x g en centrífuga Eppendorf durante 5 minutos.

Se eliminaba el sobrenadante y el precipitado se disolvía en 0,1 ml de NaOH 0,1 N y rápidamente se añadían 0,1 ml de TCA al 20%. Se mantenía 15 minutos en hielo y se repetía la centrifugación. Se despreciaba el sobrenadante y se añadían 0,3 ml de eter etílico y después de dejarlo 5 minutos en hielo se centrifugaba hasta que el eter etílico se había

evaporado.

Finalmente, se añadía la solución amortiguadora de muestras descrita en el apartado de técnicas electroforéticas 2.8.1., y se procesaban como muestras de rutina con el fin de ser cargadas en el gel. El desarrollo electroforético y tratamiento posterior del gel es análogo al descrito en el apartado 2.8. 4.

Una vez seco el gel, se procedía obtener la autorradiografía. Para ello se utilizaban películas "MAFE" RPX-1 en combinación con pantallas intensificadoras "MICRON-R". La exposición se prolongaba en función de la radioactividad que había en el gel. Este proceso de exposición se realizaba a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las películas se revelaban posteriormente siguiendo las normas dictadas por el fabricante. Las manchas que aparecían indicaban la posición de las proteínas marcadas con ^{32}P en el gel.

2.10. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA

2.10.1. METODO DE BRADFORD

El método utilizado para determinar cuantitativamente la concentración de proteína era el método de Bradford (98).

Este método presenta ventajas frente a otros por tener pocas interferencias debidas a productos no proteicos que pudiera contener la muestra, por su sencillez y por poder realizar la lectura en un amplio margen de tiempo, pues el complejo coloreado entre el colorante y la proteína es relativamente estable.

El volumen final del ensayo, que se realizaba a temperatura ambiente, era de 1 ml, repartido entre:

- 0.2 ml de la muestra a determinar la proteína.
- 0.6 ml de agua destilada.
- 0.2 ml del reactivo de Bradford (Coomassie Blue Brilliant G-250 0,01%, etanol 4,7%, ácido fosfórico 8,5%, en todos los casos p/v)

La lectura de absorbancia se realizaba a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo "DB-GT".

Para determinar la concentración de proteína de las muestras, los valores de absorbancia obtenidos se llevaban a una recta patrón confeccionada paralelamente en el mismo ensayo, con albúmina, en cantidades crecientes entre 0,005 mg/0,2 ml y 0,025 mg/0,2 ml. Entre estos márgenes la respuesta de absorbancia frente a concentración de proteína era lineal.

2.10.2. MEDIDA DIRECTA DE LA ABSORBANCIA A 280 nm

La lectura espectrofotométrica a 280 nm se ha utilizado para el seguimiento de la concentración de proteína de las fracciones eluidas de las columnas utilizadas en los distintos pasos de la purificación del enzima Reductasa-quinasa. Para ello se medía la absorbancia de las fracciones a esta longitud de onda en un espectrofotómetro "Beckman" modelo "DB-GT".

3.- RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. PURIFICACION A HOMOGENEIDAD APARENTE DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA-QUINASA DE LA FRACCIÓN DE CITOSOL DE HIGADO DE RATA

Atendiendo a la estabilidad del enzima, una vez extraído el hígado del animal, todas las operaciones se realizaron a 4°C en baño de hielo o en cámara fría. A todas las soluciones amortiguadoras se les añadió justo en el momento antes de ser utilizados DTT 5 mM, PMSF 0.5 mM y benzamidina 1 mM.

El seguimiento de la proteína que eluía de las distintas columnas se realizaba por lectura espectrofotométrica a 280 nm. La actividad reductasa-quinasa que eluía en las distintas columnas fue ensayada según el método descrito en el apartado (2.6.1.).

3.1.1. OBTENCION DEL CITOSOL

Las ratas eran sacrificadas por decapitación con guillotina. Se efectuaba la disección del animal y se le extraía el hígado el cual era rápidamente sumergido en una solución amortiguadora II₅₀₀ compuesta por:

Tris-HCl	50 mM	pH 7.4
EDTA	1 mM	
EGTA	1 mM	
NaF	50 mM	
Na ₄ P ₂ O ₇	3 mM	
Sacarosa	500 mM	
DTT	5 mM	
Benzamidina	1 mM	
PMSF	0.5 mM	
Agua dest.	c.s.	

A continuación el hígado se secaba sobre el papel de filtro y se pesaba. La homogeneización se realizaba con un homogeneizador "Potter-Elvehjem" con pistilo de de teflón. El medio de homogeneización era la solución

amortiguadora II₅₀₀ que se empleaba en una relación de 3 ml por cada gramo de hígado.

Esta solución amortiguadora llevaba una alta concentración de sacarosa (500 mM) con el fin de crear un medio hipertónico que impidiese la ruptura de lisosomas durante la homogeneización. La ruptura de estas estructuras subcelulares daría lugar a una liberación de enzimas proteolíticos a los que el enzima reductasa-quinasa mostraba gran sensibilidad.

El homogeneizado se sometía a centrifugación a 30.000 xg durante 30 minutos en una centrífuga Sorvall modelo RC-2B.

El sobrenadante se filtraba a través de lana de vidrio para eliminar la materia grasa y era ultracentrifugado a 105.000 xg durante 120 minutos en una centrífuga Beckman modelo L5-65B.

El sobrenadante, así obtenido y filtrado de nuevo por lana de vidrio, era considerado como la fracción citosólica, con una concentración de proteína de 20 mg/ml aproximadamente.

El citosol era la fuente a partir de la cual se purificaba la actividad reductasa-quinasa. Habitualmente se partía de 300 ml de citosol procedentes de 100 gr de hígado aproximadamente.

3.1.2. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

El citosol obtenido como se describe en el apartado anterior era introducido en una columna de DEAE-celulosa de 400 ml de lecho (14 x 6 cm).

La columna había sido previamente equilibrada con solución amortiguadora II que era análoga a la solución amortiguadora II₅₀₀ pero sustituyendo la sacarosa 500 mM por un 10% de glicerol. La velocidad de flujo era de 100 ml/h y se recogían fracciones de 10 ml.

Una vez la muestra había sido introducida en el lecho de la columna, esta se lavaba con solución amortiguadora II hasta que no elufa proteína.

A continuación se aplicaba un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M en solución amortiguadora II en un volumen total de 500 ml.

La actividad Reductasa-quinasa (gráfica I) eluía como un único pico a una concentración de NaCl de 100 mM. No se detectó actividad en las fracciones correspondientes al excluido y al lavado de la columna.

3.1.3. CONCENTRACION POR PRECIPITACION CON SULFATO

AMONICO

Se reunían las fracciones, procedentes de la columna de DEAE-celulosa, donde se detectaba actividad Reductasa quinasa. Sobre esta muestra se añadía lentamente sulfato amónico sólido hasta llegar a una saturación del 50% que correspondía a una concentración de 313 gr de sulfato amónico por litro. Durante todo el proceso se mantenía una agitación suave.

Una vez añadido el sulfato amónico se dejaba entre 10 y 15 minutos en agitación. El precipitado se recogía por precipitación a 30.000 xg durante 30 minutos en una centrífuga Sorvall modelo RC-2B.

Se eliminaba el sobrenadante por decantación. El precipitado era resuspendido en el mínimo volumen de solución amortiguadora II y homogeneizado en un homogeneizador manual de vidrio con pistilo del mismo material.

El homogeneizado se dializaba 7 h contra un volumen 30 veces mayor de solución amortiguadora II. Durante la diálisis se realizaban dos cambios de solución amortiguadora.

3.1.4. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE AFFI-GEL

BLUE

El dializado era introducido en una columna de Affi-Gel Blue de 77 ml de lecho (3.5 x 8 cm) equilibrada previamente en solución amortiguadora II.

G R A F I C A I

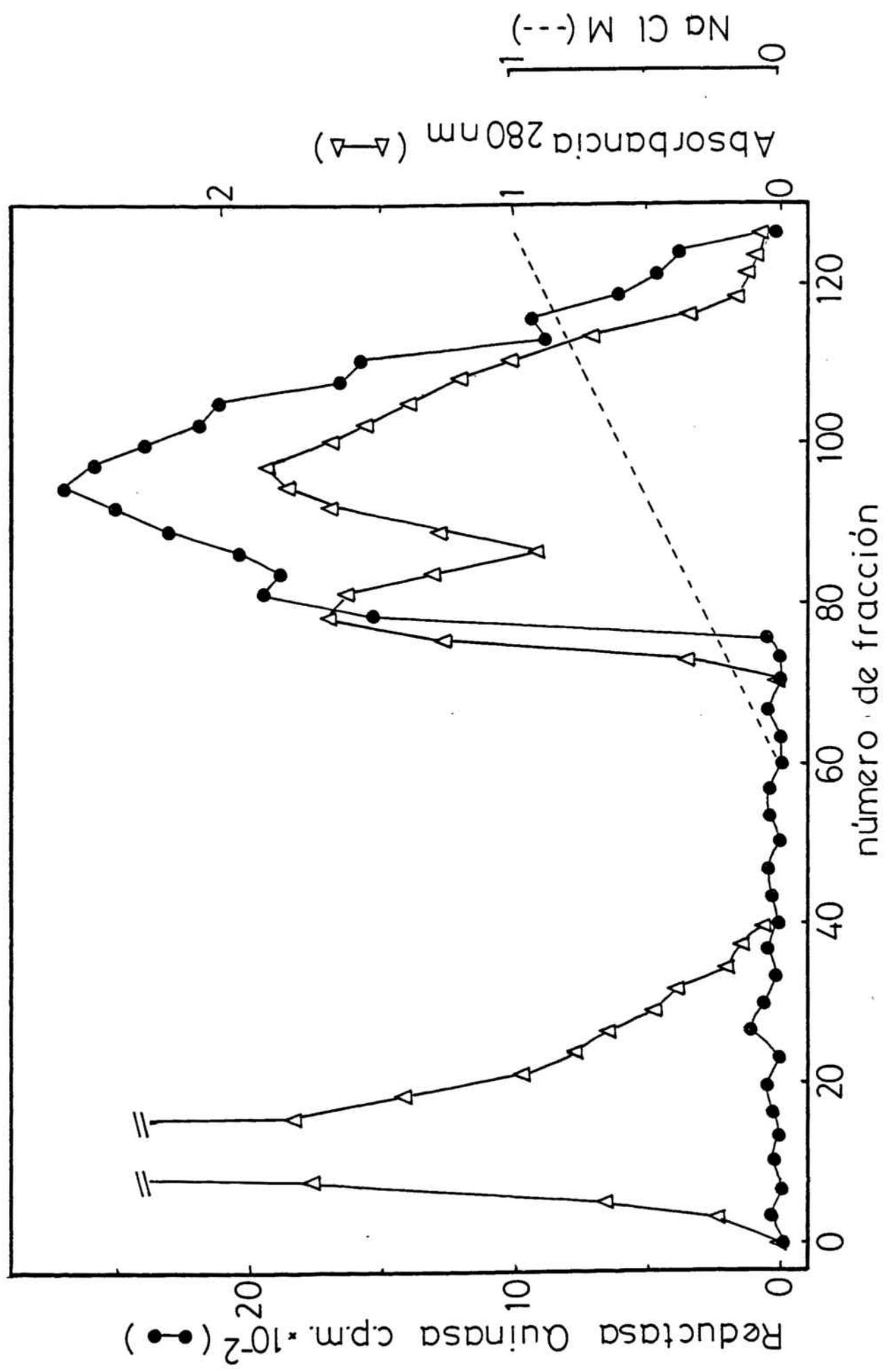
CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE CELULOSA

La gráfica muestra el perfil de elución del enzima Reductasa quinasa al aplicar el citosol de hígado de rata a una columna de DEAE-celulosa.

La actividad Reductasa quinasa se expresa como diferencia de cpm de mevalonolactona con respecto a un control de actividad Reductasa (●—●).

La proteína de las diferentes fracciones se determinó por lectura espectrofotométrica a 280 nm (Δ—Δ).

El gradiente lineal aplicado va desde 0 a 1 molar de NaCl y era aplicado a partir de la fracción 60 (---).



La velocidad de flujo a la que se desarrollaba la cromatografía era de 80 ml/h, recogién dose fracciones de 7.5 ml.

Después de introducida la muestra, la columna se lavaba con solución amortiguadora II llevada a 500 mM NaCl hasta que no se detectaba proteína en las fracciones de lavado.

Se aplicaba un gradiente lineal de NaCl de 0.5 M a 2 M en un volumen total de 400 ml de solución amortiguadora II.

Se ensayaba actividad Reductasa quinasa en las fracciones obtenidas eluyendo a 1 M NaCl (gráfica II). Estas fracciones y se concentraban por precipitación con sulfato amónico tal como se ha descrito en el apartado 3.1.3.

El homogeneizado obtenido se dializaba 5 h contra un volumen 100 veces mayor de solución amortiguadora II efectuándose un cambio.

3.1.5. CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL EN COLUMNA DE ULTROGEL ACA 34

Se empleaba una columna cuyo volumen de lecho era de 168 ml (0.75 x 95 cm) que se había equilibrado con solución amortiguadora II.

En esta columna se introducía un volumen máximo de 2 ml procedente del dializado anterior y la proteína se eluía por el paso continuado de solución amortiguadora II a una velocidad de 11 ml/h.

Se recogían fracciones de 2 ml que eran ensayadas para actividad Reductasa quinasa y se reunían aquellas en las que se detectaba dicha actividad (gráfica III). Esta muestra se concentraba hasta un volumen comprendido entre 1 y 2 ml por ultrafiltración en un concentrador marca "Amicon" equipado con una membrana Diaflo modelo "PM-10" que retenía todas aquellas proteínas cuyo peso molecular era superior a 10.000 daltons.

G R A F I C A II

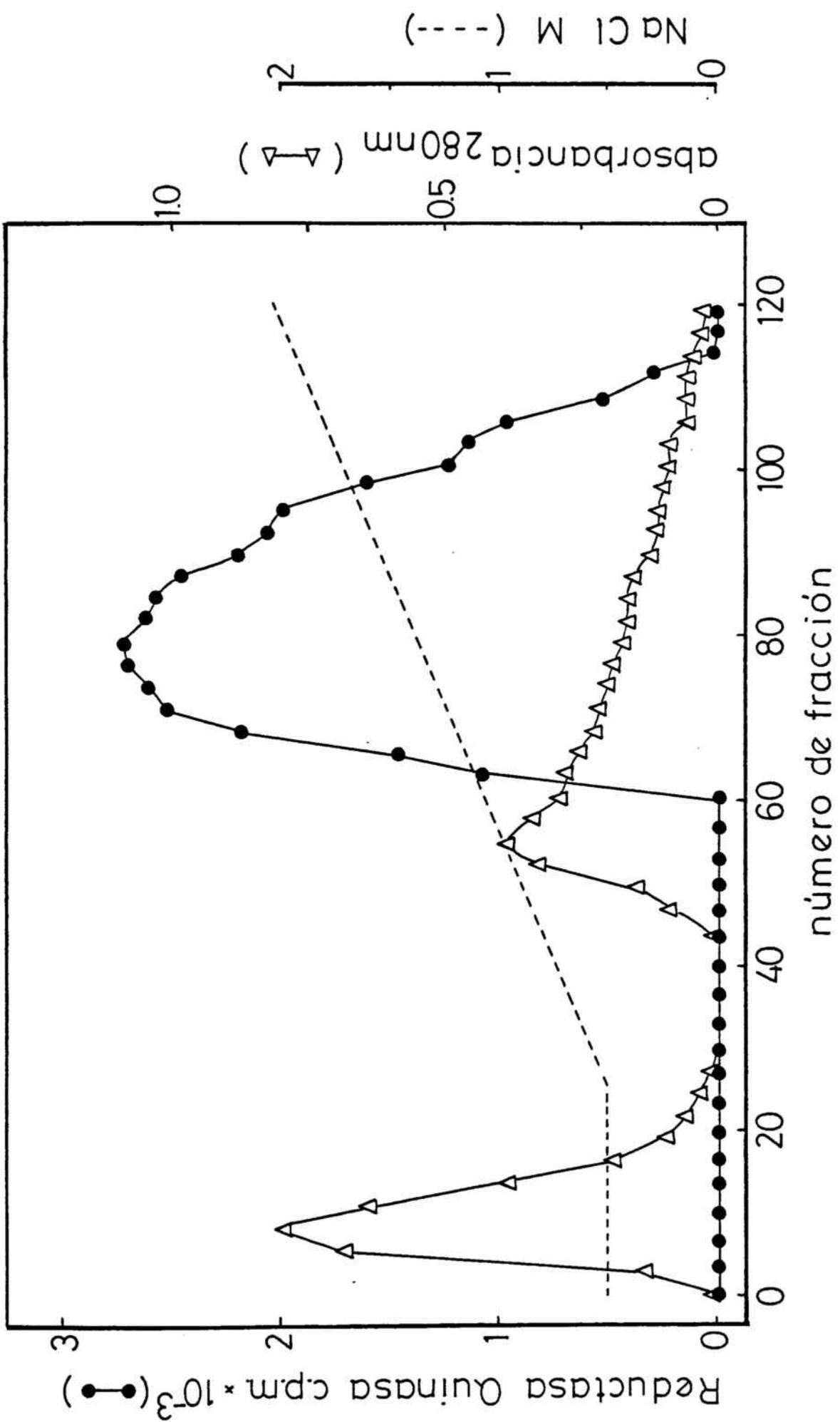
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN AFFI-GEL BLUE

La gráfica muestra el perfil de elución de la preparación de Reductasa quinasa, procedente de la columna de DEAE-celulosa, aplicada a una columna de Affi-Gel Blue.

La actividad Reductasa quinasa viene expresada como diferencia de cpm de mevalonato respecto a un control de actividad Reductasa (●—●).

La proteína fue determinada midiendo la absorción de las distintas fracciones a 280 nm (Δ—Δ).

El gradiente lineal de NaCl fue de 0,5 a 2 molar y se aplicaba en la fracción 25 (---)



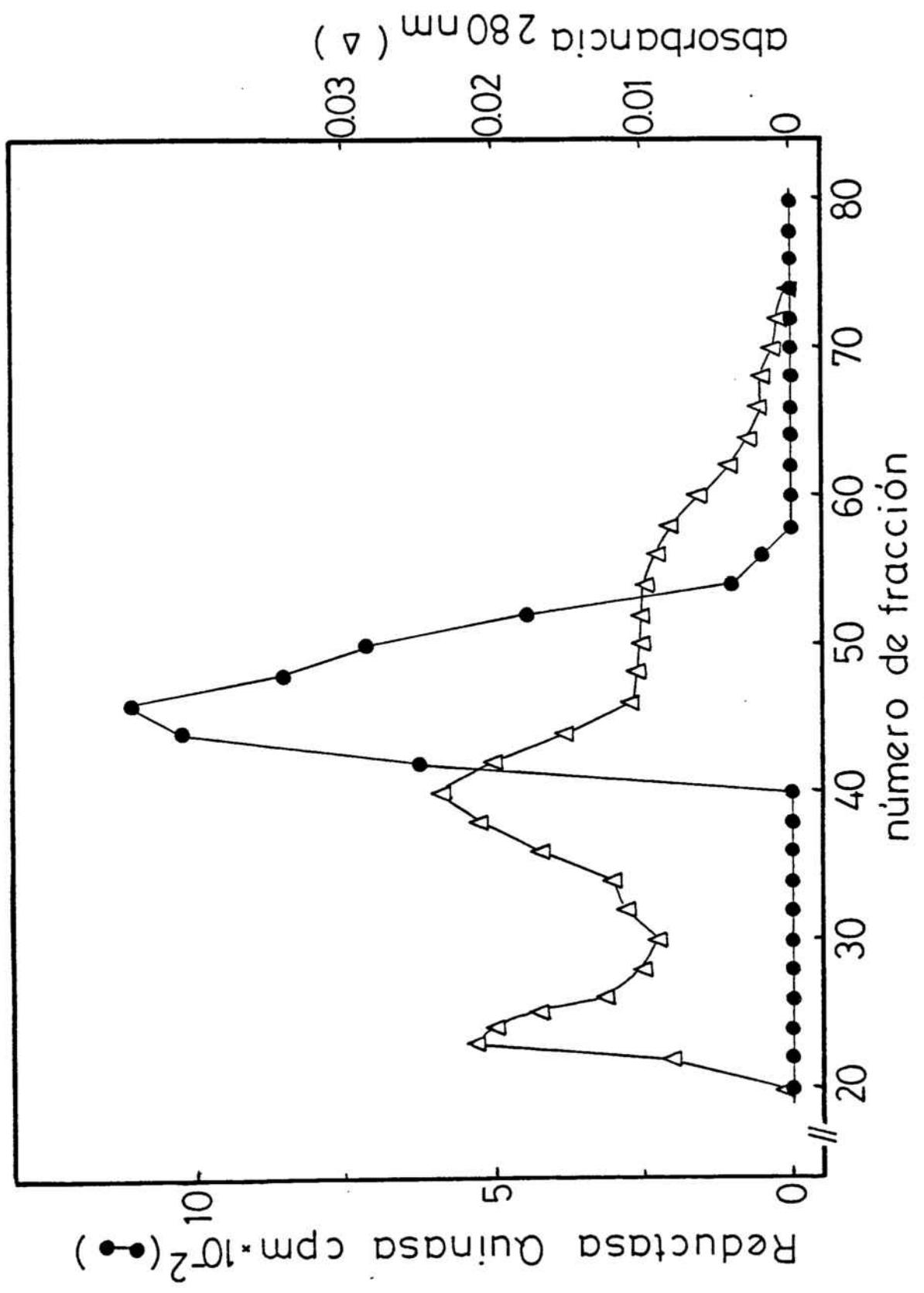
G R A F I C A III

CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRACION EN ULTROGEL Aca 34

La gráfica muestra el perfil de elución de la muestra de Reductasa quinasa procedente de la cromatografía en Affi-Gel Blue aplicada a una columna de Ultrogel Aca 34 en las condiciones que se describen en el texto.

La actividad Reductasa quinasa se expresa como diferencia de cpm de mevalonolactona frente a un control de actividad Reductasa (●—●).

La proteína de las distintas fracciones se medía por la absorción a 280 nm (Δ—Δ).



3.1.6. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

La muestra resultante de la concentración anterior se introducía en una columna de DEAE-celulosa de 8 ml de lecho (0.75 x 4.4 cm).

Esta columna había sido previamente equilibrada con solución amortiguadora II. La velocidad de desarrollo cromatográfico era de 30 ml/h y se recogían fracciones de 2 ml.

Cuando la muestra había penetrado en el lecho de DEAE-celulosa se procedía al lavado de la columna con solución amortiguadora II hasta que no eluía proteína.

Se aplicaba un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M en solución amortiguadora II con un volumen total de 80 ml.

La actividad Reductasa quinasa eluía a 100 mM NaCl (gráfica IV). Las fracciones que contenían esta actividad eran reunidas y concentradas por ultrafiltración con un concentrador marca "Amicon" con una membrana Diaflo modelo "PM-10" hasta un volumen comprendido entre 1 y 2 ml.

3.1.7. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE ATP-HEXANO AGAROSA

La muestra concentrada llevaba una alta concentración de NaCl que impediría que la proteína quedase retenida en esta columna por ello antes de ser introducida se diluía 5 veces con solución amortiguadora II de tal forma que la concentración de sal fuese inferior a 50 mM.

El volumen de lecho de la columna era de 5 ml (0.95 x 1.8 cm). La columna de ATP-hexano agarosa había sido equilibrada con solución amortiguadora II y la velocidad de flujo era de 20 ml/h.

Una vez la muestra había sido introducida, la columna se lavaba con solución amortiguadora II hasta que no se detectaba proteína en las fracciones.

Se aplicaba un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.4 M en solución amortiguadora II con un volumen total de 50 ml.

G R A F I C A IV

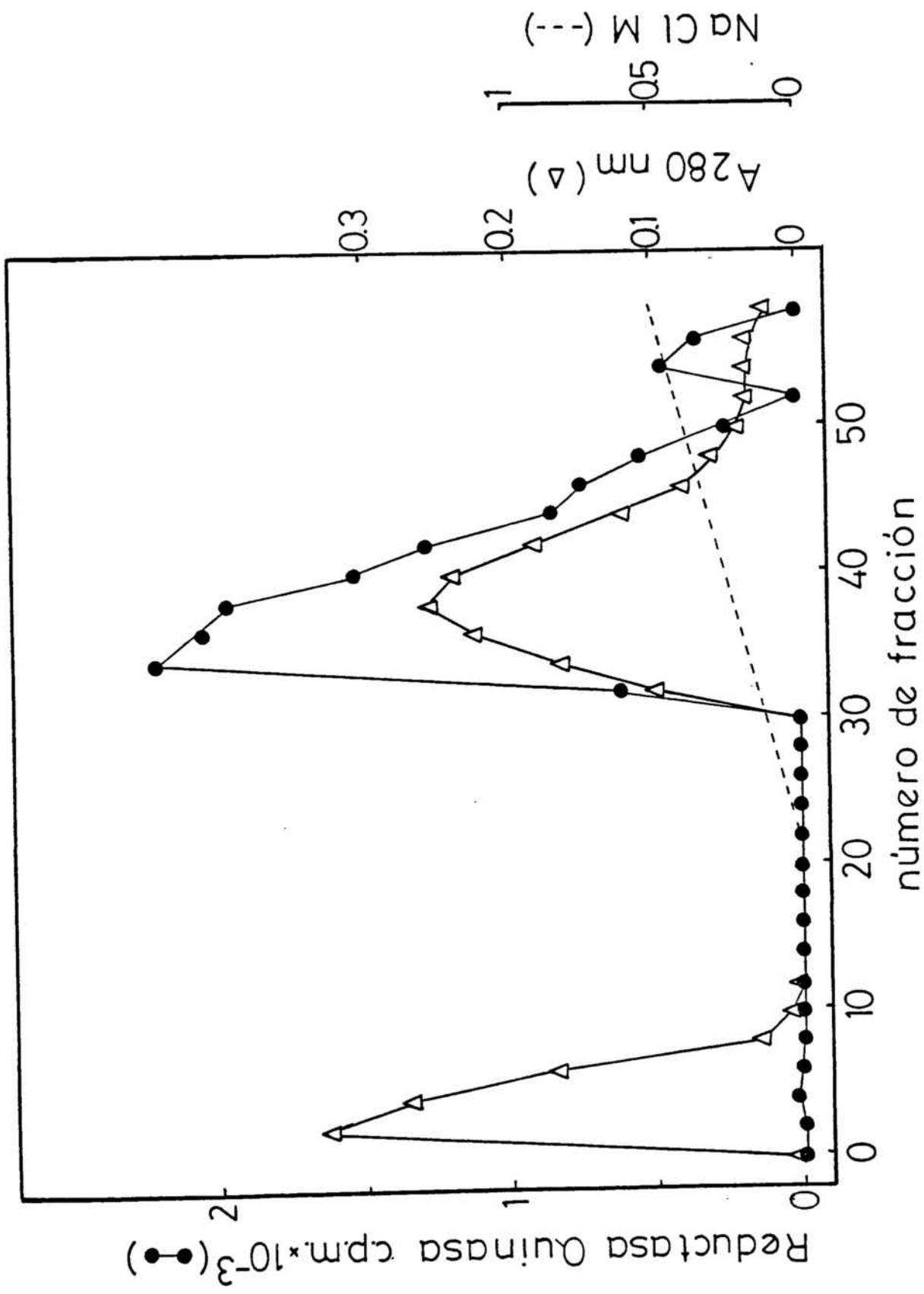
CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-CELULOSA

La gráfica muestra el perfil de elución de la muestra de Reductasa quinasa procedente de la columna de Ultrogel AcA 34 aplicada a una columna de DEAE-celulosa.

La actividad Reductasa quinasa está expresada como diferencia de cpm de mevalonolactona respecto a un control de actividad Reductasa (●—●).

La proteína de las distintas fracciones se medía por la absorción a 280 nm (Δ—Δ).

El gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M se aplicaba en la fracción 24 (---).



La actividad Reductasa quinasa eluía a partir de 100 mM NaCl y había eluído totalmente a 300 mM NaCl (gráfica V).

Las fracciones que tenían esta actividad enzimática se reunían y se concentraban por ultrafiltración.

3.1.8. CROMATOGRAFIA DE ADSORCION EN COLUMNA DE HIDROXIL- APATITA

La muestra procedente de la concentración anterior se diluía con solución amortiguadora II hasta que la concentración de NaCl era aproximadamente de 50 mM.

Esta dilución de la muestra además de llevarla a una concentración de NaCl apropiada tenía el fin de diluir el posible CO_2 que pudiese llevar disuelto. Por ello la solución amortiguadora II había sido confeccionada con agua destilada hervida previamente. Cualquier tipo de agitación a la que se sometía esta solución se realizaba en atmósfera de Nitrógeno.

Estas precauciones eran tomadas porque el lecho de la columna adsorbía CO_2 con gran facilidad formándose costras de Ca_3CO_2 que producían el colapsamiento de la columna. Cualquier tipo de solución amortiguadora que tenía que entrar en contacto con este lecho se le había eliminado el CO_2 por ebullición.

Antes de empaquetar el lecho de hidroxilapatita este se tenía que calentar a 80°C con la solución amortiguadora II.

El volumen de lecho de la columna era de 1.5 ml (0.75 x 0.9 cm) se equilibraba con solución amortiguadora II a la velocidad de 10 ml/h. Las velocidades superiores a las que está descrito un mayor poder de resolución de este tipo de lecho no eran posibles debido a la densidad de la solución amortiguadora II (10% glicerol).

La muestra diluida se introducía en la columna y seguidamente se lavaba con solución amortiguadora II llevada a 50 mM NaCl hasta que no eluía proteína. Se recogían fracciones de 1 ml.

Se aplicaba un gradiente lineal de Na_xPO_4 de 0 a 100 mM

G R A F I C A V

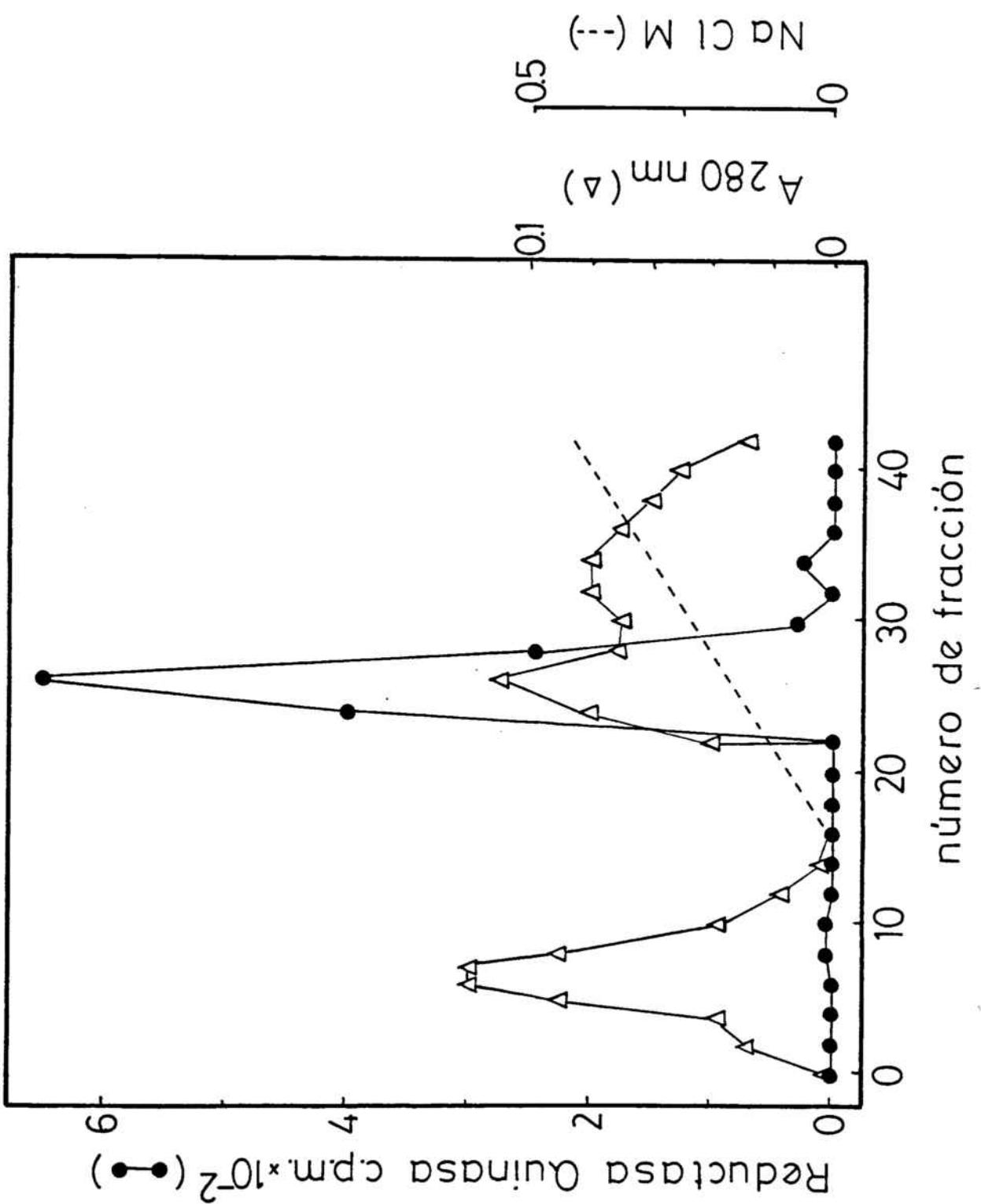
CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN ATP-HEXANO AGAROSA

La gráfica muestra el perfil de elución de la preparación Reductasa quinasa procedente del DEAE-celulosa, aplicada a una columna de ATP-hexano agarosa.

La actividad Reductasa quinasa viene expresada como diferencia de cpm de mevalonolactona respecto a un control de actividad Reductasa (●—●).

La proteína se determinó midiendo la absorción de las distintas fracciones a 280 nm (Δ—Δ).

El gradiente lineal de NaCl de 0 a 500 mM se aplicaba en la fracción 16 (---).



en solución amortiguadora II llevada a 50 mM NaCl con un volumen total de 30 ml.

La actividad Reductasa quinasa eluía alrededor de 50 mM de Na_xPO_4 (gráfica VI). Las fracciones con actividad Reductasa quinasa se reunían y concentraban por ultrafiltración.

La muestra concentrada se guardaba congelada a -80°C y en estas condiciones conservaba su actividad durante varios meses.

3.2. PURIFICACION RAPIDA DE HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL DE HIGADO DE RATA

Debido a la poca estabilidad del enzima HMG-CoA reductasa quinasa, incluso a la temperatura de 4°C se adoptó el proceso básico de la purificación descrita en el apartado anterior, con el fin de obtener mejores rendimientos. Para ello se consideraron los siguientes puntos:

- Disminuir el tiempo del proceso de purificación.
 - Se estudiaron detalladamente las condiciones de unión y elución de la Reductasa quinasa al lecho de las columnas de forma que no fuese necesario ensayar cada una de las mismas para detectar en qué fracciones eluía dicha actividad.
 - Cambiar el soporte físico del primer DEAE-celulosa, de forma que en lugar de desarrollarse una cromatografía en columna se realizase un paso en "batch". En una purificación típica, para introducir 300 ml de citosol en una columna de DEAE-celulosa necesitaba un día completo para lavar la columna hasta que eluyera proteína. Trasladando esta situación al otro sistema el paso de este primer DEAE-celulosa se desarrollaba en su totalidad en aproximadamente 2 h.
 - Disminuir el volumen de los lechos hasta el mínimo necesario para que la proteína introducida no los sature.

Con esto se reducía el volumen de solución amortiguadora de lavado y de elución y consecuente-

G R A F I C A VI

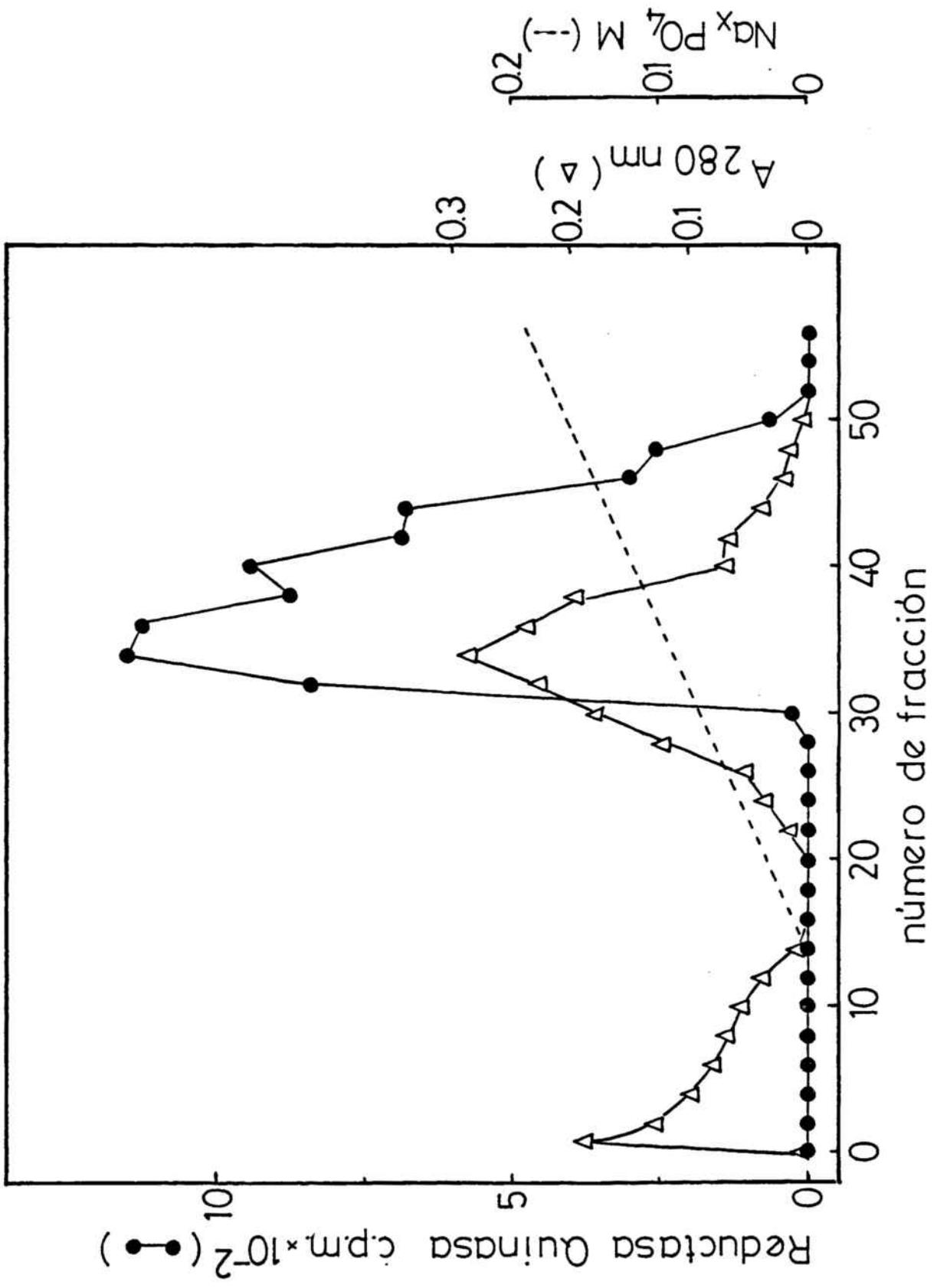
CROMATOGRAFIA DE ABSORCION EN COLUMNA DE HIDROXILAPATITA

La gráfica muestra el perfil de elución de una muestra de Reductasa quinasa, procedente de la columna de ATP-hexano agarosa, al ser aplicada a una columna de Hidroxilapatita.

La actividad Reductasa quinasa viene expresada como diferencia de cpm de mevalonolactona respecto a un control de actividad Reductasa (●—●).

La proteína de las distintas fracciones se determinó midiendo su absorción a 280 nm (Δ—Δ).

El gradiente lineal de Na_xPO_4 de 0 a 100 mM se aplicó en la fracción 14 (---).



mente el tiempo de desarrollo cromatográfico. Con este motivo el segundo DEAE-celulosa fue reducido de 8 ml a 2 ml.

- Sustituir los gradientes lineales de elución por concentraciones constantes de NaCl o Na_xPO_4 en cada caso, siendo estas las necesarias para que la Reductasa quinasa eluyese completamente. Esto permitía disminuir el volumen de las soluciones de elución.
- Disminuir al mismo los tiempos de diálisis.
- Disminuir el tiempo de concentración por ultrafiltración evitando, en los casos en que fuese posible, llegar a volúmenes tan pequeños.
- Evitar la congelación y descongelación de las muestras durante el proceso de purificación puesto que llevaba implícita una considerable pérdida de actividad enzimática.
- Evitar la concentración por ultrafiltración a no ser que fuese necesaria. Durante este proceso la muestra estaba sometida a una agitación constante que de no ser cuidadosamente controlada daba lugar a la aparición de flóculos de proteína que llevaban a una pérdida total de la actividad Reductasa quinasa.

3.2.1. PURIFICACION A HOMOGENEIDAD APARENTE DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA MODIFICADA EN FUNCION DE LOS CRITERIOS QUE SE EXPONEN EN EL APARTADO (3.2)

3.2.1.1. OBTENCION DEL CITOSOL

El citosol se obtenía según la metodología expuesta en el apartado (3.1.1).

3.2.1.2. CROMATOGRAFIA EN "BATCH" DE DEAE-CELULOSA

El citosol se mezclaba directamente, en un vaso de precipitados, con 400 ml de DEAE-celulosa, equilibrada con solución amortiguadora II. La mezcla se mantenía

20 minutos en agitación suave.

Se disponía de un embudo con placa filtrante acoplado a un sistema de succión por vacío generado por una trompa de agua.

La mezcla se filtraba, despreciando los líquidos obtenidos y teniendo la precaución de no dejar secar la resina. Se hacían dos lavados de la resina con 800 ml cada uno de solución amortiguadora II, siguiendo el mismo orden de agitación durante 20 minutos y eliminación de los líquidos de lavado.

La elución de la proteína unida al DEAE-celulosa se realizaba añadiendo un volumen igual al volumen de la resina (400 ml) de solución amortiguadora II 1 M NaCl. Se mantenía en agitación 20 minutos y se filtraba, recuperándose la actividad enzimática en los líquidos resultantes.

3.2.1.3. CONCENTRACION POR PRECIPITACION CON SULFATO

AMONICO

Se añadía sulfato amónico sólido sobre el eluido del DEAE-celulosa siguiendo la misma pauta que se describe en el apartado (3.1.3). En este caso la diálisis se reducía a 5 h.

3.2.1.4. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE AFFI-GEL BLUE

Respecto a lo descrito en el apartado 3.1.4. solo se cambiaba el hecho de no aplicar un gradiente lineal para la elución sino, que se realizaba con NaCl 1.2 M en solución amortiguadora II con un volumen de 350 ml. El eluido se recagía sin fraccionar.

3.2.1.5. CONCENTRACION POR PRECIPITACION CON SULFATO AMONICO

Se seguía la misma pauta que la descrita en el aparta-

do (3.1.3.). El tiempo de diálisis era de 3 h mínimo necesario para la redisolución de la proteína.

3.2.1.6. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE ULTROGEL ACA 34

Se desarrollaba en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 3.1.5.

En esta cromatografía se seguía el patrón de elución de proteína por lectura espectrofotométrica a 280 nm. Con este dato y conociendo el volumen de elución se determinaban las fracciones que debían ser seleccionadas.

Estas fracciones no se concentraban por ultrafiltración, sino que eran directamente aplicadas a la siguiente columna.

3.2.1.7. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-CELULOSA

Las fracciones seleccionadas a la salida de la columna de ultrogel eran introducidas en una columna de 2 ml de lecho de DEAE-celulosa. Se lavaba, una vez introducida la muestra con 20 ml de solución amortiguadora II.

La elución de la proteína se realizaba aplicando 15 ml de esta solución 500 mM NaCl.

El eluido de DEAE-celulosa, que no había sido fraccionado, se concentraba por ultrafiltración hasta 10 ml. Con objeto de disminuir la concentración de NaCl se añadían 20 ml de solución amortiguadora II y se concentraba nuevamente hasta 10 ml. Se repetía esta operación y concentrando finalmente hasta 10 ml.

3.2.1.8. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE ATP-HEXANO AGAROSA

El concentrado anterior se introducía en una columna de ATP-hexano agarosa que se lavaba con 50 ml de solución amortiguadora II. La proteína unida al lecho se eluía añadiendo 50 ml de esta solución 300 mM NaCl.

El eluido se recogía sin fraccionar y se concentraba por ultrafiltración hasta 10 ml. Con objeto de disminuir

la concentración de NaCl se añadían 10 ml de solución amortiguadora II y se concentraba hasta 1 o 2 ml.

El concentrado se guardaba congelado a -80°C .

3.2.1.9. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE HIDROXILAPATITA

La muestra se descongelaba incubándola a 37°C y se diluía con solución amortiguadora II las veces que fuese necesario para que la concentración de NaCl final oscilase alrededor de 50 mM. Se introducía en la columna y se lavaba con 10 ml de solución amortiguadora II llevada a 50 mM NaCl.

La elución de la proteína se realizaba aplicando 15 ml de solución amortiguadora II llevada a 50 mM NaCl y 50 mM Na_xPO_4 . De nuevo se recogía sin fraccionar y se concentraba por ultrafiltración hasta un volumen de 1 a 1.5 ml.

La muestra concentrada se congelaba repartida en alícuotas a -80°C .

Este proceso de purificación es lo suficientemente reproducible como para descartar cualquier ensayo de actividad Reductasa quinasa intermedio y con él se consigue la purificación a homogeneidad aparente de dicha actividad.

3.3. ELECTROFORESIS AL 7.5% DE POLIACRILAMIDA CON SDS EN GELES TIPO PLACA DE ALICUOTAS DE LAS DISTINTAS ETAPAS DE LA PURIFICACION

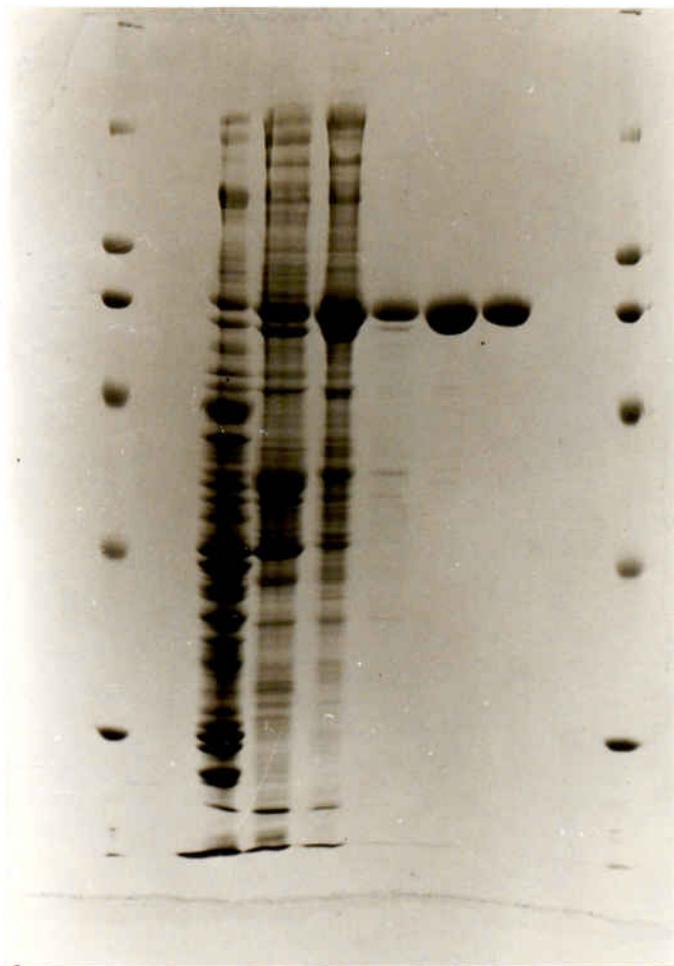
Con objeto de seguir el avance de la purificación, alícuotas de cada una de las etapas fueron sometidas a electroforesis en las condiciones descritas en el apartado (2.8). (Fotografía I).

3.4. RESULTADOS GLOBALES DEL PROCESO DE PURIFICACION DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA DE CITOSOL DE HIGADO DE RATA

En la siguiente tabla (I) se muestran los datos de una purificación típica, de la que se había partido de 100 g de

F O T O G R A F I A I

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 7.5% EN PRESENCIA DE SDS DE LAS DISTINTAS ETAPAS DE LA PURIFICACION



De izquierda a derecha se muestran los desarrollos electroforéticos de las siguientes preparaciones (entre paréntesis se indica la cantidad de proteína de cada preparación que fue introducida en el gel): marcadores de peso molecular (12 µg), citosol (138 µg), primer DEAE-celulosa (100 µg), Affi-Gel Blue (53 µg), segundo DEAE-celulosa (12.6 µg), ATP-hexano agarosa (12.9 µg), Hidroxilapatita (8.3 µg), marcadores de peso molecular (12 µg).

T A B L A I

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

Se partió de 100 g de hígado de rata.
En cada paso de purificación se determinó
la actividad Reductasa quinasa y la proteína,
obteniendo los valores que se expresan en
la tabla.

	Reductasa quinasa (mU)	Proteína (mg)	Actividad específica (mU/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Citosol	2082195	5835	356	1	100
DEAE-celulosa	1176845	518.8	2023	5.6	57
Affi-Gel Blue	204989	25.7	7960	22.3	10
DEAE-celulosa	72138	7.2	10019	28.1	3.4
ATP-hexano agarosa	12166	1.8	6760	19	0.58
Hidroxilapatita	933	0.2	3702	10.4	0.04

hígado, después de las cromatografías en DEAE-celulosa, Affi-Gel Blue, DEAE-celulosa, ATP-hexano agarosa e Hidroxilapatita.

3.5. DETERMINACION DE LA HOMOGENEIDAD DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA PURIFICADO

La homogeneidad de la preparación obtenida al final de la purificación del enzima Reductasa quinasa fue determinada por técnicas electroforéticas en presencia y ausencia de SDS.

En el gel que se presenta en el apartado (3.3), se muestra el desarrollo electroforético de la preparación correspondiente a la última etapa de la purificación, observándose una única banda de proteína.

Cuando esta misma preparación se sometía a electroforesis al 5.5% de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (geles cilíndricos sin SDS, apartado 1.8.5.) aparecía también una única banda de proteína. En la fotografía II, se muestra este desarrollo electroforético. La cantidad de proteína que se introdujo en el gel fue de 0.027 mg.

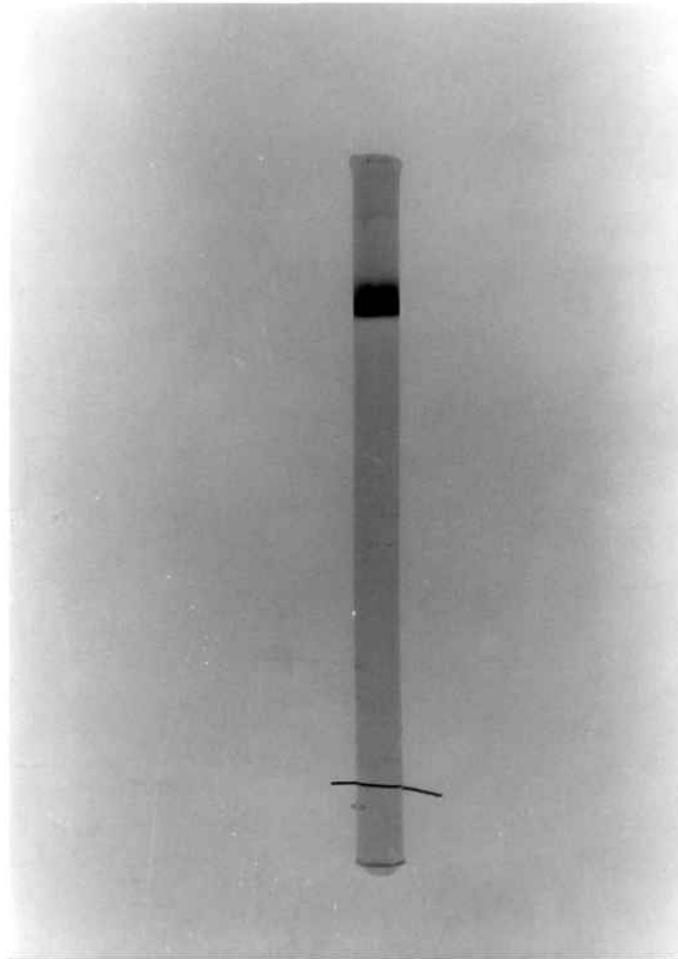
3.6. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA

La determinación del peso molecular de la forma holoenzimática de la Reductasa quinasa se realizó por técnicas de cromatografía de gel filtración. Con este fin se utilizó la columna de Ultrogel AcA 34 ya descrita en la purificación. (Apartado 3.1.5).

Se construyó una recta patrón con proteínas de peso molecular conocido que fueron sometidas a cromatografía en columna de Ultrogel AcA 34 en las mismas condiciones que la preparación de Reductasa quinasa. Las proteínas de la recta patrón eran las siguientes:

F O T O G R A F I A I I

ELECTROFORESIS DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA
QUINASA HOMOGENEA



La fotografía muestra la electroforesis en gel cilíndrico al 5.5% de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes del enzima HMG-CoA reductasa quinasa resultante de la última etapa de purificación (columna de Hidroxilapatita).

La cantidad de proteína sembrada fue de 0.027 mg.

Catalasa	240.000 daltons
Aldolasa	158.000 daltons
Alcohol Deshidrogenasa de levadura	148.000 daltons
Ovoalbúmina	45.000 daltons

En la gráfica VII se muestra esta recta patrón.

3.7. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA CITOSOLICA

El peso molecular de la subunidad del enzima HMG-CoA reductasa quinasa fue determinado en función del Rf que presentaba la banda en geles de tipo placa de poliacrilamida al 7.5% con SDS.

Para ello se construyó una recta patrón con proteínas de peso molecular conocido, las cuales se sometían a un desarrollo electroforético en las mismas condiciones que la preparación homogénea de Reductasa quinasa. (Gráfica VIII)

El enzima HMG-CoA Reductasa quinasa tratado con SDS se resolvió en una única banda cuyo Rf correspondía a un peso molecular de 107.000 daltons. (Fotografía I).

3.8. FOSFORILACION E INACTIVACION DE HMG-CoA REDUCTASA HOMOGENEA POR HMG-CoA REDUCTASA QUINASA CITOSOLICA

Estos experimentos tenían como objeto demostrar que las preparaciones obtenidas en la purificación tenían actividad protein quinasa, con capacidad de fosforilar a la Reductasa, adquiriendo con ello el carácter de Reductasa quinasa definido en un principio y que la incorporación de fosfato a la Reductasa iba acompañada con una disminución de la actividad de la misma.

En el ensayo de fosforilación de la Reductasa homogénea con Reductasa quinasa, la mezcla de inactivación contenía 0.0244 mg de la preparación Reductasa quinasa altamente purificada (fracción ATP-hexano agarosa), 0.0018 mg de Reductasa homogénea y solución de nucleótidos, ya descrita en el apartado 2.6.3. salvo que en este

G R A F I C A VII

CALIBRADO DE LA COLUMNA DE ULTROGEL Aca 34 PARA EL CALCULO APROXIMADO DEL PESO MOLECULAR DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA

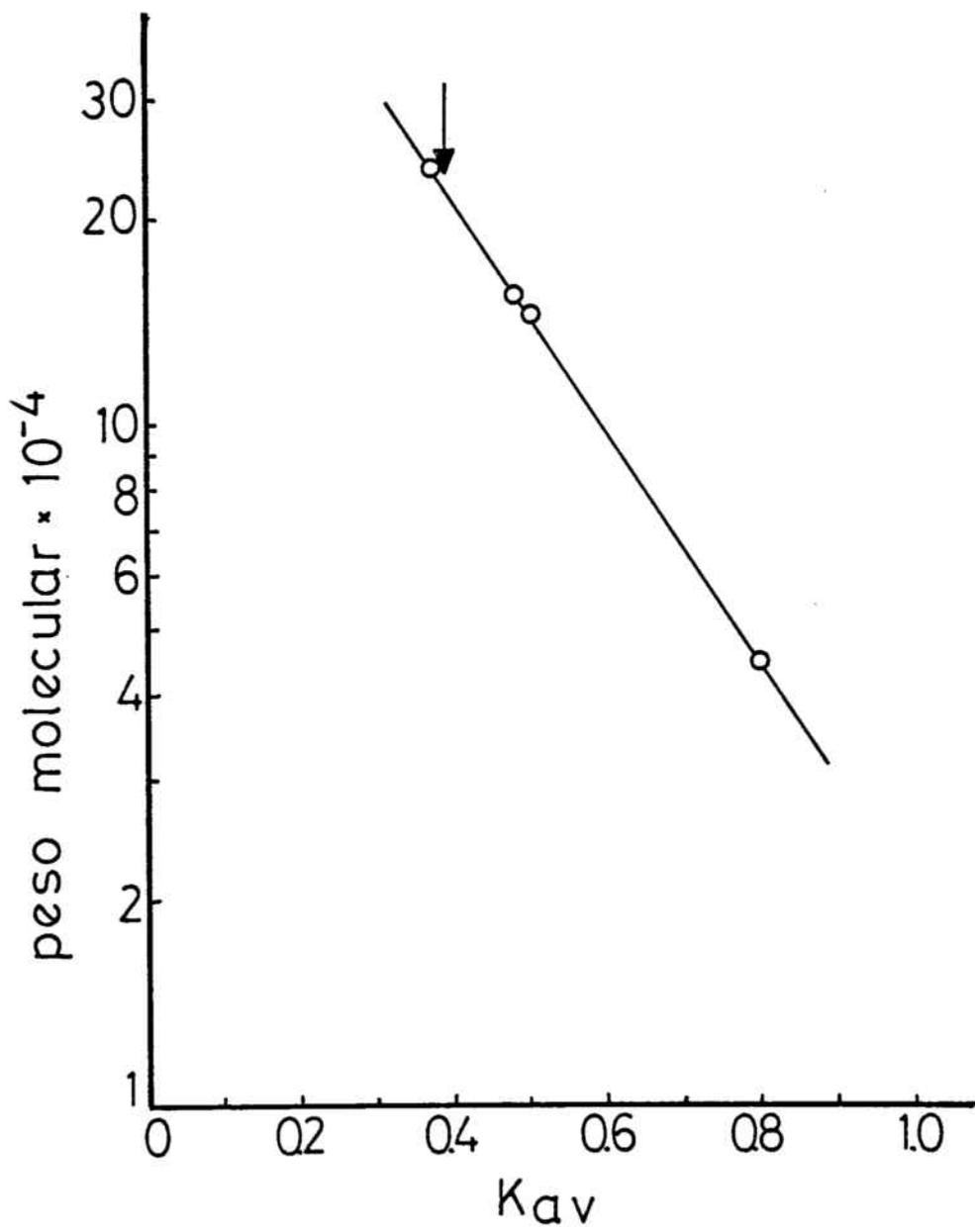
En esta gráfica se representa en ordenadas los pesos moleculares en escala logarítmica y en abcisas los valores de K_{av} .

El volumen vacío de la columna fue medido con Azul Dextrano.

La recta patrón se construyó con las siguientes proteínas de peso molecular conocido:

Catalasa	240.000 daltons
Aldolasa	158.000 daltons
Alcohol deshidrogenasa de levadura	148.000 daltons
Ovoalbúmina	45.000 daltons

La actividad Reductasa quinasa eluyó en una fracción correspondiente a un peso molecular de 205.000 daltons, representada en la gráfica con una flecha.



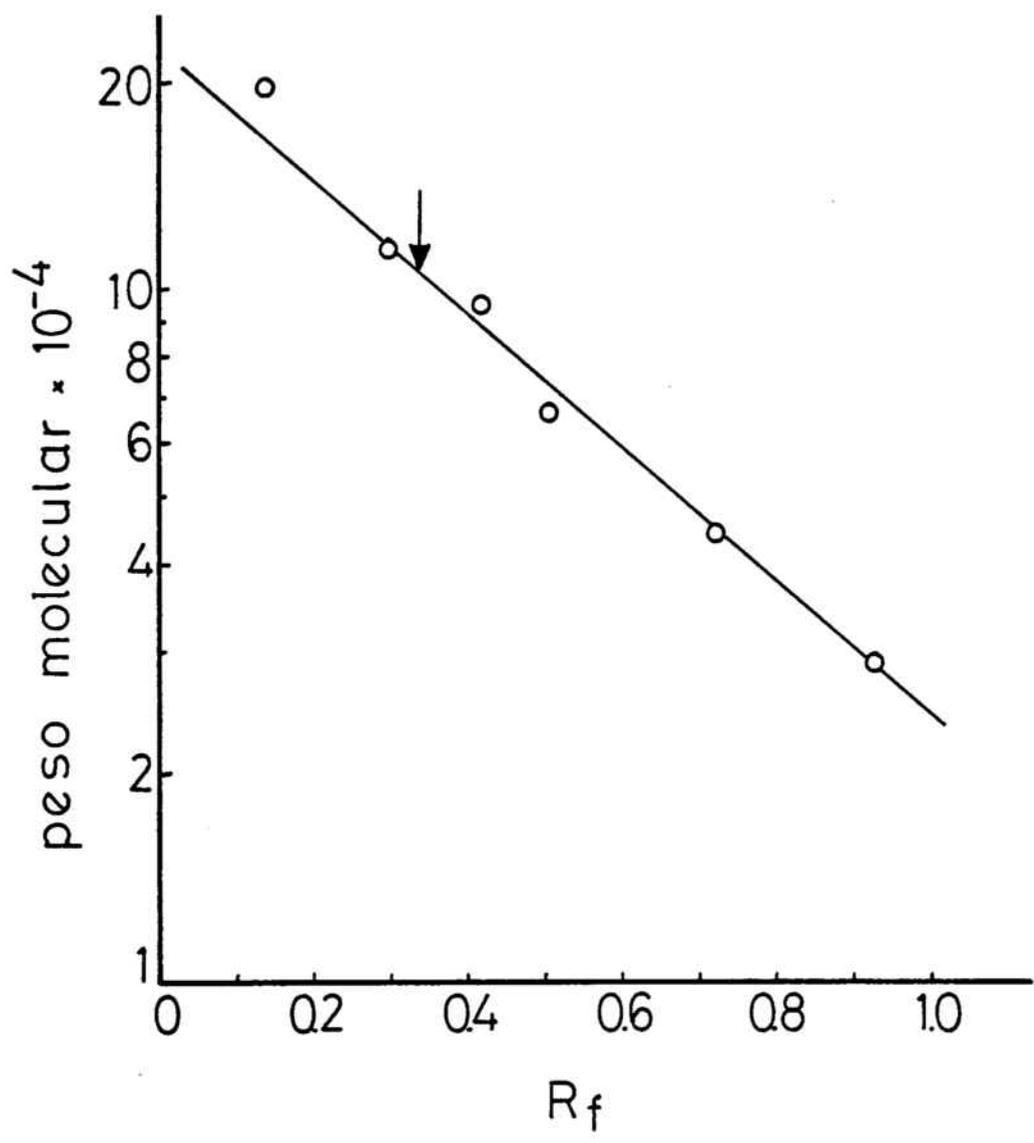
G R A F I C A VIII

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA
SUBUNIDAD DEL ENZIMA HMG-CoA REDUCTASA QUINASA
POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL
7.5% EN PRESENCIA DE SDS.

En esta gráfica está representada la recta
de calibración empleando las siguientes pro-
teínas de peso molecular conocido:

Miosina	205.000 daltons
B-Galactosidasa	116.000 daltons
Fosforilasa b	97.400 daltons
Seroalbúmina	66.000 daltons
Ovoalbúmina	45.000 daltons
Anhidrasa carbónica	29.000 daltons

La Reductasa quinasa presentó un Rf corres-
pondiente a un peso molecular de 107.000 daltons
señalado en la gráfica con una flecha.



caso no llevaba ATP. El (γ - ^{32}P) ATP se añadía dando comienzo a la reacción; en el ensayo la concentración final era de 0.5 mM, (γ - ^{32}P) ATP con una radioactividad específica de 526 cpm/pmol.

A tiempos 0, 2, 10, 15, 30 y 60 minutos se detenía la reacción por precipitación con TCA al 10% y se seguía el tratamiento de las muestras y confección del gel descritos ambos en el apartado 2.8.1.

El tiempo de exposición de la película para obtener la autorradiografía del gel era aproximadamente de 7 h.

La radioactividad ligada a la banda de Reductasa se cuantificaba recortando la correspondiente banda del gel con ayuda de la autorradiografía y midiendo las c.p.m. de $^{32}\text{PO}_4^{-3}$ en un contador de centelleo líquido por efecto Cerenkov. (Gráfica IX)

Debido al alto grado de purificación de ambas preparaciones, tanto la de Reductasa quinasa como la de Reductasa, no se hacía necesaria la inmunoprecipitación de la Reductasa de otras proteínas que podrían aparecer fosforiladas.

En experimentos preliminares se determinó que la banda que aparecía en al autorradiografía correspondía a la de Reductasa por cálculo del peso molecular de la proteína fosforilada que coincidía con el de la Reductasa.

En el ensayo de inactivación de la Reductasa homogénea por la Reductasa quinasa la composición de la mezcla de inactivación en 0.0244 mg de preparación altamente purificada de Reductasa quinasa (fracción ATP-hexano agarosa); 0.00144 mg de Reductasa homogénea (12.75 U) y solución nucleótido idéntica a la descrita en el apartado 2.6.3. salvo en la concentración de ATP que era de 2 mM y que en el ensayo quedaba 0.5 mM.

La pauta de ensayo era idéntica a la descrita en el apartado 2.6.3. y se sacaron alícuotas de 0.005 ml a tiempos 0, 2, 5, 15, 30 y 60 minutos las cuales fueron ensayadas para determinar actividad reductasa. (Gráfica IX)

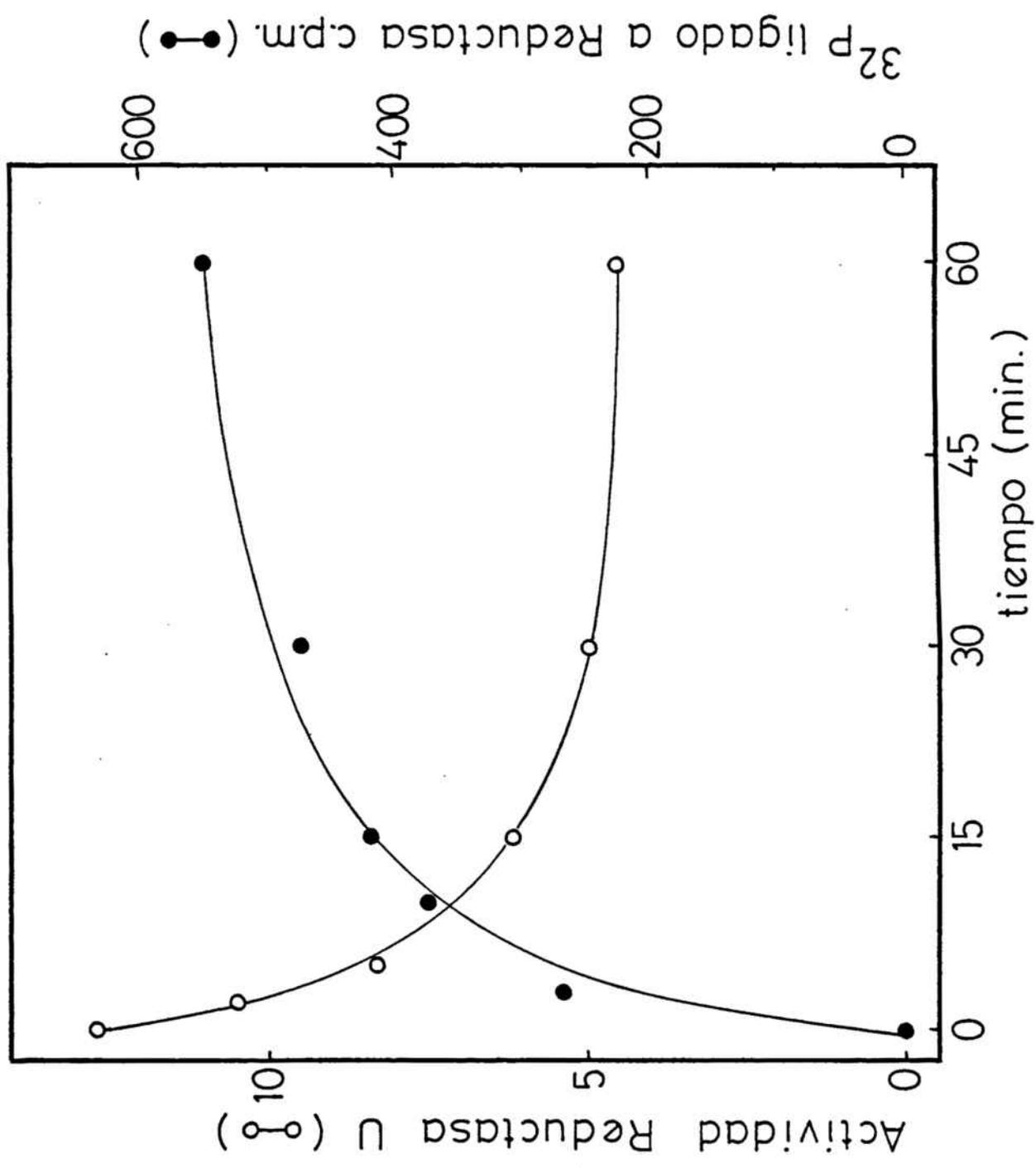
Ensayos realizados con la preparación de Reductasa quinasa homogénea mostraron que tiene capacidad de fosfo-

G R A F I C A IX

FOSFORILACION E INACTIVACION DE HMG-CoA REDUCTASA HOMOGENEA POR HMG-CoA REDUCTASA QUINASA

La gráfica muestra la incorporación de $^{32}\text{PO}_4^{-3}$ a Reductasa homogénea (●) por la Reductasa quinasa a partir de (γ - ^{32}P)ATP, frente al tiempo (min). El $^{32}\text{PO}_4^{-3}$ unido a Reductasa se expresa en c.p.m. medidas por efecto Cerenkov, directamente en la banda correspondiente a la Reductasa recortada del gel con ayuda de la autorradiografía.

Paralelamente se muestra la inactivación de Reductasa (○) homogénea, por la Reductasa quinasa, expresada en unidades de actividad Reductasa residual frente al tiempo de incubación de la inactivación expresado en minutos.



rilar a la Reductasa homogénea a partir de (γ - 32 P) ATP y paralelamente de inactivar a la actividad Reductasa.

3.9. EFECTOS DE LOS DISTINTOS NUCLEOSIDOS DIFOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD REDUCTASA QUINASA

Los primeros estudios sobre los requerimientos de nucleótidos de la Reductasa quinasa (60) pusieron de manifiesto que dicha actividad necesitaba de la presencia de ATP y ADP.

Actualmente un grupo de autores, (74) han apoyado la idea del ADP como un activador alostérico de la Reductasa quinasa citosólica. Este hecho no ha sido reconocido por otros autores como Beg y colaboradores cuya actividad Reductasa quinasa se expresa en ausencia de ADP (79).

Con objeto de comprobar que la Reductasa quinasa, purificada en este trabajo, era activada por ADP, se inactivó Reductasa homogénea con Reductasa quinasa en presencia de ATP/Mg con y sin ADP. Paralelamente y con el fin de observar si otros nucleósidos difosfato podían actuar como activadores, se sustituyó en la inactivación el ADP por CDP, UDP, GDP respectivamente.

La composición de la mezcla de inactivación era 0.0402 mgr de Reductasa quinasa (fracción del ultrogel Aca 34), 0.0018 mgr de Reductasa homogénea (10,2 U) y solución nucleótido descrita en el apartado 2.6.3., que para el caso del ADP era la misma, y en los otros casos llevaba, en lugar de ADP, el nucleósido difosfato correspondiente a la misma concentración.

Paralelamente a las inactivaciones efectuadas en presencia de ATP/nucleósido difosfato/Mg, se realizaron controles con ATP/Mg, ADP/Mg, CDP/Mg, UDP/Mg y GDP/Mg, solo en el primero de los casos se manifestó un efecto de inactivación sobre la Reductasa.

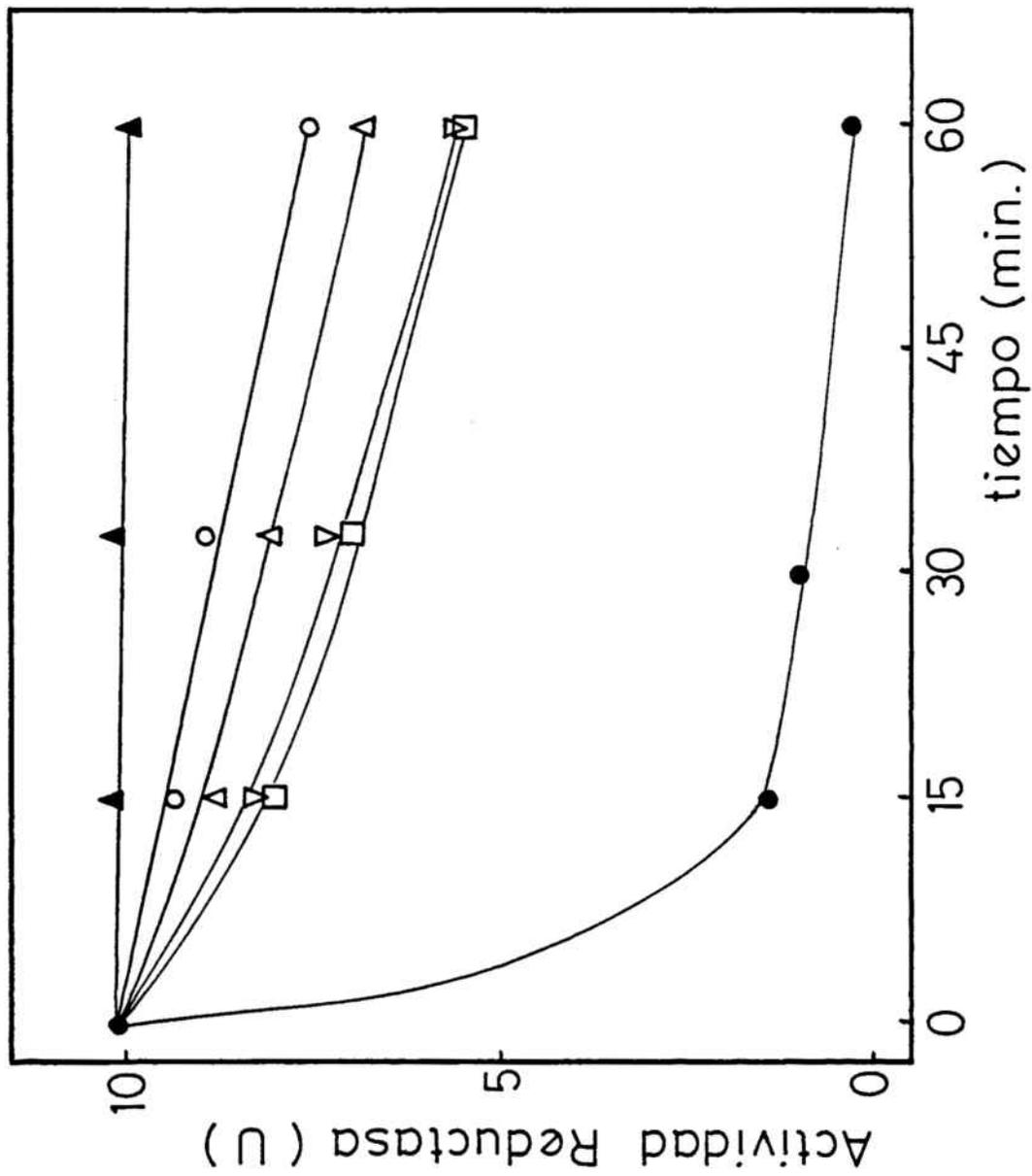
Como se muestra en la gráfica X , si bien en presencia de UDP, CDP o GDP la actividad Reductasaquinasa es ligeramente mayor que con ATP solo, en ningún caso llega a manifestarse tanta actividad como en presencia de ADP. Si la

G R A F I C A X

EFECTO DE LOS DISTINTOS NUCLEOSIDOS DIFOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD REDUCTASA QUINASA

La gráfica muestra los valores de actividad Reductasa, en unidades, frente al tiempo (min) de incubación de la reacción de inactivación con la Reductasa quinasa citosólica en presencia de ATP/Mg y distintos nucleósidos difosfato (○ ATP/Mg; ● ATP/ADP/Mg; △ ATP/GDP/Mg; ▽ ATP/UDP/Mg; □ ATP/CDP/Mg), tal como se describe en el texto.

También, y como control, se representa la actividad Reductasa, en unidades, frente al tiempo de incubación (min), con la preparación de Reductasa quinasa pero en ausencia de Mg (▲).



actividad Reductasa quinasa, medida en condiciones optimas, en presencia de ADP/ATP/Mg se le daba un valor del 100%, las actividades Reductasa quinasa obtenidas en presencia de otros nucleósidos difosfato eran las siguientes:

ATP/Mg	7,4%
ATP/GDP/Mg	13,5%
ATP/UDP/Mg	23,0%
ATP/CDP/Mg	21,2%

Como se puede ver a partir de estos datos los nucleótidos derivados de la pirimidina (UDP y CDP) eran ligeramente mejores activadores de la Reductasa quinasa que el GDP.

Estos datos concuerdan con lo descrito previamente en la literatura (74).

4.- DISCUSION

4. DISCUSION

En 1973, Beg y col. (56) aportaron los primeros indicios sobre la existencia en microsomas de un factor inactivante de la Reductasa microsomal que era dependiente de ATP/Mg. Posteriormente estos mismos autores (57) identificaron una actividad similar en la fracción citosólica.

Según los estudios acerca de la distribución celular de ambas actividades Reductasa quinasa, realizados por Ingebritsen y col. (72), la actividad presente en citosol representaría el 80% de la actividad Reductasa quinasa total y la microsomal el 20% restante. A pesar de este hecho, distintos autores (69,70) han conseguido obtener preparaciones homogéneas de Reductasa quinasa microsomal, sin embargo no ha sido descrita ninguna purificación a homogeneidad de la Reductasa quinasa citosólica. Recientemente Rodwell y col. (74) han reportado una purificación de Reductasa quinasa citosólica hasta una etapa bastante avanzada aunque no han llegado a la homogeneidad.

Los objetivos del trabajo presentado en esta memoria eran la purificación a homogeneidad del enzima HMG-CoA Reductasa quinasa de citosol de hígado de rata, y demostrar que realmente tiene actividad proteína-quinasa sobre la Reductasa.

El retraso en la obtención de preparaciones homogéneas de Reductasa quinasa citosólica se ha debido a la gran inestabilidad que presenta este enzima. Este ha sido el principal problema con el que nuestro laboratorio se ha encontrado en el momento de plantearse la purificación a homogeneidad.

Las medidas que se tomaron para paliar la pérdida de actividad del enzima Reductasa quinasa durante el proceso de purificación fueron varias y atendían a distintos criterios.

Ya se ha hecho referencia en el apartado 3.2. a alguna de estas precauciones, como son el reducir al mínimo posible el tiempo del proceso de purificación, evitar la

congelación y descongelación de las muestras durante el mismo y suprimir cuando era posible el tiempo y los procesos de concentración por ultrafiltración.

Por otra parte, se puso especial interés en la composición de las soluciones amortiguadoras empleadas con el fin de añadir determinados componentes que evitasen ciertos fenómenos a los que el enzima Reductasa quinasa se mostraba altamente sensible, como son la oxidación de grupos sulfhidrilo y la proteolisis. Como protector de grupos sulfhidrilo, a todas las soluciones amortiguadoras, justo en el momento antes de ser usadas, se añadió DTT 5 mM. Concentraciones más bajas de este agente daban lugar a disminución del rendimiento de la purificación. Para evitar los fenómenos de proteolisis se añadía también extemporáneamente, PMSF 0,5 mM y benzamidina 1 mM como inhibidores de tiolproteasas y EDTA 1 mM y EGTA 1 mM como inhibidores de proteasas dependientes de calcio. Rutinariamente el medio de homogeneización del hígado contenía sacarosa 500 mM para evitar la ruptura de lisosomas y la consecuente liberación de proteasas.

Otro punto a tener en cuenta era que la Reductasa quinasa era un enzima interconvertible por fosforilación y defosforilación (78) cuya forma activa era la fosforilada. Por este motivo, ya desde el momento en que se extraía el hígado, se tenía que detener la acción de las proteín fosfatasas. Para ello todas las soluciones amortiguadoras contenían 50 mM NaF y 3 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, conocidos inhibidores de fosfatasas.

La solución amortiguadora de purificación llevaba además como agente estabilizador glicerol al 10%.

A pesar de todas estas precauciones la pérdida de actividad durante el proceso de purificación es realmente notable. Este hecho queda patente en las veces de purificación al final del proceso, que pueden parecer sorprendentemente bajas para una purificación a homogeneidad. Esto es debido a la pérdida de actividad enzimática a través de las distintas etapas la cual, no va acompañada de una pérdida de la proteína como tal.

El método de purificación puesto a punto en nuestro laboratorio incluye cromatografías que separan las proteínas por distintos criterios: intercambio iónico (DEAE-celulosa), afinidad (Affi-Gel Blue y ATP-hexano-agarosa), exclusión molecular (Ultrogel AcA 34) y adsorción-desorción (Hidroxiapatita). Esto permite eliminar rápidamente proteínas contaminantes y evitar copurificaciones.

Alícuotas de cualquiera de las etapas de purificación congeladas a -80°C , en presencia de los componentes descritos para proteger la actividad Reductasa quinasa, conservan la actividad enzimática durante varios meses.

Ness y col. (75) apoyaron la idea de que la inactivación de la Reductasa observada al ensayar sobre ella la actividad Reductasa quinasa no era debida a esta actividad sino a la presencia en la preparación de Mevalonato quinasa. Las preparaciones de Reductasa quinasa citosólica obtenidas en este trabajo, carecen de actividad Mevalonato quinasa que a pesar de ser también un enzima citosólico, se excluye en el DEAE-celulosa (76), primera columna empleada en el proceso de purificación propuesto.

El peso molecular del holoenzima (205.000 daltons), obtenido por gel filtración, coincide con el aportado por Nordstrom y col. (71) para la Reductasa quinasa citosólica semipurificada, y con el aportado por Ferrer y Hegardt (70), aunque en este caso para la Reductasa quinasa microsomal. A partir del peso molecular de la subunidad (107.000 daltons) y del holoenzima parece posible afirmar que la Reductasa quinasa citosólica es un dímero de dos subunidades de igual peso molecular.

La Reductasa quinasa en cualquiera de sus etapas de purificación muestra más actividad sobre la Reductasa microsomal que sobre la Reductasa homogénea. Esto puede atribuirse a una diferencia como sustrato por parte de la Reductasa, que el ambiente microsomal favorezca la actividad Reductasa quinasa o a que esta actividad necesite de algún factor presente en microsomas.

Otro objetivo que iba implícito en este trabajo era demostrar que la actividad Reductasa quinasa purificada era capaz de fosforilar y simultáneamente inactivar a Reductasa homogénea. Los ensayos de fosforilación se realizaron con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y se observó la unión de ^{32}P a la banda de Reductasa, cuando ésta era incubada en presencia de Reductasa quinasa en condiciones óptimas de actividad. Debido a la pureza de ambas preparaciones, tanto la de Reductasa quinasa como la de Reductasa, no se hacía necesaria la inmunoprecipitación de la Reductasa con anticuerpos específicos para detectar la radiactividad ligada a la misma. Este hecho permitía aumentar la eficiencia en la recuperación de la Reductasa marcada.

Todos los ensayos de actividad Reductasa quinasa se han realizado en presencia de ADP, que como se muestra en la gráfica X, tiene un efecto activador sobre la Reductasa quinasa. La pequeña activación producida por otros nucleósidos difosfato puede calificarse de insignificante frente a la producida por el ADP.

5.- CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1.- La purificación de Reductasa quinasa citosólica consta de las siguientes cromatografías: DEAE-celulosa, Affi-Gel Blue, Ultrogel AcA 34, DEAE-celulosa, ATP-hexano agarosa e Hidroxilapatita. En todas ellas la actividad eluye en forma de un único pico. El método de purificación puesto a punto permite obtener preparaciones homogéneas de Reductasa quinasa citosólica.

2.- La Reductasa quinasa es un enzima altamente sensible a proteólisis y oxidación de grupo SH. Ambos fenómenos han de ser prevenidos por la inclusión extemporánea en las soluciones amortiguadoras de DTT, PMSF y benzamidina.

3.- Las preparaciones obtenidas durante la purificación a partir del primer DEAE-celulosa carece de actividad Mevalonato quinasa.

4.- La Reductasa quinasa citosólica tiene un peso molecular de 205.000 daltons y consta de dos subunidades de igual peso molecular (107.000 daltons).

5.- La preparación homogénea es capaz de activar tanto a la Reductasa microsomal como a la Reductasa homogénea en presencia de ADP/ATP/Mg.

6.- La preparación homogénea de Reductasa quinasa es capaz de unir covalentemente $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ a partir de (γ - ^{32}P) ATP a la Reductasa homogénea.

7.- La Reductasa quinasa purificada en este trabajo es fuertemente activada por la presencia de ADP. Esta activación es sensiblemente menor cuando el ADP se sustituye por otros nucleósidos difosfato tales como CDP, UDP y GDP.

6.- BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Siperstein, M.D. (1970), *Curr. Top. Cell. Regul.* 2, 65-100
- 2.- Goh, E.H. y Heimburg, M. (1977), *J. Biol. Chem.* 252 2822-2826.
- 3.- Brown, M.S., Kovanen, P.T. y Goldstein, J.L. (1981) *Sci.* 212, 628-635.
- 4.- Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73, 2434-2438.
- 5.- Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71, 788-792.
- 6.- Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1974), *J. Biol. Chem.* 249, 5153-5162.
- 7.- Goldstein, J.L., Dana, S.E y Faust, J.R. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 8487-8495.
- 8.- Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1977), *Ann. Rev. Biochem.* 46, 897-930.
- 9.- Brown, M.S., Kovanen, P.T. y Goldstein, J.L. (1980), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 348, 84.
- 10.- Rodwell, V.W., Nordstrom, J.L. y Mitschelen, J.J. (1976) *Adv. Lip. Res.* 14, 1-74.
- 11.- Kawachi, T. y Rudney, H. (1970), *Biochem.* 9, 1700-1705.
- 12.- Brown, M.S., Dana, S.E., Dietschy, J.M. y Siperstein, M.D. (1973), *J. Biol. Chem.* 248, 1731-1738.
- 13.- Heller, R.A. y Gould, R.G. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 859-865.
- 14.- Heller, R.A. y Gould, R.G. (1975), *Biochem. Biophys. Acta.* 338, 245-259.
- 15.- Ness, G.C., Spindler, C., Moffler, M.M. (1979), *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 493-499.
- 16.- Beg, Z.H. y Osborne, J.C. Jr. (1982), *Fed. Proc.* 41, 1143.
- 17.- Heller, R.A. y Shrewsbury, M.A. (1976), *J. Biol. Chem.* 251, 3815-3822.
- 18.- Kleisek, D.A. y Porter, J.W. (1979), *J. Biol. Chem.* 254, 7591-7599.
- 19.- Ness, G.C., Way, S.C., Wickham, P.S. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 81-85.

- 20.- Chin, D.J., Luskey, K.L., Anderson, R.G.W., Faust, J.R., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1982), Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79, 1185-1189.
- 21.- Chin, D.J., Luskey, K.L., Faust, J.R., Mc Donald, R. J., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1982), Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79, 7704-7708.
- 22.- Chin, D.J., Gil, G., Russell, D.W., Liscum, L., Luskey, K.L., Basu, S.K., Okayama, N., Berg, P., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1984), Nature. 308, 613-617.
- 23.- Ness, G.C. y Mc Creery, M.J. (1983), Int. Cong. Biochem. 13th (San Francisco) Abstract 162.
- 24.- Higgins, M.J.P., Kawachi, T. y Rudney, H. (1971), Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 138-144.
- 25.- Shapiro, D.J. y Rodwell, V.W. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 867-872.
- 26.- Kandutsch, A.A. y Saucier, S.E. (1969), J. Biol. Chem. 244, 2299-2305.
- 27.- Dugan, R.E., Slagay, L.L., Brieds, A.V. y Porter, J.W. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 152, 21-27.
- 28.- Edwards, P.A. y Gould, R.G. (1972), J. Biol. Chem. 247, 1520-1524.
- 29.- Clarke, C.F., Fogelman, A.M. y Edwards, P.A. (1984), J. Biol. Chem. 259, 10439-10447.
- 30.- Linn, T.C. (1967), J. Biol. Chem. 242, 990-993.
- 31.- Brown, M.S. y Goldstein, J.L. (1980), J. Lipid Res. 21, 505-517.
- 32.- Endo, A., Duroda, M. y Tanzawa, K. (1976), FEBS Lett. 72, 323-326.
- 33.- Shapiro, D.S. y Rodwell, V.W. (1971), J. Biol. Chem. 246, 3210-3216.
- 34.- Shapiro, D.S. y Rodwell, V.W. (1972), Biochem. 11, 1042-1045.
- 35.- Higgins, M.J.P. y Rudney, H. (1973), Nat. New. Biol. 246, 60-61.
- 36.- Arebalo, R.E., Hardgrave, J.E., Nolan, B.J. y Scallen, T.J. (1980), Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77, 6429-6433.
- 37.- Arebalo, R.E., Tormanen, C.D, Hardgrave, J.E., Nolan, B. J. y Scallen, T.J. (1982), Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79, 51-55.

- 38.- Scallen, T.J., Hardgrave, J.E. y Heller, R.A. (1981) *Methods in Enzimology* 74, 320-342. Academic Press Inc. New York, San Francisco, London.
- 39.- Laemmlli, U.K., (1970), *Nature* (London) 277, 680.
- 40.- Edwards, P.A., Lan, S., Tanaka, R.D. y Fogelman, A.M. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 7272-7275.
- 41.- Sinensky, M., Torget, M. y Edwards, P.A. (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 11774-11779.
- 42.- Sinensky, M. y Logel, J. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 8547-8549.
- 43.- Gil, G., Faust, J.R., Chin, D.J., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (1985), *Cell.* 41, (in press).
- 44.- Erickson, S.K., Davinson, A.M. y Gould, R.G. (1975), *Biochem. Biophys. Acta.* 409, 57-67.
- 45.- Kandutsch, A.A. y Thompson, B. (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 10813-10826.
- 46.- Mitropoulos, K.A., Knight, B.L., Reeves, B.E.A. (1980), *Biochem. J.* 185, 435-441.
- 47.- Fairbanks, K.P., Witte, D.L. y Goodman, D.S. (1982), *Fed. Proc.* 41, 621.
- 48.- Habenicht, A.J.R., Glomset, J.A. y Ross, R. (1980), *J- Biol. Chem.* 255, 5134-5140.
- 49.- Lakshmanan, M.R., Nepokroeff, C.M., Ness, G.C., Dugan, R.E. y Porter, J.W. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, 704-710.
- 50.- Lakshmanan, M.R., Dugan, R.E., Nepokroeff, C.M., Ness, G.C. y Porter, J.W. (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 89-95.
- 51.- Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R., Ness, G.C., Dugan, R.E. y Porter, J.W. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 387-393.
- 52.- Dugan, R.A., Ness, G.C., Lakshmanan, M.R., Nepokroeff, C.M. y Porter, J.W. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 499-504.
- 53.- Gil. G., (1981), Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- 54.- Juder, W., Nulte, I. y Wieland, O. (1968), *Eur. J. Biochem.* 4, 273-280.

- 55.- Kandutsch, A. A. y Packie, R.M. (1970), Arch. Biochem. Biophys. 140, 122.
- 56.- Beg, Z.H., Allmann, D.W. y Gibson, D.M. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1362-1369.
- 57.- Beg Z.H., Allmann, D.W., Anderson, P.J., Pruden, E. y Gibson, D.M. (1974), Fed. Proc. 33, 1428.
- 58.- Berndt, J. y Gaumert, R. (1974), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 905-910.
- 59.- Berndt, J., Hegardt, F.G., Bové, J., Gaumert, R., Still, J. y Cardó, M.T. (1976), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1277-1282.
- 60.- Brown, M.S., Brunschede, G.Y., y Goldstein, J.L. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2502-2509.
- 61.- Bové, J. y Hegardt, F.G. (1978), FEBS Lett. 90, 198-202.
- 62.- Gil, G., Siges, M., Bové, J. y Hegardt, F.G. (1980) FEBS Lett. 110, 195-199.
- 63.- Rogers, D.H., Keith, M.L., Rodwell, V.W. y Rudney, H. (1979), J. Lipid Res. 20, 1048.
- 64.- Keith, M.L., Rodwell, V.W., Rogers, D.H. y Rudney, H. (1979), Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 969-975.
- 65.- Beg, Z.H., Stonik, J.A. y Brewer, H.B. (1978), Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 75, 6378-6382.
- 66.- Gil, G., Sitges, M. y Hegardt, F.G. (1981), Arch. Biochem. Biophys. 210, 224-229.
- 67.- Font, E., Sitges, M. y Hegardt, F.G. (1982), Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 705-710.
- 68.- Keith, M.L., Kennelly, P.J. y Rodwell, V.W. (1983), J. Prot. Chem. 2, 209-220.
- 69.- Beg, Z.H., Stoniz, J.A. y Brewer, H.B. (1980) J. Biol. Chem. 255, 8541-8545.
- 70.- Ferrer, A. y Hegardt, F.G. (1984), Arch. Biochem. Biophys. 230, 227-237.
- 71.- Nordstrom, J.V., Rodwell, V.W. y Mitschelen, J.J. (1977), J. Biol. Chem. 252, 8924-8934.
- 72.- Ingebritsen, T.S., Parker, R. A. y Gibson, D.M. (1981), J. Biol. Chem. 256, 1138-1144.
- 73.- Ness, G.C. (1979), J. Lipid Res. 20, 1048.

- 74.- Harwood, H.J., Brandt, K.G. y Rodwell, V.W. (1984),
J. Biol. Chem. 259, 2810-2815.
- 75.- Ness, G.C., Benton, G.A., Deiter, S.A. y Wickham, R.S.
(1982), Arch. Biochem. Biophys. 214, 705-713.
- 76.- Beg, Z.H. y Stonik, J.A. (1982), Biochem. Biophys. Res.
Commun. 108, 559-566.
- 77.- Ingebritsen, T.S., Lee, H.S., Parker, R.A. y Gibson, D.
M. (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1268-
1277.
- 78.- Beg, Z.H., Stonik, J.A. y Brewer, H.G. (1979), Proc.
Nat. Acad. Sci. USA. 76, 4375-4379.
- 79.- Beg, Z.H., Stonik, J.A. y Brewer, H.B. (1984), Proc.
Nat. Acad. Sci. USA. 81, 7293-7297.
- 80.- Beg, Z.H., Stonik; J.A. y Brewer, H.B. (1985), J.
Biol. Chem. 260, 1682-1685.
- 81.- Engstrom, L., Zetterqvist, V., Ragnarsson, V., Ekman,
P. y Dahlkvist Edberg, V. (1982), Cell Function and
Differentiation. 203-212. Alan R. Liss, New York.
- 82.- Parker, R.A., Miller, S.J. y Gibson, D.M. (1984),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 629-635.
- 83.- Gil, G., Sitges, M. y Hegardt, F.G. (1981), Biochem.
Biophys. Acta. 663, 211-221.
- 84.- Hegardt, F.G., Gil, G. y Calvet, V.E. (1983), J. Lipid.
Res. 24, 821-829.
- 85.- Gil, G. y Hegardt, F.G. (1982), Arch. Biochem. Biophys.
212, 192-198.
- 86.- Gil, G., Calvet, V.E., Ferrer, A. y Hegardt, F.G. (1982)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1217-1224.
- 87.- Sitges, M., Gil, G. y Hegardt, F.G. (1984), J. Lipid.
Res. 25, 497-506.
- 88.- Calvet, V.E., Gil, G. y Hegardt, F.G. (1985), Arch.
Biochem. Biophys. 236, 753-765.
- 89.- Ingebritsen, T.S. y Cohen, P. (1983), Eur. J. Biochem.
132, 255-261.
- 90.- Ingebritsen, T.S., Foulkes, J.C. y Cohen, P. (1983),
Eur. J. Biochem. 132, 263-274.
- 91.- Ingebritsen, T.S., Steward, A.A., Cohen, P. (1983),
Eur. J. Biochem. 132, 297-307.

- 92.- Brown, M.S., Dana, S.E. y Siperstein, M.D. (1974),
J. Biol. Chem. 249, 6585-6589.
- 93.- Huff, J.W., Gilfillan, J.L. y Hunt, V.M. (1963),
Proc. Soc. Exc. Biol. Med. 114, 352-355.
- 94.- Philipp, B.W. y Shapiro, D.J. (1979), J. Lipid.
Res. 20, 588-593.
- 95.- Goldfarb, S. y Pitot, H.C. (1971), J. Lipid Res.
12, 512-515.
- 96.- Knappe, J. (1974), Methods in Enzymatic Analysis
(Bergmeyer H. U., Ed.) Vol. 4. pp. 2026-2030,
Verlag Chemie, Weinheim.
- 97.- George, R., Menon, A.S., Ramasarma, T. (1978), Biochem.
Biophys. Res. Commun. 84, 544-549.
- 98.- Bradford, M.M. (1976), Anal. Biochem. 72, 248-254.
- 99.- Walseth, T.F. y Johnson, R.A. (1979), Biochem.
Biophys. Acta. 526, 11-31.