Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Aislamiento y caracterización de una Aminopeptidasa en el ascomicete Saccobolus platensis : efecto de la fosforilación del sustrato sobre la actividad enzimática

Fernández Murray, Jorge Pedro

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Fernández Murray, Jorge Pedro. (1994). Aislamiento y caracterización de una Aminopeptidasa en el ascomicete Saccobolus platensis : efecto de la fosforilación del sustrato sobre la actividad enzimática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2683_FernandezMurray.pdf

Cita tipo Chicago:
Fernández Murray, Jorge Pedro. "Aislamiento y caracterización de una Aminopeptidasa en el ascomicete Saccobolus platensis : efecto de la fosforilación del sustrato sobre la actividad enzimática". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2683_FernandezMurray.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis:

Aislamiento y Caracterización de una Aminopeptidasasa en el ascomicete *Saccobolus platensis*. Efecto de la Fosforilación del Sustrato sobre la Actividad Enzimática.

Autor:

Jorge Pedro Fernández Murray

Directora de Tesis:

Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron

Lugar de Trabajo:
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

-1994-

fbcs
2683

FCEyN BIBLIOTECA

A Sandri y a Andrés, con todo mi amor.

A mis viejos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Passeron, Directora de este trabajo de Tesis, por su guía, apoyo y estímulo constantes a lo largo de estos años. Por su generosa y entusiasta disposición al trabajo y a la discusión científica; por la libertad y la confianza que me ha brindado.

A los Dres. María Leonor Cantore, Susana Silberstein y Andrés Muro por abrirme las puertas al fascinante mundo de la proteólisis. En particular, a la Dra. Cantore por estar siempre dispuesta a escuchar y a aportar su sapiencia.

Quiero agradecer a la Dra. Cristina Paveto por su interés en este trabajo y por su libre actitud para pensar y discutir.

A la Dra. Silvia Moreno y al Dr. Miguel Angel Galvagno por la voluntad de colaboración y disposición para enseñar.

A la Dra. Alcira Nesse y al personal docente de la Cátedra de Análisis Biológicos, por su desinterasada contribución teórico-práctica. Asimismo quiero agradecer a la Dra. Lederkremer y a sus colaboradores por la ayuda y asistencia brindada.

A la Dra. Flavia Forchiassin y a todo el personal docente de la Cátedra de Botánica, por su generosa colaboración.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio por la inestimable ayuda que generosamente me han dado y por los buenos momentos compartidos: Patricia Pardo, Claudia Tomes, Georgia Egidy, Marcelo Guthman y Claudia Gonzalez. A las mucorales: Elba Pereyra, Silvia Rossi y Vanina Zaremberg. A los cándidos (pasados y presentes): Lilian Montero, Damián Romero, Gustavo Mallo, Ricardo Biondi, Alicia Zelada, Kathy Walz y Rocío Castilla. A los peptidásicos Andrea Samela y Pablo Hammerschmidt. Sinceramente, muchas gracias.

Quiero agradecer también a Juan Carlos, a Adalí y a Ernesto, a Teresa, a Guille y a Bea, a Eduardo y a Cecilia y a todos y cada uno con los cuales compartí estos buenos años.

Agradezco a la Sra. Alicia Alcaraz y a la Srta. Noemí Arguello, por su esmerada labor técnica y su cotidiana simpatía.

Quiero agradecer al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (CONICET-UBA) por el análisis de secuencia de péptidos y el análisis composicional de aminoácidos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la Beca Doctoral otorgada.

A la Universidad de Buenos Aires por la Beca de Perfeccionamiento concedida.

Quiero agradecer al Dr. Augusto García y a todo el personal docente y no docente de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Agronomía de esta Universidad, por la generosa recepción que me han dado y su amplia disposición para colaborar.

Finalmente, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales *in toto* por todo lo que de ella he recibido y que posibilitó la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

AMP cíclico	3´-5´ adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
bis-Tris-propano	1, 3-bis[tris (hidroximetil) metilamino] propano
Bz	benzoil
Cbz	carbobenzoxi
cDNA	DNA copia
cpm	cuentas por minuto
Da	Dalton
DEAE	dietil-aminoetil
dimetil POPOP	1, 4 -bis (2-(4 metil-5 fenil-oxazol)) benceno
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitol
E-64	L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidinio) butano
EDTA	etilendiamino tetraacetato
EGTA	etilenglicol-bis (β-aminoetil éter)N N´tetraacético
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N´-[2-ácido etanosulfónico]
kDa	kiloDalton
Ki	constante de disociación del complejo enzima-inhibidor
Km	constante de Michaelis de la enzima para el sustrato
mA	miliamperio
mU	miliunidad
munidad	miliunidad
p-CMB	4-cloro mercuribenzoato
p-HMB	4-hidroxi mercuribenzoato
Pi	ortofosfato libre
PIPES	piperazina-N, N´-bis (2-ácido etano sulfónico)
PK A	quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluoruro
pNA	4-nitroanilida
PPO	2, 4 difeniloxazol
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
TLCK	N-tosil-L-leucil cloro metil cetona
TPCK	N-tosil-L-fenilalanil cloro metil cetona
Tris	2-amino 2(hidroximetil)-1, 2 propanodiol
Vmax	velocidad máxima de la reacción enzimática

INDICE

INTRODUCCION 1
AMINOPEPTIDASAS: CLASIFICACION, ESTRUCTURA Y FUNCION 3
PROTEASAS Y PROTEOLISIS EN *Sacharomyces cerevisae* 15
SISTEMA SECRETOR 15
SISTEMA VACUOLAR 17
SISTEMA CITOSOLICO 21
RELACIONES ENTRE EL SISTEMA VACUOLAR Y EL CITOSOLICO 26
OTRAS PROTEASAS EN *S. cerevisiae* 28
ENDOPROTEASAS 28
AMINOPEPTIDASAS 28
CARBOXIPEPTIDASAS 30
REGULACION DE LA PROTEOLISIS 31
COMPARTIMENTALIZACION 31
SINTESIS DE PROTEASAS 31
INHIBIDORES Y ACTIVADORES 31
METABOLITOS 32
SUSCEPTIBILIDAD DE SUSTRATOS 33
RELACION ENTRE FOSFORILACION Y PROTEOLISIS 35
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO 36

MATERIALES Y METODOS
1. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO 40
1.1 ORGANISMO Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA 40
1.2 CULTIVOS 40
1.2.1. CULTIVOS PARA PREPARACION DE ENZIMAS 40
1.2.2. CULTIVOS PARA MARCACION *IN VIVO* DE PROTEINAS 40
2. PURIFICACION DE ENZIMAS 41
2.1 PREPARACION DE EXTRACTOS SOLUBLES 41
2.2 PURIFICACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA 41
2.2.1 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-SEPHACEL 41
2.2.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FENIL-SEPHAROSA 41
2.2.3 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-300 42
2.2.4 ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS 42
2.3. PURIFICACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA 43
2.3.1 PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO 43
2.3.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FENIL-SEPHAROSA 43
2.3.3 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-SEPHACEL 43
2.3.4 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-200 HR 43

3. ENSAYOS ENZIMATICOS 44
3.1 MEDICION DE ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA POR HIDROLISIS DE FOSFOKEMPTIDO[^{32}P] 44
3.2 MEDICION DE ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA POR HIDROLISIS DE AMINOACIDOS-P-NITROANILIDA 44
4. PREPARACION DE FOSFOPEPTIDOS[^{3}H]/[^{32}P] ENDOGENOS 45
4.1 MARCACION *IN VIVO* DE PROTEINAS CON LEUCINA[^{3}H] 45
4.2 CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHACEL DE EXTRACTOS SOLUBLES Y DETECCION DE SUSTRATOS ENDOGENOS DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP CICLICO 45
..4.3 ENSAYO DE FOSFORILACION DE PROTEINAS 45
4.4 PREPARACION DE FOSFOPROTEINAS[^{32}P] 46
4.5 GENERACION Y AISLAMIENTO DE FOSFOPEPTIDOS[^{3}H]/[^{32}P] 46
4.6 ANALISIS CROMATOGRAFICO EN COLUMNA DE GEL P-2 46
5. OTRAS TECNICAS
5.1 DOSAJE DE PROTEINA 47
5.2 SINTESIS DE FOSFOKEMPTIDO[^{32}P] 47
5.3 PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL FOSFOKEMPTIDO[^{32}P] 47
5.4 PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP CICLICO DE CORAZON BOVINO 48
5.5 CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA DE MICROCELULOSA 49
5.6 ELECTROFORESIS EN PLACA DELGADA DE MICROCELULOSA 49
5.7 ANALISIS DE AMINOACIDOS 49
5.8 SECUENCIACION DE PEPTIDOS 49
5.9 HIDROLISIS DE PROTEINAS[^{3}H] 49
5.10 DETERMINACION DE LAS PROTEINAS Y PEPTIDOS MARCADORES 49
5.11 MEDICION DE RADIOACTIVIDAD 50
6. MATERIALES 50

RESULTADOS
SECCION A: IDENTIFICACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA 52
SECCION B: ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN EXTRACTOS SOLUBLES DE *S.platensis* 56
SECCION C: PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA 62
PURIFICACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA 62
CARACTERIZACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA 64
ESTRUCTURA Y PESO MOLECULAR 64
DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON EL pH 67

EFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS 67
EFECTO DE CATIONES 69
EFECTO DE AMINOACIDOS 71
ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO 71
CONSTANTES CINETICAS 76
SECCION D: EFECTO DE LA FOSFORILACION DEL SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOPEPTIDASA 78
SECCION E: PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA 90
PURIFICACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA 90
CARACTERIZACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA 93
PESO MOLECULAR 93
DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON EL pH 94
EFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS 95
ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO 97

CONCLUSIONES 99

BIBLIOGRAFIA 102

INTRODUCCION

El balance entre la síntesis y maduración de proteínas y su degradación es un principio celular vital para adaptar el metabolismo a los requerimientos celulares y a las condiciones ambientales (Schimke y Doyle, 1970).

Durante muchos años la imagen que se tenía de la regulación del metabolismo celular estuvo basada en el conocimiento de los mecanismos de síntesis proteica y de la unión covalente y no covalente de ligandos a proteínas. Resultaba difícil imaginar la proteólisis intracelular como un elemento de control del metabolismo. Por qué una estructura tan costosa de sintetizar como la molécula proteica podría ser degradada por la misma célula? Sin embargo, en los últimos años fue puesto en evidencia que la proteólisis es esencial en el metabolismo de todas las células (Hilt y Wolf, 1992).

La acción de las proteasas puede ser dividida en dos categorías: 1) proteólisis limitada, en la cual las proteasas hidrolizan una o varias uniones peptídicas específicas de los sustratos proteicos y 2) degradación completa de los sustratos a través de la hidrólisis de la totalidad de las uniones peptídicas. Mientras este último mecanismo elimina completamente una dada proteína regulando su concentración intracelular y recicla sus aminoácidos constituyentes hacia la maquinaria biosintética de la célula, la proteólisis limitada cumple variadas funciones desde la maduración de proteínas y péptidos para alcanzar su función biológica hasta la modificación e inactivación de proteínas a fin de alterar o inactivar su función biológica (Wolf, 1992).

La vida media de las proteínas intracelulares difiere marcadamente entre sí, indicando la especificidad del proceso de degradación. Se pueden definir tres clases de proteínas celulares según la vida media: 1) Proteínas de vida media larga: constituyen la mayor parte de las proteínas celulares y son relativamente poco importantes para el control metabólico. 2) Proteínas de vida media corta: son proteínas normales de la célula con una velocidad de recambio elevada. Dentro de este grupo se encuentran proteínas enzimáticas que participan en puntos de control del metabolismo. 3) Proteínas anormales: son degradadas a una velocidad mayor que las proteínas de vida media corta. En este grupo se ubican proteínas que resultan de errores en la síntesis, de una mutación sin sentido o que son incompletas.

Las proteasas pueden clasificarse en cuatro grupos según las características del sitio activo.

a) Serín-proteasas: están caracterizadas por la presencia de un residuo serina en su sitio activo y el mecanismo catalítico involucra la unión covalente del sustrato al residuo serina.

Las serín-proteasas son inhibidas por diisopropil-fosfofluoridato (Dip-F) y también por fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) o por cloro metil cetonas (TPCK o TLCK). Estos últimos inhibidores no son tan específicos ya que también inhiben a las cisteín-proteasas.

b) Cisteín o tiol-proteasas: están caracterizadas por la presencia de un residuo cisteína en el sitio activo, que participa en la formación del complejo covalente con el sustrato.

Son inhibidas por bajas concentraciones de p-hidroximercuribenzoato (p-HMB) y p-cloromercuribenzoato (p-CMB), como también por agentes alquilantes (iodoacetato, iodoacetamida y N-etil-maleimida). El PMSF también es capaz de inhibir a las cisteín-proteasas, pero a diferencia de las serín-proteasas, la inhibición puede ser revertida por ditiotreitol. Estos reactivos no son específicos para la cisteína de sitio activo y reaccionan con otros residuos sulfhidrilos presentes en la estructura proteica, pudiendo resultar o no en la inhibición de la actividad enzimática. Se utiliza el L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidinio) butano, conocido como E-64, como inhibidor específico de sitio activo.

c) Aspartil-proteasas: también llamadas proteasas ácidas, poseen dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo y se cree que el mecanismo de catálisis es de tipo ácido-base más que de formación de un complejo covalente enzima-sustrato. La pepstatina es el inhibidor específico de sitio activo.

d) Metalo-proteasas: poseen un metal en el sitio activo como parte integral de su estructura y probablemente actúan aumentando la núcleofilicidad de una molécula de agua y polarizando la unión peptídica que se va a clivar, antes del ataque nucleofílico. Son inhibidas por agentes quelantes de metales como el EDTA, el EGTA y la 1,10-fenantrolina.

Las proteasas también se clasifican en endoproteasas o en exoproteasas. Las exoproteasas sólo son capaces de clivar uniones peptídicas ubicadas a uno o dos residuos de los extremos del sustrato; dependiendo sobre cual de los extremos exhiben actividad se las define como aminopeptidasas o carboxipeptidasas. Las endoproteasas clivan uniones peptídicas internas o distantes de los extremos del sustrato. Sin embargo si el sustrato exhibe en alguno de sus extremos una secuencia o un residuo que es reconocido por la endoproteasa también puede ser clivado, es decir que la presencia de un residuo amino o carboxi libre adjacente no siempre previene el ataque endoproteolítico.

AMINOPEPTIDASAS: CLASIFICACION, ESTRUCTURA Y FUNCION

Las aminopeptidasas catalizan la hidrólisis de aminoácidos desde el extremo N-terminal de proteínas y péptidos, requiriendo que el residuo N-terminal presente el α-amino no sustituído. Dado que las aminopeptidasas sólo exhiben este requerimiento y no el reconocimiento simultáneo del extremo C-terminal del sustrato, en sentido estricto puede considerarse a las aminopeptidasas como proteinasas, a diferencia de las oligopeptidasas que requieren que los extremos N-terminal y C-terminal del sustrato se hallen a una distancia definida uno de otro (Mc Donald y Scwabe, 1977).

Las aminopeptidasas, que generalmente presentan una amplia especificidad de sustrato, son ubicuas en todo el reino viviente. Estas enzimas han sido reportadas tanto en organismos procariontes como eucariontes (hongos, plantas y animales).

Las aminopeptidasas son clasificadas según diversas características dependiendo del interés particular del investigador que resulta en la definición de clases no excluyentes (Taylor, 1993 a, b).

1) Números de residuos clivados del extremo N-terminal del sustrato: las enzimas que remueven de a un aminoácido desde el extremo amino son llamadas aminopeptidasas en sentido estricto (E.C. 3.4.11). Las dipeptidil aminopeptidasas hidrolizan dipéptidos intactos (E.C. 3.4.14) mientras que las tripeptidil aminopeptidasas remueven tripéptidos N-terminales.

2) Respecto a la eficiencia relativa de la actividad de hidrólisis sobre aminoácidos cromogénicos: La Leucina aminopeptidasa, por ejemplo, hidroliza con mayor eficiencia el derivado cromogénico de la leucina y de otros aminoácidos hidrofóbicos, con respecto a otros aminoácidos cromogénicos que también son hidrolizados. Se han descripto también Arginina, Metionina, Alanina, Cisteína, Glutámico, Aspártico y Prolina aminopeptidasas. Esta clasificación, eminentemente práctica, no representa necesariamente la especificidad de estas enzimas sobre los sustratos endógenos. Como se detalla más extensamente en el capítulo de Resultados, raramente la cinética de hidrólisis de aminoácidos cromogénicos es comparable a la de péptidos que exhiben en su extremo N-terminal el mismo residuo que el aminoácido cromogénico.

3) Según la localización subcelular: Se ha reportado la existencia de enzimas solubles, localizadas en el citoplasma o dentro de organelas como el lisosoma (o la vacuola) y la mitocondria. También se han detectado aminopeptidasas unidas a membrana.

4) Por la suceptibilidad a inhibidores de aminopeptidasas tales como la bestatina, la amastatina y la puromicina.

5) De acuerdo al pH al cual presentan actividad máxima: Las aminopeptidasas se clasifican, entonces, en neutras, ácidas o alcalinas.

6) Dado que la gran mayoría de las aminopeptidasas conocidas son metalo-enzimas, se las puede clasificar según el metal que poseen y por los aminoácidos o secuencias consenso implicadas en la unión del metal a la enzima. Este podría ser el criterio más racional para establecer una clasificación que permita formular relaciones evolutivas o de homologías estructurales entre las aminopeptidasas.

Rawlings y Barrett (1993), basándose en la información disponible a esa fecha de las secuencias aminoacídicas de proteinasas y peptidasas conocidas, formularon una clasificación de las mismas en familias evolutivas. El primer criterio de clasificación fue llamado *tipo*, y se refiere al grupo químico responsable de la catálisis (serín-, cisteín-, aspartil- y metalo-enzimas). Dentro de cada *tipo* se definen *familias* que comprenden enzimas, cada una de las cuales exhibe relación evolutiva con al menos uno de los otros miembros, tanto en la totalidad de la secuencia o al menos, en la parte de la secuencia responsable de la actividad catalítica. Un *clan* comprende un grupo de *familias* para las cuales existen indicios de relación evolutiva a pesar de la ausencia de similitud estadísticamente significativa entre las secuencias. Los indicios de relación evolutiva entre *familias* surgen principalmente del ordenamiento lineal de los aminoácidos del sitio catalítico y de la estructura terciaria.

Considerando las metalo-enzimas en su totalidad, sean con actividad endoproteolítica o exoproteolítica, las estructuras que exhiben son excepcionalmente diversas y, según estos autores, se clasifican en 25 *familias* distintas. Dentro del *tipo* metalo-enzima se define un único *clan* que comprende a 13 de las 25 *familias*, las cuales comparten la secuencia consenso de unión del zinc (bxHEbbHbc; donde H es un residuo de histidina; E es un residuo de ácido glutámico; b es un residuo no cargado; c es un residuo hidrofófico y x es cualquier aminoácido). Aparte de esta secuencia consenso, un residuo de ácido glutámico, distante linealmente de la misma, también participa en la unión del zinc.

Comprendida en este *clan* está la *familia* de la Alanina aminopeptidasa de membrana de mamíferos. Dentro de esta familia se clasifican la aminopeptidasa N de *Escherichia coli*, la Lisina aminopeptidasa de *Lactococcus* sp., la aminopeptidasa II y la Alanina/Arginina aminopeptidasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la leucotrieno A_4 hidrolasa humana, enzima bifuncional que además de ser responsable de la conversión de leucotrieno A_4 en leucotrieno B_4 posee actividad aminopeptidasa, siendo el zinc necesario para ambas actividades. También, dentro de esta *familia* se halla

el antígeno de ratón BP-1/6C3 que exhibe actividad aminopeptidásica. El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para este antígeno reveló que el mismo es idéntico a la aminopeptidasa A de membrana de mamíferos. Todos los miembros de esta *familia* poseen un átomo de zinc por monómero de enzima. Se ha postulado que el residuo de ácido glutámico ubicado en la secuencia consenso de unión del zinc (bxHEbbHbc) no participa en la coordinación del metal, sino que está involucrado en el mecanismo de catálisis.

Existe otra *familia* de aminopeptidasas que exhibe las siguientes características: poseen dos átomos de zinc por monómero de enzima y los residuos implicados en la unión de los átomos metálicos son lisina 250, aspártico 255, aspártico 273, aspártico 332 y glutámico 334 (los números corresponden al orden lineal de aminoácidos de la Leucina aminopeptidasa de mamíferos, miembro prototípico de esta familia), con un ordenamiento tridimensional tal que los dos átomos de zinc se hallan contiguos, definiendo un sitio en la enzima llamado cocatalítico (Vallee y Auld, 1993). En esta *familia* también se clasifican la Leucina aminopeptidasa de *Aeromonas* sp., las aminopeptidasas A de *E. coli*, de *Salmonella thyphimurium* y *Rickettsia prowasekii* y las Leucina aminopeptidasas de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum tuberosum*.

La aminopeptidasa I de *S. cerevisiae* define otra *familia* integrada únicamente por esta enzima de la cual se ignora cuales son los residuos involucrados en la unión del zinc.

Otra *familia* está integrada por las Metionina aminopeptidasas de *E. coli*, *S. Thyphimurium*, *Bacillus subtilis* y *S. cerevisiae*, la aminopeptidasa P de *E. coli* y la X-Pro dipeptidasa humana y de *E. coli*. Se ignora cuales son los aminoácidos implicados en la unión del metal.

A excepción de la *familia* de la Metionina aminopeptidasa, para alguno de los miembros de las otras tres *familias* de aminopeptidasas se ha reportado inhibición de la actividad enzimática por bestatina (Röhn, 1982; Achstetter y col., 1983; Burley y col., 1991; Schalk y col., 1994; Tsuge y col., 1994).

Acerca del mecanismo de catálisis de las aminopeptidasas el conocimiento que se posee proviene casi exclusivamente de estudios bioquímicos y cristalográficos de la Leucina aminopeptidasa purificada de cristalino bovino. Esta es una enzima hexamérica de 324 kDa de peso molecular formada por seis subunidades idénticas de 54 kDa, cada una de las cuales posee dos átomos de zinc (Carpenter y Vahl, 1973) que se hallan contiguos en el monómero (Burley y col., 1992; Vallee y Auld, 1993). Los átomos de zinc están unidos a la enzima con diferente afinidad; el zinc que ocupa el sitio

1 es fácilmente intercambiable no así el zinc del sitio 2 que está fuertemente unido a la enzima.

Para designar los residuos aminoacídicos del sustrato y los respectivos sitios de unión de la enzima, se seguirá la convención formulada por Schechter y Berger (1967), según la cual el residuo N-terminal y los residuos sucesivos se designan como $P_1;P'_1;P'_2;P'_3$; etc.y los respectivos sitios de unión de la enzima como $S_1;S'_1;S'_2;S'_3$; etc. donde el sitio de clivaje está entre el S_1 y el S'_1.

Según esta convención, la Leucina aminopeptidasa de cristlino bovino es capaz de clivar cualquier L-aminoácido que se halle en la posición P_1, a excepción de hallarse lisina o arginina en la posición P_1 o P'_1, o prolina o hidroxiprolina en la posición P'_1. El aminoácido que ocupa la posición P'_2 no parece tener mayor efecto sobre la hidrólisis del aminoácido N-terminal (Burley y col., 1991).

La amastatina y la bestatina (Fig. A), inhibidores competitivos de aminopeptidasas, han sido utilizados también para el estudio de la Leucina aminopeptidasa ya que son potentes inhibidores de la misma (Ki para amastatina 0,2 μM; Ki para bestatina 1,3 nM). Los estudios cristalográficos llevados a cabo sobre los respectivos complejos enzima-inhibidor han aportado inferencias muy importantes sobre el mecanismo catalítico de esta enzima (Burley y col., 1991; Burley y col., 1992; Kim y Lipscomb, 1993).

A pesar que es mucho lo que se ignora sobre el mecanismo catalítico de la Leucina aminopeptidasa, la mayoría de los estudios realizados llevan a suponer un mecanismo de tipo básico para la catálisis. El clivaje de la unión peptídica del aminoácido N-terminal del sustrato involucra un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono del carbonilo y un ataque electrofílico sobre el NH de la amida de esta unión (Kim y Lipscomb, 1993).

Hay evidencias cristalográficas de la presencia de una molécula de agua involucrada en el sitio activo. En el modelo propuesto el ataque al carbonilo es llevado a cabo por una molécula de agua que puede estar activada a un estado más nucleofílico (tipo hidróxido) por sus interacciones con los átomos de metal y con el residuo de ácido aspártico 255. Este residuo de ácido aspártico está involucrado a través de su carboxilo en la coordinación del átomo de zinc del sitio 1. Podría ser que este residuo por un cambio conformacional libere su carboxilo de la interacción con el metal y actúe como base secuestrando un protón de la molécula de agua. Como resultado de este ataque se forma un compuesto de reacción intermediario, un carbonilo tetrahédrico hidratado que posee uniones no covalentes con la enzima. Se supone que la amastatina y la bestatina se comportan como un análogo de este compuesto intermediario, en

su unión a la Leucina aminopeptidasa. Como se observa en la Figura A, el carbono 2 de ambos inhibidores es tetrahédrico y lleva un residuo hidroxilo.

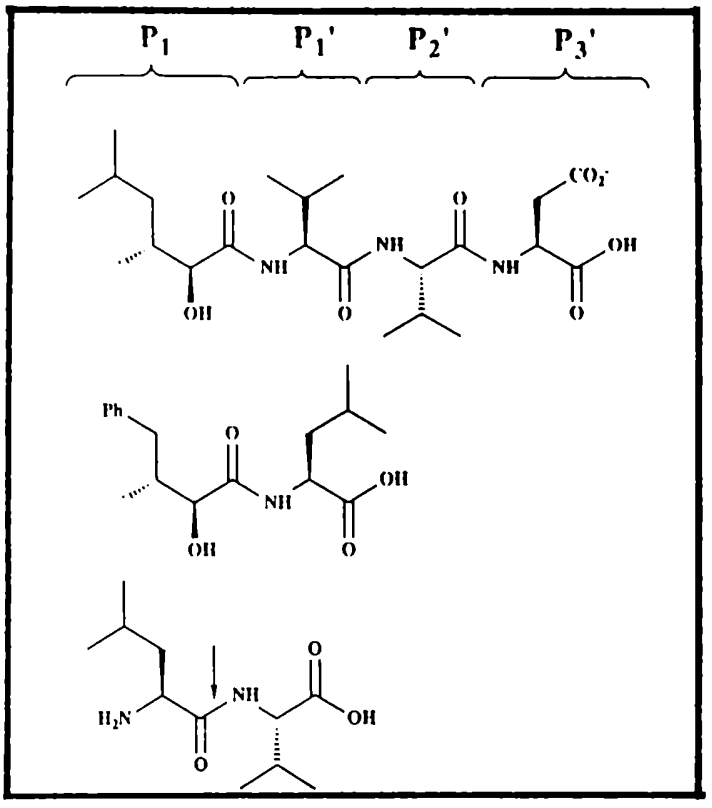


Figura A: Arriba: Amastatina, (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-5-metil-hexanoil-L-valil-L-valil-L-ácido aspártico. Medio: Bestatina, (2S,3R)-3-amino-2-hidroxi-4-fenilbutanoil-L-leucina. Abajo: L-leucil-L-valina. La flecha indica el sitio de clivaje del dipéptido. Las designaciones de los residuos de los ligandos como P_1 y P'_1 siguen la convención de Schechter y Berger (1967).

Se ha propuesto alternativamente un mecanismo de catálisis anhidra, en el cual el carbonilo escindible es directamente atacado por un residuo nucleofílico de la enzima, que resultaría en la formación de un intermediario unido covalentemente a la enzima, como es el caso de las serín-proteasas. El análisis cristalográfico de la Leucina aminopeptidasa nativa o complejada con bestatina o amastatina no muestra ningún residuo nucleofílico en el sitio activo que esté en posición como para atacar el carbonilo escindible del sustrato, suponiendo que el carbono 2 de ambos inhibidores son homólogos al carbonilo escindible de un verdadero sustrato peptídico. Así, un mecanismo de catálisis anhidra no parece probable para

la Leucina aminopeptidasa debido al ordenamiento tridimensional de los residuos del sitio activo.

La Figura B muestra los posibles intermediarios formados según los dos tipos de mecanismo de catálisis propuestos.

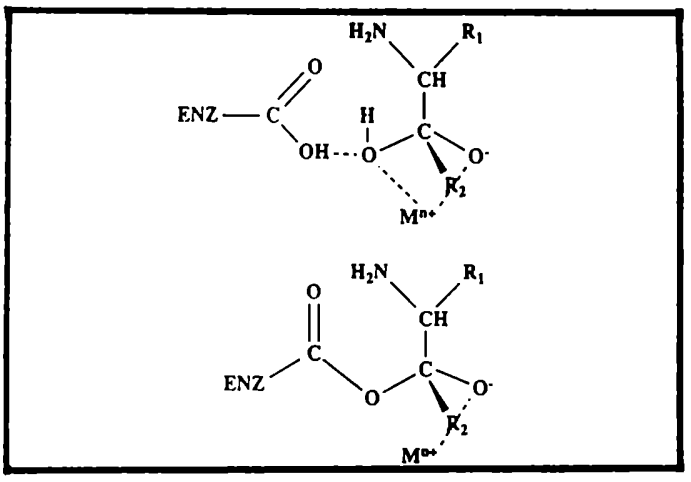


Figura B: Intermediarios de proteólisis de una metalo-aminopeptidasa Arriba: Intermediario formado durante la catálisis de tipo básica. La base se representa como un residuo que porta un grupo carboxilo, el cual ha secuestrado un protón de la molécula de agua. Abajo: Intermediario formado durante la catálisis de tipo anhidra. El residuo que ataca el carbonilo escindible se representa como un residuo que porta un grupo carboxilo. Las uniones covalentes se representan con líneas llenas y las uniones puente hidrógeno con líneas punteadas (tomado de Kim y Lipscomb, 1993).

Se ha observado que la Leucina aminopeptidasa libre de metal no posee actividad enzimática (Hanson y Frohne, 1976). Las determinaciones cristalográficas de los complejos bestatina-enzima y amastatina-enzima muestran que el amino N-terminal de ambos inhibidores están coordinados con uno de los átomos de zinc, aquél que está fuertemente unido a la enzima y que ocupa el sitio 2. La proximidad del amino N-terminal de ambos inhibidores al zinc del sitio 2, indican que estos residuos N-terminales se hallan muy probablemente en su forma neutra, no protonada.

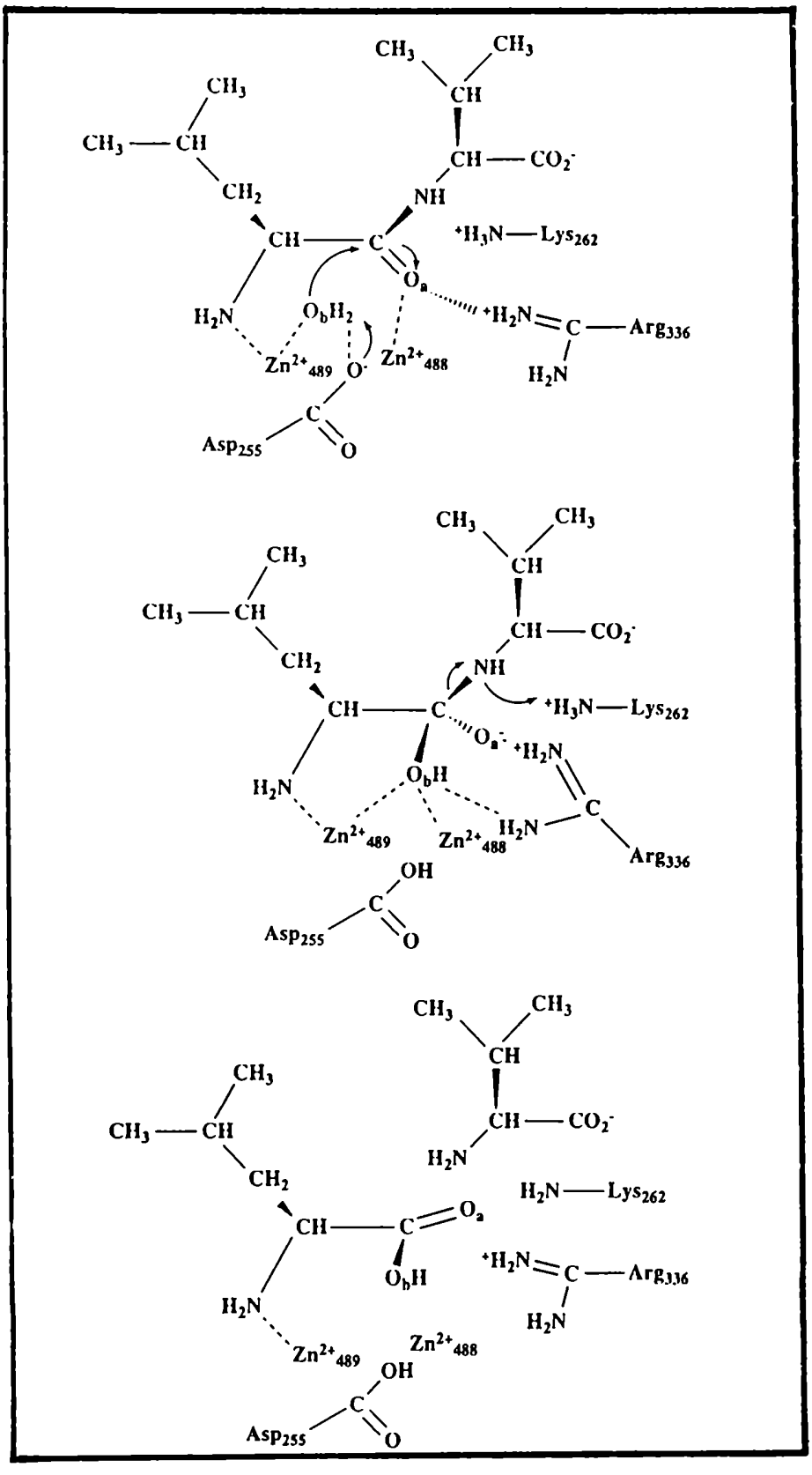
Los dos átomos de zinc también están involucrados en la unión con el oxígeno del hidroxilo del carbono 2 de la bestatina y de la amastatina y muy probablemente también con el oxígeno del carbonilo del sustrato. Se ha postulado, a partir de la modelización de unión del dipéptido Leu-Val al sitio activo de la Leucina aminopeptidasa, que el oxígeno del carbonilo escindible, además de la interacción con los átomos de zinc, también se

halla dentro de la distancia de unión de puente hidrógeno al grupo guanidinio del residuo arginina 336, según una de las conformaciones que este residuo puede adoptar. Por lo cual, se ha propuesto que este residuo arginina 336 podría moverse hacia el sustrato unido para interactuar y polarizar aún más el carbonilo escindible y así promover el ataque nucleofílico sobre el carbono del carbonilo. Este rol electrofílico podría ser compartido con el átomo de zinc del sitio 1, que también interactúa con el oxígeno del carbonilo. La presencia del residuo arginina 336 podría eliminar el requerimiento absoluto de metal en el sitio 1 para que ocurra la catálisis, tal es el caso de la Leucina aminopeptidasa nativa de riñon porcino (Van Wart y Lin, 1981). Este residuo arginina está conservado en las aminopeptidasas A de *E. coli* y de *S. thyphimurium*, como así también en la Leucina aminopeptidasa de *A. thaliana*, todas ellas miembros de la *familia* de la Leucina aminopeptidasa (Rawlings y Barrett, 1993).

El intermediario tetrahédrico formado por el ataque nucleofílico del agua lleva una carga neta negativa en el oxígeno del carbonilo y es estabilizado a través de la interacción con los dos átomos de zinc y el residuo arginina 336. La descomposición de este intermediario a sus productos estaría facilitada por un dador de protones del sitio activo que actúe sobre el nitrógeno del residuo ubicado en la posición P'_1 del sustrato, involucrado en la unión amida a clivarse. El análisis cristalográfico de la Leucina aminopeptidasa indica que la cadena lateral de la lisina 262 está en posición para poder efectuar un ataque electrofílico sobre ese grupo.

La Figura C muestra un representación esquemática del mecanismo de catálisis propuesto a partir de estudios cristalográficos. Este modelo es compatible con los estudios bioquímicos de la Leucina aminopeptidasa. Esta enzima presenta actividad enzimática en el rango de pH 6 a 11, exhibiendo un máximo alrededor de pH 9 (Mc Donald. y Schwabe, 1977). A este pH el carboxilo del Asp 255, cuyo pK_a está alrededor de 4, estaría en su forma no protonada, consistente con el rol de base propuesto para este residuo. También a este pH el grupo guanidinio de la Arg 336, con un pK_a de 13, podría estar en su forma protonada, coincidiendo con el rol electrofílico propuesto. El grupo amino de la cadena lateral del residuo Lis 262 tiene un pK_a de 10. Es probable que a pH 9 exista un equilibrio entre la forma protonada y la forma no protonada. El estado de equilibrio de la protonación de este residuo es coherente con la función propuesta para el mismo.

Figura C: Mecanismo de catálisis de la Leucina aminopeptidasa. Las uniones covalentes están representadas con líneas llenas y las uniones no covalentes con líneas punteadas. Arriba: El dipéptido Leu-Val está unido al zinc del sitio 2 (Zn 489) a través del amino N-terminal. Una molécula de agua unida al zinc del sitio 2 es activada a un estado más nucleofílico por el residuo Asp 255, que actúa como base. Esta molécula de agua ataca el carbonilo del sustrato, el cual se halla polarizado por las interacciones con el zinc del sitio 1 (Zn 488) y el residuo Arg 336. Medio: El intermediario tetrahédrico formado se estabiliza por sus interacciones no covalentes con los átomos de zinc y el residuo Arg 336. La descomposición de este intermediario es facilitada por la protonación del grupo amino del residuo valina por acción de la Lis 262. Abajo: el estado de protonación original de los residuos del sitio activo puede ser restaurado por la transferencia del protón del carboxilo del residuo Asp 255 al grupo amino de la cadena lateral del residuo Lis 262 (tomado de Kim y Lipscomb,1993).


CH3
CH3
CH
CH3
CH3 — CH
CH — CO2-
CH2
NH
CH — C
+H3N — Lys262
Oa
H2N
ObH2
+H2N = C — Arg336
Zn2+489
O-
Zn2+488
H2N
C
Asp255
O
CH3
CH3
CH
CH3
CH3 — CH
CH — CO2-
CH2
NH
+H3N — Lys262
CH — C
Oa-
+H2N
H2N
ObH
C
Zn2+489
Zn2+488
H2N
Arg336
OH
C
Asp255
O
CH3
CH3
CH
CH3
CH3 — CH
CH — CO2-
H2N
CH2
H2N — Lys262
CH — C
Oa
ObH
+H2N = C — Arg336
H2N
H2N
Zn2+489
Zn2+488
OH
C
Asp255
O

El presente modelo de catálisis fue formulado en base a estudios realizados exclusivamente con la Leucina aminopeptidasa purificada de cristalino de mamíferos (Kim y Lipscomb, 1993). Ciertos aspectos generales del mismo podrían extenderse a otras metalo-aminopeptidasas, en particular a aquellas aminopeptidasas que pertenecen a la misma *familia* de la Leucina aminopeptidasa.

Si bien no se ha reportado hasta la fecha ningún estudio cristalográfico de alguna de las aminopeptidasas perteneciente a la *familia* de la Alanina aminopeptidasa de membrana de mamíferos, que permita formular un modelo del mecanismo de catálisis para este importante grupo de aminopeptidasas, si se han realizado tales estudios para algunos de los miembros de la *familia* de la termolisina (metalo-endopeptidasas). Estas dos *familias* pertenecen a un mismo *clan* (Rawlings y Barrett, 1993); ambas *familias* exhiben la misma secuencia consenso de unión de zinc: His-Glu-X-X-His y distante 18-20 aminoácidos se encuentra otro residuo de ácido glutámico. Los estudios cristalográficos de la termolisina y de una proteasa neutra de *Bacillus cereus* revelaron que los dos residuos histidina de la región consenso y el residuo de ácido glutámico distante de la misma son los tres residuos implicados en la coordinación del único átomo de zinc. Una molécula de agua completa la coordinación del metal. Se ha postulado que el residuo de ácido glutámico que se encuentra en la secuencia consenso actúa como una base activando una molécula de agua a un estado más nucleofílico (Vallee y Auld, 1990). Por lo tanto, la función de este residuo de ácido glutámico es similar a la función propuesta para el residuo de ácido aspártico 255 de la Leucina aminopeptidasa.

En coincidencia con este postulado y validando la extensión de las conclusiones obtenidas sobre el estudio de miembros de la *familia* de la termolisina a la *familia* de la Alanina aminopeptidasa, se observó para una de las enzimas pertenecientes a esta *familia*, la leucotrieno A_4 hidrolasa, que la sustitución por mutagénesis dirigida del residuo de ácido glutámico de la secuencia consenso por un residuo de alanina determina que la proteína mutada, que tiene unido el átomo de zinc, carece de la actividad aminopeptidasa que si posee la enzima no mutada (Minami y col., 1992).

Se ha reportado para varias enzimas de la *familia* de la Alanina aminopeptidasa inhibición competitiva de la actividad enzimática por bestatina y amastatina (Röhm, 1982; Achstetter y col., 1983; Gros y col., 1985; Hersch, 1985; Muskardin y col., 1994). Estos resultados, junto con la proposición que el residuo de ácido glutámico de la secuencia consenso actúa como base activando una molécula de agua a un estado más nucleofílico, responsable del ataque sobre el carbonilo a clivarse, y que

no se ha aislado aún ningún intermediario unido de forma covalente a alguna de las aminopeptidasas que integran la *familia* de la Alanina aminopeptidasa pueden llevar a plantear que el mecanismo de catálisis para esta *familia* de metalo-aminopeptidasas es escencialmente similar al propuesto para la Leucina aminopeptidasa.

Las aminopeptidasas están involucradas en variadas funciones. La mayoría de las proteínas sufren la remoción del residuo iniciador metionina por acción de la Metionina aminopeptidasa (Miller y col., 1989; Moerschell y col., 1990; Chang y col., 1992), enzima presente en procariontes y eucariontes. La dipeptidil aminopeptidasa A de *S. cerevisiae* participa en la maduración del factor α (Jones, 1991).

Para la mayoría de las aminopeptidasas intracelulares, citosólicas o lisosomales, se ha propuesto la participación de las mismas en las etapas finales de la degradación proteica (Botbol y Scornick, 1991; Arbesú y col., 1991).

Estudios llevados a cabo sobre aminopeptidasas unidas a membrana, aisladas de riñón y de cerebro de mamíferos revelaron una importante función de estas enzimas en la degradación e inactivación de distintos péptidos bioactivos. La aminopeptidasa A, que es idéntica al antígeno de ratón BP-1/6C3 y que cliva específicamente residuos de ácido aspártico y de ácido glutámico N-terminales, se ha detectado en células epiteliales y endoteliales del glomérulo y del túbulo contorneado proximal, en las microvellosidades placentarias, en las células pre-B y en las células epiteliales de los ductos interlobulares del páncreas. Esta enzima inactiva la angiotensina II por remoción del residuo aspártico N-terminal. Estudios llevados a cabo en células epiteliales del glomérulo demostraron la inducción de esta aminopeptidasa por concentraciones fisiológicas de glucocorticoides a través de un mecanismo mediado por receptor (Stefanovic y col., 1991).

La aminopeptidasa M aislada de cerebro de rata es capaz de hidrolizar *in vitro* la encefalina. Dado el hecho que la distribución tisular de esta enzima se correlaciona estrechamente con la distribución de receptores opiáceos se ha propuesto que esta aminopeptidasa podría estar involucrada en la regulación del nivel de actividad de esta hormona (Gros y col., 1985; Hersch, 1985).

Es interesante señalar aquí la influencia particular que ejerce la presencia de residuos prolina sobre la maduración y degradación de péptidos y proteínas de acción hormonal (Mentlein, 1988).

Los péptidos bioactivos son sintetizados generalmente como pre-pro-péptidos. La pre-secuencia N-terminal es clivada por la peptidasa señal en el retículo endoplasmático. Otros eventos proteolíticos pueden ocurrir en el tránsito a través del aparato de Golgi y en las vesículas secretortias. Las etapas claves en el procesamiento de pro-péptidos son el clivaje endoproteolítico sobre el lado carboxi de un par de residuos básicos, y la posterior remoción de estos residuos básicos C-terminales por acción de carboxipeptidasas. Dependiendo del tipo particular de proceso de maduración, también pueden ocurrir otros eventos no proteolíticos como la ciclización del residuo glutámico N-terminal, N-α-acetilación, C-amidación y glicosilación.

El precursor de la sustancia P no es clivado en el lado carboxi del par de residuos básicos conservados (-Arg-Arg-Pro-) dada la presencia del residuo prolina sino que es clivado entre ambos residuos arginina, resultando en un péptido bioactivo maduro cuya secuencia N-terminal es Arg-Pro-. Otro ejemplo más complejo es la conversión, en el lóbulo intermedio de la pituitaria, del ACTH (1-39) (hormona trófica de la corteza adrenal) en α-MSH (1-13) (hormona estimulante de melanocitos) y en CLIP (18-39) (péptido corticotrófico del lóbulo intermedio). Estos dos fragmentos bioactivos están unidos por una región de cuatro residuos básicos. El clivaje endoproteolítico ocurre entre los residuos Lis 16 y Arg 17. El residuo Arg 17 es removido por una aminopeptidasa, no así el Arg 18 ya que en la posición 19 se halla un residuo prolina. Estos ejemplos, junto a otros, señalan que las proteasas involucradas en la maduración intracelular de péptidos bioactivos normalmente son incapaces de clivar uniones X-Pro.

La existencia de proteasas con alta especificidad para uniones peptídicas en las cuales de hallan involucrados residuos prolina, sugiere que estas enzimas podrían jugar un rol clave en la degradación de péptidos bioactivos maduros. Dipeptidil aminopeptidasas con especificidad para secuencias X-Pro serían buenos candidatos para esta función, dado que gran cantidad de péptidos bioactivos poseen en su extremo N-terminal motivos X-Pro.

La dipeptidil aminopeptidasa IV hidroliza con alta eficiencia dipéptidos X-Pro de varios péptidos bioactivos: β-casomorfina (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile); sustancia P (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-...); polipéptido pancreático (Ala-Pro-Leu-...); prolactina (Thr-Pro-Val-...) o subunidad α de la gonadotrofina coriónica (Ala-Pro-Asp-...). Dado que la dipeptidil aminopeptidasa IV se encuentra en altas concentraciones en la cara luminal del endotelio y en riñón, hormonas peptídicas circulantes podrían ser atacadas por esta enzima. La secuenciación de varias hormonas como la subunidad α de la gonadotrofina coriónica, de la folículo estimulante, de

la luteinizante o de la estimulante de la tiroides muestran heterogeneidad en el extremo N-terminal, con y sin la secuencia X-Pro. Dado que esta heterogeneidad no se produce durante el procesamiento intracelular, podría ser debido a la acción de la dipeptidil aminopeptidasa IV. Sin embargo, a excepción de la sustancia P, la remoción del dipéptido X-Pro de las otras hormonas no determina la pérdida de actividad biológica. La acción de la dipeptidil aminopeptidasa IV podría facilitar la posterior degradación por otras aminopeptidasas.

Otra enzima que podría estar implicada en la degradación de péptidos que contienen motivos N-terminales X-Pro es la aminopeptidasa P. Esta enzima está unida a membrana, con una distribución amplia en tejidos, y es capaz de hidrolizar aminoácidos adjacentes a un residuo prolina. En el pulmón inicia la degradación de la bradikinina circulante, removiendo la arginina N-terminal. El octapéptido generado es luego degradado por la aminopeptidasa M.

Análogamente, existen proteasas intracelulares que participan en la degradación de proteínas, que exhiben una alta especificidad para la hidrólisis de uniones peptídicas en las cuales están involucrados residuos de prolina, tales como la dipeptidil aminopeptidasa II, la prolil endopeptidasa, la prolil carboxipeptidasa, y dos dipeptidasas que hidrolizan dipéptidos X-Pro (prolidasa) y Pro-X (prolinasa) (Mc Donald y Schwabe, 1977; Mentlein, 1988).

Además de todos estos ejemplos, que señalan las distintas funciones que cumplen las aminopeptidasas en el metabolismo de proteínas y péptidos, cabe mencionarse el caso de la aminopeptidasa A de *E. coli* y la aminopeptidasa N de membrana de mamíferos.

La presencia de la aminopeptidasa A es un requerimiento absoluto para la estabilización de las formas multiméricas del plásmido ColE1, que ocurre por un proceso de recombinación para dar formas monoméricas del mismo (Stirling y col., 1989). A través de mutagénesis dirigida se obtuvo una aminopeptidasa A carente de actividad enzimática pero que funcionaba normalmente en el proceso de recombinación (Mc Culloch y col., 1994).

La aminopeptidasa N de cerdo es el receptor celular del coronavirus TGEV (transmissible gastroenteritis virus), que infecta específicamente cerdos. Aunque la aminopeptidasa N humana es 80 % homóloga a la enzima de cerdo, no puede sustituirla en su función de receptor del virus. A partir de los clones de cDNA de ambas enzimas se construyeron una serie de estructuras quiméricas entre ambos y del ensayo de la capacidad de los mismos para conferir infectividad, se mapeó la región de la enzima porcina responsable de la unión con el virus. Esta región, que contiene los epitopes de tres

anticuerpos monoclonales anti-aminopeptidasa N porcina capaces de bloquear el proceso de infección, está ubicada en un dominio proteico distinto al que se encuentra el sitio catalítico de la enzima. A través de mutagénesis dirigida se obtuvo una proteína defectiva en actividad aminopeptidásica; las mutaciones del sitio catalítico no afectaron la permisividad para el virus, indicando que la actividad enzimática no está involucrada en el proceso de infección (Delmas y col., 1994).

Asimismo, se ha reportado que la aminopeptidasa N humana actúa como receptor celular del citomegalovirus humano (Soderberg y col., 1993).

PROTEASAS Y PROTEOLISIS EN *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* ha resultado ser un excelente modelo de célula eucarionte para el estudio de la proteólisis dado que es fácilmente manejable con técnicas genéticas, bioquímicas y de biología molecular. Así, *S. cerevisiae* ha devenido en el organismo mejor estudiado en cuanto a la naturaleza de sus sistemas proteolíticos y sus funciones en la fisiología celular.

En base a ello y dado que el presente trabajo fue realizado en el ascomicete *Saccobolus platensis*, se hará una revisión sobre las proteasas y la proteólisis en *S. cerevisiae*.

SISTEMA SECRETOR

Las levaduras pueden existir como dos tipos de células haploides, a o α, y ambas pueden cruzarse para dar un diploide a/α. El cruzamiento se dispara por la acción de feromonas peptídicas, el factor a, producido por células a y el factor α, producido por células α. Existen receptores en la superficie celular que son específicos para el péptido opuesto al tipo celular y median las respuestas celulares que se requieren para que el proceso de cruzamiento tenga lugar. Ambos factores son sintetizados como preproproteínas y requieren de un adecuado procesamiento para alcanzar la forma activa (Fuller y col., 1988; Jones, 1991).

El precursor del factor α es una polipéptido de 165 aminoácidos que presenta la siguientes características: 1) una región hidrofófica N-terminal que constituye la secuencia señal (que es removida por la peptidasa señal); 2) un región hidrofílica que contiene tres sitios de N-glicosilación y 3) una región C-terminal que contiene cuatro repeticiones en tandem del factor α, separados entre sí y de la región previa por segmentos espaciadores. Cada segmento espaciador se inicia con un par de

residuos básicos (Lis-Arg) seguido por dos dipéptidos de estructura Glu/Asp-Ala. El primer procesamiento ocurre por acción de la endoproteasa Kex 2, que cliva en el lado carboxi de el par Lis-Arg de cada segmento espaciador. Este clivaje libera péptidos que son ligeramente más grandes que el factor α maduro, y deben aún sufrir dos procesamientos exoproteolíticos. El primero, por acción de la carboxipeptidasa Kex 1, produce la remoción de los dos residuos básicos carboxi-terminales, y el segundo la remoción de los dos dipéptidos amino-terminales por acción de la dipeptidil-aminopeptidasa A.

El factor a es un péptido de 12 aminoácidos sustituído en la Cis carboxiterminal con un residuo farnesilo. Existen dos genes que codifican para el precursos del factor a , de 36 y 38 aminoácidos ,y llevan una sola copia del factor. Estos precursores no contienen secuencia señal ni sitios de glicosilación. Además, son secretados en mutantes defectivas en secreción a temperatura restrictiva, indicando que el factor a es procesado y exportado por una ruta secretoria distinta a la utilizada por el factor α y otras proteinas de secreción.

Además, las levaduras pueden contener en su citoplasma estructuras de ARN doble cadena encapsidadas que codifican tanto para un polipéptido tóxico como para una función de imnunidad. La toxina es una estructura de dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro que actúa sobre otras células de levadura sensibles por un mecanismo de dos pasos; 1) se fija a un receptor en la pared celular, probablemente un 1,6-β-D-glucano. 2) subsecuentemente se une a un receptor en la membrana plasmática y se forma un canal que disipa el gradiente de protones transmembrana. Esta toxina también es sintetizada como un precursor inmaduro que requiere de un procesamiento proteolítico. El precursor es un polipéptido de 316 aminoácidos y contiene: 1) un segmento de 44 aminoácidos que sirve como secuencia señal (llamado δ), 2) la subunidad α de la toxina madura, 3) una región espaciadora de 86 aminoácidos (llamada γ) que contiene tres sitios de N-glicosilación y 4) la subunidad β de la toxina madura. Aún se ignora si la secuencia señal es removida por la peptidasa señal. El primer procesamiento que sufre el precursor es el clivaje por la endoproteasa Kex 2 en dos sitios distintos: entre el extremo C-terminal de la subunidad α y el espaciador (Arg148-Arg149) y entre el espaciador y el extremo N-terminal de la subunidad β (Lis232-Arg233). Se ha sugerido que el clivaje entre el segmento líder y la subunidad α (Pro43-Arg44) también puede ser debido a la endoproteasa Kex 2 dado que experimentos *in vitro* mostraron que es capaz de hidrolizar péptidos sintéticos que poseen esta secuencia con una velocidad del 50 % respecto de péptidos que poseen la secuencia Lis-Arg. El segundo

procesamiento se debe a la acción de la carboxipeptidasa Kex 1, que remueve los residuos Arg del extremo C-terminal de la subunidad α.

Características de las proteasas del sistema secretor:

La peptidasa señal es una proteína integral de membrana, formada por al menos cuatro subunidades. Se ha clonado una de las subunidades (SEC 11) y la secuencia de aminoácidos deducida muestra una alta homología con una de las subunidades de la peptidasa señal de mamíferos (Greenburg y col., 1989). Mutantes termosensibles de SEC 11 crecidas a la temperatura restrictiva no son viables (Bohni y col., 1988).

La endoproteasa Kex 2 es una serín-proteasa del tipo de la subtilisina, que cliva en el lado carboxi de un par Arg-Arg o Lis-Arg (Fuller y col., 1989). Es una glicoproteína integral de membrana ubicada en el aparato de Golgi, que requiere Ca^{2+} para su actividad (Franzusoff y col, 1991). El gen KEX 2 fue identificado por mutaciones que prevenían la producción de la toxina killer y causaba esterilidad en células del tipo α porque fallaba en la producción del factor α maduro (Leibowitz y Wickner, 1974).

La carboxipeptidasa Kex 1 es un glicoproteína integral de membrana probablemente ubicada en el aparato de Golgi. Esta enzima, que pertenece al grupo de las serín-proteasas, parece tener especificidad sólo sobre aminoácidos básicos (Cooper y Bussey, 1989).

La dipeptidil-aminopeptidasa A es una proteína de membrana, que presenta una alta homología con la dipeptidil-aminopeptidasa V vacuolar tanto en su estructura primaria como en su topología (Julius y col., 1983; Roberts y col., 1989).

Ninguna de estas proteasas, a excepción de la peptidasa señal, son esenciales para la viabilidad celular.

SISTEMA VACUOLAR

La vacuola fúngica es a menudo descripta como una organela análoga al lisosoma de las células de mamíferos. Comparten la característica de ser compartimientos acídicos que contienen enzimas hidrolíticas. Además de intervenir en la degradación de macromoléculas, participa en el almacenamiento de metabolitos y en la regulación de la concentración iónica y del pH del citoplasma. En este sentido la vacuola fúngica tiene muchas similitudes con la vacuola de las plantas (Klionsky y col., 1990).

Aparte de las enzimas que constituyen el sistema proteolítico, otras hidrolasas se hallan presentes en la vacuola: trehalasa y RNAsa solubles; α-manosidasa, fosfatasa alcalina y ATPasa unidas a membrana.

El sistema proteolítico vacuolar está constituído por dos endopeptidasas, proteinasa A y proteinasa B, y cinco exopeptidasas, carboxipeptidasa Y,

carboxipeptidasa S, aminopeptidasa I, aminopeptidasa Co (ó Y) y dipeptidil-aminopeptidasa V, siendo esta última la única asociada a la membrana.

La proteinasa A, que pertenece a la clase de las aspartil-proteasas, es una glicoproteína de 42 kDa, que sufre tres clivajes postraduccionales hasta alcanzar la forma madura. La primera es la remoción del péptido señal de 22 aminoácidos. La segunda es la remoción de un fragmento N-terminal de 47 aminoácidos durante el pasaje de Golgi a vacuola. Este proceso es autocatalítico, ya que se observó acumulación de la forma inmadura cuando se estudió el procesamiento de una mutante que llevaba un residuo asparragina en lugar del aspártico de sitio activo. El último procesamiento es la remoción de un fragmento N-terminal de 7 aminoácidos por acción de la proteinasa B. Estas dos últimas formas tienen actividad proteolítica sobre otras moléculas (Teichert y col., 1987; Jones, 1991; Heinemeyer y col., 1991, a).

La proteinasa B es una serín-proteinasa de la familia de la subtilisina. Esta glicoproteína de 31 kDa sufre cuatro clivajes postraduccionales durante su maduración. Después de la remoción del péptido señal, la proteína pierde un fragmento N-terminal de 260 aminoácidos a través de un mecanismo intramolecular y autocatalítico que sucede a nivel del retículo endoplasmático. El tercer clivaje, que ocurre a nivel del aparato de Golgi, está mediado por la proteinasa A y reduce la forma autocatalítica de 40 kDa a una forma de 37 kDa, removiendo un fragmento C-terminal. El último clivaje sucede a nivel de la vacuola y es, presumiblemente, autocatalítico, sobre el extremo C-terminal. Sólo esta última forma madura de 31 kDa es activa proteolíticamente sobre otras proteínas (Teichert y col., 1987; Jones, 1991; Heinemeyer y col., 1991, a).

La carboxipeptidasa Y es una glicoproteína de 61 kDa. Pertenece a la clase de las serín-proteasas y presenta una amplia especificidad de sustrato. Durante su maduración sufre tres clivajes proteolíticos. Después de la remoción del péptido señal, un fragmento N-terminal es removido por la proteinasa A durante el tránsito de Golgi a la vacuola. El tercer evento de clivaje está mediado por la proteinasa B dentro de la vacuola (Suarez Rendueles y Wolf, 1988; Jones, 1991).

La carboxipeptidasa S es una metaloenzima que si bien no ha sido aún purificada a homogeneidad, su gen ha sido clonado revelando un marco abiero de lectura que codifica para una proteína de 64 kDa. Se postula un péptido señal de 39 aminoácidos y además posee cinco sitios posibles de N-glicosilación. Se ha observado actividad de carboxipeptidasa S en cepas defectivas en proteinasa A y B, indicando que su actividad es independiente de la presencia de las endoproteinasas (Spormann y col., 1991).

La aminopeptidasa I es una metaloglicoproteína de 640 kDa formada por 12 subunidades. Dado que la actividad de la aminopeptidasa I está muy disminuída en cepas defectivas en proteinasa A, se supone la maduración de un precursor de esta actividad mediado por proteinasa A. De acuerdo con esto, la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del gen con la secuenciación del N-terminal de la proteína madura, revela la existencia de una prosecuencia de 45 aminoácidos. Además el gen de la aminopeptidasa I no parece codificar para una secuencia señal de los tipos característicos responsables para la entrada al retículo endoplasmático (Cueva y col., 1989; Chang y Smith, 1989).

La aminopeptidasa Co es una metaloproteína de 100 kDa que cuya actividad es estimulada por cobalto (Achstetter y col., 1982). Recientemente, Yasuhara y col. (1994) reportaron la purificación de una actividad vacuolar de características similares a la aminopeptidasa Co, *v.g.* hidroliza preferencialmente, entre una serie de aminoácidos cromogénicos, los derivados de aminoácidos básicos y la actividad hidrolítica sobre todos ellos es estimulada por cobalto. A diferencia de la aminopeptidasa Co, cuyo peso molecular se estimó por filtración molecular en un valor de 100 kDa, esta aminopeptidasa, llamada aminopeptidasa Y, posee un peso molecular de 70 kDa para su forma madura. También se observó, que al igual que otras enzimas vacuolares, la aminopeptidasa Y, se sintetiza como una preproproteína, es decir, posee una secuencia N-terminal responsable del ingreso al retículo endoplasmático, seguida de otra secuencia peptídica cuya remoción por acción de la proteinasa B resulta en la formación de la proteína madura activa (Nishizawa y col., 1994; Yasuhara y col., 1994).

La dipeptidil-aminopeptidasa V es una glicoproteína integral de membrana de 120 kDa. La secuencia señal permanece en la proteína madura y funciona como anclaje a la membrana, exponiendo el amino terminal en la cara citoplasmática de la vacuola. La actividad de esta enzima no es dependiente de proteinasa A (Suarez Rendueles y Wolf, 1987; Roberts y col., 1989).

Ignorando la contribución de la peptidasa señal, se puede resumir el conocimiento que se posee sobre la producción de las enzimas vacuolares del modo siguiente. Algunas de las enzimas son sintetizadas como precursores inactivos (proteinasa A, proteinasa B, carboxipeptidasa Y, aminopeptidasa I y aminopeptidasa Y) pero no todas (carboxipeptidasa S y dipeptidil-aminopeptidasa V). Los roles de la proteinasa A y de la proteinasa B no son igualmente importantes en el proceso de activación. La proteinasa A es esencial en la producción de si misma, de la proteinasa B, de la carboxipeptidasa Y, de la aminopeptidasa I y de otras hidrolasa presentes en la vacuola (fosfatasa alcalina, trehalasa y RNAsa). El requerimiento de

proteinasa B sólo es absoluto en la producción de si misma y de la aminopeptidasa Y, mientras que en los otros casos (proteinasa A y carboxipeptidasa Y) la falta de procesamiento por la proteinasa B igual resulta en moléculas activas.

El uso de mutantes de estas proteasas ha permitido estudiar la función de la proteólisis vacuolar en el metabolismo celular. Durante el crecimiento logarítmico de *S. cerevisiae* en medio rico con glucosa, la tasa de degradación proteica es de aproximadamente 1%/hora. El mismo análisis realizado con una mutante defectiva en proteinasa A y proteinasa B (defectiva también en todas aquellas hidrolasas dependientes de activación) revela una disminución del 46% (0,54 %/hora). También se estudió la participación del sistema vacuolar en la degradación de proteínas anormales, inducida por canavanina, un análogo de arginina. La tasa de degradación proteica durante la primera media hora es igual en la cepa salvaje y en la cepa defectiva en proteinasa A y proteinasa B (2 %/hora). Sin embargo a tiempos más largos, la tasa de degradación en la cepa mutante disminuye hasta 1,3 %/hora, mientras la tasa de la cepa salvaje permanece inalterada, indicando que durante los eventos tempranos de degradación de proteínas anormales, el sistema vacuolar no está involucrado y que luego de la primera hora es responsable del 35 % de la degradación (Teichert y col., 1987; Teichert y col., 1989).

Cuando la levadura crece en un medio de esporulación (acetato y sin nitrógeno) la tasa de degradación proteica alcanza 3,3 %/hora y en cambio, la tasa de degradación de una cepa defectiva en proteinasa A y proteinasa B en las mismas condiciones es 0,46 %/hora, lo que equivale a una disminución del 85 %. Esta notable disminución de la degradación proteica *in vivo* debido a la ausencia de ambas proteinasas vacuolares coincide con mediciones realizadas *in vitro*. Extractos crudos de células defectivas en ambas proteinasas tienen disminuída en un 97 % su capacidad para hidrolizar metil[^{3}H]-caseína y en un 86 % su capacidad para hidrolizar proteínas de levadura marcadas con leucina[^{3}H] (Teichert y col., 1989). Utilizando esta cepa defectiva en el sistema proteolítico vacuolar, mediante estudios de microscopía electrónica, se observó la acumulación de vesículas autofágicas en el interior de las vacuolas de células que crecían en un medio pobre aumentando la cantidad de vesículas cuando las células alcanzaban condiciones de hambreado (Simeon y col., 1992). Mediante determinaciones bioquímicas en vacuolas aisladas se determinó un aumento progresivo de la concentración de enzimas citosólicas (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fructosa 1,6 difosfatasa, ácido graso sintetasa) durante el hambreado del cultivo (Egner y col., 1993).

Todos estos resultados en conjunto señalan que la degradación vacuolar de proteínas participa tanto en condiciones vegetativas de crecimiento, como en condiciones de stress nutricional, siendo su participación decisiva en condiciones de ayuno. En coincidencia con esto, se ha observado durante la deprivación de glucosa, y, en un grado menor, de nutrientes nitrogenados un aumento muy considerable (nueve veces y tres veces, respectivamente) de la actividad de proteinasa A, proteinasa B y carboxipeptidasa Y (Betz y Weiser, 1976; Hansen y col., 1977).

Además del efecto sobre la degradación proteica, la ausencia de las dos endoproteinasas vacuolares determina la incapacidad de las células diploides para esporular. La depleción de nucleótidos de guanina, que inicia la esporulación en células tipo salvaje en condiciones ricas en nitrógeno, no restaura la esporulación de células defectivas en proteinasa A y proteinasa B en las mismas condiciones, indicando que la alteración de otro evento distinto del suministro de aminoácidos es responsable de la incapacidad de esporular de mutantes defectivas en ambas proteinasas. Se estudió también la viabilidad celular en condiciones de hambreado. Mientras que la cepa salvaje y la cepa defectiva en proteinasa B mantienen un 100 % de viabilidad después de 8 días de ayuno de nitrógeno, la cepa defectiva en proteinasa A y la doble mutante pierden completamente su viabilidad dentro de los 3-4 días. El mismo comportamiento pudo observarse por ayuno de carbono, azufre o fósforo, por lo tanto, la proteinasa A es una enzima crucial, esencial para la sobrevivencia celular en condiciones de stress nutricional (Teichert y col., 1989).

Debe señalarse además, la existencia en el citoplasma de tres inhibidores específicos para la proteinasa A, proteinasa B y carboxipeptidasa Y (Matern y col., 1974; Lenney, 1975), cuyos niveles de expresión acompañan los niveles de estas proteinasas (Hansen y col., 1977).

SISTEMA CITOSOLICO

El sistema proteolítico citosólico está constituído fundamentalmente por la proteinasa E o proteosoma o proteinasa multicatalítica o partícula 20 S (Achstetter y col., 1984 b). Esta enzima, conservada en todos los organismos eucariontes, es un complejo de alto peso molecular (650-700 kDa) con una estructura cílindrica hueca característica, formada por al menos 12 subunidades no idénticas pero relacionadas, cuyos pesos moleculares oscilan entre 20 y 38 kDa (Rechsteiner y col., 1993; Rivett, 1993). El proteosoma es capaz de hidrolizar sin consumo de ATP uniones peptídicas sobre el lado carboxi de aminoácidos hidrofóficos, neutros, básicos y ácidos, utilizando péptidos cromogénicos como sustratos. Los estudios llevados a cabo con

distintos inhibidores de proteasas sobre la enzima purificada de mamíferos permiteron establecer la existencia de al menos tres sitios distintos responsables de sus actividades catalíticas (actividad tipo quimotripsina, actividad tipo tripsina y actividad hidrolizante sobre aminoácidos ácidos) (Orlowski y Michaud, 1989). Esta caracterización fue confirmada con el aislamiento de mutantes de *S. cerevisiae*, defectivas en la actividad quimotripsina (Heinemeyer y col., 1991, b) o en la actividad hidrolizante sobre aminoácidos ácidos (Hilt y col., 1993) que retenían las otras dos actividades con niveles similares a la cepa salvaje. Estudios realizados *in vitro* con el proteosoma purificado de mamífero mostraron que esta enzima es capaz de asociarse con otras proteínas, en una reacción dependiente de ATP, para constituir una proteinasa de 26 S (1.500 kDa) que es capaz de degradar proteínas ubiquitinadas con consumo de ATP (Eytan y col., 1989; Driscoll y Goldberg, 1990). Es posible que la actividad catalítica independiente de ATP del proteosoma sea debido al desacople del mismo de las putativas subunidades "regulatorias". La presencia de estas subunidades "regulatorias" probablemente se requiera a fin de conferir dependencia energética y especificidad a la proteasa 26 S asegurando así que sólo sean degradados aquellos sustratos destinados a la degradación. Es posible que estas subunidades regulatorias estén involucradas en la unión con la cadena de poliubiquitina conjugada al sustrato, llevando a éste a la proximidad de los sitios activos de la proteasa (Ciechanover y Schwartz, 1994). Muy recientemente se ha podido determinar que la subunidad S5 del complejo regulatorio de la proteasa 26 S es capaz de unir proteínas ubiquitinadas (Deveraux y col., 1994).

Se han clonado varios genes que codifican para subunidades del proteosoma de levadura; sin embargo no pudieron realizarse estudios *in vivo* de sus funciones dado que las mutantes nulas que se obtuvieron por inserción resultaron letales en todos los casos (Fujiwara y col., 1990; Emori y col., 1991). En 1991, Heinemeyer y col. aislaron mutantes termosensibles de *S. cerevisiae* que tenían muy disminuída la actividad quimotripsina del proteosoma a temperatura restrictiva. Esta cepa crece más lentamente que la cepa salvaje, siempre que se cultive en condiciones que no impongan un stress a la célula, y es incapaz de esporular. Se observó que la viabilidad de esta cepa disminuye pronunciadamente cuando se la cultiva a 38°C o en presencia de canavanina, además de observarse acumulación de proteínas ubiquitinadas. Asimismo se determinó una disminución del 27% y del 43 % de la degradación proteica respecto de la cepa salvaje cuando la mutante se creció a 38°C y en presencia de canavanina, respectivamente (Heinemeyer y col., 1991,b).

Se estudió la degradación de la enzima ácido graso-sintetasa en esta mutante. Esta enzima es un complejo compuesto por seis subunidades α y seis subunidades β, con una vida media de aproximadamente 20 horas. La mutación o deleción de una de las subunidades lleva a la degradación de la otra subunidad. La subunidad α no ensamblada tiene una vida media de 1 hora y su degradación es dependiente del proteosoma e independiente del sistema vacuolar. La subunidad β, en cambio, tiene una vida media de 3 horas en condiciones de crecimiento vegetativo, obteniéndose el mismo resultado con una cepa defectiva en el sistema vacuolar. Además se determinó la aparición de subunidad β dentro de las vacuolas en condiciones de hambreado no así de la subunidad α. Estos resultados indican que durante el crecimiento vegetativo la subunidad β no ensamblada es degradada por un sistema proteolítico no vacuolar, mientras que en condiciones de hambreado es importante la degradación vacuolar de la misma (Egner y col., 1993)

La fructosa-1,6 difosfatasa, es una de las enzimas de la gluconeogénesis, que sufre un proceso de inactivación cuando levaduras que crecen en un medio con una fuente de carbono no fermentable (acetato o etanol) son transferidas a un medio con glucosa. Se ha demostrado que este proceso llamado inactivación catabólica ocurre en dos etapas: a la rápida fosforilación de la enzima le sigue su degradación (Tortora y col., 1981). Cuando se estudió la intervención del sistema proteolítico vacuolar durante la inactivación catabólica de la fructosa-1,6 difosfatasa, se observó que la cinética de inactivación de esta enzima como la desaparición del antígeno fueron esencialmente iguales en una cepa salvaje y en una cepa defectiva en proteinasa A y proteinasa B, indicando la participación de un sistema degradativo distinto del vacuolar (Teichert y col., 1989). Recientemente se observó, utilizando una cepa de *S. cerevisiae* defectiva en la actividad proteolítica del proteosoma, una marcada reducción de la degradación inducida por glucosa de la fructosa-1,6 difosfatasa (Schork y col., 1994 a,b)

También se estudió la participación del proteosoma en la regulación del ciclo celular. Es sabido que en todas las células eucariontes existe una quinasa de proteínas, codificada en levaduras por el gen CDC28, que es el elemento central en la regulación del ciclo celular. Esta actividad quinasa está regulada por una clase de proteínas llamadas ciclinas, la mayoría de las cuales son muy inestables y están sólo presentes en una particular etapa del ciclo celular. De las cuatro ciclinas que actúan durante la mitosis sólo la ciclina Clb2 es esencial (Nasmyth, 1993). Se observó que el crecimiento de una cepa de *S. cerevisiae* defectiva en la actividad quimotripsina del proteosoma fue levemente menor que la de la cepa salvaje.

En cambio, cuando se estudió el crecimiento de ambas cepas, transformadas con un plásmido que portaba un gen adicional de la ciclina Clb2 bajo el control de un promotor fuerte e inducible, se observó que la cepa salvaje era capaz de crecer, aunque con una velocidad menor que la cepa respectiva sin transformar. En cambio, la cepa defectiva en la actividad quimotripsina del proteosoma, que sobreexpresaba la ciclina Clb2, cesó en su crecimiento. Estos resultados sugieren una relación entre la acción de la ciclina Clb2 y el defecto de la actividad quimitripsina del proteosoma. El arresto en el crecimiento de la cepa mutante que sobreexpresa Clb2 probablemente es debido a la incapacidad del proteosoma defectivo para degradar una cantidad mayor de ciclina Clb2 (Richter-Ruoff y Wolf, 1993).

Finalmente, utilizando la cepa defectiva en la actividad quimotripsina del proteosoma, se observó la estabilización de proteínas que son degradadas vía ubiquitinación en una cepa salvaje (Richter-Ruoff y col., 1992; Seufert y Jentsch, 1992). Esta evidencia, junto con la acumulación de proteínas ubiquitinadas en células mutantes (Heinemeyer y col., 1991,b; Heinemeyer y col., 1993; Hilt y col., 1993), señalan al proteosoma como el responsable final de la degradación de proteínas vía ubiquitinación.

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada en todos los organismos eucariontes. El primer paso de la conjugación de ubiquitina a proteínas es la activación de la misma, mediante la formación dependiente de ATP de un enlace tioéster entre la glicina C-terminal de ubiquitina y un grupo tiol de la enzima activante, E_1. El segundo paso es la transferencia de la ubiquitina activada desde la E_1 a un residuo tiol de un miembro de la familia de enzimas transportadoras de ubiquitina, E_2. Estas enzimas transfieren la ubiquitina activada a un residuo lisil específico de la proteína blanco que está unida a una ubiquitina-proteína ligasa, E_3, formándose una unión isopeptídica entre el grupo ε-amino de la lisina con la glicina C-terminal de la ubiquitina. Esta reacción involucra la unión específica del sustrato proteico a la E_3 antes de la reacción con la ubiquitina activada. Luego de la primer reacción de conjugación, siguen sucesivas conjugaciones de ubiquitina sobre la ubiquitina unida a la proteína, resultando entonces, en una multiubiquitinación de la proteína blanco. Cabe señalar que durante este proceso la proteína permanece unida a la E_3. Este conjugado es reconocido y degradado por la proteasa 26 S con consumo de ATP, produciendo péptidos pequeños y liberando ubiquitina libre dado que el complejo 26 S contiene también actividad hidrolítica sobre la unión isopeptídica de la glicina C-terminal de la ubiquitina con el sustrato proteico (Hershko y Ciechanover, 1992; Ciechanover y Schwartz, 1994).

Es sabido que la ubiquitinación de proteínas cumple otras funciones además de la vinculada a la proteólisis, tales como regulación de la expresión génica, reparación del DNA, importación de proteínas dentro de mitocondria y biogénesis de ribosomas, peroxisomas y mitocondrias. A través de estudios genéticos y bioquímicos de estos procesos se ha determinado que para algunos casos la reacción de conjugación de ubiquitina a la proteína blanco ocurre mediada por la enzima transportadora E_2 sin la intervención de la E_3. La mayoría de los conjugados así formados son del tipo monoubiquitinados y no son destinados a la degradación.

El mecanismo de reconocimiento de los sustratos ubiquitinados a ser degradados por el proteosoma es aún un enigma. Ya se mencionó un modelo que involucra a las putativas subunidades regulatorias del proteosoma (aquellas proteínas que se unen de un modo dependiente de ATP al proteosoma para formar la proteasa 26 S) en el reconocimiento de los sustratos ubiquitinados. Se ha propuesto otro modelo basado en las características físicas del proteosoma, de ser un complejo proteico cilíndrico y hueco. Según este modelo, el proteosoma reconocería específicamente como sustratos sólo proteínas en estado desnaturalizado y la ubicación física de los sitios activos de sus tres actividades catalíticas sería hacia el interior del cilindro hueco. Así, proteínas globulares nativas no accederían a los sitios activos y no serían degradadas, y en cambio, una proteína al desnaturalizarse expondría regiones desplegadas que podrían acceder a los mismos. La actividad quimotripsina iniciaría el clivaje en regiones hidrofóficas del sustrato y los péptidos liberados pasarían a lo largo del cilindro donde serían clivados por las otras dos actividades de la enzima. Las subunidades no catalíticas del complejo podrían servir a funciones adicionales. Se ha reportado que el proteosoma (20 S) posee actividad ATPasa. Tal actividad podría ser responsable del movimiento del sustrato a lo largo del cilindro. Este modelo presenta al proteosoma como una pseudo-organela proteolítica que excluye a las proteínas que no son sustrato, no por una membrana como lo hace la vacuola sino por restricciones físicas. Además implica un mecanismo de canalización de los subproductos hacia otros sitios activos del complejo hasta la producción de péptidos pequeños evitando la liberación citosólica de intermediarios potencialmente tóxicos. La ubiquitina unida al sustrato podría actuar como señal de reconocimiento o de unión al proteosoma. Una alternativa para explicar la señalización por ubiquitina se basa en el hecho que su estructura nativa presenta superficies iónicas y superficies hidrofóbicas y que se ha reportado que la velocidad de degradación de proteínas ubiquitinadas depende del tamaño de la estructura de poli-ubiquitina conjugada. Así, las moléculas de

ubiquitina podrían actuar como detergentes desplegando y desnaturalizando el sustrato. El tamaño de la cadena de poli-ubiquitina necesario para desplegar una dada proteína dependería del estado estructural de la misma (Hilt y Wolf, 1992).

Debe mencionarse que se ha demostrado *in vitro* que la proteasa 26 S también es capaz de degradar sustratos proteicos no ubiquitinados, como es el caso de la ornitina descarboxilasa (Murakami y col., 1992; Murakami y col., 1993).

RELACIONES ENTRE EL SISTEMA VACUOLAR Y EL CITOPLASMATICO

Cualquier proteína citoplasmática puede ser importada al interior de la vacuola por un proceso de autofagia. Para las proteínas de vida media larga (ácido graso sintetasa, fructosa 1,6 difosfatasa) la proteólisis vacuolar representa el principal evento degradativo. Durante condiciones de stress nutricional, además del aumento considerable de la actividad específica de las proteinasas vacuolares, ocurre un aumento del proceso de autofagia. En el caso de proteínas de vida media "intermedia", como la subunidad β de la ácido graso sintetasa, son degradadas en el citoplasma y parcialmente en la vacuola cuando ocurre autofagia. Las proteínas de vida media corta son principalmente degradadas en el citoplasma, por el proteosoma o por otro sistema citosólico aún no detectado. Tales proteínas llegan a la vacuola por autofagia en muy pequeñas cantidades lo que hace muy difícil su detección. El proceso de autofagia no excluye la existencia de otros procesos de entrada a la vacuola más específicos, como el descripto para eucariontes superiores durante stress nutricional (Dice, 1990).

Además de la respuesta proteolítica durante el stress nutricional mediada fundamentalmente por el sistema vacuolar, ocurren otras respuestas a otras condiciones (temperatura elevada, análogos de aminoácidos, condiciones de esporulación, etc.) donde la selectividad de la proteólisis es extremadamente importante. Tal selectividad puede ser alcanzada 1) por una captura selectiva de proteínas dentro de la vacuola y 2) por un degradación *in situ* de las proteínas seleccionadas mediada por el reconocimiento de alguna señal dentro de los sustratos. Tales señales podrían ser reconocidas directamente por la proteinasa o existir un sistema mediador que reconozca la señal y dirija la proteína hacia su degradación, como es el caso del sistema de ubiquitinación.

La esporulación es inducida cuando células creciendo en un medio rico con glucosa son cambiadas a un medio libre de nitrógeno. En este proceso son esenciales tanto el sistema vacuolar como el sistema proteolítico dependiente de ubiquitina. Como ya se mencionó, el proceso de esporulación

puede tambien tener lugar en condiciones ricas en nitrógeno si ocurre exhausión de nucleótidos de guanina. El hecho que mutantes defectivas en el sistema proteolítico vacuolar tampoco puedan esporular en estas condiciones, señala que la proteólisis no sólo es necesaria para proveer los aminoácidos requeridos para la síntesis de nuevas proteínas sino que, probablemente, se requiera la desaparición de ciertas proteínas.

Se ha demostrado que la recuperación celular al stress inducido por calor como por anólogos de aminoácidos es dependiente del producto del gen de poliubiquitina, de la integridad del sistema de conjugación de ubiquitina y del proteosoma, todos de localización citoplasmática. Sin embargo se ha observado que parte de la proteólisis inducida por canavanina es mediada por el sistema vacuolar después de media hora de inducido el stress. Esto puede interpretarse considerando que el sistema vacuolar no es requerido tanto como el sistema citosólico, mucho más específico, para iniciar la recuperación celular, pudiendo intervenir cuando el sistema citosólico se encuentra sobrecargado de sustratos.

Se ha descripto una nueva función para el sistema de ubiquitina. Gropper y col. (1991) trabajando con dos líneas celulares de mamíferos, ambas termosensibles para la E_1, enzima activante de ubiquitina, observaron que después del cambio del cultivo a la temperatura restrictiva, no se modificaba la tasa de degradación proteica de las proteínas de vida media larga. En cambio si la inducción por calor se hacía sobre la cepa salvaje se observó un aumento de 2-3 veces de la tasa de degradación para este grupo de proteínas. Este aumento de la degradación de proteínas de vida media larga pudo ser prevenido por el agregado de agentes lisomotrópicos tales como cloruro de amonio y cloroquina, indicando que la degradación tenía lugar principalmente en lisosomas y vesículas autofágicas. Estos resultados en conjunto indican que una enzima E_1 activa es necesaria para el aumento de la degradación lisosomal de proteínas de vida media larga inducida por calor.

Pueden postularse dos mecanismos distintos que involucren el sistema de ubiquitina con la autofagia. Una posibilidad es que las proteínas a ser degradadas preferencialmente en el lisosoma previamente deben ser marcadas con ubiquitina. Coincidente con esta hipótesis, se observó enriquecimiento de proteínas ubiquitinadas en lisosomas de fibroblastos (Laszlo y col., 1990). También se encontró ubiquitina libre en lisosomas (Schwartz y col., 1988). Asimismo, se observó en una cepa de *S. cerevisiae* deficiente en las dos proteinasas vacuolares acumulación de proteínas en esta organela. Una considerable cantidad de estas proteínas acumuladas estaban ubiquitinadas (Heinemeyer y col., 1991,a; Simeon y col., 1992). Una segunda posibilidad

es que el sistema de ubiquitina esté involucrado directa o indirectamente en la formación, maduración o función de las vacuolas autofágicas. Así, una proteína que es esencial en la biogénesis de las vacuolas debe ser primero conjugada con ubiquitina para devenir activa; o, una proteína de vida media corta que inhibe la formación de estas vacuolas tiene que ser proteolizada a fin de revertir la inhibición (Hershko y Ciechanover, 1992).

OTRAS PROTEASAS DE *S.CEREVISIAE*

ENDOPROTEASAS

El análisis cromatográfico en columnas de intercambio iónico y de tamiz molecular de extractos solubles de una cepa de levadura defectiva en el sistema proteolítico vacuolar, reveló la presencia de una importante cantidad de otras proteinasas (Achstetter y col., 1981; Achstetter y col., 1984, a). Se han purificado y caracterizado parcialmente dos, la proteinasa D (Achstetter y col., 1985) y la proteinasa J (Wagner y Wolf, 1992). Además, recientemente la proteinasa D ha sido clonada (Buchler y col., 1994). Esta enzima, también llamada oligopeptidasa D, presenta una amplia especificidad de sustrato sólo para oligopéptidos y no así para proteínas. El estudio de una cepa defectiva en esta enzima no mostró ninguna alteración en su fisiología, comparada a una cepa salvaje, excepto un aumento en la concentración intracelular de péptidos. A partir de este resultado, de su especificidad por oligopéptidos y de su localización citosólica, se ha sugerido que podría estar involucrada en la degradación de péptidos producidos por la proteinasa E (Buchler y col., 1994). La proteinasa J corta específicamente en el lado amino de un par de residuos básicos (Wagner y Wolf, 1992). Dado que las otras proteinasas detectadas, además de la proteinasa D y J, presentan actividad hidrolítica sobre alguno/algunos, pero no todos, de los péptidos cromogénicos utilizados como sustratos, se ha sugerido que la especificidad de las mismas no debe ser amplia.

AMINOPEPTIDASAS

Además de las aminopeptidasas I e Y, de localización vacuolar, se han descripto varias aminopeptidasas citosólicas.

Se purificó y caracterizó la Metionina aminopeptidasa, actividad responsable de la remoción de la metionina N-terminal de los polipéptidos. Esta enzima exhibe una especificidad de sustrato similar a la enzima de *E. coli* y *S. typhimurium* (remueve la metionina cuando el aminoácido siguiente es pequeño o no cargado y es incapaz de clivar cuando el aminoácido vecino

a la metionina N-terminal es grande o cargado) (Chang y col., 1990). Se clonó el gen y se observó que la sobreexpresión de la Metionina aminopeptidasa no implicó ningún cambio ni en la velocidad de crecimiento ni en la morfología celular. Por otro lado, una cepa mutante defectiva en la enzima fue viable aunque exhibió un aumento considerable en el tiempo de duplicación y una disminución en el tamaño de las colonias. Estos resultados contrastan con los obtenidos en *E. coli* y *S. typhimurium*, organismos en los cuales la deleción del gen de la Metionina aminopeptidasa es letal, e indican que en *S. cerevisiae* debe existir un mecanismo alternativo para la remoción de la metionina N-terminal de los péptidos nacientes (Chang y col., 1992).

La aminopeptidasa II es la actividad citoplasmática mayoritaria y es capaz de hidrolizar derivados cromogénicos de aminoácidos hidrofóbicos y básicos. Además de su localización citoplasmática, la enzima también se detectó en el periplasma (Frey y Rohm, 1979). El estudio de una cepa mutante termosensible para la actividad de la aminopeptidasa II no mostró ninguna consecuencia en la tasa de crecimiento, ni en la frecuencia de esporulación, y tampoco se modificó la tasa de degradación proteica, comparada a la cepa salvaje. La deficiencia de actividad aminopeptidasa II sólo incidió en la fisiología celular cuando se estudió el crecimiento de cepas auxótrofas para leucina en medios de cultivos suplementados con dipéptidos conteniendo leucina. El crecimiento de la cepa defectiva en aminopeptidasa II fue sensiblemente menor que el de la cepa salvaje (Hirsch y col., 1988). En 1991 se clonó el gen que codifica para la aminopeptidasa II y del análisis de su secuencia se concluyó que se trata de una zinc-enzima, dada la presencia del motivo consenso característico de unión de este metal. Además se construyó una mutante nula (por inserción) de esta actividad y al igual que con la mutante termosensible, la ausencia de la actividad aminopeptidasa II no implicó ninguna alteración evidente en la fisiología celular (García-Alvarez y col., 1991).

Se purificó y caracterizó la aminopeptidasa XVI. Esta enzima es la única aminopeptidasa soluble de *S. cerevisiae* capaz de hidrolizar residuos cisteína N-terminales. Además es capaz de hidrolizar aminoácidos hidrofóficos y cargados (Tisljar y Wolf, 1993).

Se clonó el gen BLH1 que codifica para una aminopeptidasa y se la llamó bleomicina hidrolasa, dado que exhibe una alta homología con la enzima de mamíferos. Esta es la primera aminopeptidasa estudiada en levaduras que no es una metalo-enzima, sino una tiol-enzima y que no es inhibible por bestatina, conocido inhibidor de aminopeptidasas, sino por el E-64, específico de tiol-proteasas (Enenkel y Wolf, 1993).

Además de estas aminopeptidasas, que fueron estudiadas con mayor profundidad, se reportó la existencia en extractos solubles de al menos otras 13 aminopeptidasas, todas ellas inhibibles por bestatina y con especificidasd de sustrato cruzadas (Achstetter y col., 1983).

Se ignora las funciones de estas actividades como tampoco se sabe el porque de un número tan importante de actividades aminopeptidásicas distintas y redundantes, dado que entre ellas comparten especificidad de sustrato. De acuerdo con esto, se observó que cepas mutantes en cuatro aminopeptidasas distintas (Trumbly y Bradley, 1983) o aún con un gen delecionado que codifica para una aminopeptidasa (García-Alvarez y col., 1991), no exhiben ninguna disfunción evidente. Justamente, estos hechos que señalan la redundancia funcional han sido tomados como aval teleológico de la importancia de las aminopeptidasas en la fisiología celular (Taylor, 1993,a).

Arbesú y col. (1991) aislaron una mutante de *Schizosaccharomyces pombe*, defectiva en la única aminopeptidasa detectada en este organismo (aminopeptidasa I). No se observaron diferencias significativas entre la cepa mutante y la cepa salvaje en cuanto a tasa de crecimiento, frecuencia de esporulación y tasa de degradación proteica. Sin embargo, cuando se analizó cromatográficamente la naturaleza de la fracción celular soluble al ácido tricloroacético en la cepa mutante se observó la presencia de una importante cantidad de péptidos y en cambio el mismo análisis en la cepa salvaje mostró que la cantidad de péptidos solubles era sensiblemente menor. Estos resultados sugieren que al menos la aminopeptidasa I de *S. pombe* participa en la degradación final de péptidos. Otra evidencia a favor de la participación de las aminopeptidasas en la degradadción final de péptidos se obtuvo estudiando el efecto *in vivo* de la bestatina sobre la degradación de proteínas hepáticas. Se observó que por acción de el inhibidor se producía acumulación citosólica de péptidos (Botbol y Scornik, 1989).

CARBOXIPEPTIDASAS

Hasta el presente no existen reportes de la presencia de carboxipeptidasas en la fracción citosólica de *S. cerevisiae*. En *S. pombe* se ha reportado la presencia de una única actividad carboxipeptidasa (Suarez Rendueles y col., 1991). Si bien aún no se ha determinado la localización subcelular de esta enzima, las características exhibidas por la misma sugieren que se halla localizada en la vacuola. Asimismo, tampoco se ha detectado la presencia de carboxipeptidasas citosólicas en células de mamíferos (Mc Donald y Schwabe, 1977).

REGULACION DE LA PROTEOLISIS

La proteólisis intracelular es un proceso altamente regulado y específico para prevenir una degradación descontrolada e inapropiada de proteínas y para llevar a cabo los objetivos de importantes procesos celulares en los cuales están involucradas proteasas.

Compartimentalizacion

La acción de una proteasa puede estar limitada por su localización subcelular, siendo el ejemplo más estudiado el de las proteasas vacuolares en levaduras que restringen su acción a aquellas proteínas que entran dentro de la organela.

Síntesis de proteasas

Como ya se mencionó, la deprivación de glucosa en un cultivo de *S. cerevisiae* induce la síntesis de la proteinasa A, proteinasa B y carboxipeptidasa Y, como asimismo la de sus inhibidores citosólicos específicos (Hansen y col., 1977).

En el acrasial *Dictyostelium discoideum* se estudió las cisteín-proteinasas y se observó que las mismas están reguladas por las condiciones nutricionales y por el estado de desarrollo (North y col., 1988).

Inhibidores y activadores

Se clonaron los inhibidores específicos de levadura para las proteinasas vacuolares A y B y se construyeron mutantes nulas para ambos inhibidores (Schu y col., 1991; Schu y Wolf, 1991). Se observó que la deficiencia de ambos inhibidores no tiene consecuencias sobre la viabilidad celular en ninguna de las condiciones fisiológicas estudiadas. Sin embargo, la tasa de degradación proteica de la doble mutante es 2-3 veces más alta que la de la cepa salvaje en condiciones de stress nutricional. Estos resultados indican una interacción *in vivo* entre las proteinasas vacuolares y sus inhibidores específicos. Se había propuesto que estos inhibidores citoplasmáticos podrían actuar protegiendo la célula de la degradación descontrolada de proteínas citoplasmáticas producida por las enzimas vacuolares liberadas en el citoplasma durante los procesos de fragmentación y fusión vacuolar. Si bien esta función de los inhibidores no puede ser excluída, el hecho que la viabilidad celular de mutantes nulas para ambos inhibidores no esté afectada en ninguna de las condiciones metabólicas estudiadas, señala que la liberación del contenido vacuolar en el citoplasma parece no ser un evento frecuente.

Se sabe de experimentos realizados *in vitro*, que las proteinasas vacuolares se digieren a si mismas (Kominami y col., 1981). Así, los inhibidores podrían proteger a las proteinasas de la autodigestión y las proteinasas incompletamente inhibidas podrían activar unas a otras por la degradación de los inhibidores. De este modo los inhibidores podrían mantener una alta actividad proteolítica dentro de la vacuola. Dado que la regulación de la expresión de la proteinasa A difiere al menos en un elemento regulatorio de la de su inhibidor específico (Beck y col., 1980), la célula podría regular el nivel de actividad de la proteasa por el nivel de su inhibidor.

Dependiendo del procedimiento utilizado para purificar el proteosoma a partir de eucariontes superiores, se observó que el mismo podía ser aislado en una forma latente o en una forma activa. Se describieron dos complejos proteicos capaces de inhibir al proteosoma de un modo no competitivo y con un valor de Ki de alrededor de 10-7 M. Asimismo, se purificó un complejo proteico capaz de unirse reversiblemente al proteosoma con un Kd aproximado de 10-9 M y capaz de estimular marcadamente la capacidad del proteosoma de hidrolizar péptidos cromogénicos (Rechsteiner y col., 1993; Rivett, 1993).

Metabolitos

Las concentraciones intracelulares de pequeños metabolitos pueden afectar de distinto modo la actividad de las proteasas.

En el hongo acuático *Allomyces arbuscula* se describió la presencia de una proteasa neutra activable por concentraciones micromolares de Ca^{2+} (Ojha y Wallace, 1988).

El requerimiento de ATP para el funcionamiento del proteosoma es absoluto. El proceso de ubiquitinación de proteínas, el ensamblado de la partícula 20 S, donde residen las actividades catalíticas, con otras proteínas, de posible actividad regulatoria, para formar la partícula 26 S y la proteólisis en si misma requieren hidrólisis de ATP. Además, trabajando con la enzima purificada de eucariontes superiores, se observó un efecto de activación de la proteólisis por el agregado de ácidos grasos (Rechsteiner y col., 1993).

Se ha reportado la presencia en cerebro de mono de una aminopeptidasa estimulable por ATP. La misma enzima sufre inactivación por fosforilación mediada por la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (PK A) (Ramamoorthy y Balasubramanian, 1989)

Susceptibilidad de sustratos

La concentración intracelular de una proteína está determinada por el balance entre la tasa de síntesis y la tasa de degradación (Schimke y Doyle, 1970). Mientras los mecanismos de regulación de la síntesis, sea a nivel transcripcional o traduccional, son bien conocidos, el conocimiento que se posee sobre los medios de que dispone la célula para regular la degradación de una proteína particular respecto de otras es aún escaso. Que tal regulación existe es evidente del hecho que hay grandes diferencias en el tiempo de vida media de las proteínas y que la tasa de degradación de una proteína puede variar independientemente de otras, por cambios en el estado nutricional celular. Tal especifidad requiere más que el solo cambio de los niveles de actividad enzimática de las proteasas. La observación de la diversidad de tiempos de vida media de las proteínas ha planteado muchos interrogantes sobre que característica estructural de la proteína determina que sea más o menos susceptible al ataque de las proteasas. Distintos factores como las modificaciones covalentes, la interacción con otras proteínas, metabolitos, cofactores o efectores alostéricos, cambios en la hidrofobicidad y la glicosilación pueden afectar la susceptibilidad de los sustratos proteicos a la proteólisis y así funcionar en la regulación de la degradación proteica (Holzer y Heinrich, 1980).

Numerosos estudios realizados *in vitro* indican que los sustratos o activadores alostéricos protegen a sus enzimas blanco de la inactivación proteolítica, como así también inhibidores o inactivadores alostéricos tornan más susceptible una proteína a la degradación (Wolf, 1980; Holzer y Heinrich, 1980; Bond y Butler, 1987). Recientemente se ha reportado la degradación de la ornitina descarboxilasa por la proteasa 26 S independiente de ubiquitinación. Además de ello, se ha observado una gran estimulación (9 veces) de la degradación de la enzima por la unión de la misma con su inhibidor específico (Murakami y col. 1992; Murakami y col., 1993).

Ya se mencionó el rol que tiene la ubiquitinación de proteínas como evento de señalización para la proteólisis, tanto en la degradación citosólica (mediada por la proteasa 26 S) como en la degradación lisosomal. Los primeros estudios llevados a cabo a fin de dilucidar cual o cuales características estructurales de una proteína eran reconocidas por el sistema conjugante de ubiquitina revelaron la importancia que posee el residuo N-terminal del sustrato proteico. Se observó que la modificación específica del grupo α-NH2 de la lisozima disminuía marcadamente la capacidad de esta proteína a ser ubiquitinada y degradada en un sistema reconstituído libre de células. La adición de cadenas laterales de

polialanina a la proteína modificada restauraba la susceptibilidad a ser ubiquitinada y degradada (Hershko y col., 1984). Posteriormente, Bachmair y col. (1986) pudieron establecer que la identidad del residuo N-terminal de una proteína es un determinante importante de su estabilidad metabólica *in vivo*. Trabajaron con una serie de proteínas derivadas de la β-galactosidasa de *E. coli* que diferían unas de otras sólo en la identidad del aminoácido N-terminal. El análisis del tiempo de vida media de estas proteínas expresadas en levaduras reveló que variaban entre menos de 2 minutos a más de 20 horas y se observó, además, la formación de conjugados ubiquitina-proteína en el caso de las variantes de vida media corta. Se concluyó clasificando los 20 amino ácidos en estabilizantes o desestabilizantes según la vida media que ellos conferían cuando ocupaban la posición N-terminal de la proteína y enunciando, así, la regla del N-terminal.

Si bien actualmente se conoce con bastante detalle muchos aspectos mecanísticos de la regla del N-terminal, distintas líneas de trabajo experimental indican que su rol fisiológico es bastante limitado y que el sistema de reconocimiento por el N-terminal no es esencial en el metabolismo celular. 1) Aproximadamente el 80 % de las proteínas celulares están N-α-acetiladas (Brown y Roberts, 1976). Para las proteínas remanentes, con el N-terminal libre, la especificidad de sustrato de la Metionina aminopeptidasa, que remueve específicamente el residuo iniciador metionina, determina que sólo será removido si el amino ácido siguiente es de naturaleza estabilizante (Moerschell y col., 1990; Hershko y Ciechanover, 1992). Así, proteínas con un residuo N-terminal desestabilizante parecen ser muy poco frecuentes. 2) Mayer y col. (1989) han mostrado que proteínas con su N-terminal acetilado son degradadas por el sistema de ubiquitina y que no es necesaria la remoción del grupo N-α-acetilo para que tenga lugar el reconocimiento y la degradación proteica. Recientemente se ha purificado y caracterizado una nueva enzima trasportadora de ubiquitina, E_2, que está involucrada en la degradación de proteínas no gobernadas por la regla del N-terminal (Blumenfeld y col., 1994). 3) La inactivación de la regla del N-terminal (por deleción del gen que codifica para la enzima $E_{3\alpha}$, responsable del reconocimiento de sustratos gobernados por la regla del N-terminal) en *S. cerevisiae* no es letal y no presenta ningún fenotipo característico (Bartel y col., 1990; Varshavsky, A., 1992). Este dato sugiere que el reconocimiento de aquellas proteínas N-α-acetiladas o con su extremo amino libre que no son gobernadas por la regla del N-terminal, ocurre por ubiquitina-proteína ligasas distintas de la $E_{3\alpha}$ y que son reconocidas por motivos estructurales que

residen, muy probablemente, fuera del N-terminal. Aún se ignora la naturaleza de estas señales.

En estudios realizados en sistemas procariontes como eucariontes se observó una correlación de la susceptibilidad al ataque proteolítico con la conformación de la proteína (plegamiento y grado de desnaturalización) y/o la hidrofobicidad de la misma. En ambos sistemas también se observó un aumento de la hidrofobicidad y de la desnaturalización de las proteínas por la oxidación de las mismas y el aumento consiguiente de la susceptibilidad proteolítica. Estudios posteriores llevados a cabo en células de mamíferos revelaron la independencia del proceso proteolítico del sistema de ubiquitina, pero dependiente de la presencia del proteosoma 20 S (Davies, 1993). El modelo propuesto para interpretar estos resultados es esencialmente similar al modelo de Hilt y Wolf ya mencionado (Hilt y Wolf, 1992). Así, proteínas no dañadas "esconden" las zonas hidrofóficas en su estructura terciaria y cuaternaria y por lo tanto son malos sustratos del proteosoma. Durante la modificación oxidativa de las proteínas una desnaturalización parcial de la estructura proteica expone estos residuos hidrofóbicos, resultando en un aumento general de la hidrofobicidad. Estas zonas hidrofóbicas expuestas pueden ser entonces sustratos del proteosoma (Davies, 1993). Debe señalarse que ambos modelos también coinciden en asignar a la actividad quimotripsina del proteosoma (con especificidad por residuos hidrofóbicos) el evento iniciador de la proteólisis. Se han reportado numerosos ejemplos de cambios en la susceptibilidad proteolítica asociado a otras modificaciones postraduccionales distintas de la oxidación proteica. Este modelo de especificidad proteolítica podría generalizarse considerando que la adición o remoción de un sustiyutente sobre la proteína, dada la modificación conformacional que produce, puede llevar a la exposición de regiones sensibles a la proteólisis (Stadtman, 1990).

RELACION ENTRE FOSFORILACION Y PROTEOLISIS

El hecho que la fosforilación de proteínas constituye uno de los principales mecanismos de regulación de diversas funciones biológicas llevó a la proposición que la fosforilación también podría regular la degradación de proteínas (Goldberg y Dice, 1974; Goldberg y St. John, 1976). Esta proposición es confirmada por varias evidencias experimentales. Así, se ha observado que *in vitro* la piruvato quinasa fosforilada es 10 veces más sensible a la proteólisis que la forma no fosforilada (Ekman y col., 1978). Por el contrario, también se ha observado que la fosforilación reduce la susceptibilidad al ataque proteolítico, como es el caso de la isocitrato deshidrogenasa de *E. coli* (Garland y Nimmo, 1984).

Se ha postulado que el mecanismo de fosforilación-defosforilación está involucrado en la organización del citoesqueleto, en el cual la proteína ligadora de actina posee un rol importante (Zhuang y col., 1984). Se ha demostrado que ésta proteína es hidrolizada por la calpaína durante la agregación plaquetaria y que su fosforilación *in vitro* por la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (PK A) la protege de la acción de la calpaína plaquetaria, no así de la degradación por tripsina, papaína o termolisina (Zhang y col., 1988). Se demostró que la activación de la PK A de plaquetas, por el agregado de prostaglandina E1, resulta en la fosforilación *in situ* de las proteína ligadora de actina y en su consecuente estabilización contra la degradación de calpaína (Chen y Stracher, 1989).

Se ha reportado también la modificación de la susceptibilidad proteolítica de péptidos mediada por fosforilación. El kémptido es un heptapéptido sintético cuya secuencia (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gli) es el motivo consenso de fosforilación de los sustratos de la PK A. Benore-Parsons y col. (1989) demostraron que la fosforilación en serina reduce marcadamente la degradación del péptido por acción de la tripsina y de otras proteasas con especificidad por residuos básicos. Asimismo, se demostró que la fosforilación del péptido epidermal inhibidor de la mitosis y del péptido inhibidor de la transcripción protege a los mismos de la degradación por acción de una proteasa sérica (Bramucci y col., 1992).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Saccobolus platensis es un ascomicete coprófilo en el cual la producción de estructuras reproductivas es un proceso morfogenético dependiente de la luz. Este hongo es capaz de formar apotecios con ascos maduros cuando se lo cultiva en condiciones de iluminación, siendo incapaz de producir estructuras sexuales cuando es crecido en oscuridad (Gamundi y Ranalli, 1969).

Trabajos previos del laboratorio mostraron que la adición de dibutiril-AMP cíclico a cultivos de *S. platensis* crecidos en oscuridad, provoca el mismo efecto que la luz, es decir induce la formación de estructuras reproductivas normales (Galvagno y col., 1984). Estos resultados indican que el efecto inductor de la luz sobre la producción de fructificaciones puede ser simulado por la presencia de AMP cíclico en el medio de cultivo del organismo desarrollado en oscuridad. Otra evidencia a favor de la participación del AMP cíclico en el proceso de formación de estructuras reproductivas se obtuvo mediante el agregado de inhibidores de fosfodiesterasa de AMP cíclico en el medio de cultivo, lo cual equivale a

aumentar los niveles intracelulares del nucleótido cíclico. El agregado de teofilina o 3-isobutil-1-metilxantina en el medio de cultivo del organismo desarrollado en oscuridad induce la formación de estructuras reproductivas normales. El correlato bioquímico del efecto fisiológico del AMP cíclico en este hongo fue obtenido mediante la medición de las actividades de las enzimas adenilato ciclasa y fosfodiesterasa del nucleótido cíclico en extractos de micelio crecido en ausencia y en presencia de luz; se determinó, como era de esperar, una actividad específica de adenilato ciclasa dos veces mayor en extractos de micelio crecido en condiciones de iluminación respecto de los extractos de micelio crecido en oscuridad y, por el contrario, la actividad específica de fosfodiesterasa de AMP cíclico resultó ser mayor en extractos de micelio crecido en oscuridad.

En células eucariotas la PK A es el principal y tal vez el único receptor intracelular del nucleótido cíclico. En eucariontes superiores esta proteína tiene una estructura tetramérica formada por dos tipos de subunidades: una responsable de la actividad catalítica (subunidad C) que transfiere el fosfato γ del ATP a las proteínas sustratos fosforilables y un componente regulatorio dimérico (R_2) que es capaz de unir AMP cíclico y que en ausencia del mismo se asocia a dos subunidades C para formar una holoenzima inactiva cuya composición es R_2C_2.

A fin de profundizar el estudio de los mecanismos mediante los cuales el AMP cíclico ejerce su acción como mediador endógeno de la respuesta a la luz en este organismo, se inició en el laboratorio el estudio de la PK A. Cuando se analizaron extractos solubles del hongo por cromatografía en columna de DEAE-celulosa, se observó que la actividad ligante de AMP cíclico (actividad de la subunidad regulatoria) eluía como un único pico, del mismo modo la actividad fosfotransferasa medida sobre protamina como sustrato aceptor de fosfato (actividad de la subunidad catalítica). La relación de actividad quinasa de protamina a proteína ligante de AMP cíclico en las fracciones del pico fue constante, indicando que ambas actividades residen en una única especie molecular. En cambio, cuando la actividad fosfotransferasa se midió con kémptido como sustrato, no se observó un único pico que acompañaba a las otras dos actividades, como era de esperar, sino que se observaron dos picos de actividad fosforilante interrumpidos por una zona en la cual no se detectó actividad fosforilante alguna y que coincidía con el máximo del pico de actividad ligante de AMP cíclico y de protamina quinasa (Figura D) (Silberstein y col., 1990).

El análisis por centrifugación en gradientes de sacarosa de la fracción de la cromatografía de intercambio iónico que contenía el máximo de actividad ligante de AMP cíclico y que no presentaba actividad fosforilante

sobre kémptido, permitió evidenciar la presencia de la actividad kémptido quinasa en esa fracción y además se observó que cosedimentaba con la actividad ligante de AMP cíclico. Estos resultados indican que durante la centrifugación en gradientes de sacarosa se separa algún factor que dificulta e incluso impide la detección de la actividad kémptido quinasa (Silberstein, 1990).

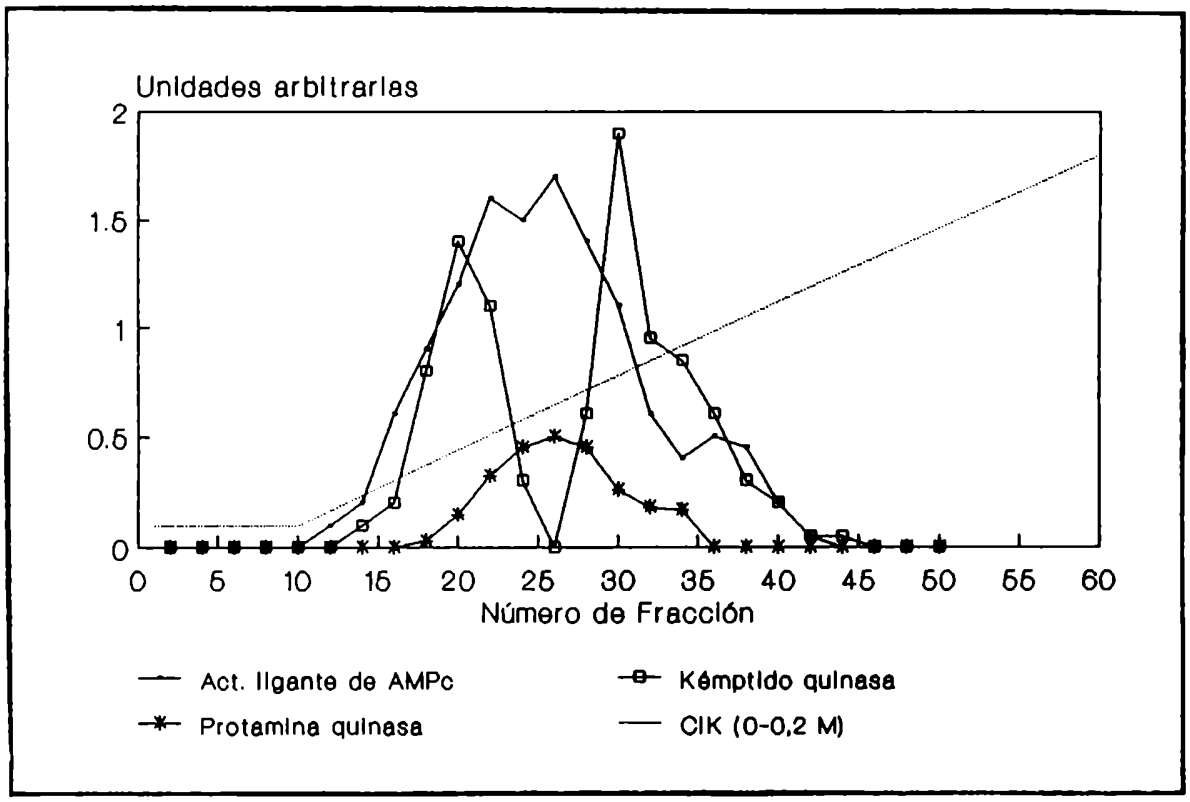


Figura D: Análisis cromatográfico de extractos solubles de *S. platensis* en columna de DE-52. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad quinasa sobre kémptido y sobre protamina y actividad ligante de AMP cíclico (tomado de Silberstein y col., 1990).

Se llevaron a cabo una serie de estudios a fin de dilucidar la naturaleza de este factor que enmascaraba la actividad fosfotransferasa sobre kémptido y no sobre protamina. Se analizó la posibilidad que se tratase de una fosfatasa que cocromatografiara en DEAE-celulosa junto a la PK A y que tuviera una mayor especificidad para péptidos pequeños. Para ello se incubó fosfokémptido[^{32}P] con alícuotas de las fracciones que no presentaban actividad fosfotransferasa y se ensayó la liberación de fosfato radioactivo por la formación del complejo fosfomolíbdico en medio ácido; se descartó esta posibilidad al no detectarse formación de complejo fosfomolíbdico radioactivo (Silberstein, 1990).

El método de medición de actividad quinasa utilizando kémptido como sustrato se basa en la capacidad que tiene el fosfokémptido[^{32}P], producto de la reacción, de adsorberse cuantitativamente a pH ácido a papel de fosfocelulosa mientras que el ATP[γ^{32}P] es lavado a ese pH. La capacidad del fosfokémptido de unirse a la fosfocelulosa reside en la carga neta positiva (3+) que posee a pH ácido, dada por el amino terminal y los dos residuos arginina. La disminución de la carga neta positiva determina que el producto ya no se adsorba cuantitativamente a la fosfocelulosa. Considerando que la estructura del kémptido (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) presenta un par de residuos arginina contiguos y su extremo N-terminal libre, es posible que una endoproteasa de tipo tripsina (que cliva en el lado carboxi de residuos básicos) o una aminopeptidasa o dipeptidil aminopeptidasa puedan actuar sobre el fosfokémptido generando un fragmento fosforilado cuya carga neta sea menor que 3+ (libre de al menos una arginina) y que por lo tanto no se adsorba sobre papel de fosfocelulosa.

Los productos obtenidos de la incubación de fosfokémptido[^{32}P] con la fracción de DEAE-celulosa que contenía la actividad enmascarante de la fosforilación se analizaron por electroforesis y se observó la formación de productos fosforilados con menor carácter catiónico que el fosfokémptido intacto. Estos resultados permitieron concluir, entonces, que dicha actividad enmascarante se trataba de una potente peptidasa que degradaba al fosfokémptido y muy probablemente también al kémptido (Silberstein, 1990).

A la luz del conocimiento actual sobre la relación que existe entre fosforilación y proteólisis, y dado que el kémptido, como ya se mencionó, representa la secuencia consenso de fosforilación de los sustratos naturales de la PK A, resultaba de mucho interés el estudio de esta potente actividad peptidásica capaz de degradar su fosfoderivado. Por lo cual se propusieron los siguientes **OBJETIVOS:**

- Identificación, aislamiento y caracterización de la actividad hidrolizante de fosfokémptido.

- Estudio de la posible influencia de la fosforilación del sustrato sobre la actividad enzimática.

MATERIALES Y METODOS

1. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

1.1 ORGANISMO Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA

Se utilizó la cepa C-1205 de *S. platensis* aislada y caracterizada por Gamundí y Ranalli (1969).

La cepa se conservó en cajas de Petri conteniendo un disco de papel Whatman N° 1 como fuente de carbono y 10 ml de una solución que contenía 3 g de extracto de levadura y 20 g de agar por litro de agua destilada (medio PF). Debido a la pérdida de fertilidad que presenta este organismo, como toda ascobolácea, con el paso del tiempo y los sucesivos repiques, se llevó a cabo periódicamente el rejuvenecimiento del cultivo de acuerdo al método descripto por Forchiassin (1989). Brevemente, el organismo se cultivó en cajas de Petri conteniendo estiércol tindalizado y al madurar los apotecios las ascosporas se cosecharon colocando a modo de tapa una caja de Petri con agar-agua. La germinación de las ascosporas se indujo por tratamiento alcalino en las cajas de agar-agua, luego se incubaron a 37°C durante 48-72 horas hasta la aparición de las hifas que se transfirieron a picos de flauta con medio PF.

1.2 CULTIVOS

1.2.1 CULTIVOS PARA PREPARACION DE ENZIMAS

El micelio utilizado en el trabajo se cultivó en frascos Erlenmeyer de 4 litros que contenían 2 litros de medio sintético con glucosa y asparragina como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente (Groisman et al., 1981) (medio A). El inóculo consistió en tarugos de agar-micelio sacados de las cajas de Petri con medio PF. El organismo se cultivó aeróbicamente en presencia de luz y con agitación contínua (200 rpm), a 24°C durante 4-5 días. El micelio se cosechó por filtración al vacío, se lavó con abundante agua destilada fría, se molió en mortero de porcelana con nitrógeno líquido y se guardó a -70°C hasta el momento de ser usado.

1.2.2 CULTIVOS PARA MARCACION *IN VIVO* DE PROTEINAS

Cuando se llevó a cabo la marcación con leucina[^{3}H] de las proteínas del hongo, el micelio se cultivó en el mismo medio sintético excepto que la asparragina (4 g/litro) fue reemplazada por urea (1,5 g/litro) (medio B).

2. PURIFICACION DE ENZIMAS

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4-8°C, a menos que se indique expresamente otra temperatura.

2.1 PREPARACION DE EXTRACTOS SOLUBLES

El polvo de micelio se suspendió en el buffer de homogeneización que se especifica en cada caso, a una relación de 3 ml de buffer/g de micelio. La suspensión se homogeneizó con un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (20.000 rpm, 3-4 golpes de 5 segundos cada uno). El homogenado, luego de 45 minutos de agitación con barra magnética, se centrifugó a 3.000 x g por 15 minutos. El sobrenadante (extracto crudo) se recentrifugó a 100.000 x g durante 60 minutos y a la fracción sobrenadante (extracto soluble) se la llamó S-100.

2.2 PURIFICACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

2.2.1 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-SEPHACEL

A partir de 200 g de polvo de micelio se prepararon 680 ml de fracción S-100 en buffer Tris-ClH 20 mM pH 8 (buffer A), como se indica en la sección precedente. La fracción S-100 (1.800 mg de proteína) se sembró en una columna de DEAE-Sephacel (2,5 x 40 cm) equilibrada en buffer A. La columna se lavó con 400 ml de buffer A y las proteínas unidas a la columna se eluyeron con 2 litros de un gradiente lineal 0-0.4 M ClK preparado en buffer A, a un flujo aproximado de 160 ml/hora. Se recogieron fracciones de 20 ml y se midió actividad aminopeptidasa y contenido de proteínas en alícuotas apropiadas de cada fracción. Aquellas fracciones que presentaron actividad peptidásica sobre el fosfokémptido[^{32}P] se concentraron por precipitación con sulfato de amonio al 80 % de saturación y el pellet se resuspendió en 20 ml de buffer A. La solución, luego de una diálisis de 4 horas contra 4 litros de sulfato de amonio 1 M preparado en buffer A, se clarificó por centrifugación a 20.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante constituyó la fracción DEAE.

2.2.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FENIL-SEPHAROSA

La fracción DEAE se sembró en una columna de fenil-Sepharosa CL-4B (1,2 x 10 cm) equilibrada en buffer A 1 M sulfato de amonio. La cromatografía se desarrolló con un gradiente lineal 1-0 M sulfato de amonio en buffer A (volumen total de gradiente: 110 ml) a un flujo de 20 ml/hora. Se recogieron fracciones de 1,1 ml y se midió actividad peptidásica y contenido de proteínas en alícuotas apropiadas de cada fracción. Las

fracciones que presentaron actividad se dializaron contra buffer A y se concentraron hasta 1 ml en un Centriprep-10 (fracción fenil-Sepharosa).

2.2.3 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-300

La fracción fenil-Sepharosa, previo agregado de ClK y glicerol hasta una concentración final de 50 mM y 20 % (v/v) respectivamente, se cromatografió en una columna de Sephacryl S-300 (1,2 x 80 cm) equilibrada en buffer A conteniendo ClK 50 mM y glicerol 20 % (v/v) y desarrollada en el mismo buffer a un flujo de 11 ml/hora. Se recogieron fracciones de 0,9 ml y se midió actividad peptidásica y contenido de proteínas en alícuotas apropiadas de cada fracción. Las fracciones que exhibieron actividad enzimática se concentraron con un Minicom B-15 hasta 0,5 ml (fracción Sephacryl S-300). Este material se utilizó para la determinación de los parámetros hidrodinámicos.

2.2.4 ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS

El último paso de purificación se llevó a cabo por electroforesis en geles nativos cilíndricos (0,7 x 13 cm) de poliacrilamida al 6% (Davis, 1964). Los geles fueron precorridos en buffer Tris-ClH 100 mM pH 8,8 durante 45 minutos a 4 mA/gel, despues de al menos 8 horas de haber sido armados. 200-250 µg de proteína correspondientes a la fracción Sephacryl S-300 se sembraron en cada gel cilíndrico. La electroforesis se desarrolló a 1 mA/gel hasta que la muestra sembrada ingresó en el gel y luego se continuó a 4 mA/gel durante 3 horas. Finalizada la electroforesis, los geles se cortaron en rodajas de 2 mm de espesor y se incubó cada una con 300 µl de buffer A glicerol 20 % durante 10 minutos a 30° C. Se midió actividad aminopeptidasa en una alícuota de cada fracción y se guardaron los sobrenadantes de las fracciones que contenían actividad enzimática. Las rodajas de gel correspondientes, previamente cortadas y empaquetadas dentro de un tubo, se polimerizaron con cantidad suficiente de poliacrilamida al 6%. La enzima fue electroeluída dentro de una bolsita de diálisis unida al fondo del tubo a 4 mA durante 1 hora. Finalizada la electroelución, se invirtió la polaridad del campo eléctrico durante 5 minutos. La proteína electroeluída, previo agregado de los sobrenadantes, se dializó contra buffer A y se concentró hasta 200 µl en un concentrador Minicon B-15. La solución, conteniendo 20 % glicerol, se guardó en alícuotas de 20 µl a -20°C. En estas condiciones la actividad fue estable al menos durante dos meses.

2.3 PURIFICACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA

2.3.1 PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

A partir de 47 g de polvo de micelio se obtuvieron 155 ml de extracto soluble (fracción S-100) (1,8 mg de proteína/ml de extracto) en buffer Tris-ClH 30 mM pH 7,2 DTT 1 mM (buffer B) como se indica en la sección correspondiente. Se agregó sulfato de amonio sólido hasta el 55% de saturación, manteniendo el pH de la solución alrededor de 7 con el agregado de amoníaco concentrado. Después de 2 horas de agitación las proteínas precipitadas se sedimentaron por centrifugación a 30.000 x g durante 30 minutos y con el sobrenadante (fracción S-55%) se continuó la purificación.

2.3.2 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE FENIL-SEPHAROSA

La fracción S-55% se diluyó hasta una concentración 1 M de sulfato de amonio con el agregado de buffer B y se sembró en una columna (1,6 x 10 cm) de 20 ml de fenil-Sepharosa CL-4B equilibrada en buffer B 1 M sulfato de amonio. Las proteínas unidas se eluyeron con dos gradientes sucesivos. Primero, con 50 ml de un gradiente lineal 1-0 M sulfato de amonio y luego con 200 ml de un gradiente lineal 0-15 % etilenglicol, ambos en buffer B. Se recogieron fracciones de 2 ml a un flujo de 30 ml/hora y aquellas fracciones que presentaron mayor actividad enzimática (eluídas en el gradiente de etilenglicol) se juntaron y constituyeron la fracción fenil-Sepharosa.

2.3.3 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE DEAE-SEPHACEL

La fracción fenil-Sepharosa se sembró en una columna (1,2 x 6 cm) de 6 ml de DEAE-Sephacel equilibrada en buffer B. Se lavó la columna con 15 ml del mismo buffer y las proteínas unidas se eluyeron con 60 ml de un gradiente lineal 0-125 mM ClNa. Se recogieron fracciones de 0,6 ml a un flujo de 10 ml/hora. Aquellas fracciones que presentaron mayor actividad enzimática (pico I) se juntaron en un pool (fracción DEAE) y se concentraron hasta un volumen de 2 ml utilizando un concentrador Centriprep P-10.

2.3.4 CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-200 HR

La fracción DEAE (2 ml) se sembró en una columna (2,5 x 50 cm) de 235 ml de Sephacryl S-200 HR equilibrada en buffer B 150 mM ClNa. La columna se desarrolló con el mismo buffer a un flujo de 20 ml/hora y se recogieron fracciones de 2,35 ml. Las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática se juntaron en un pool (fracción Sephacryl), se concentraron con un minicon B-15 hasta un volumen de 500 µl. Se agregó glicerol hasta una

concentración del 30 % y se guardó en alícuotas de 100 µl a -20°C. Esta fracción fue utilizada en los experimentos de caracterización.

3. ENSAYOS ENZIMATICOS

3.1 MEDICION DE ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA POR HIDROLISIS DE FOSFOKEMPTIDO[^{32}P]

Se midió actividad aminopeptidasa utilizando fosfokémptido[^{32}P] como sustrato en una mezcla de reacción que contenía buffer bis-Tris-propano ClH 50 mM pH 7,4; fosfokémptido[^{32}P] 40 µM (100-400 cpm/pmol) y la enzima en un volumen final de 50 µl. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 15 minutos a 30°C y la reacción se detuvo con el agregado de 20 µl de ácido fosfórico 75 mM. 50 µl de la mezcla de reacción se sembraron sobre papel de fosfocelulosa de 1 x 1 cm, los cuales fueron lavados por inmersión en ácido fosfórico 75 mM tres veces consecutivas agitando suavemente durante diez minutos cada vez y una última vez con etanol 96 %. Los papeles de fosfocelulosa se secaron con corriente de aire caliente y la radioactividad de los mismos se determinó usando solución centelladora de tolueno. En todos los casos las mediciones de actividad enzimática se realizaron en condiciones de linealidad con el tiempo y la concentración de enzima. Una miliunidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de fosfokémptido[^{32}P] por minuto a 30°C.

3.2 MEDICION DE ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA POR HIDROLISIS DE AMINOACIDOS-P-NITROANILIDA

Todos los aminoácidos cromogénicos fueron disueltos en dimetilsulfóxido a una concentración 100 mM y guardados en oscuridad a -20°C. En estas condiciones las soluciones stock de sustratos fueron estables al menos por dos meses.

Se midió actividad aminopeptidásica utilizando aminoácidos p-NA como sustratos en una mezcla de reacción que contenía buffer Tris-ClH 30 mM pH 7,4; aminoácido-p-NA 1 mM y la enzima en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició con el agregado de sustrato y se incubó a 30°C entre 15 y 60 minutos según la actividad presente en la preparación enzimática. Se detuvo la reacción con el agregado de 0,1 ml de ácido acético 1 M. La cantidad de p-nitroanilina liberada se determinó colorimétricamente a 405 nm en un colorímetro Coleman 35. Los cálculos de actividad se realizaron usando un coeficiente de absorción molar para la p-nitroanilida a 405 nm de 9.500 litros/moles x cm. Una miliunidad enzimática se definió como la

cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 nmol de p-nitroanilina por minuto a 30°C.

4. PREPARACION DE FOSFOPEPTIDOS[^{3}H/^{32}P] ENDOGENOS

4.1 MARCACION *IN VIVO* DE PROTEINAS CON LEUCINA[^{3}H]

Un cultivo del hongo en fase exponencial de crecimiento (2 mg de peso húmedo/ml) en medio B se incubó con leucina[^{3}H] (5 µM final; 1 µCi/ml) por dos o tres generaciones. El micelio se cosechó por filtración al vacío, se lavó con 5 mM de leucina fría, se molió en mortero de porcelana con nitrógeno líquido y se guardó a -70°C hasta su uso.

4.2 CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHACEL DE EXTRACTOS SOLUBLES Y DETECCION DE SUSTRATOS ENDOGENOS DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP CICLICO

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4-8°C. 5 g de polvo de micelio, con el agregado de 15 ml de buffer Tris-ClH 20 mM pH 8, DTT 2 mM se homogeneizó con un homogeneizador Ultra-Turrax T- 25 (20.000 rpm, 4 veces por 5 segundos). El homogenado se mantuvo con agitación durante 45 minutos y luego se centrifugó a 100.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante de 100.000 x g (1.750 dpm/µg) se sembró en una columna de DEAE-celulosa (1,2 x 5 cm) equilibrada en buffer Tris-ClH 20 mM pH 8, DTT 2 mM a razón de 9 mg de proteína por ml de resina. Se lavó la columna con 10 ml del mismo buffer y se desarrolló con 50 ml de un gradiente lineal 0-0.4 M ClK hecho en buffer Tris-ClH 20 mM pH 8, DTT 2 mM. Se recogieron fracciones de 0,6 ml y en alícuotas apropiadas de las mismas se midió radioactividad de [^{3}H] como medida del contenido proteico y se ensayó fosforilación de proteínas utilizando subunidad catalítica de la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (PK A) purificada a partir de corazón bovino y ATP[γ^{32}P] como dador de fosfato como se indica en el parágrafo siguiente. Las fracciones que exhibieron la relación [^{32}P]/[^{3}H] más alta se juntaron, se concentraron hasta 2 ml con un Centriprep-10 y se dializaron contra buffer Tris-ClH 20 mM pH 8, DTT 2 mM.

4.3 ENSAYO DE FOSFORILACION DE PROTEINAS

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 50 µl buffer Tris-ClH 25 mM pH 7,5, Cl_2Mg 10 mM, DTT 1 mM, ATP[γ^{32}P] 0,1 mM (100-200 cpm/pmol), 40 unidades/ml de subunidad catalítica de la PK A y 10 µl de cada una de las fracciones de DEAE-celulosa. Después de 15 minutos de incubación a 30°C, 40 µl de la mezcla de reacción se sembraron sobre papel de fosfocelulosa de 1 x 1 cm, los cuales fueron lavados por inmersión en

ácido fosfórico 75 mM tres veces consecutivas agitando suavemente durante diez minutos cada vez y una última vez con etanol 96 %. Los papeles de fosfocelulosa se secaron con corriente de aire caliente y la radioactividad de [^{3}H] y [^{32}P] adsorbida a los mismos se determinó usando solución centelladora de tolueno, en un contador de centelleo líquido Rack Beta 1428.

4.4 PREPARACION DE FOSFOPROTEINAS[^{32}P]

Los sustratos endógenos de la PK A (1,8 mg) fueron fosforilados en condiciones idénticas al ensayo de fosforilación de proteínas salvo que el volumen de incubación fué de 3,5 ml conteniendo fosfato de potasio 100 mM pH 7 y FNa 40 mM. Al finalizar el período de incubación de 15 min a 30 °C, la mezcla de reacción, enfriada a 4°C se cromatografió en una columna de Sephadex G-25 (1,2 x 18 cm) equilibrada en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7, FNa 40 mM y desarrollada en el mismo buffer. Las proteínas fosforiladas, que eluyeron en el volumen de exclusión de la columna se concentraron hasta 1 ml con un Centriprep-10.

4.5 GENERACION Y AISLAMIENTO DE FOSFOPEPTIDOS[$^{3}H/^{32}P$]

Las fosfoproteínas (1,6 mg) se digirieron con 120 µg de subtilisina durante 1 hora a 30°C en un volumen final de 1,5 ml de buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7. Al término del período de incubación a la mezcla de reacción se agregó ácido tricloroacético hasta una concentración final de 10 % (p/v) y se dejó en reposo durante 6 horas a 4°C. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación y el sobrenadante, previo lavado por cuatro veces sucesivas con éter etílico saturado en agua, se concentró por liofilización. El residuo seco se resuspendió en 740 µl de HCO_3NH_4 100 mM etanol 15 % (v/v) y se analizó por cromatografía en columna de gel P-2, como se detalla en la sección siguiente. Las fracciones eluídas que contenían la relación [^{32}P]/[^{3}H] más alta (ver Figura 14) se juntaron y se concentraron por liofilización. Este material fue utilizado como fuente de fosfopéptidos.

4.6 ANALISIS CROMATOGRAFICO EN COLUMNA DE GEL P-2

Las muestras a analizar, llevadas a una volumen final de 740 µl (HCO_3NH_4 100 mM etanol 15 %) se sembraron en una columna (1 x 47 cm) de gel P-2 equilibrada en HCO_3NH_4 100 mM etanol 15 % (v/v) y desarrollada en el mismo solvente con un flujo lineal de 5 cm/hora. Se recogieron fracciones de 225 µl y en alícuotas apropiadas de cada fracción, previo agregado de 2,5 ml de líquido de centelleo Optiphase ´Hisafe´2, se midió radioactividad de [^{3}H] y

[^{32}P], en un contador de centelleo líquido Rack Beta 1428. La columna fue calibrada con vitamina B_{12} (1350 Da), kémptido (772 Da), S-L (218 Da), leucina[^{3}H] (131 Da), fosfokémptido[^{32}P] (850 Da), A-S(P)-L-G[^{32}P] (424 Da), fosfoserina (183 Da) y fosfato inorgánico[^{32}P] (96 Da).

5. OTRAS TECNICAS

5.1 DOSAJE DE PROTEINAS

La proteína se valoró por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

5.2 SINTESIS DE FOSFOKEMPTIDO[^{32}P]

El kémptido fue fosforilado en una mezcla de reacción que contenía ATP[γ^{32}P] 250 µM (50-400 cpm/pmol); buffer Tris-ClH 50 mM pH 7,4; Cl_2Mg 10 mM; β-mercaptoetanol 2 mM; 650 unidades de subunidad catalítica de la PK A y kémptido 100 µM en un volumen final de 5 ml. Después de 1 hora de incubación a 30°C la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 3 minutos. El ATP[γ^{32}P] remanente se separó por cromatografía de intercambio iónico. La mezcla de reacción se hizo 10 mM en ácido acético y se sembró en una columna de 3 ml de AG 1 X 8 equilibrada en ácido acético 10 mM. El ATP[γ^{32}P] quedó retenido en la columna y el fosfokémptido[^{32}P] se eluyó con la misma solución de equilibrio siendo su recuperación cuantitativa. Se eliminó el ácido acético del eluído por evaporación a presión reducida y lavados sucesivos con agua destilada. La radioactividad específica del [^{32}P] incorporado al kémptido se considera igual a la del ATP[γ^{32}P] utilizado. La fosforilación varió entre el 90 y el 100 %.

Para la realización de experimentos cinéticos, se separó el fosfokémptido de las trazas de kémptido sin fosforilar por cromatografía de intercambio iónico. El fosfokémptido disuelto en acetato de amonio 10 mM pH 9, se sembró en una columna de 1 ml de AG 1 X 8 equilibrada en el mismo solvente. En estas condiciones el kémptido no se unió a la resina. La columna se lavó con 10 ml de acetato de amonio 10 mM pH 9 y el fosfokémptido se eluyó con ácido acético 10 mM. Se eliminó el ácido acético del eluído por evaporación a presión reducida y lavados sucesivos con agua destilada.

5.3 PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL FOSFOKEMPTIDO[^{32}P]

La mezcla de reacción contenía buffer Tris-ClH 50 mM pH 7,4, fosfokémptido[^{32}P] 40 µM (80-100 cpm/pmol) y 6 munidades de Alanina aminopeptidasa en un volumen final de 3,5 ml. Después de 30 minutos de incubación a 30°C la reacción se detuvo por el agregado de 1,5 ml de ácido

acético glacial y la mezcla se sembró en una columna de 2 ml de fosfocelulosa equilibrada en ácido acético 30 % (v/v). Los productos de la degradación enzimática del fosfokémptido[^{32}P] percolaron con 3 ml de ácido acético 30 % (v/v), mientras que el fosfokémptido[^{32}P] intacto y el primer producto, libre de la leucina N-terminal permanecieron unidos a la columna. Se removió el ácido acético del percolado por evaporación a presión reducida y sucesivos lavados con agua destilada. El residuo seco obtenido se disolvió en 100 µl de de acetato de amonio 20 mM pH 6,8 y se sembró en una columna de 1 ml de resina AG 1X8 equilibrada con la misma solución. La columna se lavó sucesivamente con 3 ml de acetato de amonio 20 mM, 200 mM y 700 mM. Las fracciones eluídas a cada concentración de sal se concentraron cada una por separado y alícuotas de las mismas se analizaron por electroforesis en placa de microcelulosa. El producto principal, que eluyó con acetato de amonio 700 mM, fue analizado para determinar la composición de aminoácidos.

5.4 PURIFICACION DE LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE AMP CICLICO DE CORAZON BOVINO

Se siguió el método de Reimann y Beham (1983). Brevemente, 80 g de corazón bovino, cortado en trozos pequeños y desgrasado, se homogeneizó con 160 ml de buffer fosfato de sodio 10 mM pH 6,8 conteniendo β-mercaptoetanol 15 mM y EDTA 1 mM, con cinco pulsos de Omni-Mixer a máxima velocidad durante 1 minuto y a intervalos de 5 minutos. El homogenado se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante, previamente filtrado a través de gasa y lana de vidrio, se mezcló con 80 ml de DEAE-celulosa equilibrada en buffer fosfato de sodio 55 mM pH 6,8 y se matuvo con agitación suave durante 30 minutos. La resina de intercambio se recuperó por filtración y se lavó dos veces con 500 ml de buffer fosfato de sodio 55 mM β-mercaptoetanol 15 mM EDTA 1 mM. Después de la última filtración, la resina se resuspendió y se empaquetó en una columna (2,5 x 20 cm) con cantidad suficiente de buffer fosfato de sodio 45 mM pH 6,8; se lavó con 40 ml de buffer fosfato de sodio 45 mM pH 6,8 AMP cíclico 50 µM y se descartó el percolado. La subunidad catalítica, disociada por acción del AMP cíclico, se eluyó con el agregado de 220 ml de buffer fosfato de sodio 45 mM pH 6,8 y se recogió directamente sobre una columna de hidroxil-apatita (1,2 x 2 cm) equilibrada en buffer fosfato de sodio 45 mM pH 6,8. La cromatografía en columna de hidroxil-apatita se desarrolló con un gradiente 45-500 mM fosfato de sodio pH 6,8 (volumen total de gradiente: 25 ml) y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Aquellas fracciones que presentaron actividad fosforilante de kémptido se concentraron hasta 3 ml con un

Centriprep-10 y se agregó sacarosa hasta el 20 % (p/v). Se guardó a -20°C en alícuotas de 0,3 ml.

5.5 CROMATOGRAFIA EN PLACA DELGADA DE MICROCELULOSA

Se llevaron a cabo cromatografías ascendentes de aminoácidos sobre placa delgada de microcelulosa utilizando como solvente piridina:dioxano:hidróxido de amonio:agua (35:35:15:15). Los aminoácidos fueron revelados con ninhidrina (0,25 % p/v en acetona) seguido de calentamiento.

5.6 ELECTROFORESIS EN PLACA DELGADA DE MICROCELULOSA

Se llevaron a cabo electroforesis sobre placas de microcelulosa a pH 3,5 en piridina:ácido acético:agua (10:100:890) por 2 horas a 300 V en heladera. La radioactividad se reveló por autoradiografía y la fosfoserina se reveló con ninhidrina.

5.7 ANALISIS DE AMINOACIDOS

La composición de aminoácidos del producto principal de la degradación enzimática del fosfokémptido[^{32}P] se determinó en un analizador de aminoácidos Beckman 119 CL después de la hidrólisis de la muestra en ClH 6 N durante 24 horas a 110°C.

5.8 SECUENCIACION DE PEPTIDOS

La secuencia N-terminal de los péptidos remanentes después de tres rondas sucesivas de digestión con la Alanina aminopeptidasa se llevó a cabo por el método de Edman (1950) en un secuenciador Applied Biosystems modelo 477A.

5.9 HIDROLISIS DE PROTEINAS[^{3}H]

Se hidrolizó una alícuota de las proteínas solubles del hongo, marcadas *in vivo* con leucina[^{3}H], con ClH 6 N a 110°C durante 24 horas. El hidrolizado, concentrado hasta sequedad y lavado dos veces con agua destilada, se resuspendió en 0,1 ml de agua y una alícuota se analizó por cromatografía ascedente en placa de microcelulosa.

5.10 DETERMINACION DE LAS PROTEINAS Y PEPTIDOS MARCADORES

Catalasa: se midió la actividad enzimática valorando el sustrato consumido (H_2O_2) con solución de IK de acuerdo al método de Terenzi y col.(1971).

Citocromo C: Se valoró midiendo la absorbancia a 410 nm.

Peroxidasa: Se siguió la técnica descripta en el manual de Worthington (1972) midiendo el color desarrollado por la oxidación de la o-dianisidina luego de la descomposición enzimática del H_2O_2.

Seroalbúmina bovina: se valoró midiendo la absorvancia a 280 nm

Mioglobina: se valoró midiendo la absorbancia a 410 nm.

El fosfokémptido[^{32}P], el fragmento Ala-Ser(P)-Leu-Gly[^{32}P], el Pi[^{32}P] y la leucina[^{3}H] se valoraron midiendo la radioactividad.

El kémptido se valoró por su capacidad aceptora de fosfato, en condiciones esencialmente similares a las descriptas en el acápite 5.2. Previo al ensayo de fosforilación, las fracciones cromatográficas se liofilizaron a fin de eliminar el etanol y el HCO_3NH_4 presente en las fracciones.

La fosfoserina y el dipéptido Ser-Leu, previa liofilización de las fracciones cromatográficas, se valoraron por la reacción con ninhidrina en medio líquido.

5.11 MEDICION DE LA RADIOACTIVIDAD

Para el contaje de las muestras radioactivas se utilizó un contador de centelleo líquido Rack Beta 1428. Cuando se midió radiación de [^{32}P] adsorbida a papel de fosfocelulosa se utilizó solución centelladora de tolueno (0,1 g de dimetil POPOP y 4 g de PPO por litro de tolueno). Cuando se midió radiación de [^{3}H] y [^{32}P] en solución acuosa se utilizó líquido de centelleo OptiPhase ´Hisafe´ 2. En ambos casos la medición se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante.

6. MATERIALES

El ATP[γ^{32}P], la L-leucina[^{3}H-4,5] y el ácido ortofosfórico[^{32}P] se obtuvieron de New England Nuclear.

Los siguientes reactivos y materiales fueron provistos por Sigma Chemical Co.: los inhibidores de proteasas, los aminoácidos y péptidos cromogénicos, las placas cromatográficas de microcelulosa, la fosfatasa alcalina (mucosa intestinal bovina), la subtilisina (Tipo VIII), los L-aminoácidos y la fosfoserina, las proteínas marcadoras para los estudios hidrodinámicos y las electroforesis en poliacrilamida, el DEAE-Sephacel, el Sephacryl S-200 HR, y la fosfocelulosa.

El Sephacryl S-300, el Sephadex G-25 y la fenil-Sepharosa CL-4B fueron de Pharmacia. El papel de fosfocelulosa P-81 y la DEAE-celulosa (DE-52) se obtuvieron de Whatman; las placas radiográficas (Curix-RP1) fueron de Agfa Gevaert. La resina AG 1X8, el Bio-Gel P-2 extra fino y los reactivos de grado electroforético fueron de Bio-Rad. El kémptido se obtuvo de

Peninsula, Inc. La solución de centelleo OptiPhase ´Hisafe´2 se obtuvo de Fisons Chemicals.

El resto de los reactivos utilizados fue de grado analítico.

RESULTADOS

SECCION A: IDENTIFICACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

Como se señaló en la Introducción, trabajos previos del laboratorio pusieron en evidencia la existencia de una potente actividad peptidásica presente en extractos solubles del hongo *S. platensis*. Dicha actividad se detectó por primera vez por su interferencia en el ensayo de medición de la actividad quinasa de la PK A, cuando se utilizaba kémptido como sustrato aceptor de fosfato. Esta peptidasa era capaz de hidrolizar al fosfokémptido generando un fragmento fosforilado de menor carácter catiónico que el fosfokémptido intacto y por lo cual no se adsorbía a papel de fosfocelulosa (Silberstein, 1990).

Dada la estructura del fosfokémptido, Leu-Arg-Arg-Ala-Ser(P)-Leu-Gly, la actividad peptidásica capaz de degradarlo podía ser una endoproteasa de tipo tripsina (con especificidad por residuos básicos) que clivase al péptido entre los residuos arginina o entre el residuo arginina y el alanina; en ambos casos el producto fosforilado generado tendría menor carácter catiónico. Otra posibilidad, dado que el fosfokémptido posee su extremo amino libre, es que se tratase de una aminopeptidasa o de una dipeptidil aminopeptidasa de amplia especificidad, capaz de atacarlo secuencialmente llevando a la formación de un producto fosforilado carente, al menos, de una de las argininas.

A fin de identificar la naturaleza de la actividad responsable de la degradación del fosfokémptido se realizaron una serie de estudios preliminares utilizando como fuente de enzima una preparación parcialmente purificada de esta actividad (DEAE-Sephacel y Sephacryl S-300). Cabe señalar que esta actividad hidrolizante del fosfokémptido eluyó en ambos sistemas cromatográficos como un único pico simétrico.

Como se observa en la Figura 1, la incubación durante ocho minutos del fosfokémptido[^{32}P] con la preparación enzimática resultó en la formación de dos productos radioactivos de menor carácter catiónico (calle 2, banda **a** y **b**). A mayor tiempo de incubación (12 minutos; calle 3) se observa una disminución de la cantidad de producto correspondiente a la banda **a** y el aumento concomitante de la cantidad de producto de la banda **b**. A veinticinco minutos de incubación sólo se detecta el producto correspondiente a la banda **b** (calle 4). Este resultado indica que el fosfokémptido[^{32}P] fue hidrolizado por esta actividad y que durante la hidrólisis se formó al menos un producto intermediario que fue degradado por la enzima llevando a la acumulación de un único producto final. Como se

observa (calle 1 y calle 4), la movilidad electroforética de este producto final fue distinta a la movilidad del estándar de fosfoserina.

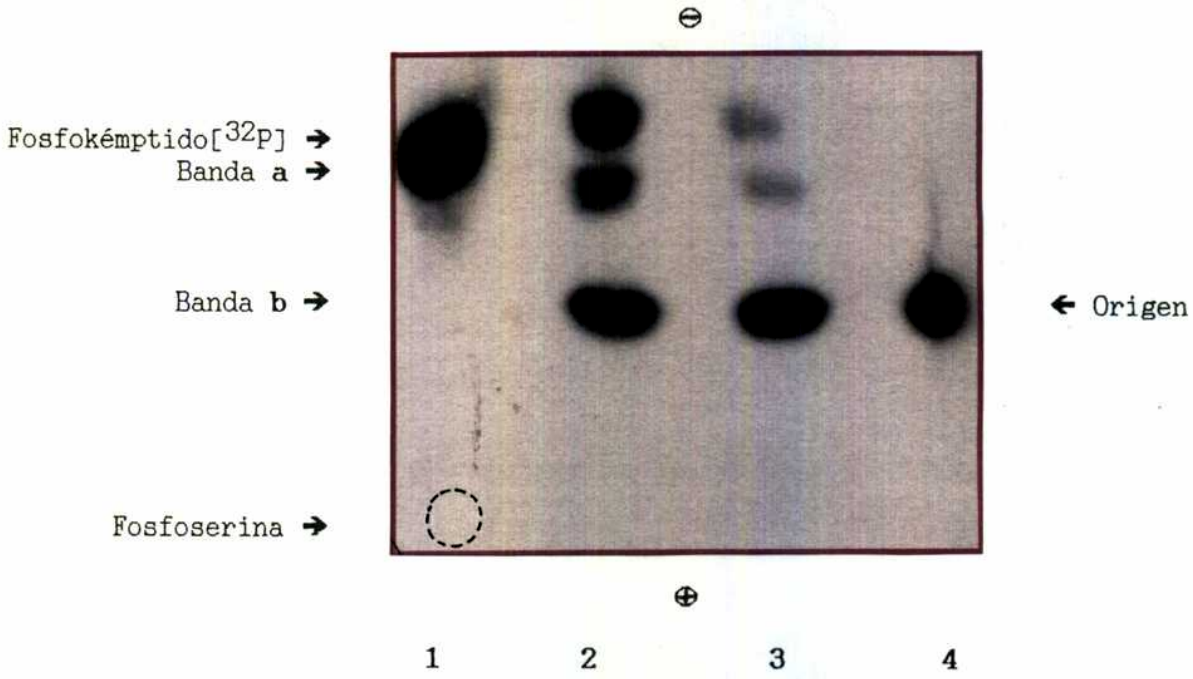


Figura 1: Análisis electroforético de los productos de degradación del fosfokémptido[^{32}P] en función del tiempo de incubación con la enzima de *S. platensis*. 4 nmoles de fosfokémptido[^{32}P] se incubaron a 30°C con 0,3 munidades de enzima parcialmente purificada en un volumen final de 100 µl. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 15 µl y previo calentamiento a 95° C por 3 minutos, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. Las fracciones sobrenadantes se sembraron en una placa de microcelulosa y se llevó a cabo la electroforesis como se indica en Materiales y Métodos. Calle 1: estándar de fosfokémptido[^{32}P] y fosfoserina. Calles 2-4: 8, 12, y 25 minutos de incubación respectivamente. Los productos radioactivos se revelaron por autoradiografía. La fosfoserina se reveló con reactivo de ninhidrina.

Se analizaron por cromatografía ascedente en placa de microcelulosa los productos de la hidrólisis enzimática del kémptido no fosforilado. Como se observa en la Figura 2, la enzima del hongo fue capaz de hidrolizar completamente al kémptido, hasta sus aminoácidos constituyentes. Este resultado permite descartar la posibilidad de que la enzima se trate de una endoproteasa o de una dipeptidil aminopeptidasa. Sin embargo, dado que la preparación enzimática utilizada era una fracción parcialmente purificada, no puede tampoco descartarse la posibilidad de que en ella coexistieran dos o más actividades, que en conjunto llevaran a la hidrólisis total del

kémptido. Cuando se analizó la cinética de hidrólisis de este péptido (ver Figura 9, *Sección C*) con la enzima purificada se observó que los aminoácidos era clivados uno a uno desde el extremo N-terminal del sustrato.

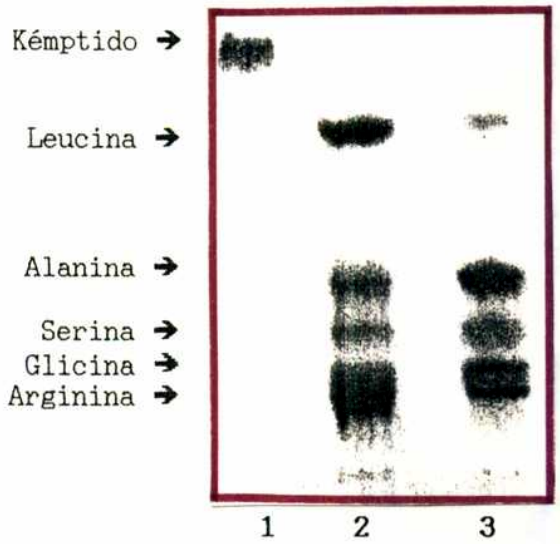


Figura 2: Análisis cromatográfico de los productos de degradación del kémptido por la enzima de *S. platensis*. 90 nmoles de kémptido se incubaron a 30°C con 4 munidades de enzima parcialmente purificada durante 40 minutos en un volumen final de 20 µl. Finalizado el período de incubación, se calentó la mezcla de reacción a 95°C por 3 minutos, y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Una alícuota de 6 µl de la fracción sobrenadante se sembró en una placa de microcelulosa y se llevó a cabo una cromatografía ascendente como se indica en Materiales y Métodos. Calle 1: estándar de kémptido. Calle 2: incubado. Calle 3: estándar de aminoácidos. La placa fue revelada con reactivo de ninhidrina.

A fin de confirmar el carácter de aminopeptidasa de la enzima en estudio se ensayó actividad hidrolítica sobre péptidos y aminoácidos cromogénicos. Cuando se utilizaron péptidos cromogénicos con su extremo amino bloqueado (Cbz-Gly-Gly-Leu-pNA; Bz-Phe-Val-Arg-pNA y Bz-Pro-Phe-Arg-pNA) no pudo detectarse actividad hidrolítica alguna. En cambio, sí se pudo medir actividad hidrolítica cuando se utilizaron aminoácidos cromogénicos como sustrato (Ala-pNA; Leu-pNA; Arg-pNA entre otros) siendo el Ala-pNA el derivado cromogénico clivado con mayor eficacia.

La enzima exhibió requerimiento del extremo amino libre del sustrato, ya que no se detectó hidrólisis del N-acetil derivado de Ala-pNA.

Se estudió el efecto de la bestatina, conocido inhibidor de aminopeptidasas, sobre la actividad de la enzima. Se observó una fuerte inhibición de su actividad (90 %) en presencia de 10 µM bestatina cuando se ensayó sobre fosfokémptido[^{32}P] o Ala-pNA.

De estos resultados se pudo concluir que la actividad detectada y aislada por su capacidad de degradar al fosfokémptido[^{32}P] se trataba de una aminopeptidasa que degradaba también al kémptido sin fosforilar.

Además, estos experimentos preliminares pusieron en evidencia un hecho muy interesante. Mientras el kémptido fue degradado completamente hasta aminoácidos libres por la enzima parcialmente purificada, la hidrólisis del fosfokémptido pareció no ser total, ya que durante la incubación con la enzima se acumulaba un producto fosforilado cuya movilidad electroforética fue distinta a la de la fosfoserina.

Resultados similares a los descriptos se obtuvieron con la enzima purificada a homogeneidad (ver *Sección C*).

SECCION B: ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN EXTRACTOS SOLUBLES DE S. PLATENSIS

En una etapa preliminar de este trabajo se investigó el perfil de actividades aminopeptidásicas presentes en extractos solubles de *S. platensis*, utilizando como sustratos nueve aminoácidos cromogénicos. Como puede observarse en la Tabla I, se midió actividad aminopeptidasa a pH 7,2 sobre los nueve sustratos utilizados siendo las más altas las determinadas sobre Ala-pNA, Leu-pNA, Met-pNA y Lys-pNA.

TABLA I

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN EXTRACTOS SOLUBLES DE *S. platensis* [a].

Sustrato (1 mM)	Actividad específica [b] mU/mg
Ala-pNA	123.2
Leu-pNA	101.6
Met-pNA	70.2
Lys-pNA	54
Arg-pNA	37
Phe-pNA	27.1
Glu-pNA	17.5
Pro-pNA	16.8
Gly-pNA	2.4

[a] El extracto soluble de *S. platensis* de preparó como se indica en Materiales y Métodos, excepto que el buffer de homogenización utilizado fue 30 mM Tris-ClH pH 7,2 1mM DTT.

[b] Se midió actividad aminopeptidasa como se indica en Materiales y Métodos. Se utilizaron entre 30 y 120 µg de proteína por ensayo.

Asimismo se determinó actividad aminopeptidásica utilizando fosfokémptido[^{32}P] como sustrato en presencia de 50 mM FNa y 30 mM fosfato a fin de inhibir fosfatasas presentes en extractos solubles del hongo. La actividad específica calculada fue 3 mU/mg de proteína.

A fin de avanzar en el conocimiento de las aminopeptidasas presentes en extractos solubles del hongo, se fraccionaron las proteínas solubles por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-Sephacel y se ensayó

actividad aminopeptidasa sobre el fosfokémptido[^{32}P] y los nueve aminoácidos cromogénicos. El perfil de elución con gradiente salino (0 a 1 M ClNa) de las actividades aminopeptidásicas reveló que la totalidad de las actividades se recuperaron en el rango 0-250 mM ClNa. No se detectó actividad aminopeptidasa alguna en el percolado y lavado, ni en el rango 250-1000 mM ClNa. Por consiguiente, a fin de obtener una separación más eficiente de las actividades presentes en extractos solubles, las proteínas unidas a la columna de intercambio iónico se eluyeron con un gradiente 0-250 mM ClNa. Cuando se midió actividad sobre los nueve aminoácidos cromogénicos y el fosfokémptido[^{32}P] en las fracciones eluídas, se detectaron tres picos de actividad aminopeptidásica.

Como se observa en la Figura 3, a 50 mM ClNa, eluyó una actividad aminopeptidasa capaz de hidrolizar únicamente Glu-pNA (pico I).

A 100 mM ClNa eluyó una potente actividad que hidrolizó los nueve aminoácidos cromogénicos y el fosfokémptido[^{32}P] (pico II). Como se observa en la figura la campana de elución de la actividad que hidroliza Glu-pNA no acompaña el perfil de actividad hidrolítica sobre los otros aminoácidos cromogénicos. Además, pudo observarse (resultados no mostrados) que la relación de actividad hidrolizante de Glu-pNa con respecto de la actividad hidrolizante de Ala-pNA, que eluyen en la posición del pico II, varió en diferentes preparaciones, mientras que la relación de actividad hidrolizante de otros aminoácidos cromogénicos (v.g. Leu-pNA, Lys-pNA, Met-pNA, etc.) con respecto de la actividad hidrolizante de Ala-pNA siempre se mantuvo constante. Cuando las fracciones correspondientes al pico II (fracciones 43-47) se analizaron por cromatografía en columna de filtración molecular, se observó una separación de actividades; la actividad hidrolizante sobre Glu-pNA eluyó con un Kav distinto del de otra actividad, que fue capaz de hidrolizar el fosfokémptido[^{32}P] y la totalidad de los aminoácidos cromogénicos ensayados excepto Glu-pNA (Figura 4).

Como se detalla en la *Sección E* (Purificación y Caracterización de la Glutámico Aminopeptidasa), el comportamiento cromatográfico en columnas de filtración molecular y columnas de interacción hidrofóbica de la actividad aminopeptidasa sobre Glu-pNA del pico I fue idéntico al de la actividad aminopeptidasa sobre Glu-pNA del pico II. Además cuando se estudió el efecto de distintos inhibidores enzimáticos (Cl_2Hg; p-CMB; bestatina; 1,10-fenantrolina; E-64) sobre ambas actividades se observó que el patrón de sensibilidad fue idéntico. Se desconoce aún si estas dos formas de la enzima existen *in vivo* o si representan artificios generados durante la preparación del extracto. A esta actividad capaz de hidrolizar sólo Glu-pNA se la llamará Glutámico aminopeptidasa.

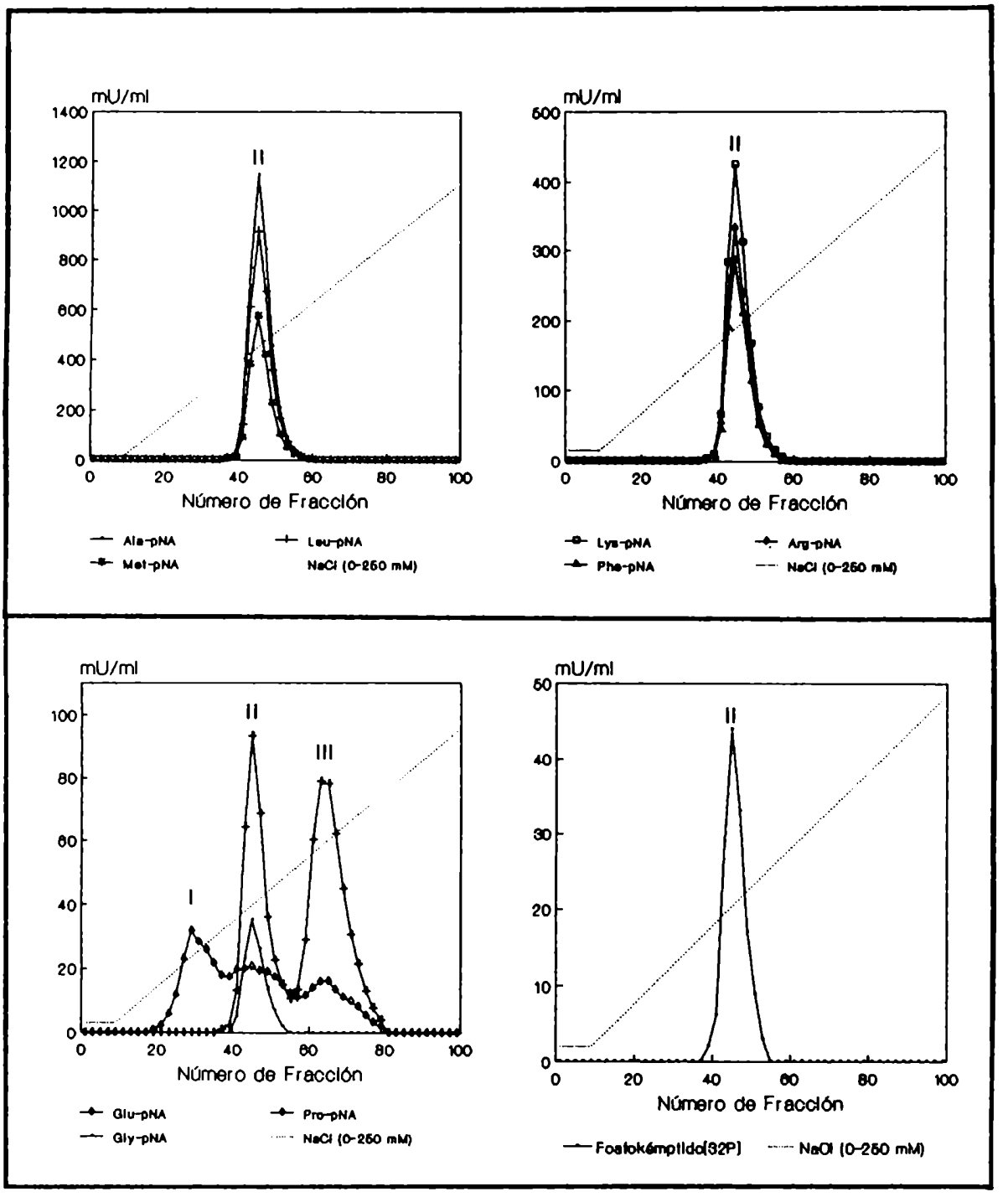


Figura 3: Análisis cromatográfico de aminopeptidasas en columna de DEAE-Sephacel. A partir de 10 g de micelio se obtuvieron 38 ml de extracto soluble (1,7 mg de proteína/ml de extracto) según lo indicado en Materiales y Métodos, excepto que el buffer de homogenización fue 30 mM Tris-ClH pH 7,2 1 mM DTT. El extracto se sembró en una columna (1,2 x 8 cm) de 10 ml de DEAE-Sephacel equilibrada con el buffer de homogenización. Se lavó la columna con 20 ml del mismo buffer y las proteínas unidas se eluyeron con 100 ml de un gradiente lineal 0-250 mM ClNa a un flujo de 12 ml/h. Se recogieron fracciones de 1 ml y en alícuotas apropiadas se midió actividad aminopeptidasa como se detalla en Materiales y Métodos.

Dado que la actividad aminopeptidasa del pico II, que fue separada de la Glutámico aminopeptidasa por filtración molecular (Figura 4), fue capaz de hidrolizar Ala-pNA con mayor eficacia entre una variedad de aminoácidos cromogénicos ensayados, se la llamará Alanina aminopeptidasa.

En la Figura 3 se observa, además, que a 140 mM ClNa eluyó una actividad que hidrolizó sólo Glu-pNa y Pro-pNA (pico III). Aún no se han realizado los estudios necesarios para determinar si se trata de una o más actividades.

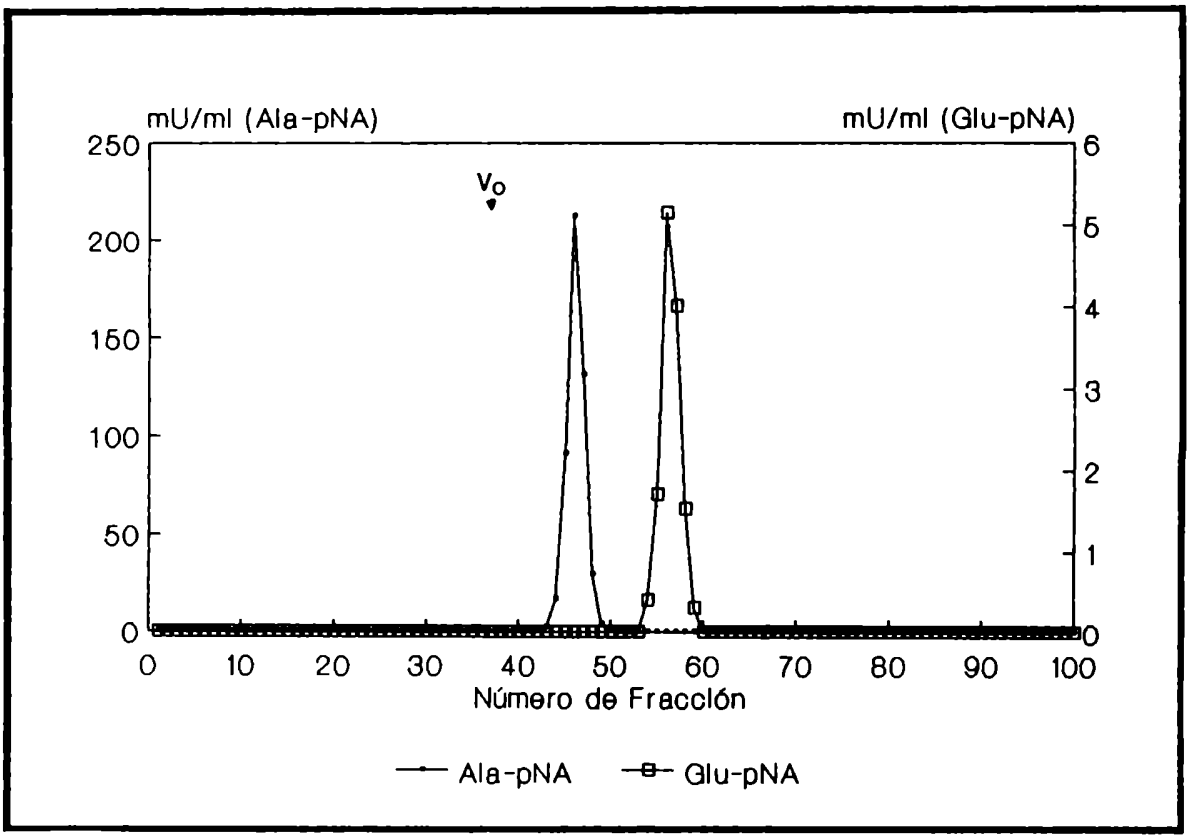


Figura 4: Análisis cromatográfico en columna de Sephacryl S-200 HR de las fracciones 43-47 de DEAE-Sephacel (pico II). 3 ml del pool de fracciones del pico II de DEAE-Sephacel se sembraron en una columna (2,5 x 50 cm) de 235 ml de Sephacryl S-200 HR equilibrada en 30 mM Tris-ClH pH 7,2 1 mM DTT 150 mM ClNa. La columna se desarrolló con el mismo buffer a un flujo de 20 ml/hora y se recogieron fracciones de 2,3 ml. En alícuotas apropiadas se midió actividad aminopeptidasa como se detalla en Materiales y Métodos. El Kav se calculó como Ve-Vo/Vt-Vo, siendo Vt el volumen total de la columna, Vo el volumen de elución del azul de dextrano y Ve el volumen de elución de las proteínas.

Del análisis de la Figuras 3 y 4 y de la Tabla I. puede concluirse que la actividad aminopeptidásica total medida en extractos solubles de *S.*

platensis está dada fundamentalmente por la actividad de la Alanina aminopeptidasa. El análisis cromatográfico de extractos solubles del hongo reveló la existencia de al menos dos actividades aminopeptidásicas distintas de la Alanina aminopeptidasa. A diferencia de ésta, que exhibe una amplia especificidad de sustratos (Ala-pNA, Leu-pNA, Lys-pNA, Met-pNA, Arg-pNA, Phe-pNA, Pro-pNA, Gly-pNA, kémptido y fosfokémptido), las otras enzimas detectadas poseen actividad sólo sobre uno (Glu-pNA) o dos sustratos (Glu-pNA y Pro-pNA).

A continuación se presenta con fines comparativos una tabla donde se muestran las actividades específicas de la actividad aminopeptidásica medida en extractos solubles de *S. cerevisiae* (en fase logarítmica o fase estacionaria de crecimiento) (tomado de Achstetter y col., 1983) y en extractos solubles de *S. platensis*.

Sustrato (1 mM)	*S. platensis*	*S. cerevisiae* (Fase logarítmica)	*S. cerevisiae* (Fase estacionaria)
Ala-pNA	123.2	1.47	1.79
Leu-pNA	101.6	2.79	4.25
Met-pNA	70.2	nd	nd
Lys-pNA	54	2.06	2.55
Arg-pNA	37	1.54	2.31
Phe-pNA	27.1	1.16	1.29
Glu-pNA	17.5	0.2	0.26
Pro-pNA	16.8	0.11	0.13
Gly-pNA	2.4	0.19	0.35

Nota: todos los valores están expresados en mU/mg de proteína.

Como puede observarse las diferencias de actividades específicas entre ambos organismos son notables. En S. *cerevisiae* no se ha descripto una actividad aminopeptidásica con características similares a la Alanina aminopeptidasa de *S. platensis*, ya sea en cuanto a su alta actividad específica en extractos solubles, como a la especificidad de sustrato que posee.

Además del contraste manifiesto entre el nivel de actividad aminopeptidásica medidas en extractos solubles de *S. cerevisiae* y de *S. platensis*, se destaca también la diferencia que existe entre ambos organismos en cuanto al número total de aminopeptidasas distintas

individualizadas. Hasta el presente se han reportado al menos 17 actividades aminopeptidásicas distintas en *S. cerevisiae* (Achstetter y col., 1983; Enenkel y Wolf, 1993; Tisljar y Wolf, 1993; Caprioglio y col, 1993; Yasuhara y col., 1994) y existe entre varias de ellas especificidad cruzada, es decir, hay redundancia de actividades. Los estudios llevados a cabo en una cepa de *S. cerevisiae* defectiva en cuatro aminopeptidas mostraron que en todas las condiciones metabólicas ensayadas esta cepa fue viable (Trumbly y Bradley, 1983).

En contraste con la cantidad de aminopeptidasas descriptas en *S. cerevisiae,* en *N. crassa* sólo se han detectado dos aminopeptidasas (Siepen y col., 1975; Siepen y Kula, 1976). Asimismo, en *S. pombe* hasta el presente se ha detectado sólo una actividad aminopeptidasa (Súarez Rendueles y col., 1991). Es interesante señalar aquí que se ha aislado una cepa de este organismo defectiva en esta única aminopeptidasa, que sorprendentemente resultó ser viable en todas las condiciones de crecimiento ensayadas, sólo detectándose un aumento en la concentración intracelular de péptidos en condiciones de stress nutricional (Arbesú y col., 1991). La viabilidad de esta cepa podría deberse a la actividad de otras dos actividades exopeptidásicas detectadas en este organismo (Súarez Rendueles y col., 1991), una carboxipeptidasa y una dipeptidil aminopeptidasa, que actuando en conjunto puedan rescatarlo de un posible fenotipo letal. No puede descartarse, tampoco, la posibilidad que exista al menos otra aminopeptidasa que no exhiba actividad hidrolítica sobre aminoácidos cromogénicos sino sólo sobre los sustratos endógenos.

Hasta el presente se desconoce el significado de la divergencia entre todos estos organismos en cuanto a su batería de aminopeptidasas y las características bioquímicas de las mismas.

SECCION C: PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

Experimentos preliminares, llevados a cabo con una preparación parcialmente purificada de la Alanina aminopeptidasa, indicaron que esta actividad hidrolizó completamente al kémptido, hasta aminoácidos libres, mientras que la degradación del fosfokémptido llevó a la acumulación de un producto fosforilado que exhibió una movilidad electroforética distinta a la de un estándar de fosfoserina (*Sección A*). Otros estudios revelaron que la Alanina aminopeptidasa es la principal actividad aminopeptidásica presente en extractos solubles de *S. platensis* (*Sección B*). A fin de estudiar las características y propiedades de esta enzima y en particular el aparente bloqueo de su actividad por fosforilación del sustrato, la misma fue purificada a homogeneidad.

PURIFICACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

La Tabla II resume una marcha de purificación típica de la Alanina aminopeptidasa.

TABLA II

PURIFICACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

Fracción	Actividad total (mU)[a]	Recuperación (%)	Proteína (mg)	Actividad específica (mU/mg)	Purificación (veces)
S-100	5.400	100	1800	3	1
DEAE-celulosa	3.290	61	110	29	9,6
fenil-Sepharosa	2.430	45	4,1	590	196
Sephacryl S-300	1.130	21	1,2	940	313
Gel nativo	780	14,4	0,4	1.950	650

[a] Una miliunidad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza un nmol de fosfokémptido[^{32}P] por minuto a 30°C.

Durante la purificación de la Alanina aminopeptidasa el ensayo de medición de actividad se realizó utilizando fosfokémptido[^{32}P] como sustrato. En las cuatro etapas de purificación se detectó siempre un único pico de actividad hidrolizante sobre fosfokémptido[^{32}P] que coincidió en todos los casos con un único pico de actividad hidrolizante sobre Ala-pNA y Leu-pNA. Además, durante todo el proceso de purificación la relación entre

las actividades hidrolíticas sobre los tres sustratos se mantuvo constante. Estos resultados indican que *S. platensis* posee una única actividad soluble que es capaz de hidrolizar una serie de aminoácidos cromogénicos y el fosfokémptido[^{32}P].

La Alanina aminopeptidasa fue purificada a homogeneidad aparente. La preparación obtenida del último paso de purificación (electroforesis en gel nativo) exhibió una única banda proteica que coincidió con el pico de actividad cuando se la analizó por electroforesis en gel nativo (Figura 5).

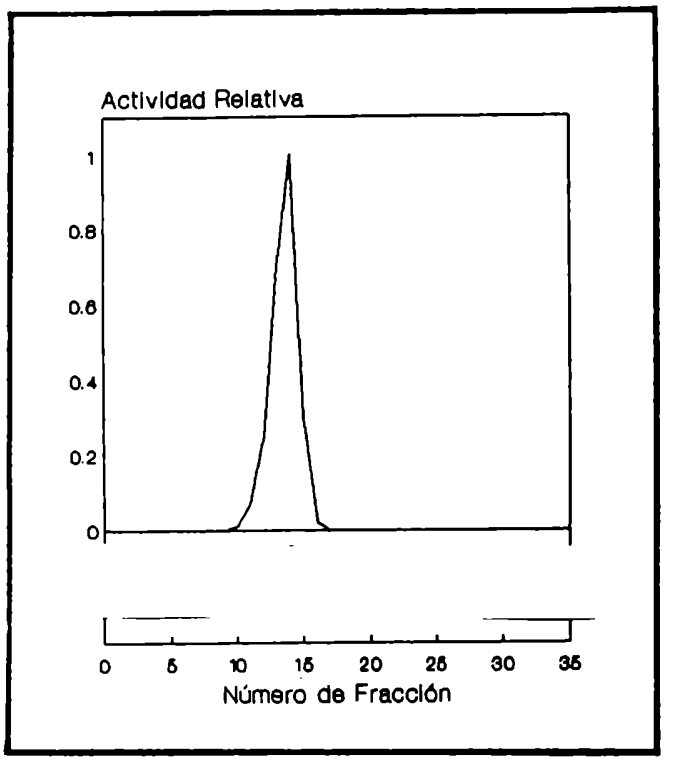


Figura 5: Análisis electroforético en gel nativo de la Alanina aminopeptidasa purificada. 15 µg de enzima purificada se analizó por electroforesis en gel plano de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturalizantes (Davis, 1964). El gel fue precorrido a 4°C en buffer 100 mM Tris-ClH pH 8,8 durante 1 hora a 25 mA después de al menos 8 horas de haber sido armado. Una calle del gel se tiñó para proteínas con el reactivo azul de Coomassie R-250 y otra calle se utilizó para medir actividad enzimática. La misma se cortó en tiras de 2 mm de ancho que se incubaron con 100 µl de buffer 20 mM Tris-ClH pH 8 a 30°C durante 10 minutos y se midió actividad enzimática en cada fracción.

La enzima purificada fue sumamente estable en presencia de 20 % (v/v) de glicerol guardada a -20°C. La pérdida de actividad por cada ciclo de

congelamiento y descongelamiento en estas condiciones fue inferior al 5%. El almacenamiento prolongado (dos meses) a -20°C redujo la actividad de la preparación enzimática en un 30-40%.

CARACTERIZACION DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

ESTRUCTURA Y PESO MOLECULAR

A fin de estimar el peso molecular de la enzima nativa se determinaron los parámetros hidrodinámicos radio de Stokes y coeficiente de sedimentación de la Alanina aminopeptidasa, a través de cromatografía de filtración molecular en columna de Sephacryl S-300 y centrifugación en gradiente de sacarosa, respectivamente.

A partir de los gráficos de las Figuras 6 y 7 se estimó que la Alanina aminopeptidasa posee un radio de Stokes de 3,45 nm y un coeficiente de sedimentación de 6 S, respectivamente.

Se calculó el peso molecular de la enzima nativa combinando los datos del coeficiente de sedimentación y el radio de Stokes, según la siguiente ecuación (Siegel y Monty ,1966), obteniéndose un valor de 90 kDa.

$$PM = \frac{6\,\pi\,N\,h_{20,w}}{(1-v)\delta_{20,w}} \cdot S_{20,w} \cdot a$$

N: número de Avogadro

h: viscosidad del agua a 20°C

S: coeficiente de sedimentación

a: radio de Stokes

v: volumen específico parcial (0,74 cm^3/g)

δ: densidad del agua a 20°C.

El análisis electroforético de la enzima purificada en gel de poliacrilamida desnaturalizante mostró una única banda proteica de un peso molecular aproximado de 93 kDa (Figura 8), indicando que la enzima está constituída por un único polipéptido.

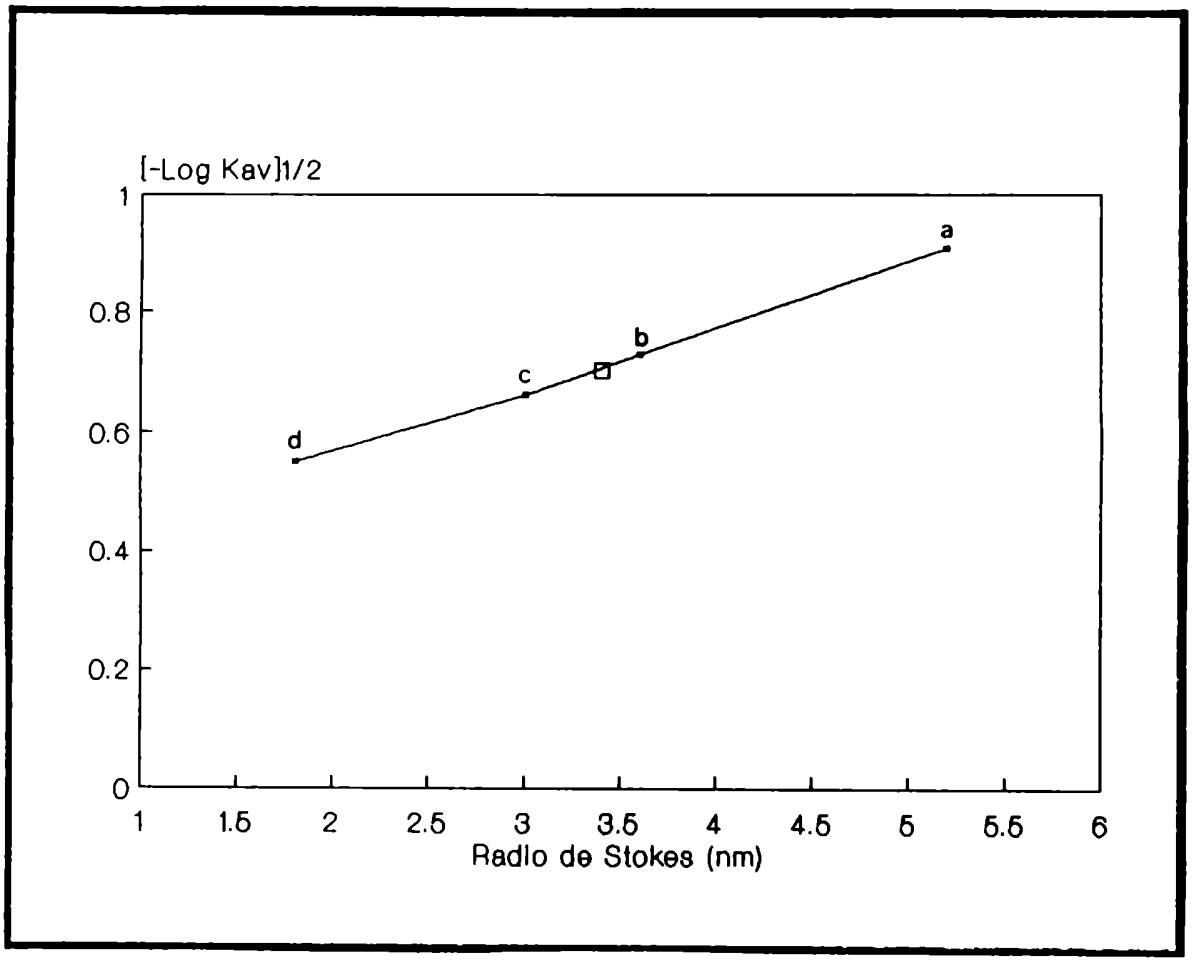


Figura 6: Estimación del radio de Stokes de la Alanina aminopeptidasa. 150 µg de Alanina aminopeptidasa (correspondiente a la fracción Sephacryl S-300) se recromatografió en una columna precalibrada de Sephacryl S-300 (1,2 x 80 cm) equilibrada en buffer Tris-ClH 20 mM pH 8 conteniendo ClK 50 mM y glicerol 20 % (v/v) y desarrollada en el mismo buffer a un flujo de 9 ml/hora. Se recogieron fracciones de 0,9 ml y se midió actividad peptidásica en alícuotas apropiadas de cada fracción. Las proteínas utilizadas como marcadores y sus respectivos valores de radio de Stokes fueron las siguientes: **a**, catalasa (hígado bovino), 5,2 nm; **b**, seroalbúmina bovina, 3,55 nm; **c**, peroxidasa (rábano picante), 3,04 nm y **d**, citocromo C (corazón equino), 1,8 nm. El Kav se calculó como Ve-Vo/Vt-Vo, siendo Vt el volumen total de la columna, Vo el volumen de elución del azul de dextrano y Ve el volumen de elución de las proteínas. El símbolo abierto indica la posición de la Alanina aminopeptidasa. El radio de Stokes se estimó por interpolación gráfica de acuerdo con el método de Laurent y Killander (1964) representando el $[-\log Kav]^{1/2}$ en función del radio de Stokes de las proteínas marcadoras.

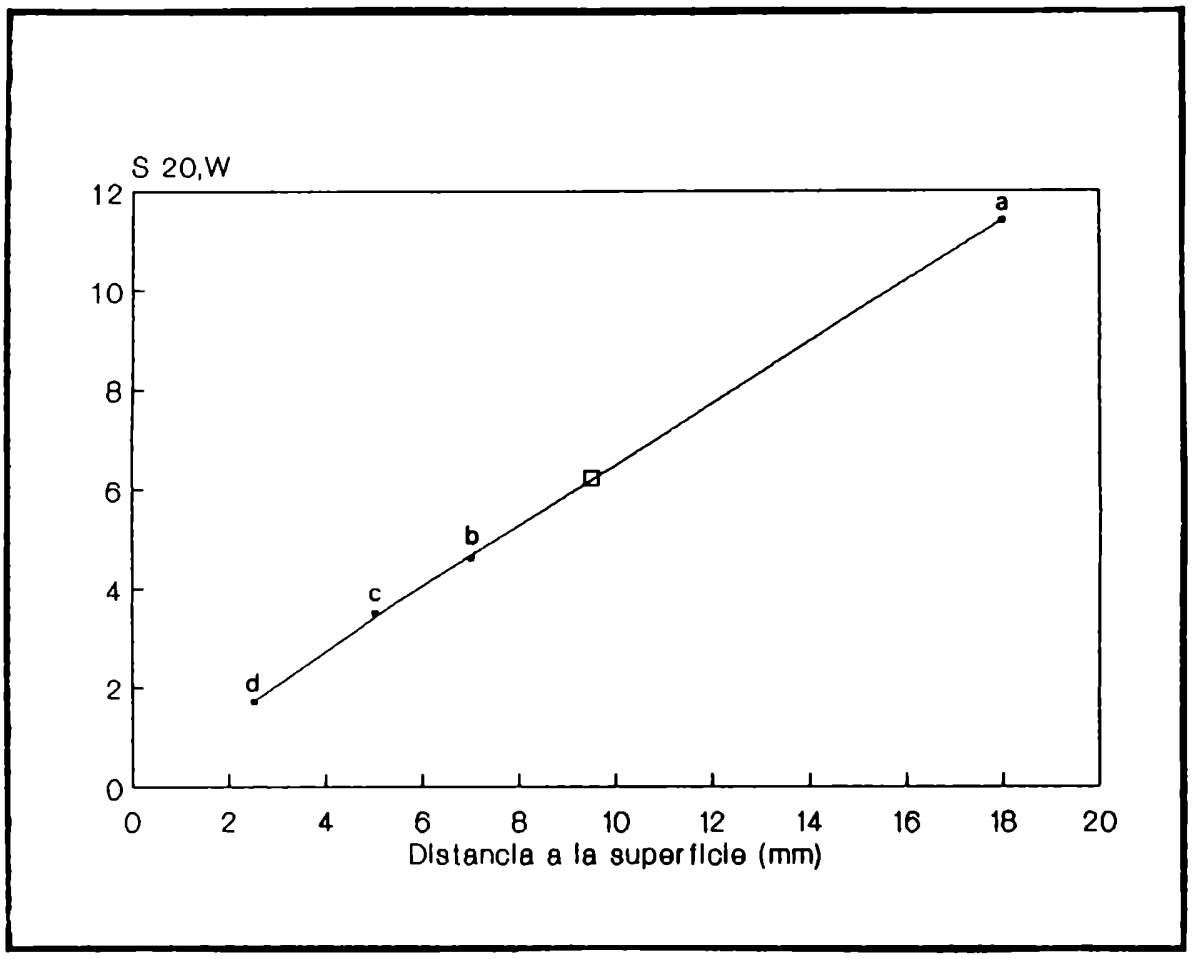


Figura 7: Determinación del coefieciente de sedimentación de la Alanina aminopeptidasa. Una alícuota de 50 µg de la Alanina aminopeptidasa (correspondiente a la fracción Sephacryl S-300) se dializó contra buffer Tris-ClH 20 mM pH 8 y se sembró en un gradiente lineal de sacarosa 5-20% en buffer Tris-ClH 20 mM pH 8 junto a las proteínas marcadoras. La centrifugación se llevó a cabo en un rotor SW 55 Ti a 140.000 x g durante 16 horas a 4°C. Finalizada la centrifugación se retiraron 26 fracciones desde el fondo del tubo a la superficie mediante un dispositivo sifón y en alícuotas apropiadas de cada una de ellas se midieron las actividades enzimáticas. Las proteínas utilizadas como marcadores ,y sus respectivos valores de coeficiente de sedimentación, fueron las siguientes: **a**, catalasa (hígado bovino), 11,4 S; **b**, seroalbúmina bovina, 4,6 S; **c**, peroxidasa (rábano picante), 3,5 S y **d**, citocromo C (corazón equino), 1,7 S. El símbolo abierto señala la posición de la Alanina aminopeptidasa. El coeficiente de sedimentación de la Alanina aminopeptidasa se estimó por interpolación gráfica en la recta de calibración que se obtiene de graficar la distancia recorrida por las proteínas marcadoras desde la superficie del gradiente, en función de sus respectivos valores de coeficiente de sedimentación (Martin y Ames, 1961).

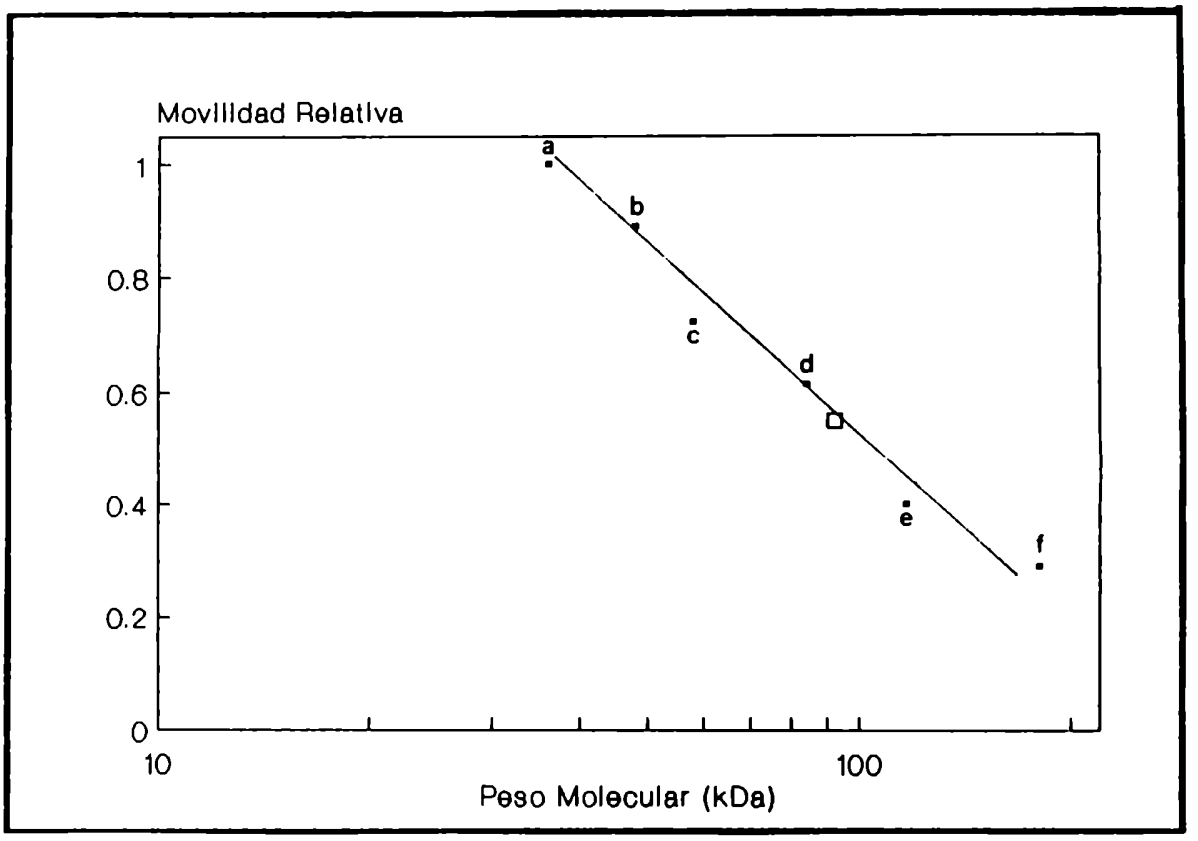


Figura 8: Estimación del peso molecular de la Alanina aminopeptidasa por electroforesis en gel desnaturalizante. 10 µg de enzima purificada se analizó por electroforesis en gel plano de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Las proteínas marcadoras y sus respectivos pesos moleculares, fueron las siguientes: **a**: lactato deshidrogenasa (36,5 kDa); **b**: fumarasa (48,5 kDa); **c**: piruvato quinasa (58 kDa); **d**: fructosa-6-fosfato quinasa (84 kDa); **e**: β-galactosidasa (116 kDa) y **f**: α_2-macroglobulina (180 kDa). El símbolo abierto indica la posición de la Alanina aminopeptidasa.

DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON EL pH.

Se estudió el efecto del pH sobre la actividad de la Alanina aminopeptidasa utilizando buffer 50 mM bis-Tris-propano-ClH en un rango de pH 6-9. Se pudo determinar el óptimo de actividad enzimática en el rango de pH 7,4-7,6 utilizando fosfokémptido[^{32}P] y Ala-pNA como sustratos.

EFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

Se investigó el efecto de diversos inhibidores de proteasas sobre la actividad de la Alanina aminopeptidasa. Inhibidores de serín proteasas

tales como el PMSF, benzamidina, TLCK, antipaína y aprotinina no tuvieron efecto alguno sobre la actividad enzimática. Como se observa en la Tabla III agentes reactivos de grupo tiol inhibieron la actividad enzimática. Sin embargo, el E-64, inhibidor específico de cisteín-proteasas no tuvo efecto sobre la actividad. Estos resultados sugieren que la aminopeptidasa en estudio no se trata de una cisteín-enzima, pero sí posee al menos un residuo cisteína cuya modificación lleva a una disminución de la actividad.

La actividad enzimática fue fuertemente inhibida por quelantes de metales tales como 1,10-fenantrolina y EDTA, lo que sugiere que la Alanina aminopeptidasa se trata de una metalo-enzima, como es el caso de la gran mayoría de las aminopeptidasas caracterizadas. Como se observa en la Tabla III la bestatina y la amastatina, conocidos inhibidores de aminopeptidasas, inhibieron marcadamente la actividad enzimática, como así también lo hizo la puromicina.

Los resultados obtenidos sugieren que la Alanina aminopeptidasa se trata de una aminopeptidasa típica dada la inhibición que manifiesta por acción de la bestatina y la amastatina, como por quelantes de metales. Los ensayos llevados a cabo para obtener una preparación de apoenzima a fin de estudiar la reactivación de la misma por agregado de distintos metales fueron infructuosos. Siguiendo los lineamientos establecidos por Wagner (1988) y Auld (1988, a y b) se trató de eliminar el posible metal unido a la enzima por incubación de la misma con 1,10-fenantrolina y diálisis posterior contra el mismo quelante. Estos ensayos de eliminación del metal por quelación se realizaron a pH 6,2; 7 y 8. Después de la remoción por diálisis de la 1,10-fenantrolina, el ensayo de actividad enzimática mostró en todos los casos que la enzima conservaba alrededor de un 80 % de la actividad inicial. Se ha reportado que la inhibición de la enzima alcohol deshidrogenasa de hígado humano por 1,10-fenantrolina no está acompañada de pérdida del ión metálico, y se piensa que estaría involucrada la formación de un complejo ternario entre la enzima, el ión metálico (Zn^{2+}) y el agente quelante (Wagner y col., 1984). Podría también ser esta la explicación de los resultados obtenidos con la Alanina aminopeptidasa, ya que la enzima en presencia del quelante no presentó actividad enzimática y cuando el mismo fue removido por diálisis la reversión de la inhibición fue casi total. Si bien el agua que se utilizó en la preparación de las soluciones fue tratada en un sistema Milli-Q de Millipore y las soluciones de buffer PIPES (pH 6,2) y HEPES (pH 7 y 8) fueron tratadas por pasaje a través de una columna de Chellex 100 (Holmquist, 1988), no puede descartarse la posibilidad que trazas de metales, en especial Zn^{2+}, se hallasen en las mismas en cantidad

suficiente como para producir la reactivación de la enzima durante la eliminación por diálisis de la 1,10-fenantrolina.

TABLA III

EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

Inhibidor	Concentración [a]	Actividad (%)
		100 [b]
$HgCl_2$	1 mM	14
NEM	5 mM	63
FMA	10 µM	45
p-OHMB	1 mM	19
E-64	0.5 mM	98
Pepstatina	1 mM	94
Amastatina	1 µM	32
	10 µM	16
Bestatina	1 µM	50
	10 µM	16
EGTA	10 mM	60
EDTA	10 mM	16
1.10-fenantrolina	2 mM	4
Concanavalina A	100 µg/ml	100
Puromicina	1 mM	20

[a] 0,25 munidades de Alanina aminopeptidasa purificada se preincubaron con el inhibidor a la concentración indicada durante 25 minutos a 30°C.
[b] La actividad enzimática se midió sobre fosfokémptido[^{32}P] como se indica en Materiales y Métodos.

EFECTO DE CATIONES SOBRE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

Se estudió el efecto de cationes bivalentes sobre la actividad enzimática. La Tabla IV muestra que en todos los casos analizados se observó una disminución de la actividad enzimática por agregado de metal, produciendo el Zn^{2+} el mayor efecto inhibitorio.

Cuando se ensayó el efecto de cationes monovalentes (Na^+ y K^+) sobre la Alanina aminopeptidasa no se observó variación significativa de la actividad enzimática respecto del control.

TABLA IV

EFECTO DE IONES METALICOS SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOPEPTIDASA [a]

Metal (1 mM)	Actividad relativa (%)
Control	100
Co^{2+}	83
Cu^{2+}	58
Ba^{2+}	57
Mg^{2+}	54
Ni^{2+}	52
Ca^{2+}	51
Mn^{2+}	34
Fe^{2+}	27
Zn^{2+}	14

[a] La enzima se preincubó con 1 mM de cada ión durante 30 minutos a 30°C. Se midió la actividad enzimática remanente a la misma concentración del ión.

La característica exhibida por la enzima de *S. platensis, v.g.* su sensibilidad a cationes bivalentes, es similar a la de la metalo-aminopeptidasa yspI de *S. pombe* (Arbesú y col, 1993). Ambas enzimas comparten también la sensibilidad a reactivos mercuriales. Existe la posibilidad que la inhibición de la actividad enzimática por cationes bivalentes esté dada por la interacción de un residuo tiol de la proteína con el ión metálico. Además, la fuerte inhibición de la actividad enzimática ejercida por el Zn^{2+} es también una característica común con otras metalo-aminopeptidasas (Achstetter y col., 1983; Chang y col., 1990; Arbesú y col, 1993). Se ha reportado que otra zinc-peptidasa, la carboxipeptidasa A bovina, es inhibida por Zn^{2+}, después de la formación del ión ZnOH+, el cuál se une al carboxilo del residuo glutamil involucrado en la coordinación del ión metálico (Larsen y Auld, 1989). Aún no se ha demostrado para ninguna de las aminopeptidasas inhibibles por Zn^{2+} que la inhibición ocurra por un mecanismo similar.

EFECTO DE AMINOACIDOS SOBRE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA

Se estudió el efecto del agregado de aminoácidos sobre la hidrólisis del fosfokémptido[^{32}P] por acción de la Alanina aminopeptidasa. Como se observa en la Tabla V el mayor efecto inhibitorio se obtuvo con los aminoácidos hidrofóbicos fenilalanina y tirosina. Leucina, triptofano y metionina inhibieron parcialmente la actividad, mientras que aminoácidos pequeños, polares, o cargados no tuvieron gran efecto.

TABLA V

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOPEPTIDASA POR L-AMINOACIDOS [a]

L-Aminoácidos	Inhibición (%)[b]
Gly;Ala;Asn;Glu;Lys	<10
Leu	60
Trp	63
Met	64
Phe	80
Tyr	>98

[a] Los aminoácidos, a una concentración final de 2 mM, se preincubaron con la enzima purificada durante 5 minutos a 30°C.

[b] Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición respecto de un control no tratado. La actividad enzimática se ensayó sobre el fosfokémptido[^{32}P] como se indica en Materiales y Métodos.

ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

Como ya se señaló en las *Secciones A* y *B* la Alanina aminopeptidasa exhibió una amplia especificidad de sustrato sobre aminoácidos cromogénicos. En la Tabla VI se puede observar la actividad hidrolítica sobre distintos sustratos, relativa a la hidrólisis de Ala-pNA.

La enzima purificada no fue capaz de hidrolizar el N-α-acetil derivado de la Ala-pNA. Además se ensayó inhibición de la hidrólisis del fosfokémptido[^{32}P] por agregado de N-α-acetil-Ala-pNA, sin observarse efecto alguno, lo que sugiere que se requiere el extremo α-amino libre del sustrato para que tenga lugar la unión del mismo a la enzima.

La Alanina aminopeptidasa tampoco fue capaz de hidrolizar el p-nitroanilida derivado del ácido glutámico.

Se destaca la capacidad de la Alanina aminopeptidasa de hidrolizar con similar velocidad las p-nitroanilidas de alanina y de leucina. No se ha reportado hasta el presente la existencia en otros eucariontes inferiores (v.g. *S. cerevisiae, S. pombe, N. crassa, Blastocladiella emersonii*) de una aminopeptidasa con la especificidad de sustrato que exhibe la enzima caracterizada en *S. platensis*.

TABLA VI

ACTIVIDAD DE LA ALANINA AMINOPEPTIDASA SOBRE AMINOACIDOS p-NITROANILIDAS

L-aminoácido-pNA (1mM)	Actividad relativa (%)[a]
Ala	100
Leu	85
Met	56
Lys	45
Phe	32
Arg	30
Pro	8
Gly	4
Glu	<1
N-Ac-L-Ala	<1

[a] La velocidad de hidrólisis de cada sustrato está expresada relativa a la hidrólisis de L-Ala-pNA.

Cabe señalar aquí que si bien existen homologías manifiestas entre varias de estas enzimas (v.g.: inhibición por quelantes de metales y bestatina; sensibilidad al Zn^{2+}), es notable la diversidad que existe entre la cantidad y las características bioquímicas y estructurales de las aminopeptidasas presentes en estos organismos. Como ya se mencionó, en *S. cerevisiae* se han descripto por lo menos 17 aminopeptidasas citosólicas, y en cambio, se ha reportado la existencia de sólo una y dos aminopeptidasas en *S. pombe* y *N. crassa*, respectivamente. Del análisis comparativo entre estas enzimas de características tales como peso molecular, composición de subunidades, especificidad de sustrato, y patrón de inhibición, no se ha llegado a la conclusión de la existencia de aminopeptidasas homólogas entre estos organismos.

Se estudió la capacidad de la Alanina aminopeptidasa de hidrolizar distintos dipéptidos. Se analizó por cromatografía ascendente en placa de microcelulosa los productos de la actividad enzimática sobre Ser-Leu, Asp-Ala y Glu-Ala, observándose hidrólisis de los tres dipéptidos (resultados no mostrados). LLama la atención la capacidad de la Alanina aminopeptidasa de hidrolizar dipéptidos que poseen un residuo ácido en su extremo amino, en contraste con la incapacidad de la enzima purificada de hidrolizar el Glu-pNA. Se ha observado que la Metionina aminopeptidasa de *S. cerevisiae* hidroliza residuos metionina N-terminales de péptidos con eficiencia variable dependiendo de la identidad de los aminoácidos adjacentes a la metionina. En cambio, no es capaz de hidrolizar la Met-pNA (Chang y col., 1990). También se observó para las aminopeptidasas I y II del mismo organismo que la tasa de hidrólisis de péptidos es muy superior a la velocidad de degradación de aminoácidos cromogénicos (Frey y Röhm, 1978). Por el contrario, Lazdunski y col. (1975) estudiando una aminopeptidasa periplasmática de *E. coli*, observaron que entre una variedad de aminoácidos cromogénicos ensayados, la Ala-pNA es el sustrato hidrolizado con mayor velocidad, siendo la velocidad de hidrólisis del β-naftilamida derivado del mismo aminoácido cinco veces menor y que cuando se utilizó una serie de péptidos como sustratos (Ala-Gly-Gly; Ala-Val; Ala-Pro y Ala-Ser) no se detectó actividad enzimática sobre los mismos.

Estas evidencias experimentales en conjunto sugieren que el uso de derivados cromogénicos de aminoácidos puede ser una herramienta útil para la detección y aislamiento de aminopeptidasas pero que no necesariamente la hidrólisis de los mismos representa la actividad "real" de una dada aminopeptidasa. Ha sido demostrado para varias aminopeptidasas que hasta el segundo aminoácido adjacente al residuo N-terminal del sustrato (P'_2) está implicado en la unión a la enzima y afecta la hidrólisis del residuo N-terminal, dependiendo de la identidad de los mismos (Garner y Behal, 1975; Minagawa y col., 1988; Chang y col., 1990; Yasuhara y col., 1994). Estudiando la aminopeptidasa vacuolar Y de *S. cerevisiae*, se observó un importante aumento de la actividad hidrolítica sobre aminoácidos cromogénicos y dipéptidos cuando se ensayó en presencia de Co^{2+} 0,25 mM. En cambio, cuando los sustratos ensayados fueron dipéptidos cromogénicos, tripéptidos, hexapéptidos y heptapéptidos se observó inhibición de la hidrólisis del residuo N-terminal de los sustratos por el agregado del metal (Yasuhara y col., 1994). Esta evidencia también pone en duda que los estudios de caracterización bioquímica de aminopeptidasas llevados a cabo con aminoácidos cromogénicos sean el mejor abordaje experimental al estudio de estas enzimas.

Se estudió la capacidad de la Alanina aminopeptidasa purificada de hidrolizar el kémptido. Para ello se incubó el péptido con la enzima y se retiraron alícuotas a distintos tiempos a fin de ser analizadas por cromatografía ascendente. Como se observa en la Figura 9 la degradación del kémptido ocurrió desde su extremo N-terminal de un modo secuencial. A los cinco minutos de incubación se detectó leucina y trazas de arginina. A los quince minutos de incubación se detectó además la presencia de alanina. A los cuarenta minutos de incubación el kémptido fue completamente hidrolizado hasta sus aminoácidos constituyentes.

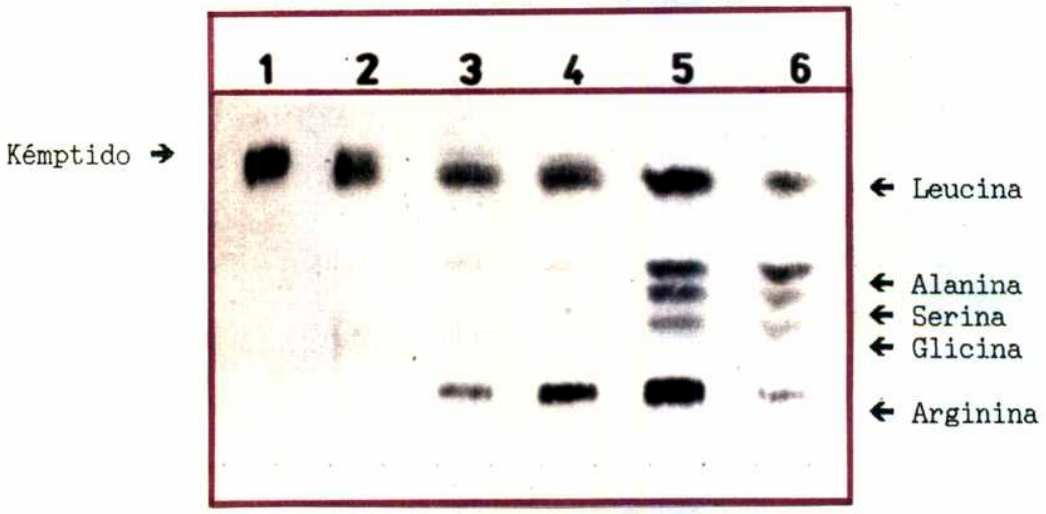


Figura 9: Análisis cromatográfico de los productos de degradación del kémptido en función del tiempo de incubación con la Alanina aminopeptidasa. 100 nmoles de kémptido se incubaron a 30°C con 2 µg de enzima purificada a 30°C en un volumen final de 100 µl. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 15 µl y previo calentamiento a 95°C durante 3 minutos, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. Las fracciones sobrenadantes se sembraron en una placa de microcelulosa y se llevó a cabo una cromatografía ascedente como se indica en Materiales y Métodos. Calles 1-5: 0, 5, 15, 30 y 40 minutos de incubación, respectivamente. Calle 6: estándar de aminoácidos. La cromatografía se reveló con reactivo de ninhidrina.

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del fosfokémptido[^{32}P] en condiciones similares a las utilizadas para la hidrólisis del kémptido (concentración de sustrato y de enzima). La Figura 10 muestra el análisis electroforético de los productos radioactivos formados a tiempos crecientes. Como puede observarse, la acción de la enzima sobre el fosfokémptido llevó a la acumulación de un producto fosforilado (banda **b**),

cuya movilidad electroforética fue distinta a la del estándar de fosfoserina.

Como se detalla en la sección siguiente este producto fue purificado, y el análisis composicional del mismo indicó que su estructura corresponde a Ala-Ser(P)-Leu-Gly. De este resultado se deduce que el compuesto fosforilado que se formó de modo transiente (banda **a**) y que posee carácter catiónico, corresponde al fragmento Arg-Ala-Ser(P)-Leu-Gly. Dado que sólo se observa una única banda catiónica adicional a las bandas **a** y **b**, y considerando que el primer producto de degradación del fosfokémptido, Arg-Arg-Ala-Ser(P)-Leu-Gly, posee la misma carga neta que el fosfokémptido intacto, es lógico suponer que en las condiciones en que se llevó a cabo la electroforesis no se alcanzó a resolver entre este primer producto y el fosfokémptido intacto.

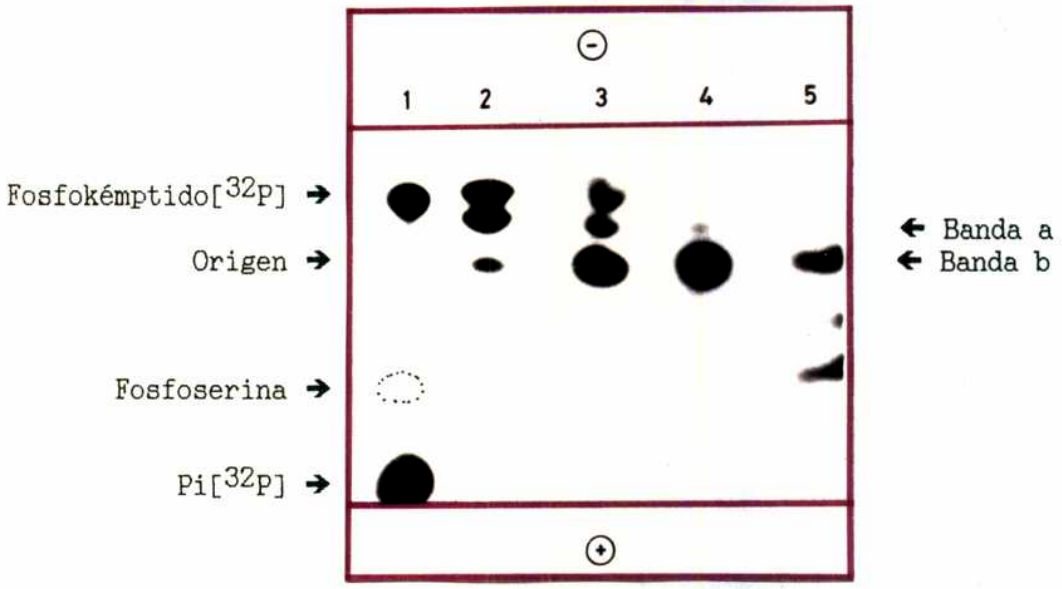


Figura 10: Análisis electroforético de los productos de degradación del fosfokémptido[^{32}P] en función del tiempo de incubación con la Alanina aminopeptidasa. El experimento se realizó en condiciones similares a las descriptas en la leyenda de la figura 9, excepto que se utilizó fosfokémptido[^{32}P] en lugar de kémptido. Calle 1: estándar de fosfokémptido, fosfoserina y Pi[^{32}P]. Calles 2-4: 5, 9 y 15 minutos de incubación. Calle 5: 10 horas de incubación. Los productos se analizaron por electroforesis como se decribe en Materiales y Métodos.

Como se observa en la calle 5, sólo despues de un largo período de incubación (más de 10 horas) se detectó la formación de otros dos productos adicionales minoritarios de carácter aniónico, uno de los cuales exhibió la misma movilidad electroforética del estándar de fosfoserina.

Los resultados obtenidos son coincidentes a los obtenidos con la preparación de enzima parcialmente purificada, que se muestran en la *Sección A* y permiten formular la hipótesis que la presencia de un grupo fosfato sobre el sustrato impide o disminuye marcadamente el progreso de la actividad aminopeptidásica sobre el mismo. Dado que sólo la incubación prolongada del sustrato fosforilado con la enzima purificada llevó a la formación de otros productos fosforilados de carácter aniónico, uno de los cuales exhibió la movilidad electroforética de la fosfoserina, puede considerarse que el efecto del grupo fosfato en la vecindad de la unión peptídica a hidrolizarse puede consistir en una fuerte disminución de la unión del mismo a la enzima o en una disminución de la velocidad de hidrólisis de la unión peptídica. El estudio del efecto de la fosforilación del sustrato sobre la actividad de la Alanina aminopeptidasa llevado a cabo sobre fosfopéptidos distintos del fosfokémptido se detalla en la *Seccion D.*

CONSTANTES CINETICAS

Se determinaron las constantes cinéticas de hidrólisis del fosfokémptido[^{32}P]. En la Figura 11, panel A se observa la representación de Lineweaver-Burk de los datos de velocidades iniciales en función de las distintas concentraciones de fosfokémptido[^{32}P]. El valor de la Km de la enzima calculado gráficamente fue 0,5 µM y el valor de la Vmáx fue 4 µmol min^{-1} mg^{-1}.

Se estimó la afinidad de la enzima por el kémptido, midiendo la disminución de la hidrólisis del fosfokémptido por agregado de kémptido sin fosforilar. La representación de Dixon, que se observa en la Figura 11 panel B, muestra que el kémptido inhibe la hidrólisis del fosfokémptido de un modo competitivo. De este gráfico se calculó la Ki para el kémptido en un valor de 0,6 µM.

Es importante destacar la gran afinidad que posee la enzima para estos péptidos. Estos datos, junto con la evidencia de que la Alanina aminopeptidasa posee una amplia especificidad de sustrato, sugieren la participación de esta enzima en las etapas finales de la degradación proteica, es decir, la hidrólisis hasta aminoácidos libres de los péptidos generados por endoproteólisis. En coincidencia con ello, en la *Sección* siguiente se muestran experimentos *in vitro* que indican que la Alanina aminopeptidasa fue capaz de degradar aproximadamente el 70 % de los péptidos generados por endoproteólisis de proteínas del hongo.

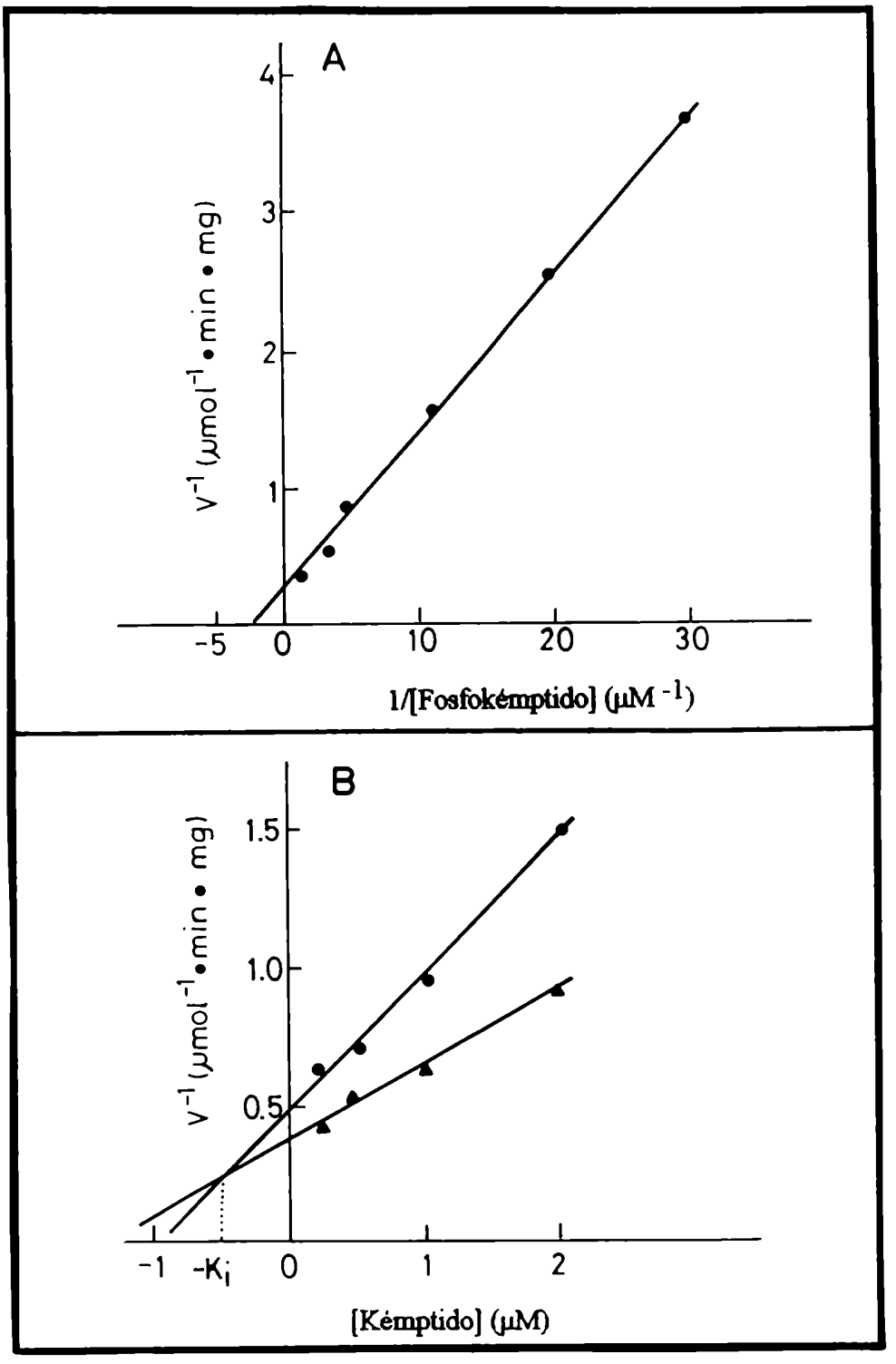


Figura 11: Panel A: Representación de Lineweaver-Burk de velocidades iniciales en función de la concentración de fosfokémptido[^{32}P] para la Alanina aminopeptidasa. Panel B: Representación de Dixon de inhibición por kémptido de la hidrólisis del fosfokémptido[^{32}P] a dos concentraciones de sustrato. Símbolos abiertos 0,4 µM de fosfokémptido[^{32}P]. Símbolos cerrados 1,2 µM de fosfokémptido[^{32}P]. El fosfokémptido utilizado para la determinación de velocidades iniciales fue purificado como se detalla en Materiales y Métodos, a fin de eliminar las trazas de kémptido sin fosforilar.

SECCION D: EFECTO DE LA FOSFORILACION DEL SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOPEPTIDASA.

Existe abundante evidencia experimental que indica que la fosforilación de proteínas afecta la susceptibilidad de las mismas al ataque endoproteolítico, produciendo efectos opuestos, es decir aumentando o disminuyendo la sensibilidad a la proteólisis (Ekman y col., 1978; Garland y Nimmo, 1984; Chen y Stracher, 1989; Orlowski y Michaud, 1989; Kyriakidis y col., 1993)). Por el contrario, los estudios del efecto de la fosforilación realizados sobre péptidos indican siempre una disminución de la sensibilidad a la degradación por efecto de la fosforilación (Benore-Parsons y col., 1989; Bramucci y col., 1992). Este hecho podría interpretarse considerando que en el caso de las proteínas el sitio de fosforilación puede ser distante del sitio de clivaje endoproteolítico, pudiendo exponerse o enmascarse por cambios conformacionales debidos a la fosforilación. En el caso de los péptidos el sitio de fosforilación y el sitio de clivaje están próximos sobre el mismo dominio de modo que la presencia del fosfato afectaría siempre negativamente el reconocimiento de la enzima por su secuencia blanco en el sustrato.

No hay hasta el presente antecedentes en la literatura referidos al efecto de modificaciones postraduccionales, incluída la fosforilación, sobre la degradación aminopeptidásica. Parece probable que la presencia de un fosfoaminoácido en la cadena peptídica afecte la progresión de la enzima sobre el sustrato.

Existen, sí, antecedentes que señalan que las características estructurales de los sustratos afectan la actividad de las aminopeptidasas. Tal es el caso de la Metionina aminopeptidasa, enzima responsable de la remoción del residuo iniciador metionina de las cadenas polipeptídicas nacientes. Esta aminopeptidasa puede remover el residuo metionina si el aminoácido adjacente (P'_1) es pequeño o no cargado y en cambio, es incapaz de hacerlo, si el residuo adjacente es grande o cargado (Moerschell y col., 1990; Chang y col., 1990). Otro ejemplo está dado por la Leucina aminopeptidasa y la Alanina aminopeptidasa de membrama, ambas purificadas de mamíferos. Cuando adjacente al residuo N-terminal del sustrato se halla un residuo prolina (posición P'_1), la actividad hidrolítica de estas dos enzimas sobre el residuo N-terminal (posición P_1).es prácticamente nula (Mentlein, 1988).

Como ya se mostró en la *Sección C* la Alanina aminopeptidasa de *S. platensis* hidrolizó completamente el kémptido hasta sus aminoácidos constituyentes. En cambio, la hidrólisis enzimática del fosfokémptido llevó

a la acumulación de un producto fosforilado, cuya movilidad electroforética es distinta a la de la fosfoserina. A fin de identificar este producto, se lo aisló y purificó. Para ello, 140 nmoles de fosfokémptido[^{32}P] fueron digeridos con la Alanina aminopeptidasa purificada y el avance de la reacción se monitoreó por la medición de la radioactividad remanente en papeles de fosfocelulosa y por análisis electroforético de los productos. Como se observa en la Figura 12, calle 5 a los 30 minutos de incubación la reacción de hidrólisis enzimática ha progresado hasta alcanzar la acumulación del producto correspondiente a la banda **b**.

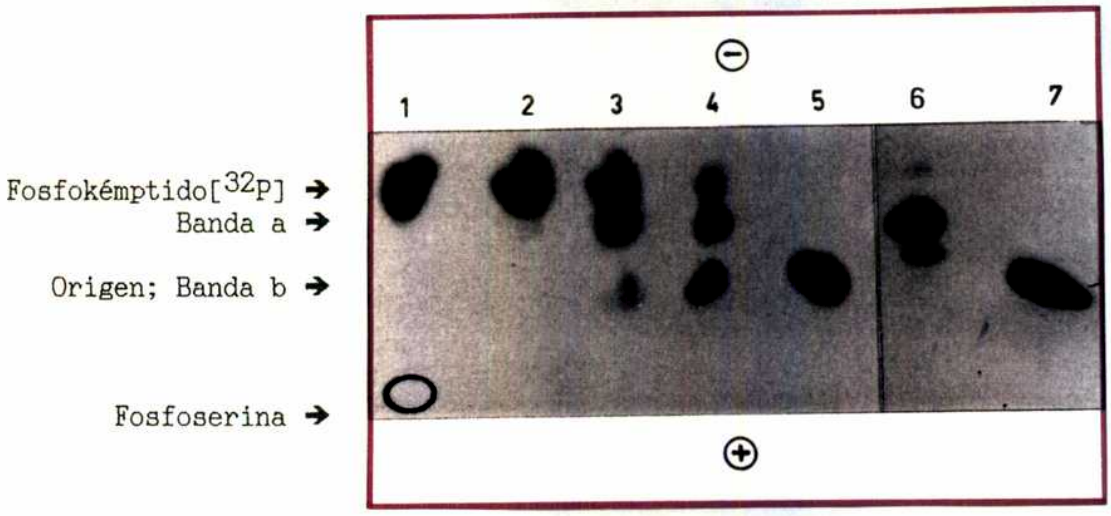


Figura 12: Análisis electroforético de los productos de degradación del fosfokémptido[^{32}P] en función del tiempo de incubación con la Alanina aminopeptidasa. 140 nmol de fosfokémptido[^{32}P] se incubaron a 30°C con 6 munidades de Alanina aminopeptidasa purificada en un volumen final de 3,5 ml. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 30 µl, se calentaron a 95°C durante 5 minutos y se guardaron para ser analizadas por electroforesis. Calles 1-5: 0, 5, 10, 20 y 30 minutos de incubación. Después de 30 minutos de incubación la reacción se detuvo por el agregado de 1,5 ml de ácido acético glacial y los productos fosforilados se purificaron como se detalla en Materiales y Métodos. Las calles 6 y 7 muestran la posición electroforética de los fragmentos purificados eluídos a 200 mM y 700 mM acetato de amonio de la columna AG 1X8, respectivamente.

Este producto acumulado fue purificado como se detalla en Materiales y Métodos. Brevemente, la mezcla de reacción acidificada con ácido acético se cromatografió en una columna de fosfocelulosa, donde quedaron retenidos las trazas del fosfokémptido intacto y del primer producto (libre de la leucina N-terminal) y eluyeron los productos de menor carácter catiónico. Previa

eliminación del ácido acético, estos productos se sembraron a pH 6,8 en una columna de intercambio aniónico AG 1X8 y la misma se lavó sucesivamente con 3 volúmenes de 20 mM, 200 mM y 700 mM de acetato de amonio. Las fracciones eluídas con cada una de las concentraciones salinas se concentraron y analizaron por electroforesis en placa de microcelulosa. Como se observa en la Figura 12 calles 6 y 7, este método cromatográfico permitió resolver las trazas de un producto intermediario (calle 6, banda **a**) que eluyó con 200 mM sal, del producto principal, que eluyó con 700 mM sal (calle 7, banda **b**). Una alícuota de este producto, reincubada durante dos horas con enzima purificada, exhibió la misma movilidad electroforética (no mostrado) que la del producto correspondiente a la banda **b**, indicando que el producto eluído a 700 mM acetato de amonio corresponde al producto que se acumula durante la degradación enzimática del fosfokémptido.

El análisis composicional de aminoácidos del fragmento purificado permitió su identificación como Ala-Ser(P)-Leu-Gly. Como se señaló en la *Sección C* Ala-pNA es, entre una serie de aminoácidos cromogénicos, el sustrato más susceptible a la hidrólisis por acción de la Alanina aminopeptidasa. Estos resultados tomados en conjunto sugieren que la presencia de la fosfoserina adjacente al residuo N-terminal alanina (posición P'_1) podría afectar el reconocimiento enzima-sustrato.

Cabe señalar que otras aminopeptidasas como la Leucina aminopeptidasa de riñón porcino y la aminopeptidasa N de *E. coli*, exhibieron un comportamiento idéntico a la enzima de *S. platensis*, en cuanto ambas también fueron capaces de degradar completamente al kémptido hasta aminoácidos libres mientras que la hidrólisis exhaustiva del fosfokémptido llevó a la acumulación de un producto fosforilado cuya secuencia también resultó ser Ala-Ser(P)-Leu-Gly (Hammerschmidt, P., 1990; Samela, A.,1993)

Considerando que secuencias análogas al kémptido se encuentran comúnmente en dominios expuestos de proteínas globulares y que estas regiones son susceptibles tanto a la fosforilación por la PK A y al ataque endoproteolítico (Ekman y col., 1978), se extendió el estudio del bloqueo de la actividad aminopeptidasa por fosforilación del sustrato a fosfopéptidos derivados de proteínas del hongo fosforiladas *in vitro* por la PK A.

Para ello, el enfoque experimental fue el siguiente. Se marcaron *in vivo* las proteínas del hongo con leucina[^{3}H] como se describe en Materiales y Métodos. Se prepararon extractos solubles a partir de este micelio marcado y las proteínas presentes en ellos se cromatografiaron en columna de DEAE-Sephacel. En las fracciones eluídas se ensayó la presencia de sustratos endógenos de la PK A por la medida de incorporación de fosfato[^{32}P] mediada

por la subunidad catalítica de la PK A utilizando como dador de fosfato radioactivo ATP[γ ^{32}P].

Como se observa en la Figura 13, las fracciones señaladas con la barra exhibieron la relación [^{32}P]/[^{3}H] más alta. Las proteínas presentes en estas fracciones, previamente concentradas y dializadas, fueron fosforiladas con ATP[γ ^{32}P] y subunidad catalítica de la PK A como se indica en Materiales y Métodos. La reacción se detuvo por separación del ATP[γ ^{32}P] por cromatografía en columna de filtración molecular (G-25). Las fosfoproteínas[^{32}P], que eluyeron en el volumen de exclusión, se concentraron hasta un volumen de 1 ml y luego se digirieron con subtilisina como se detalla en Materiales y Métodos.

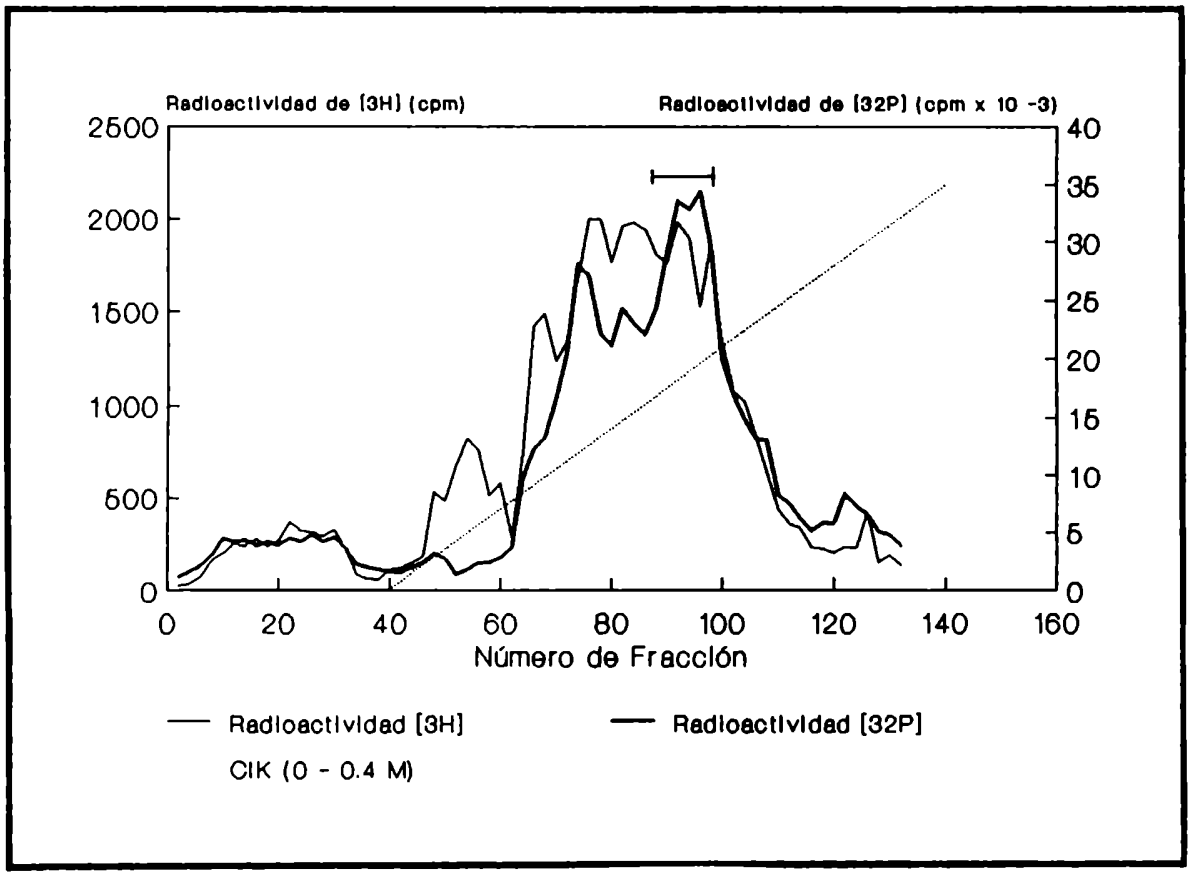


Figura 13: Detección de sustratos endógenos de la PK A presentes en extractos solubles de *S. platensis*. Las proteínas presentes en extractos solubles, preparados a partir de 5 g de micelio marcado *in vivo* con leucina[3H], se separaron por cromatografía en columna de DEAE-Sephacel como se detalla en Materiales y Métodos. En alícuotas apropiadas de las fracciones se determinó radiactividad de [^{3}H] como medida del contenido proteico y la presencia de sustratos endógenos de la PK A, como se indica en Materiales y Métodos. Las fracciones señaladas con la barra se juntaron y se concentraron hasta 2 ml.

La Figura 14 muestra el perfil de elución de los péptidos y fosfopéptidos analizados por cromatografía en columna de filtración molecular P-2, provenientes de la digestión con subtilisina de fosfoproteínas del hongo.

Como puede observarse, los fosfopéptidos eluyeron como un pico agudo delante de los péptidos, cuyos pesos moleculares varían entre 1700 Da y 600 Da, aproximadamente.

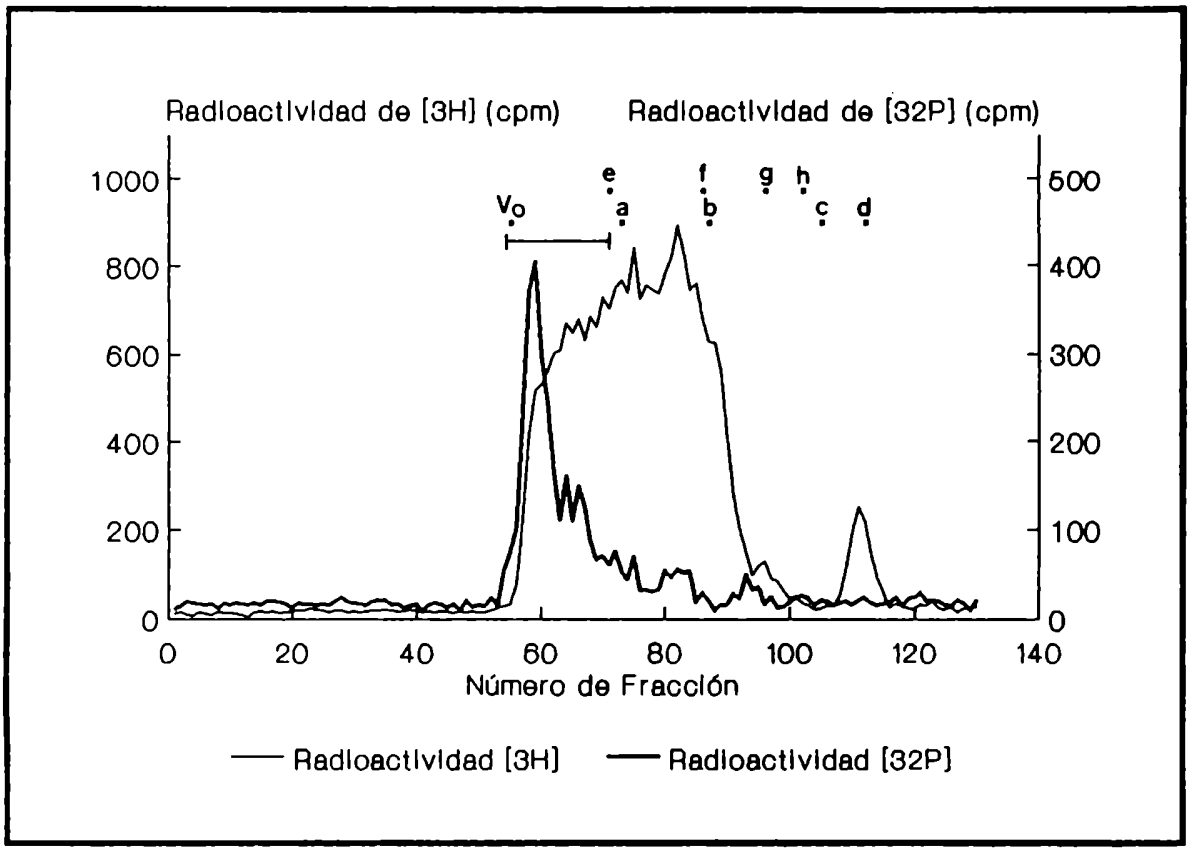


Figura 14: Análisis cromatográfico en columna de filtración molecular P-2 de péptidos y fosfopéptidos generados por digestión con subtilisina de fosfoproteínas de *S. platensis*. 1,3 mg de péptidos[$^{3}H/^{32}P$] se cromatografiaron en una columna de gel P-2 como se describe en Materiales y Métodos. En alícuotas de 15 µl de cada fracción se midió la radioactividad de [^{3}H] y de [^{32}P]. Las fracciones indicadas por la barra se concentraron y se usaron para los experimentos subsiguientes. Las letras indican las posiciones de elución de los siguientes estándares: **a**, vitamina B12; **b**, kémptido; **c**, Ser-Leu; **d**, leucina; **e**, fosfokémptido; **f**, Ala-Ser(P)-Leu-Gly; **g**, fosfoserina y **h**, fosfato inorgánico.

La Figura 15 muestra las curvas de calibración construídas con los estándares indicados en la Figura 14. Como puede observarse las moléculas cargadas negativamente eluyeron con un peso molecular aparente mayor que los estándares no cargados. Este hecho puede dar cuenta de la posición

cromatográfica de los fosfopéptidos respecto de los péptidos. Además, el mayor peso molecular promedio de los fosfopéptidos podría también deberse a un efecto protectivo del fosfato unido al péptido contra la degradación por subtilisina.

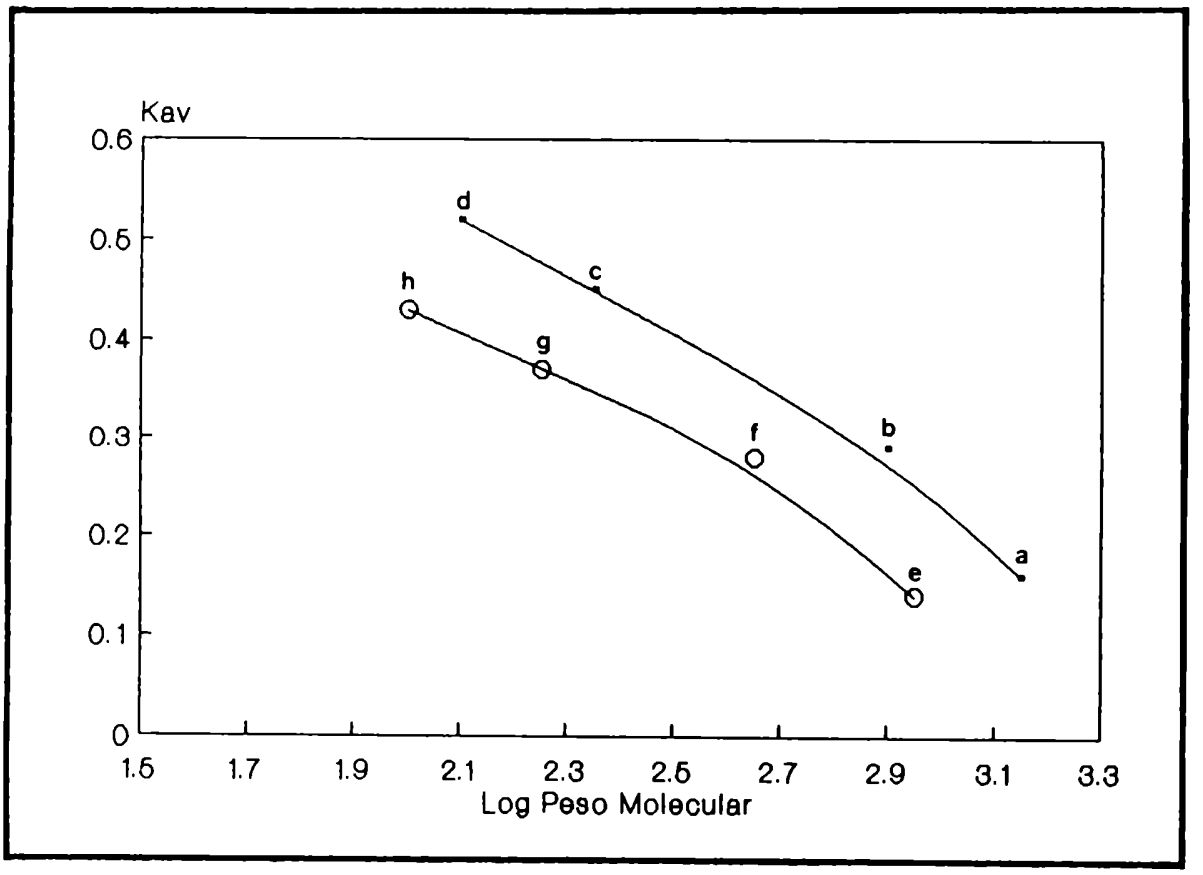


Figura 15: Calibración de la columna cromatográfica de gel P-2. La calibración se llevó a cabo con los estándares indicados en la leyenda de la Figura 14. Los símbolos llenos corresponden a moléculas no cargadas y los símbolos vacíos corresponden a moléculas cargadas negativamente.

La metodología experimental escogida para analizar la susceptibilidad de los péptidos al ataque de la Alanina aminopeptidasa reside en la separación cromatográfica de los productos de reacción en columna de gel P-2. Como se observa en la Figura 14 este sistema cromatográfico pudo resolver eficientemente la leucina de un dipéptido (Ser-Leu) y un heptapéptido (kémptido). Si se dispone de péptidos marcados con leucina[^{3}H], la cuantificación de la leucina[^{3}H] libre producida por acción de la enzima, puede ser tomada como medida de su actividad. A fin de validar tal diseño experimental, se investigó si durante la marcación *in vivo* de las proteínas del hongo con leucina[^{3}H], ésta se incorporó sin sufrir modificaciones, o si en cambio, fue metabolizada hacia otros aminoácidos. Se analizó por cromatografía ascedente un hidrolizado total de proteínas del hongo

marcadas *in vivo* con leucina[^{3}H] y se determinó que la radioactividad de [^{3}H] estaba asociada exclusivamente a leucina (resultados no mostrados).

Las fracciones indicadas por la barra en la Figura 14 previamente concentradas por liofilización, se incubaron con la Alanina aminopeptidasa y se cromatografiaron en una columna de gel P-2. Como se observa en la Figura 16 la Alanina aminopeptidasa fue capaz de hidrolizar un 60 % de los péptidos (dada la cantidad de leucina[^{3}H] libre producida) indicando la susceptibilidad de los mismos al ataque por la enzima del hongo.

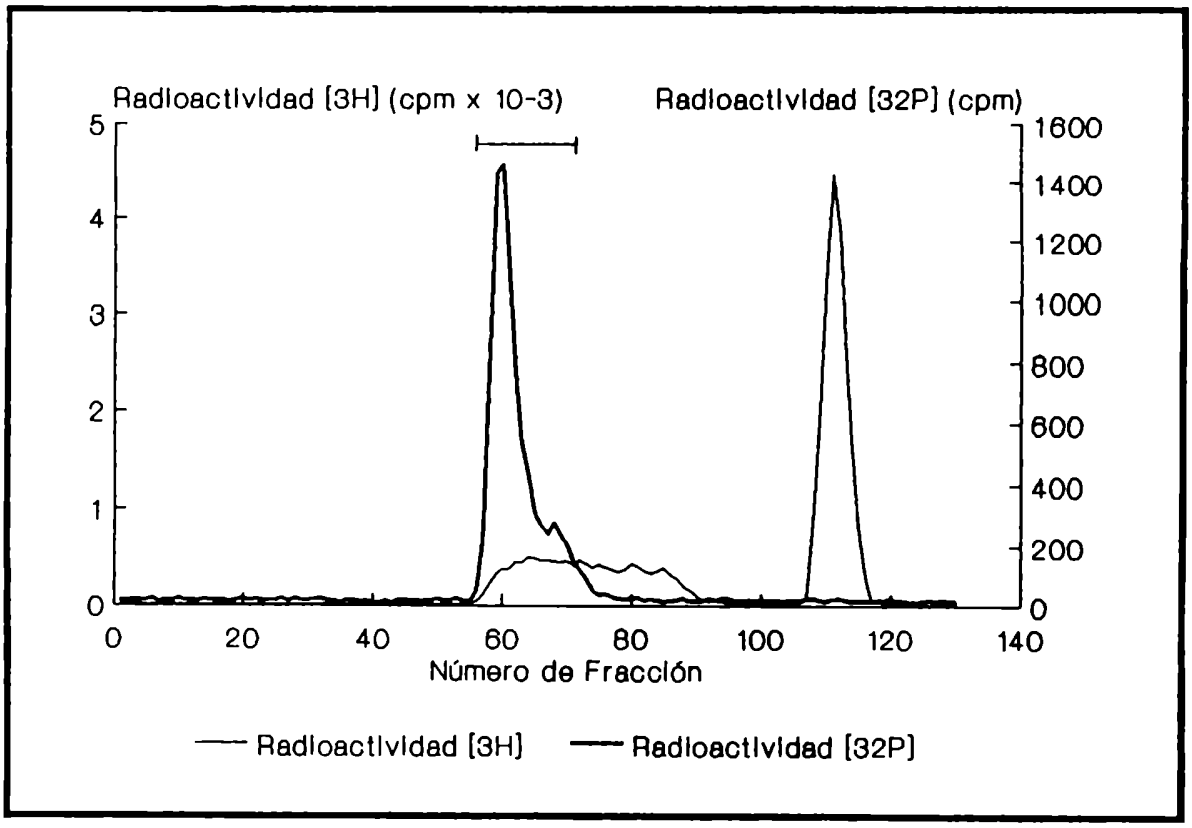


Figura 16: Análisis cromatográfico en columna de gel P-2 de los productos de degradación de péptidos y fosfopéptidos por acción de la Alanina aminopeptidasa. 590 µg de péptidos[^{3}H/^{32}P] se incubaron con 100 munidades de la Alanina aminopeptidasa purificada en un volumen final de 550 µl. Después de 3 horas de incubación a 30°C la mezcla de reacción fue procesada como se indica en Materiales y Métodos y cromatografiada en una columna de gel P-2. En alícuotas de 36 µl se midió radioactividad de [^{3}H] y de [^{32}P]. Las fracciones indicadas por la barra se juntaron y se utilizaron para experimentos subsiguientes.

La figura también muestra que el pico de fosfopéptidos permaneció prácticamente inalterado, sólo observándose un muy leve desplazamiento del

máximo del pico hacia pesos moleculares menores. No se detectó formación de fosfoserina ni de fosfotreonina por acción de la enzima.

Teniendo en cuenta que el 60 % de la radioactividad de [^{3}H] se liberó como leucina, la concentración de aminoácidos libres al final del período de incubación se estimó en 5 mM. Como se señaló en la *Sección C* la Alanina aminopeptidasa es fuertemente inhibida por concentraciones milimolares de aminoácidos, por lo cual los péptidos y fosfopéptidos remanentes podrían no ser estructuras peptídicas resistentes al ataque de la Alanina aminopeptidasa. Por consiguiente, las fracciones indicadas con la barra en la Figura 16 se concentraron y se reincubaron con la Alanina aminopeptidasa. Cuando los productos de reacción se analizaron por cromatografía en columna de gel P-2 (Figura 17) un 15 % de la radioactividad de [^{3}H] se recuperó como leucina libre mientras que no se observó cambio alguno en la distribución de la radioactividad de [^{32}P].

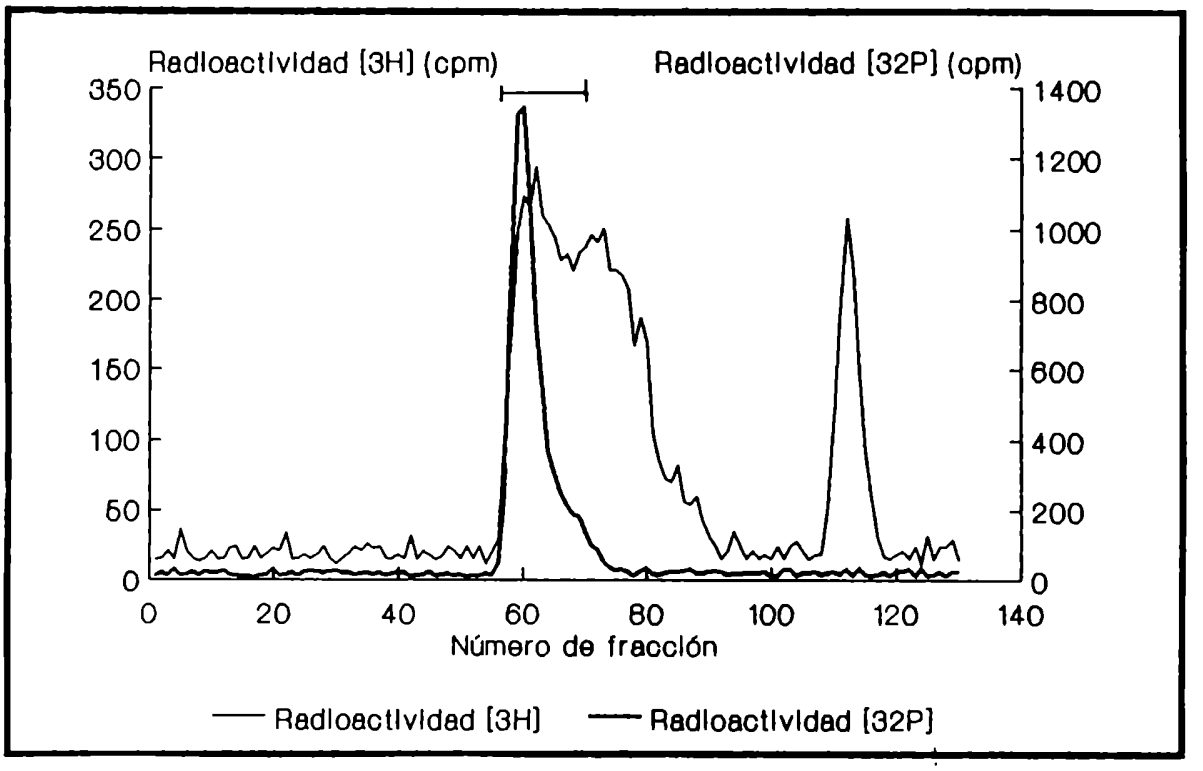


Figura 17: Análisis cromatográfico en columna de gel P-2 de los productos de degradación de péptidos y fosfopéptidos por acción de la Alanina aminopeptidasa. 130 µg de péptidos[^{3}H/^{32}P] se reincubaron con 50 munidades de la Alanina aminopeptidasa purificada en un volumen final de 550 µl. Después de 3 horas de incubación a 30°C la mezcla de reacción fue procesada como se indica en Materiales y Métodos y cromatografiada en una columna de gel P-2. En alícuotas de 38 µl se midió radioactividad de [^{3}H] y de [^{32}P]. Las fracciones indicadas por la barra se juntaron y se utilizaron para experimentos subsiguientes.

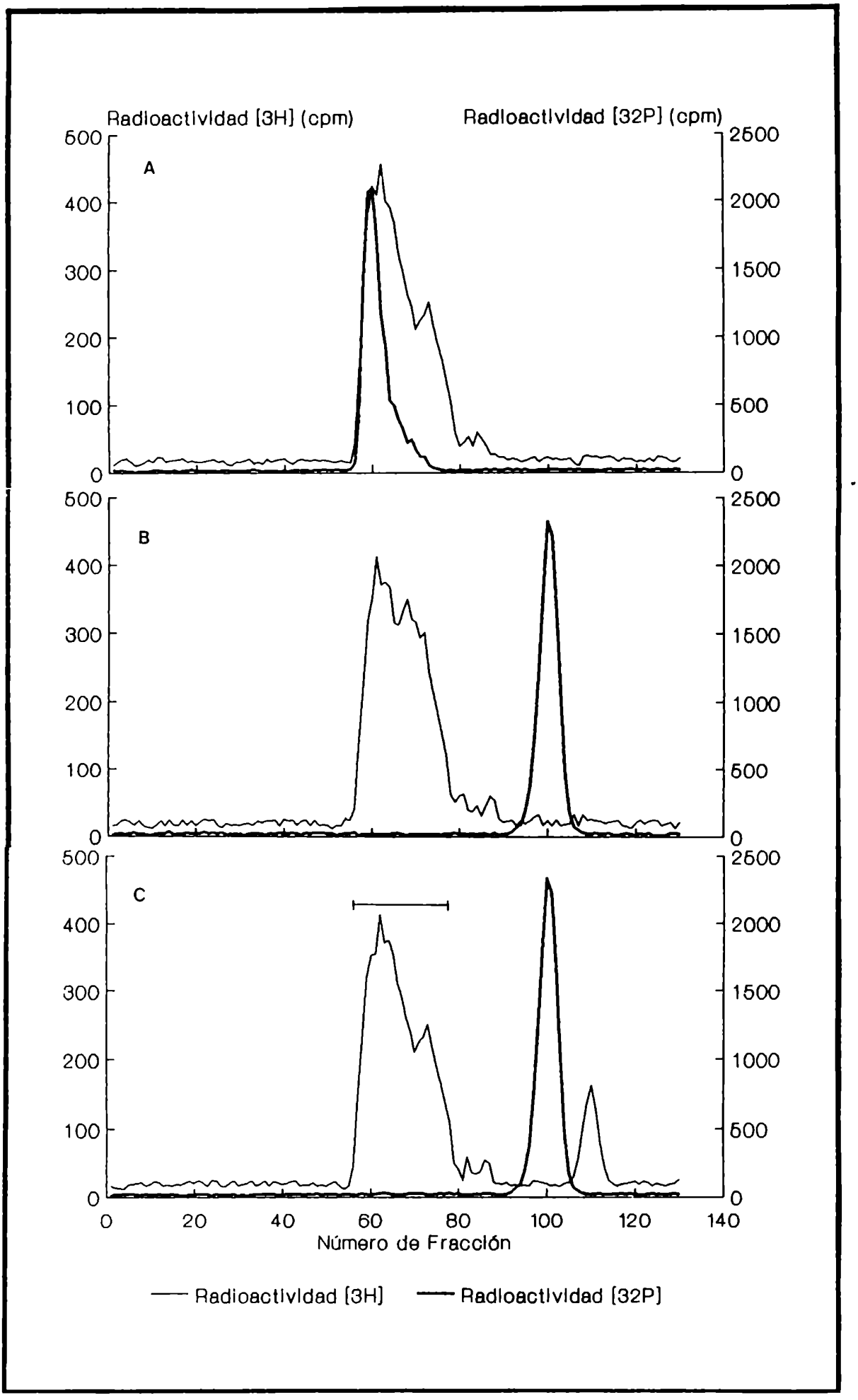
Las fracciones que contenían el pico de fosfopéptidos (indicadas por la barra) se juntaron y se concentraron por liofilización. Una tercera incubación de estos péptidos con la enzima del hongo no generó leucina libre (ver abajo), lo cual sugiere que estos péptidos deberían exhibir en su extremo N-terminal motivos peptídicos resistentes a la acción de la Alanina aminopeptidasa.

Dado que el perfil de distribución de radioactividad de [^{32}P] no se modificó en absoluto durante la segunda y tercer degradación por la Alanina aminopeptidasa (Figuras 17 y 18, A), y considerando también las evidencias obtenidas del estudio de la hidrólisis enzimática del kémptido y de su fosfoderivado, parece probable, entonces, que alguna de las restricciones impuestas al ataque enzimático fuera debido a la presencia en los péptidos de un residuo fosfoserina o fosfotreonina. A fin de verificar tal hipótesis, una alícuota de esta fracción resistente fue tratada con fosfatasa alcalina previo a la incubación con la enzima del hongo. Además se realizaron los siguientes controles: i) los péptidos resistentes incubados sólo con Alanina aminopeptidasa y ii) los péptidos incubados sólo con fosfatasa alcalina. La Figura 18 muestra los análisis cromatográficos de los respectivos productos de reacción.

Como se observa en el panel A la incubación de los péptidos sólo con la Alanina aminopeptidasa no llevó a la aparición de leucina libre, indicando el carácter resistente de los mismos. Cuando los péptidos se incubaron sólo con la fosfatasa alcalina (panel B) toda la radioactividad de [^{32}P] eluyó como fosfato sin detectarse aparición de leucina libre, señalando que la preparación de fosfatasa alcalina se encontraba libre de contaminación de actividades exopeptidásicas. De acuerdo con el comportamiento cromatográfico mostrado por moléculas cargadas y no cargadas (Figura 15), se observó un ligero cambio en el perfil de distribución de la radioactividad de [^{3}H].

Cuando los péptidos se incubaron con la Alanina aminopeptidasa, previa defosforilación por acción de la fosfatasa alcalina (panel C) se observa que, además de la liberación de toda la radioactividad de [^{32}P] como fosfato, un 12 % de la radioactividad de [^{3}H] eluyó como leucina libre, indicando que cuando los residuos fosfato fueron removidos, una fracción de los péptidos se hizo susceptible a la acción de la Alanina aminopeptidasa.

Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la presencia de fosfoaminoácidos en los péptidos afecta la susceptibilidad de los mismos a la degradación por la Alanina aminopeptidasa y que dicho efecto se revierte por la remoción del grupo fosfato.


Radioactividad [3H] (cpm)
Radioactividad [32P] (cpm)
A
B
C
500
400
300
200
100
0
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Número de Fracción
Radioactividad [3H]
Radioactividad [32P]

Si bien no se llevó a cabo la secuenciación de los fosfopéptidos resistentes a la Alanina aminopeptidasa a fin de poder determinar en que posición se encuentra el fosfoaminoácido en la cadena peptídica, se podrían asimilar los resultados obtenidos con ellos a los resultados obtenidos del estudio de la hidrólisis enzimática del fosfokémptido, en cuanto la Alanina aminopeptidasa fue capaz de hidrolizar los primeros aminoácidos N-terminales del fosfopéptido hasta alcanzar el residuo adjacente al fosfoaminoácido, es decir, cuando el fosfoaminoácido está en la posición P'_1. Este supuesto coincide con la observación del ligero desplazamiento del perfil de distribución de radioactividad de [^{32}P] de los péptidos generados por subtilisina después de la degradación por la Alanina aminopeptidasa (Figuras 14 y 16).

Como se mostró en la *Sección C* (Figura 9) sólo después de un largo período de incubación (más de diez horas) la Alanina aminopeptidasa fue capaz de hidrolizar el fragmento Ala-Ser(P)-Leu-Gly, generando dos productos fosforilados, uno de los cuales exhibió la misma movilidad electroforética que la fosfoserina. Parece probable, entonces, que la degradación *in vivo* de fosfopéptidos requiera de la participación de alguna actividad fosfatasa.

Como se observa en la Figura 18 panel C, una importante fracción de los péptidos permaneció resistente a la acción de la enzima aún después de la remoción de los grupos fosfato, indicando que otras características estructurales distintas de la presencia de un fosfoaminoácido pueden determinar el carácter resistente de estos péptidos al ataque de la Alanina aminopeptidasa. Estos péptidos, indicados por la barra (Panel C), se concentraron por liofilización y se sometieron a tres ciclos de degradación de Edman a fin de conocer su estructura N-terminal. En la primer ciclo de degradación se obtuvieron señales significativas de Val (80%) y Ala (20%). En el segundo y tercer ciclo de degradación sólo se detectaron señales significativas de Pro y Gly, respectivamente. Es importante señalar aquí que la población de péptidos con que se llevó a cabo este estudio era altamente heterogénea por razón de su origen, y que fue aislada en virtud de la resistencia a la degradación por la Alanina aminopeptidasa. En esta población, por lo tanto, estarían representadas sino todas, la mayoría de las estructuras peptídicas que no son sustrato o que son muy lentamente atacadas por la Alanina aminopeptidasa.

Las consideraciones recién expuestas podrían explicar la razón de la detección de múltiples señales menores, aparte de las mencionadas, en cada ciclo de degradación. Sin embargo, es importante señalar que la masa

correspondiente a cada una de estas señales fue en todos los casos diez a veinte veces menor que la masa de la señal principal ya mencionada.

De los resultados obtenidos de la secuenciación del N-terminal de los péptidos resistentes se destaca la presencia del residuo prolina en la segunda posición. Como ya se mencionó, la Leucina aminopeptidasa y la Alanina aminopeptidasa de membrana son incapaces de hidrolizar motivos X-Pro (Mentlein, 1988). También, la aminopeptidasa purificada de *Thermus aquaticus* no hidrolizó péptidos que poseían un residuo prolina en posición adjacente al residuo N-terminal (Minagawa y col., 1988). En coincidencia con estos hechos, se ha reportado para *S. cerevisiae* y para *S. pombe* la presencia citosólica de actividad dipeptidil aminopeptidasa, capaz de remover del extremo N-terminal de péptidos dipéptidos de estructura X-Pro (Achstetter y col., 1983; Suarez Rendueles y col., 1991).

El uso de una población de péptidos heterogéneos como sustrato de la Alanina aminopeptidasa resultó sumamente útil para avanzar en el estudio de la enzima y de su participación en el metabolismo de péptidos. Primero, permitió demostrar que la imposibilidad de la enzima para progresar sobre un fosfopéptido no está limitada al modelo del fosfokémptido. Segundo, aportó evidencias que sostienen la propuesta ya formulada que la enzima en estudio es la principal actividad aminopeptidasa del hongo, dado que la enzima purificada fue capaz de hidrolizar un 67 % de los péptidos. Tercero, puso en evidencia que la especificidad de sustrato de la Alanina aminopeptidasa, si bien es amplia, no es irrestricta.

SECCION E: PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA

Como se mencionó en la *Sección B,* en extracto solubles de *S. platensis* se detectó actividad aminopeptidásica sobre Glu-pNA. El análisis cromatográfico en columna de DEAE-Sephacel de las proteínas solubles del hongo, reveló la presencia de tres picos de actividad hidrolítica sobre Glu-pNA.

Dado que la Alanina aminopeptidasa no exhibió actividad medible sobre Glu-pNA, resultó de interés estudiar las actividades hidrolíticas sobre Glu-pNA a fin de obtener una imagen más completa de la batería enzimática del hongo, responsable de la degradación de péptidos.

PURIFICACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA

La Tabla VII resume una marcha de purificación típica, llevada a cabo según se detalla en Materiales y Métodos. La Glutámico aminopeptidasa fue purificada 80 veces con un rendimiento aproximado del 6%.

TABLA VII

PURIFICACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA

Fracción	Actividad total (mU) [a]	Recuperación (%)	Proteína (mg)	Actividad específica (mU/mg)	Purificación (veces)
S-100	4603	100	279	16.5	1
S-55 %	3084.6	67	129.8	23.7	1.44
fenil-Sepharosa	1214.6	26	28.4	42.7	2.6
DEAE-Sephacel	521	11.3	2.7	193	11.7
Sephacryl S-200 HR	258	5.6	0.2	1290	78.2

[a] Una miliunidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 nmol de p-nitronilina por minuto a 30°C

En la fracción sobrenadante de 55 % de saturación con sulfato de amonio se detectó actividad aminopeptidásica sólo sobre Glu-pNA. Esta fracción, diluída hasta 1 M sulfato de amonio se cromatografió en columna de fenil-Sepharosa. La enzima eluyó como un único pico en el gradiente de etilenglicol. Cuando esta fracción se analizó por cromatografía en columna de DEAE-Sephacel, se detectaron dos picos de actividad hidrolítica sobre

Glu-pNA (Figura 19). Como se puede observar el pico que eluyó a 50 mM ClNa presentó una forma simétrica característica (pico I), no así en cambio el pico que eluyó a 100 mM ClNa (pico II).

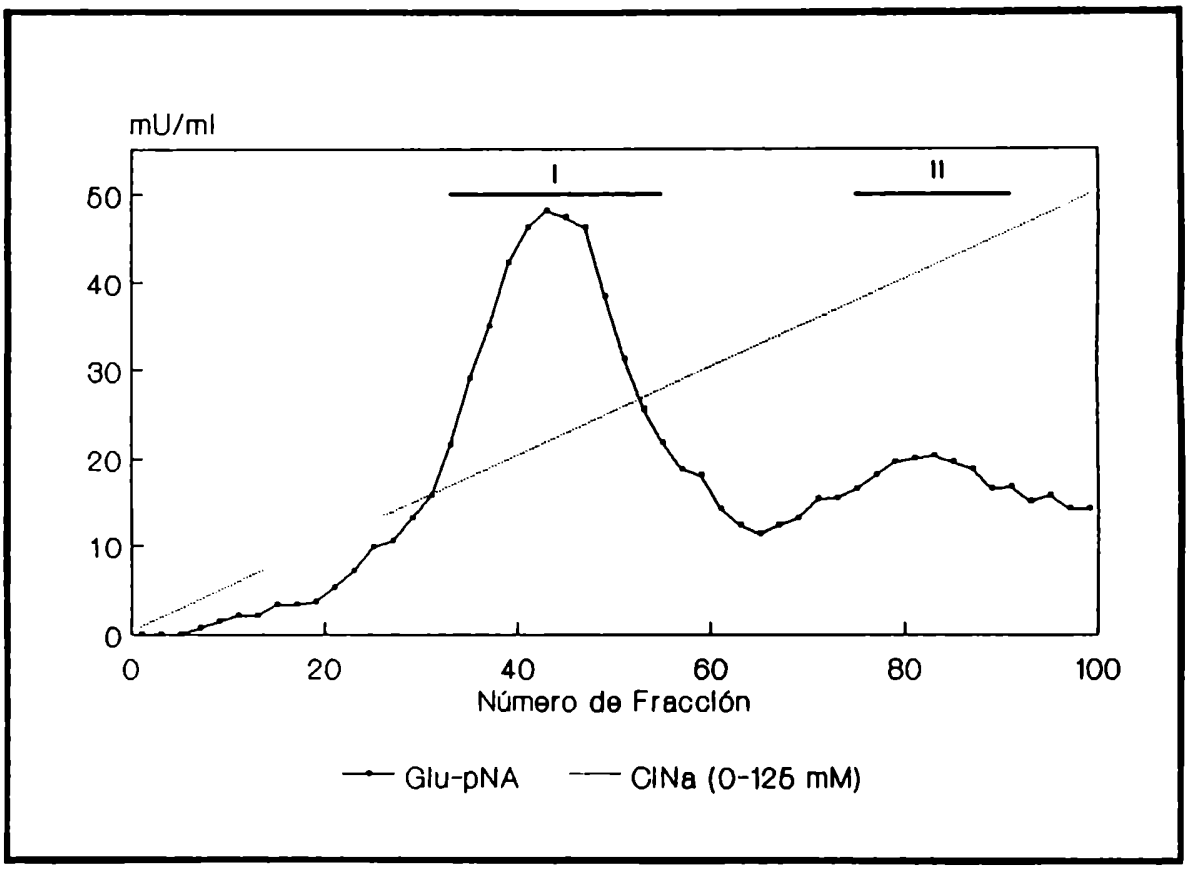
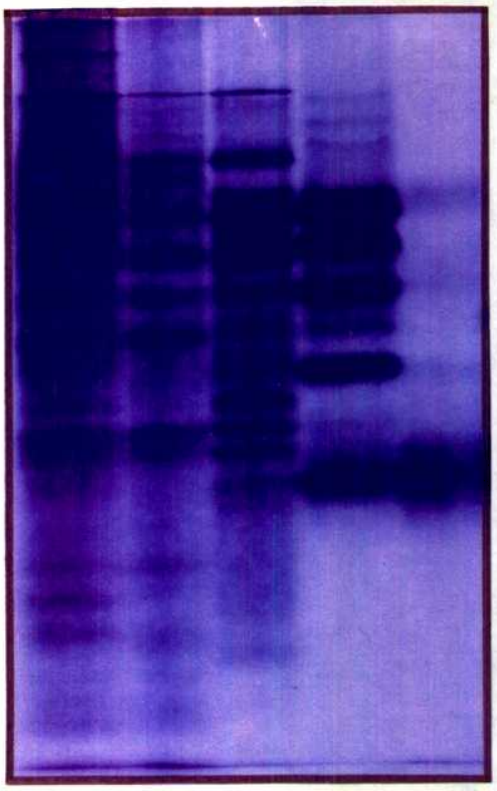


Figura 19: Análisis cromatográfico en columna de DEAE-Sephacel de la preparación de Glutámico aminopeptidasa correspondiente a la fracción fenil-Sepharosa. La cromatografía en columna de DEAE-Sephacel se llevó a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. En alícuotas apropiadas de cada fracción se midió actividad enzimática. Pico I: fracciones 33-55; Pico II: fracciones 75-89.

Se escogieron las fracciones correspondientes al pico I para continuar con la purificación. La Figura 20 muestra el análisis electroforético de las distintas fracciones de la marcha de purificación. La fracción correspondiente al último paso de purificación (Sephacryl S-200 HR) exhibió otras bandas proteicas adicionales a la banda principal, que coincidió con el pico de actividad. Los intentos de alcanzar la homogeneidad de la enzima utilizando geles nativos fueron infructuosos dada la bajísima recuperación de actividad.



← Actividad
Glutámico Aminopeptidasa

Figura 20: Análisis electroforético de las fracciones de actividad Glutámico aminopeptidasa obtenidas durante la purificación enzimática. Alícuotas correspondientes a cada etapa de la purificación se analizaron por electroforesis en gel plano de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturalizantes (Davis, 1964). El gel fue precorrido a 4°C en buffer 100 mM Tris-ClH pH 8,8 durante 1 hora a 25 mA después de al menos 8 horas de haber sido armado. Calle 1: Extracto soluble (100 µg). Calle 2: Sobrenadante de 55 % de saturación con sulfato de amonio (50 µg). Calle 3: fenil-Sepharosa (50 µg). Calle 4: DEAE-Sephacel (50 µg). Calle 5: Sephacryl S-200 HR (15 µg). Las proteínas se tiñieron con reactivo azul de Coomasie R-250. Una calle adicional se sembró con 15 µg de proteína correspondiente a la fracción Sephacryl S-200 HR y finalizada la corrida electroforética se separó del resto del gel para ser utilizada en la medición de actividad enzimática. Esta calle se cortó en tiras de 2 mm de ancho que se incubaron con 100 µl de buffer 30 mM Tris-ClH pH 7,2 3 mM DTT a 30°C durante 20 minutos y se midió actividad enzimática en cada fracción como se indica en Materiales y Métodos.

La purificación de esta enzima resultó muy dificultosa, dado que exhibió una marcada inestabilidad. Como se analiza con detalle más adelante la

enzima requirió para su actividad de al menos un grupo sulfhidrilo reducido ya que se observó que el agregado de DTT previene una mayor inactivación. Así, todas las etapas de purificación se llevaron a cabo en presencia de DTT 1 mM. Además se observó inactivación de la enzima por almacenamiento a 4°C o a -20°C. Por ello, a fin de obtener porcentajes de recuperación de actividad aceptables se evitó el almacenamiento durante la purificación. Asimismo, en el diseño del esquema de purificación no se incluyó diálisis, ya que también se pudo determinar una pérdida importante de actividad durante este proceso.

Las fracciones enzimáticas correspondientes al pico II de la cromatografía en DEAE-Sephacel (Figura 19) se analizaron por cromatografía en columna de Sephacryl S-200 HR. La posición cromatográfica de esta actividad fue la misma que la exhibida por la actividad del pico I (Figura 21). Estos resultados, junto a la evidencia obtenida durante la cromatografía en columna de Fenil-Sepharosa, en que la actividad hidrolizante de Glu-pNA eluyó como un único pico, sugieren que los dos picos de actividad obtenidos en la cromatografía en DEAE-Sephacel corresponden a una única especie enzimática. Además, la susceptibilidad de ambas fracciones (pico I y pico II) a inhibidores de proteasas fue similar. Se desconoce aún si estas dos formas de la enzima existen *in vivo* o si representan artificios generados durante la preparación del extracto o durante la purificación.

CARACTERIZACION DE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA

PESO MOLECULAR

Se estimó el peso molecular de la Glutámico aminopeptidasa a partir de su volumen de elución de una columna de filtración molecular Sephacryl S-200 HR calibrada con proteínas de peso molecular conocido (Figura 21). El promedio de dos determinaciones independientes indicó un peso molecular aproximado de 22 kDa.

Un análisis similar se realizó con la actividad Glutámico aminopeptidasa correspondiente al pico II del DEAE-Sephacel (Figura 19) estimándose el mismo peso molecular.

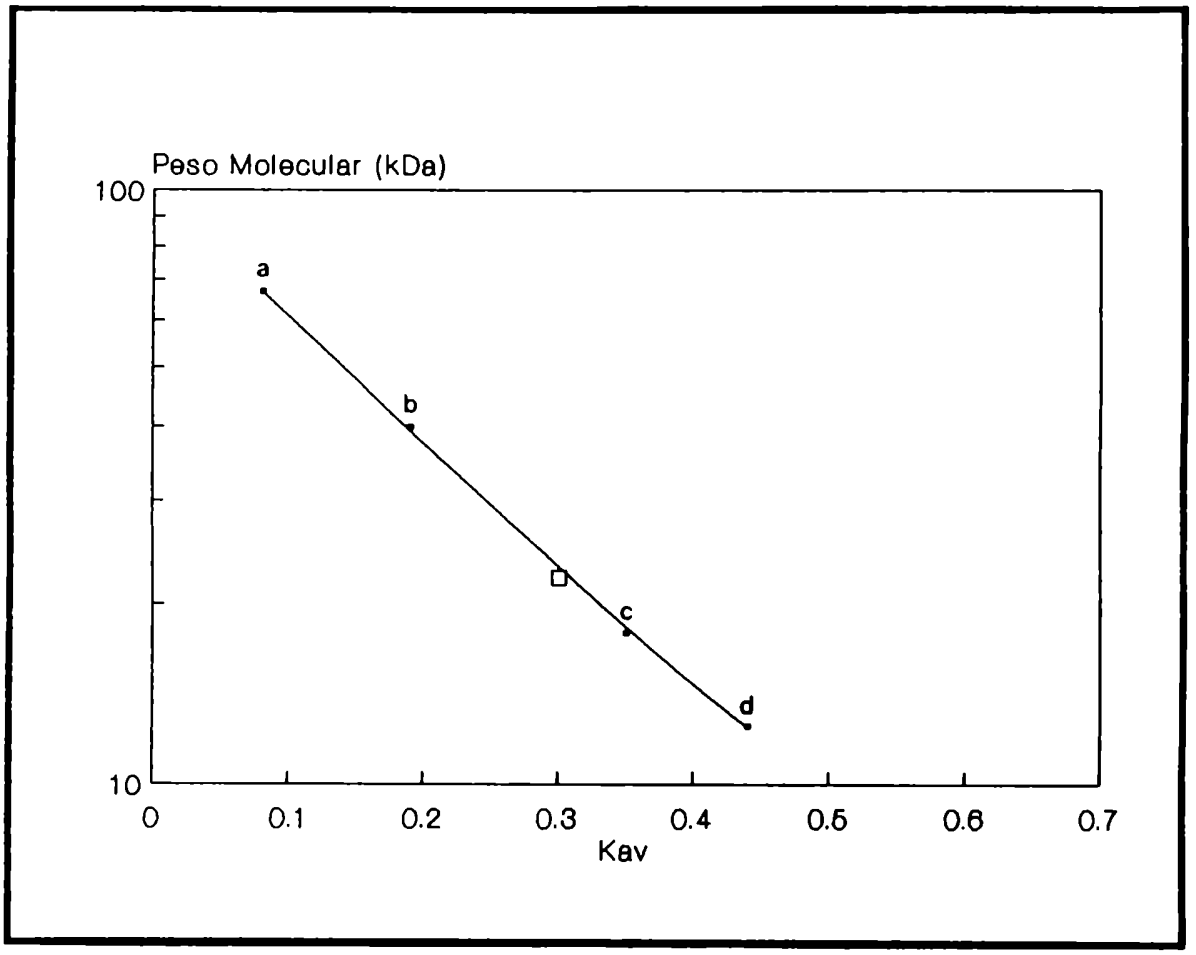


Figura 21: Estimación del peso molecular de la Glutámico aminopeptidasa. Aproximadamente 100 mU de la Glutámico aminopeptidasa correspondiente al Pico I o al pico II de la cromatografía en DEAE-Sepahacel (Figura 21) se analizaron por cromatografía de filtración molecular en una columna precalibrada de Sephacryl S-200 HR en condiciones idénticas a las descriptas en Materiales y Métodos (Purificación de la Glutámico aminopeptidasa).Las proteínas utilizadas como marcadores y sus respectivos pesos moleculares fueron las siguientes: **a**, seroalbúmina bovina, 67 kDa; **b**, peroxidasa (rábano picante), 39,8 kDa; **c**, mioglobina (músculo equino), 17,8 kDa y **d**, citocromo C (corazón equino),12,5 kDa. El Kav se calculó como Ve-Vo/Vt-Vo, siendo Vt el volumen total de la columna, Vo el volumen de elución del azul de dextrano y Ve el volumen de elución de las proteínas. El símbolo abierto indica la posisicón de la Glutámico aminopeptidasa.

DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON EL pH

Se analizó la dependencia de la actividad enzimática con el pH en el rango 5,2-8,8. Como se observa en la Figura 22 el rango de pH óptimo fue 7,2-8,0.

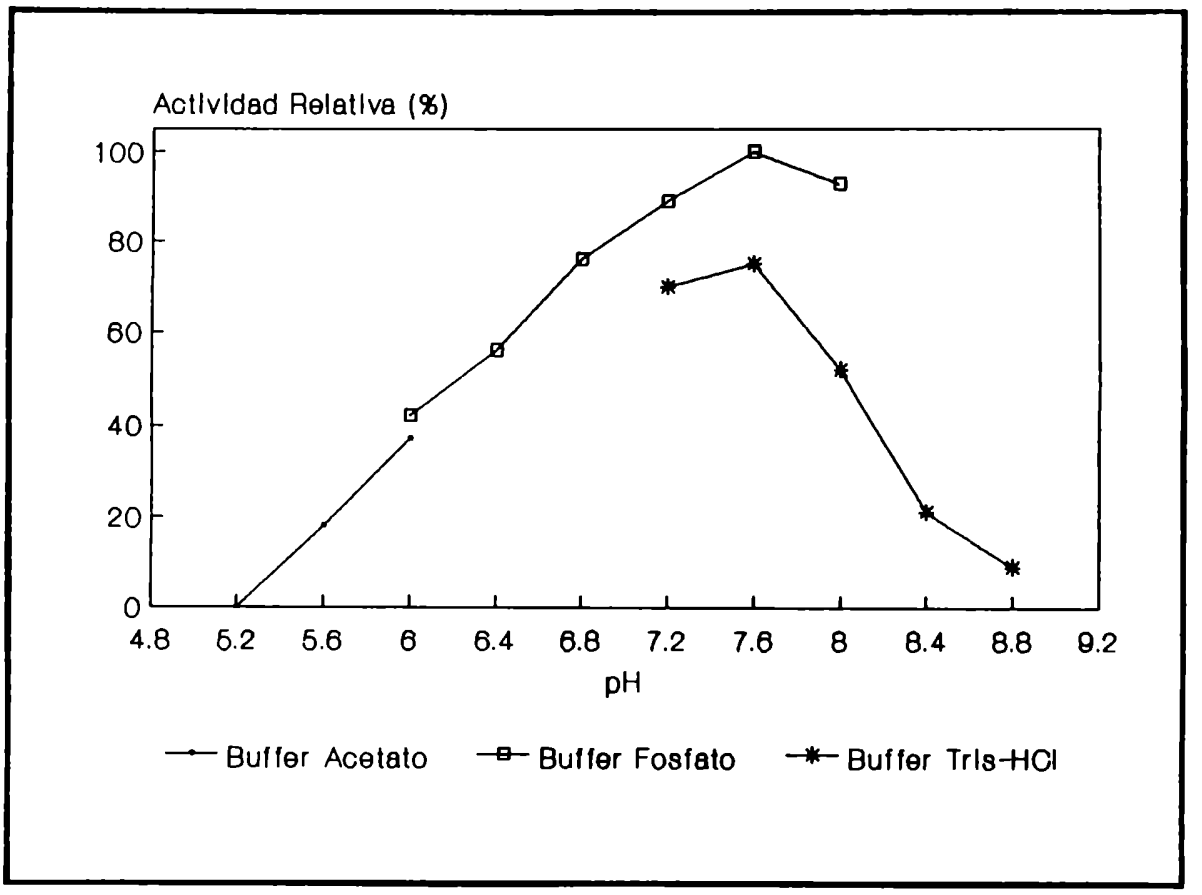


Figura 22: Efecto del pH sobre la actividad Glutámico aminopeptidasa. Se ensayó la actividad enzimática de 1 µg de aminopeptidasa purificada a 30°C durante 30 min en 1 ml de los distintos buffers indicados conteniendo 1 mM Glu-pNA. La cantidad de p-nitroanilina liberada se determinó según se detalla en Materiales y Métodos.

EFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA

En la Tabla VIII se muestra el efecto de varios inhibidores sobre la actividad enzimática. Compuestos mercuriales tales como el Cl_2Hg y p-CMB, fueron potentes inhibidores de la aminopeptidasa, indicando la necesidad de un residuo sulfhidrilo para la actividad enzimática. Además el DTT (1mM) revirtió casi completamente la inhibición por p-cloromercuribenzoato. La insensibilidad de la enzima al E-64 (60 µM) señala que dicho sulfhidrilo no es de sitio activo, descartándose, entonces que se trate de un cisteín-enzima.

La 1,10-fenantrolina (2 mM) inhibió fuertemente la actividad enzimática, en cambio el EDTA (10 mM), sólo la inhibió parcialmente después de 24 hs de preincubación.

TABLA.VIII

EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMICO AMINOPEPTIDASA.

Inhibidor	Concentración [a]	Actividad relativa [b] (%)
Cl_2Hg	50 µM	0
p-CMB	50 µM	0
+ DTT	50 µM	15
+ DTT	500 µM	85
+ DTT	1 mM	92
1,10-fenantrolina	1 mM	25
	2 mM	6
EDTA	10 mM	93
	10 mM (24 hs)	57
E-64	60 µM	100
Bestatina	50 µM	7
PMSF	1 mM	74
Zn^{2+}	0.1 mM	1
Co^{2+}	0.1 mM	60
	0.5 mM	2
Mn^{2+}	0.1 mM	35
	0.5 mM	5
	1 mM	2

[a] Una miliunidad de enzima purificada se preincubó 30 min a 4°C con el inhibidor a la concentración indicada en 990 µl de buffer 30 mM Tris-ClH pH 7,4.

[b] Se inició la reacción con el agregado de 10 µl de Glu-pNA 100 mM y se incubó 30 min a 30°C. La cantidad de p-nitroanilina liberada se determinó según se detalla en Materiales y Métodos.

Al igual que muchas otras aminopeptidasas, la enzima fue sensible a la bestatina (50 µM).

Estos resultados sugieren, aunque no prueban, que la Glutámico aminopeptidasa purificada es una metaloenzima, al igual que la mayoría de las aminopeptidasas conocidas. La comprobación definitiva del carácter metálico de la enzima requeriría de estudios de quelación del putativo metal y reactivación por el agregado de metales.

ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

Como ya se señaló, esta aminopeptidasa presenta actividad hidrolítica sólo sobre el Glu-pNA. Se determinó la Km para el Glu-pNA a partir de un gráfico de Lineaweaver-Burk. Su valor se estimó en 190 µM.

Se intentó estudiar la especificidad de la enzima sobre los β-naftilamida-derivados del ácido glutámico y del ácido aspártico. Se intentó preparar soluciones stock de los dos aminoácidos cromogénicos según protocolos habituales (dimetilsulfóxido, dimetilformamida y ácido acético al 2 %, v/v) pero con ninguno de estos solventes se logró disolver los sustratos. Se pudieron preparar soluciones stock utilizando información brindada por el servicio técnico de la firma expendedora (Sigma Co.). Sin embargo, al intentar la dilución de las soluciones stock en el buffer de ensayo (30 mM Tris-ClH pH 7,2 1 mM DTT) como asimismo en otros buffers (fosfato, bis-Tris-propano o Tris) de variadas concentraciones y de variados pH, los sustratos precipitaron.

En contrario a lo esperado, no se observó hidrólisis de los dipéptidos Asp-Ala y Glu-Ala por acción de la Glutámico aminopeptidasa. A partir de este resultado puede pensarse que la enzima en estudio exhibiría una especificidad particular para el aminoácido adjacente al residuo ácido N-terminal. Dado el carácter hidrofóbico del residuo p-nitroanilida, y que el Glu-pNA es clivado por la enzima, entonces podrían explicarse estos resultados postulando que la especificidad del sitio correspondiente al segundo aminoácido (S'_1) sería para residuos grandes e hidrofóbicos preferencialmente.

Evaluando en su totalidad la información obtenida sobre las características de esta enzima se destaca la capacidad de hidrolizar entre una variedad de aminoácidos cromogénicos ensayados, sólo Glu-pNA , y por tal motivo se la llamó Glutámico aminopeptidasa. No se ha reportado aún en otros organismos eucariontes inferiores una actividad con tal característica. Se ha descripto en *S. cerevisiae* la presencia de dos actividades aminopeptidasas capaces de clivar Glu-pNA, pero ambas capaces también de hidrolizar otros aminoácidos-pNA. Una de ellas, llamada Bleomicina hidrolasa, es una cisteín-enzima, inhibible por E-64 e insensible a la bestatina, de 220 kDa de peso molecular formada por 4 subunidades idénticas de 55 kDa (Enenkel y Wolf, 1993). La otra llamada aminopeptidasa XVI, es una típica aminopeptidasa, inhibible por bestatina y agentes quelantes de metales, y constituída por un único polipéptido de 45-50 kDa de peso molecular (Tisljar y Wolf, 1993). Por lo tanto, la especificidad de sustrato, el peso molecular y el perfil de inhibición,

distinguen claramente la Glutámico aminopeptidasa purificada de *S. platensis* de las aminopeptidasas con actividad sobre Glu-pNA presentes en *S. cerevisiae*. Se ha reportado la presencia en riñón de perro de un aminopeptidasa soluble con especificidad sólo para los β-naftilamida derivados del ácido aspártico y del ácido glutámico (Cheung y Cushman, 1971). Esta enzima es activable por Mn^{2+}, mientras que la enzima del hongo fue fuertemente inhibida por el mismo catión.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la existencia de una aminopeptidasa mayoritaria, llamada Alanina aminopeptidasa, en el ascomicete *Saccobolus platensis*. Esta actividad, presente en extractos solubles, fue purificada a homogeneiedad aparente y caracterizada.

La enzima posee un peso molecular aproximado de 90 kDa y está constituída por único polipéptido. La actividad hidrolítica de la enzima medida sobre el fosfokémptido o el Ala-pNA exhibe un máximo en el rango de pH 7,4-7,6, lo cual sugiere la localización citosólica de la misma.

Del estudio comparativo de las propiedades físicas y bioquímicas de la Alanina aminopeptidasa con las de otras aminopeptidasas bien caracterizadas de organismos eucariontes inferiores no surge ninguna homología destacable, a excepción de las características más comunes de las aminopeptidasas (v.g. inhibición por bestatina y por quelantes de metales). Si bien el carácter de metalo-enzima de la Alanina aminopeptidasa no ha sido inequívocamente demostrado, estas mismas características típicas sugieren que la Alanina aminopeptidasa, como el común de las aminopeptidasas, es una metalo-enzima.

La sensibilidad de la enzima a reactivos de grupo tiol indica la existencia de un residuo sulfhidrilo esencial para la actividad. Dado que la Alanina aminopeptidasa no fue inhibida por E-64, un reactivo específico para cisteína de sitio activo, se descarta la posibilidad que se trate de un cisteín-proteasa.

Las evidencias obtenidas a lo largo de este trabajo permiten suponer que la Alanina aminopeptidasa juega un rol central en la degradación final de péptidos.

Así, esta enzima es la única actividad detectada en extractos solubles del hongo capaz de hidrolizar al fosfokémptido y a una serie de aminoácidos cromogénicos (los p-nitroanilida derivados de los aminoácidos alanina, leucina, metionina, lisina, arginina, fenilalanina, prolina y glicina). Además, la enzima también es capaz de hidrolizar los siguientes dipéptidos: Ser-Leu, Glu-Ala y Asp-Ala. Estos resultados indican la amplia especificidad de sustrato que exhibe la enzima. En coincidencia con esto, la Alanina aminopeptidasa fue capaz de hidrolizar el 70 % de una población heterogénea de péptidos, generados *in vitro* por digestión con subtilisina de proteínas del hongo. Además, los valores de las constantes Km y Ki del fosfokémptido y del kémptido, respectivamente, indican la gran afinidad que posee la enzima por estos dos péptidos.

El uso del fosfokémptido (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser(P)-Leu-Gly) como sustrato de la Alanina aminopeptidasa reveló una característica muy interesante y novedosa de esta actividad enzimática. La Alanina aminopeptidasa de *S. platensis* es capaz de progresar rápidamente sobre el fosfopéptido acumulándose un producto fosforilado, el cual resulta muy mal sustrato de la enzima. Este producto se aisló y purificó, pudiéndose determinar que su estructura corresponde al fragmento Ala-Ser(P)-Leu-Gly. Sólo después de una incubación prolongada con la Alanina aminopeptidasa se detecta la formación de trazas de dos productos fosforilados menores, uno de los cuales exhibe la movilidad electroforética de la fosfoserina.

El kémptido sin fosforilar, en cambio es rápidamente degradado hasta aminoácidos libres por la enzima. Estas evidencias en conjunto indican que la presencia del fosfato impone a la Alanina aminopeptidasa una restricción al progreso de su actividad sólo sobre la unión peptídica en la cual está involucrado el fosfoaminoácido. Si bien no se han realizado estudios cuantitativos para determinar si la presencia del fosfato afecta la velocidad de hidrólisis de los primeros aminoácidos N-terminales del fosfokémptido (Leu-Arg-Arg-), comparadas a las del kémptido sin fosforilar, los resultados presentados en este trabajo sugieren que son comparables. Puede pensarse, entonces, que la naturaleza del residuo adjacente al aminoácido N-terminal (P'_1) debe ser una importante característica de los péptidos para ser reconocidos como sustratos por la Alanina aminopeptidasa. Otras evidencias experimentales avalan tal hipótesis: 1) la incapacidad de la enzima de hidrolizar el ácido glutámico-p-nitroanilida, mientras que sí hidroliza el dipéptido Glu-Ala; 2) el análisis de secuencia del extremo N-terminal de una población heterogénea de péptidos resistentes a la hidrólisis enzimática muestra que para la posición adjacente al residuo N-terminal se detecta casi exclusivamente señal de prolina.

El estudio del efecto de la fosforilacción del sustrato sobre la actividad Alanina aminopeptidasa se extendió a fosfopéptidos generados por digestión con subtilisina de proteínas del hongo fosforiladas *in vitro* por la PK A, confirmándose que la presencia de un grupo fosfato sobre el sustrato peptídico impide o dificulta marcadamente el progreso de la actividad sobre el mismo.

Dado que al momento de realizarse estos experimentos no se conocían antecedentes en la literatura que reportaran el efecto de alguna modificación post-traduccional de los sustratos, *v.g.* fosforilación, sobre alguna actividad aminopéptidásica, se extendió este estudio a otras aminopeptidasas, tales como la aminopeptidasa N de *E. coli* y la Leucina aminopeptidasa de mamíferos. Las dos enzimas exhibieron un comportamiento

idéntico a la enzima de *S. platensis*, en tanto ambas también fueron capaces de degradar completamente al kémptido hasta aminoácidos libres mientras que la hidrólisis exhaustiva del fosfokémptido llevó a la acumulación de un producto fosforilado cuya secuencia también resultó ser Ala-Ser(P)-Leu-Gly (Hammerschmidt, P., 1990; Samela, A.,1993).

Además de la Alanina aminopeptidasa, se han detectado al menos otras dos actividades aminopeptidásicas por análisis cromatográfico de extractos solubles del hongo y ensayo de actividad sobre aminoácidos cromogénicos. Se purificó y caracterizó parcialmente una de ellas, que poseee una característica muy peculiar, la de hidrolizar sólo el derivado del ácido glutámico entre la serie de aminoácidos cromogénicos ensayados, por lo cual se la llamó Glutámico aminopeptidasa. La enzima exhibió una marcada inestabilidad lo cual dificultó la purificación completa de la misma. La enzima tiene un peso molecular aproximado de 22 kDa y la actividad hidrolítica sobre el Glu-pNA presenta un máximo a pH 7,6. La enzima posee al menos un residuo sulfhidrilo esencial para su actividad, sin embargo no es sensible al E-64, por lo cual se descarta que se trate de una cisteín-proteasa. La sensibilidad de la enzima a la 1,10-fenantrolina sugiere que la misma pertenece a la clase de las metalo-proteasas, como es el caso de la mayoría de las aminopeptidasas ya estudiadas. La Glutámico aminopeptidasa es también inhibible por bestatina. Tampoco esta enzima exhibe alguna homología manifiesta con alguna otra aminopeptidasa caracterizada en eucariontes inferiores.

La segunda actividad detectada es capaz de hidrolizar sólo los p-nitroanilida derivados del ácido glutámico y de la prolina. Aún no se ha estudiado esta última actividad, por lo cual se ignora si ambas actividades hidrolíticas residen en la misma molécula o corresponden a proteínas distintas.

BIBLIOGRAFIA

Achstetter, T., Ehmann, C. y Wolf, D. H. (1981) Arch. Biochem. Biophys. **207**, 445.

Achstetter, T., Ehmann, C. y Wolf, D. H. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. **109**, 341.

Achstetter, T., Ehmann, C. y Wolf, D. H. (1983) Arch. Biochem. Biophys. **226**, 292.

Achstetter, T., Emter, O., Ehmann, C. y Wolf, D. H. (1984, a) J. Biol. Chem. **259**, 13334.

Achstetter, T., Ehmann, C., Osaki, A. y Wolf, D. H. (1984, b) J. Biol. Chem. **259**, 13344.

Achstetter, T., Ehmann, C. y Wolf, D. H. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 4585.

Arbesú, M. J., Gascon, S., y Suarez Rendueles, P. (1991) Yeast **7**, 525.

Arbesú, M. J., Valle, E., y Suarez Rendueles, P. (1993) Yeast **9**, 637.

Auld, D. S. (1988,a) Meth. Enzymol. **158**, 13.

Auld, D. S. (1988,b) Meth. Enzymol. **158**, 71.

Bachmair, A., Finley, D. y Varshavsky, A. (1986) Science **234**, 179.

Bartel, B., Wunning, I. y Varshavsky, A. (1990) EMBO J. **9**, 3179.

Beck, I., Fink, G. y Wolf, D. H. (1980) J. Biol. Chem. **255**, 4821.

Benore-Parsons, M., Seidah, N. G. y Wennogle L. P. (1989) Arch. Biochem. Biophys. **272**, 274.

Betz, H. y Weiser, U. (1976) Eur. J. Biochem. **62**, 65.

Blumenfeld, N., Gonen, H., Mayer, A., Smith, C. E., Siegel, N. R., Schwartz, A. L. y Ciechanover, A. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 9574.

Bohni, P. C., Deshaies, R.J. y Schekman, R. W. (1988) J. Cell. Biol. **106**, 1035.

Bond, J. S. y Butler, E. (1987) Ann. Rev. Biochem **56**, 333.

Botbol, V. y Scornik, O. A. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 13504.

Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. **72**, 248.

Bramucci, M., Miano, A. y Amici, D. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. **183**, 474.

Brown, J. L. y Roberts, W. K. (1976) J. Biol. Chem. **251**, 1009.

Buchler, M., Tisljar, U., y Wolf, D. H. (1994) Eur. J. Biochem. **219**, 627.

Burley, S. K., David, P. R., y Lipscomb, W. N. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 6919.

Burley, S. K., David, P. R., Sweet, R. M., Taylor, A. y Lipscomb, W. N. (1992) J. Mol. Biol. **224**, 113.

Caprioglio, D. R., Padilla, C., y Werner-Washburne, M. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 14310.

Carpenter, F. H. y Vahl, J. M. (1973) J. Biol. Chem. **248**, 294.

Ciechanover A., y Schwartz, A. L. (1994) FASEB J. **8**, 182.

Cooper, A. y Bussey, H. (1989) Mol. Cell. Biol. **9**, 2706.

Cueva, R., García Alvarez, N. y Suarez Rendueles, P. (1989) FEBS Lett. **259**, 125.

Chang, Y. y Smith, J. A. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 6979.

Chang, Y., Teichert, U. y Smith J. A. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 19892.

Chang, Y., Teichert, U. y Smith J. A. (1992) J. Biol. Chem. **267**, 8007.

Chen, M. y Stracher, A. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 14282.

Cheung, H. S. y Cushman, D. W. (1971) Biochim. Bhiophys. Acta **242**, 190.

Davies, K. J. A. (1993) Biochem. Soc. Trans. **21**, 346.

Davis, B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. **121**, 404.

Delmas, B., Gelfi, J., Kut, E., Sjostrom, H., Noren, O., y Laude, H. (1994) J. Virol. **68**, 5216.

Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. y Rechsteiner M. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 7059.

Dice, J. F. (1990) Trends Biochem. Sci. **15**, 305.

Driscoll, J. y Goldberg, A.L. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 4789.

Edman, P.(1950) Acta Chem. Scand. **4**, 283.

Egner, R., Thumm, M., Straub, M., Simeon, A., Schuller, H. J. y Wolf, D. H. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 27269.

Ekman, P., Hermansson, U., Bergstrom, G. y Engstrom, L. (1978) FEBS Lett. **86**, 250.

Emori, Y., Tsukahara, T., Kawasaki, H., Ishiura, S., Sugita, H. y Suzuki, K. (1991) Mol. Cell. Biol. **11**, 344.

Enenkel, C. y Wolf, D. H. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 7036.

Eytan, E., Ganoth, D., Armon, T. y Hershko, A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 7751.

Forchiassin, F. (1989) Tesis Doctoral. FCEN-UBA.

Franzusoff, A., Redding, K., Crosby, J., Fuller, R. S. y Schekman, R. (1991) J. Cell. Biol. **112**, 27.

Frey, J. y Röhm, K. H. (1978) Biochim. Biophys. Acta **527**, 31.

Frey, J. y Röhm, K. H. (1979) Eur. J. Biochem. **97**, 169.

Fujiwara, T., Tanaka, K., Orino, E., Yoshimura, T.,Kumatori, A., Tamura, T., Gung, C., Nakai, T., Yamaguchi, K., Shin,S., Kakizuka, A., Nakanishi, S. y Ichihara, A. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 16604.

Fuller, R. S., Sterne, R.E. y Thorner,J. (1988) Ann.Rev.Physiol. **50**, 345.

Fuller, R. S., Brake, A. J. y Thorner, J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**, 1434.

Galvagno, M. A., Forchiassin, F., Cantore, M. L. y Passeron, S. (1984) Exp. Mycol. **8**, 334

Gamundí, I. J. y Ranalli, M. E. (1969) Nova Edwigia **17**, 383.

García-Alvarez, N., Cueva, R. Y Suarez-Rendueles, P. (1991) Eur. J. Biochem. 202, 993.

Garland, D. y Nimmo, H. G. (1984). FEBS Lett. **165**, 259.

Garner, C. W. y Behal, F. J. (1975) Biochemistry **14**, 3208.

Goldberg, A. L. y Dice, J. F. (1974) Ann. Rev. Biochem. **43**, 835.

Goldberg, A. L. y St. John, A. C. (1976) Ann. Rev. Biochem. **45**, 747.

Greenburg, G., Shelness, G. S. y Blobel, G. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 15762.

Groissman, J. F., Forchiassin, F., Ranalli, M. E. y Lederkremer, R. (1981) Exp. Mycol. 5, 253

Gropper, R., Brandt, R. A., Elias, S., Bearer, C. F., Mayer, A., Schwartz, A. L. y Ciechanover A. (1991) J. Biol. Chem. **266**, 3602.

Gros, C., Giros, B. y Scwartz J. C. (1985) Biochemistry **24**, 2179.

Hammerschmidt, P. (1990) Seminario de Licenciatura. FCEN. UBA.

Hansen, R. J., Switzer, R. L., Hinze, H. y Holzer H. (1977) Biochim. Biophys. Acta **496**, 103.

Hanson, H. y Frohne, M. (1976) Meth. Enzymol. **45**, 504.

Heinemeyer, W., Simeon, A., Hirsch H. H., Schiffer, H. H., Teichert, U. Wolf, D. H. (1991, a) Biochem. Soc. Trans. **19**, 724.

Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J. A., Saidowsky, J., Escher, C. y Wolf, D. H. (1991, b) EMBO J. **10**, 555.

Heinnemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. y Wolf, D. H. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 5115.

Hersch, L. B. (1985) J. Neurochem. **44**, 1427.

Hershko, A., Heller, H., Eytan, E., Kaklij, G. y Rose, I. A. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7201.

Hershko, A. y Ciechanover, A. (1992) Ann. Rev. Biochem. **61**, 761.

Hilt, W. y Wolf, D. H. (1992). Molec. Microbiol. **6**, 2437.

Hilt, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T. y Wolf, D. H. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 3479.

Hirsch, H. H., Suarez Rendueles, P. Achstetter, T. y Wolf, D. H. (1988) Eur. J. Biochem. **173**, 589.

Holmquist, B. (1988) Meth. Enzymol. **158**, 6.

Holzer, H. y Heinrich, P. C. (1980) Ann. Rev. Biochem. **49**, 63.

Jones, E. W. (1984) Ann. Rev. Genet. **18**, 233.

Jones, E.W. (1991). J. Biol. Chem. **266**, 7963.

Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G. F. y Thorner, J. (1983) Cell **32**, 839.

Kim, H., y Lipscomb, W. N. (1993) Biochemistry **32**, 8465.

Klionsky, D. J., Herman P. K., y Emr S. D. (1990) Microbiol. Rev. **54**, 266.

Kominami, E., Hoffschulte, H. y Holzer, H. (1981) Biochim. Biophys. Acta **661**, 124.

Kyriakidis, S. M., Sakellaris, G. y Sotiroudis, T. G. (1993) Letts. Appl. Microbiol. **16**, 295.

Laemmli, U. K. (1970) Nature **227**, 680.

Larsen, K. S. y Auld, D. S. (1989) Biochemistry **28**, 9620.

Laszlo, L., Doherty, F. J., Osborn, N. U. y Mayer, R. J. (1990) FEBS Lett. **261**, 365.

Laurent, T. y Killander, J. (1964) J. Chromatography **14**, 317.

Lazdunski, C., Busuttil, J. y Lazdunski, A. (1975) Eur. J. Biochem. **60**, 363.

Leibowitz, M. J. y Wickner, R. B. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73**, 2061.

Lenney, J. F. (1975) J. Bacteriol. **122**, 1265.

Martin, R., y Ames, B. (1961) J. Biol. Chem. **236**, 1372.

Matern, H., Betz, H. y Holzer, H. (1974). Biochem. Biophys. Res. Commun. **60**, 1051.

Mayer, A., Siegel, N. R., Schwartz, A. L. y Ciechanover, A. (1989) Science **244**, 1480.

Mc Culloch, R., Burke, M. E., y Sherratt, D. J. (1994) Molec. Microbiol. **12**, 241.

Mc Donald, J. K. y Schwabe, C. (1977) Intracellular exopeptidases. En Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (A. J. Barrett, Ed.) pp 311 y sig. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, The Netherlands.

Mentlein, R. (1988) FEBS Lett. **234**, 251.

Miller, C. G., Kukral, A. M., Miller, J. L. y Movva, N. R. (1989) J. Bacteriol. **171**, 5215.

Minagawa, E., Kaminogawa, S., Matsuzawa, H., Ohta, T. y Yamauchi, K (1988) Agric. Biol. Chem. **52**, 1755.

Minami, M., Bito, H., Ohishi, N., Tsuge, H., Miyano, M., Mori, M., Wada, H., Mutoh, H., Shimada, S. Izumi, T., Abe, K. y Shimizu, T. (1992) FEBS Lett. **309**, 353.

Moerschell, R. P., Hosokawa, Y. Tsunasawa, S. y Sherman, F. (1990). J. Biol. Chem. **265**, 19638.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. e Ychihara, A. (1992) Nature **360**, 597.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Tanaka K., Ichihara, A. y Hayashi, S. (1993) Biochem J **295**, 305.

Muskardin, D. T., Voelkel, N. F. y Fitzpatrick, F. A. (1994) Biochem. Pharmacol. **48**, 131.

Nasmyth, K. (1993) Curr. Opinion Cell. Biol. **5**, 166.

Nishizawa, M., Yasuhara, T., Nakai, T., Fujiki, Y., y Ohashi, A. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 13651.

North, M. J., Scott, K. I. y Lockwood, B. C. (1988) Biochem. J. **254**, 261

Ojha, M., y Wallace, L. J. A. (1988) J. Bacteriol. **170**, 1254

Orloski, M. y Michaud, C. (1989) Biochemistry **28**, 9270

Ramamoorthy, S. y Balasubramanian, A. S. (1989) Biochem. J. **258**, 777.

Rawlings, N. D. y Barrett, A. J. (1993) Biochem. J. **290**, 205.

Rechsteiner, M., Hoffman, L. y Dubiel W. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 6065.

Reimann, E. M. y Beham, R. A. (1983) Meth. Enzymol. **99**, 51.

Richter-Ruoff, B., Heinemeyer, W. y Wolf, D H. (1992) FEBS Lett. **302**, 192.

Richter-Ruoff, B. y Wolf, D. H. (1993) FEBS Lett. **336**, 34.

Rivett, A. J. (1993) Biochem. J. **291**, 1.

Roberts, C. J., Pohlig, G., Rothman, J. H. y Stevens, T. (1989) J. Cell. Biol. **108**, 1363.

Röhm, K. H. (1982) Hoppe Seyler´s Physiol. Chem. **363**, 641.

Samela, A. (1993) Seminario de Licenciatura. FCEN. UBA.

Schalk, C., d´Orchymont, H., Jauch, M., y Tarnus, C. (1994) Arch. Biochem. Biophys. **311**, 42.

Schechter, I. y Berger, A. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 175.

Schimke, R. T. y Doyle, D. (1970) Ann. Rev. Biochem. **39**, 929.

Schork, S. M., Bee, G., Thumm, M. Y Wolf, D. H. (1994,a) Nature **369**, 283.

Schork, S. M., Bee, G., Thumm, M. Y Wolf, D. H. (1994,b) FEBS Lett. **349**, 275.

Schu, P., Suarez Rendueles, P, y Wolf, D. H. (1991) Eur. J. Biochem. **197**, 1.

Schu, P. y Wolf, D. H. (1991) FEBS Lett. **283**, 78.

Schwartz, A. L., Ciechanover, A., Brandt, R. A. y Geuze, H. J. (1988) EMBO J. **7**, 2961.

Seufert, W. y Jentsch, S. (1992) EMBO J. **11**, 3077.

Siepen, D., Yu, P., y Kula, M. (1975) Eur. J. Biochem. **56**, 271.

Siepen, D. y Kula, M. (1976) FEBS Lett.**66**, 31.

Siegel, L. y Monty, K. (1966) Biochim. Biophys. Acta **112**, 346.

Silberstein, S. (1990) Tesis Doctoral. F.C.E.N.-U.B.A.

Silberstein, S., Cantore, M. L., Galvagno, M. A. y Passeron, S. (1990) Arch. Biochem. Biophys. **282**, 132.

Simeon, A., Van der Klei, I. J., Veenhuis, M. y Wolf, D. H. (1992) FEBS Lett. **301**, 231.

Soderberg, C., Giugni, T. D., Zaia, J. A., Larsson. S., Wahlberg, J. M., Moller, E. (1993) J. Virol. **67**, 6576.

Spormann, B. O, Heim, J. y Wolf, D. H. (1991) Eur. J. Biochem. **197**, 399.

Stadtman, E. R. (1990) Biochemistry **29**, 6323.

Stefanovic, V., Vlahovic, P., Ardaillou, N. y Ardaillou, R. (1991) FEBS Lett. **294**, 171.

Stirling, V. J., Colloms, S. D., Collins, J. F., Szatmari, G., y Sherratt, D. J. (1989) EMBO J. **8**, 1623.

Suarez Rendueles, M. P. y Wolf, D. H. (1987) J. Bacteriol. **169**, 4041.

Suarez Rendueles, M. P. y Wolf, D. H. (1988) FEMS Microbiol. Rev. **54**, 17.

Suarez Rendueles, P., Villa, L., Arbesú, M. J., y Escudero B. (1991) FEMS Microbiol. Letts. **81**, 215.

Taylor, A. (1993,a) Trends Biochem. Sci. **18**, 167.

Taylor, A. (1993,b) FASEB J. **7**, 290.

Teichert, U., Mechler, B., Muller, H. y Wolf, D. H. (1987) Biochem. Soc. Trans. **15**, 811.

Teichert, U., Mechler, B., Muller, H. y Wolf, D. H. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 16037.

Terenzi, H. F., Rosellino, E. y Passeron, S. (1971) Eur. J. Biochem. **18**, 342.

Tisljar, U. y Wolf, D. H. (1993) FEBS Lett. **322**, 191.

Tortora, P., Birtel, M., Lenz, A. G. y Holzer, H. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. **100**, 688.

Trumbly, R. J. y Bradley, G. (1983) J. Bacteriol. **156**, 36

Tsuge, H., Ago, H., Aoki, M., Furuno, M., Noma, M. Miyano, M., Minami, M., Izumi, T. y Shimizu, T. (1994) J. Mol. Biol. **238**, 854.

Vallee, B. L. y Auld, D. S. (1990) Biochemistry **29**, 5647.

Vallee, B. L. y Auld, D. S. (1993) Biochemistry **32**, 6493.

Van Wart, H. E. y Lin, S. H. (1981) Biochemistry **20**, 5682.

Varshavsky, A. (1992) Cell **69**, 725.

Wagner, F. W., Páres, X., Holmquist, B. y Vallee, B. L. (1984) Biochemistry **23**, 2193.

Wagner , F. W. (1988) Meth. Enzymol. **158**, 21.

Wagner, J. C. y Wolf, D. H. (1992). Eur. J. Biochem. **203**, 571.

Wolf, D. H. (1980) Advanc. Microb. Physiol. **21**, 267.

Wolf, D.H. (1992) Experientia **48**, 117.

Worthington Enzyme Manual (1972) Worthington Biochemical Corp., Freehold. New Jersey.

Yasuhara, T., Nakai, T., y Ohashi, A. (1994) J. Biol. Chem. **269**, 13644.

Zhang, Z., Lawrence, J. y Stracher, A. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. **151**, 355.

Zhuang, Q., Lawrence, J. y Stracher, A. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. **118**, 508.

FCEyN BIBLIOTECA