

## Síntesis de AMP cíclico por la corteza renal *in vitro*

J. Camps, W. Jiménez, A. Llorens y F. Rivera-Fillat

Laboratorio de Bioquímica Hormonal  
Hospital Clínico y Provincial  
Facultad de Medicina  
Barcelona - 36

(Recibido el 5 de mayo de 1980)

J. CAMPS, W. JIMENEZ, A. LLORENS and F. RIVERA-FILLAT. *Synthesis of Cyclic AMP from Renal Cortex in vitro*. Rev. esp. Fisiol., 37, 31-36. 1981.

The parathyroid-hormone sensitive adenylate-cyclase from renal rat cortex has been studied.  $Mg^{2+}$  acts as stimulator at a specific locus increasing the apparent  $V_{max}$  slightly from 50 to 60 nmol of cAMP per gram of protein if the  $Mg^{2+}$  concentration increases from 3.25 to 16 mM, and decreases the apparent  $K_M$  from 2 to 0.4 mM.

Fluoride decreases the apparent  $K_M$  from 5 mM in NaF concentrations of 0 to 2 mM in NaF concentrations 2 mM.

Magnesium ion also decreases the apparent  $K_a$  for NaF.

El enunciado de la hipótesis del segundo mensajero por ROBINSON *et al.* (18) aclaró cómo llevan a cabo sus efectos las hormonas peptídicas. Esta hipótesis se basa en suponer que la hormona se une a un receptor específico situado en la parte externa de la membrana, lo que activaría en la parte interna una enzima adenil-ciclasa (ATP pirofosfato liasa [ciclante] E.C.: 4.6.1.1.) formándose AMP cíclico (AMPc) a partir del ATP; este AMPc activaría una proteín-quinasa que catalizaría todo un conjunto de reacciones bioquímicas que constituyen el efecto hormonal. Hoy se ha reseñado con gran evidencia de que uno de los modos de acción de la mayoría de las hormonas peptídicas — con la excepción de la insulina (1, 13) — sería éste (6, 12, 17).

El ion magnesio parece esencial para la

actividad enzimática. El auténtico substrato de la subunidad catalítica es el MgATP, siendo necesaria, al menos, una relación 1:1 entre el ion y el nucleótido para que exista actividad enzimática *in vitro*. Está bajo discusión si éste es el único papel jugado por el  $Mg^{2+}$  o si este ion ejerce otras funciones en un *locus* extra-catalítico. Algunos autores han evidenciado la existencia de una regulación alostérica por el magnesio; PERKINS *et al.* (2) encontraron que la exposición al fluoruro de membranas conteniendo ciclasas causa un descenso de la constante de activación aparente ( $K_a$  ap.) y un aumento de la velocidad máxima aparente ( $V_{max}$  ap.) en presencia de concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$ . Al contrario, DRUMMOND y DUNCAN (8) encontraron sólo un aumento de la  $V_{max}$  ap. en otros sistemas estu-

diados. BIRNBAUMER *et al.* (2) sugieren que este ion jugaría dos papeles distintos: activación por secuestro del ATP libre e inhibición por interacción con un *locus* alostérico.

Las ciclasas de sistemas membranosos desprovistos de células son estimulables por el ion fluoruro, en especial por el fluoruro sódico, cuyo efecto es inespecífico y general para todos los sistemas, con la excepción de la adenil-ciclasa de membrana de espermatozoide de rata. El mecanismo de acción de este ion es desconocido, a pesar de tener algunas características comunes con el modo de acción hormonal. Sin embargo, la activación por el NaF es mucho menos dependiente de la envoltura lipídica que la hormonal, y el comportamiento cinético es distinto. A pesar de estas diferencias, la activación de la adenil-ciclasa por el NaF no parece ser independiente de la hormonal. HARDWOOD y ROBBELL (2) demostraron que el NaF, que a temperatura inferior de 30° C estimula la adenil-ciclasa de corteza adrenal menos que la adrenocorticotropina, inhibe la acción estimuladora de ésta si se incuban conjuntamente. MANGANIELLO y VAUGHAN (15) han reseñado evidencias de que la acción del NaF sobre la ciclasa es distinta cualitativamente (estimuladora o inhibidora) según la concentración y la presencia o ausencia de hormona en el medio.

De los datos expuestos hay pocos firmemente establecidos. Sólo la complejidad de la interacción de la enzima con un conjunto de elementos moduladores, y el carácter de substrato del MgATP más que del ATP libre, parecen bien claros. La falta de conceptos asentados y la posibilidad de que diferentes sistemas actúen y sean modulados de modo distinto, justifica su estudio exhaustivo. Uno de los menos conocidos es el de corteza renal sensible a la parathormona (PTH), que ha sido el escogido para el presente trabajo, en que se estudia su modulación por magnesio y fluoruro sódico.

## Material y métodos

Se determina en membranas de células de corteza renal de rata la actividad adenil-ciclasa, siguiendo los trabajos de CHABARDÈS *et al.* (7), quienes, estudiando la sensibilidad de diversas zonas de la nefrona a diferentes hormonas, demostraron que es en la corteza donde se encuentra la mayoría de la actividad estimulable por la PTH.

El protocolo seguido es una modificación de los de MARCUS y AURBACH (16) y CANTERBURY *et al.* (5). Se usan ratas hembra, Sprague-Dawley, de un peso aproximado de 500 g, anestesiadas con éter. Los riñones se lavaron con una solución isotónica de sacarosa (0,25 M) colocada en un baño con hielo fundente; aproximadamente 500 mg de la corteza de ambos riñones se homogenizaron con un homogenizador Potter-Elvehem en un tampón tris-HCl (25 mM) a pH 7,4. La suspensión obtenida se centrifugó a 12.000 × g durante 10 min. El precipitado se resuspendió en tampón y se recentrifugó; el nuevo precipitado se resuspendió en tampón tris hasta una concentración proteínica de 3 g/l, medida según el método de LOWRY *et al.* (14). El sistema membrano- so obtenido fue incubado con concentraciones variables de ATP, MgCl<sub>2</sub> y NaF en un tampón tris-HCl (25 mM) a pH 7,4 que contenía, además, KCl (13 mM), seroalbúmina bovina (0,13 %), teofilina (6 mM) como inhibidor de la fosfodiesterasa y un sistema regenerador de ATP compuesto por fosfoenolpiruvato (3 mM) y piruvato-quinasa (30 mg/l) en un volumen final de 150 μl. La incubación se llevó a cabo durante 15 min a 37° C; después, la muestra se desproteinizó por inmersión en un baño a 100° C durante 3 min seguida de centrifugación a 2.000 × g. El sobrenadante se guardó a -20° C.

El AMPc se determinó por un método de unión competitiva a proteínas basado en el de GILMAN (11) y modificado por TOVEY *et al.* (19) que usa como proteína

de unión proteína-quinasa de músculo de buey que en nuestro trabajo resultó ser una proteína con alta afinidad por el AMPc, con una  $K_D$  a  $4^\circ\text{C}$  de  $6,4 \times 10^{-10}\text{ M}$  (4) calculada según el método de SCATCHARD (9).

Los resultados de las determinaciones de AMPc se expresan como nmoles de AMPc producidos por gramo de proteína.

### Resultados

**Modulación por el  $\text{Mg}^{2+}$ .** La relación entre el ATP y el  $\text{Mg}^{2+}$  se estudió viendo el efecto de concentraciones variables de uno u otro o bien de ambos conjuntamente sobre la actividad enzimática. Concentraciones crecientes de ATP incremen-

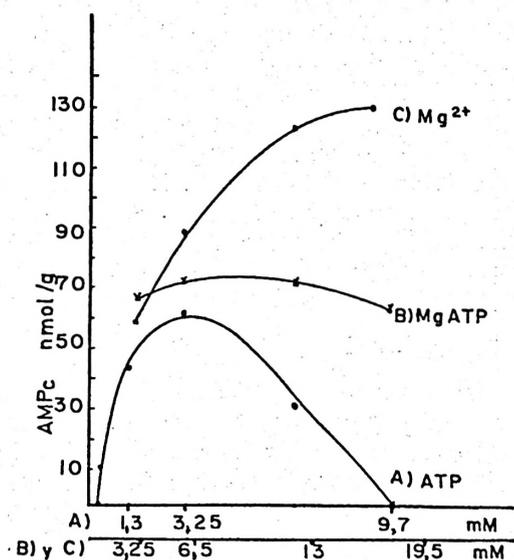


Fig. 1. Relación  $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$  en la actividad enzimática.

A) Determinación de la actividad adenil-ciclasa en función de la concentración de ATP. B) Determinación de la actividad de adenil-ciclasa en función del incremento equimolecular de las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  y de ATP. Concentración de NaF en A) y en B), 6 mM. C) Influencia de los niveles de  $\text{Mg}^{2+}$  permaneciendo los de ATP invariables.

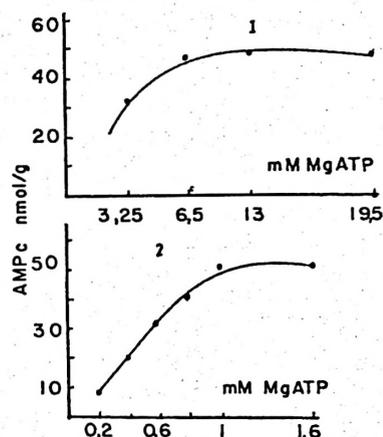


Fig. 2. El  $\text{Mg}^{2+}$  como estimulador alostérico. 1) Concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  equimolecular con la de ATP. 2) Existe exceso de Mg de 12,8 mM por encima del de ATP. La  $K_M$  aparente de 1) 2 mM.  $K_M$  aparente de 2) 0,4 mM. Concentración de NaF, 6 mM.

tan la actividad adenil-ciclasa siempre que su concentración sea inferior a la de magnesio (fig. 1 a). Cuando es inferior a la de ATP, la actividad enzimática se inhibe fuertemente.

Si se varían equimolecularmente las concentraciones de magnesio y de ATP, no se ocasionan cambios importantes en la actividad enzimática, que permanece prácticamente constante. En cambio, si se incrementa el nivel de  $\text{Mg}^{2+}$  por encima del de ATP, permaneciendo la concentración de nucleótido invariable, se estimula la adenil-ciclasa (fig. 1 b y c).

El papel estimulador del magnesio queda más claro en la figura 2, que muestra su comportamiento como estimulador alostérico, aumentando ligeramente la  $V_{max}$  ap. y disminuyendo la  $K_M$  ap. de 2 a 0,4 mM cuando existe un exceso de magnesio (12,8 mM) por encima de la concentración equimolecular con la de ATP.

**Modulación por el NaF.** El NaF es un modulador positivo de la actividad adenil-ciclasa (fig. 3). Parece actuar dis-

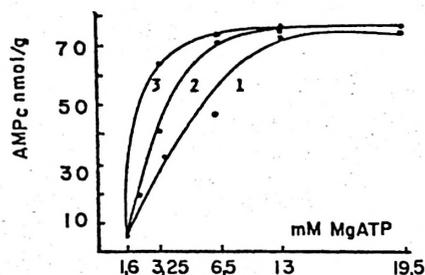


Fig. 3. Curva de Michaelis-Menten en presencia de concentraciones crecientes de NaF. Para 1, 2 y 3 corresponden los valores de 0, 3 y 6 mM y  $K_M$  aparente de 5, 3 y 2 mM, respectivamente. No había exceso de magnesio.

minuyendo la  $K_M$  ap. que pasa de 5 mM, cuando no existe fluoruro en el medio de incubación, a 2 mM cuando existe una concentración de 6 mM.

La influencia mutua del magnesio y el fluoruro sódico se muestra en la figura 4, en la que se ve que sin ningún exceso de  $Mg^{2+}$  —actuando el magnesio sólo como sustrato junto al ATP— el efecto del NaF no se manifiesta a concentraciones más bajas de 2 mM y existe inhibición por exceso de sustrato. La adición del exceso de magnesio suprime la inhibición por el NaF, incrementa la  $V_{max}$  ap. y disminuye la  $K_a$  ap.

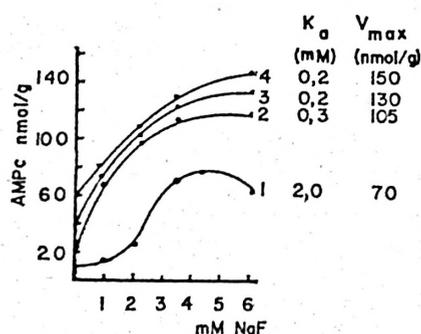


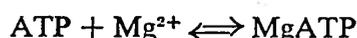
Fig. 4. Modulación del estímulo del NaF por el magnesio.

La concentración de  $Hg^{2+}$  en las curvas 4, 3, 2 y 1 fue de 19,5, 13, 6,5 y 3,25 mM, respectivamente; esta última es igual que la de ATP.

## Discusión

La modulación de la enzima adenil-ciclasa es un proceso muy poco conocido. Se cree que todo el conjunto de estimuladores e inhibidores podría actuar modificando el acoplamiento del receptor hormonal y la subunidad catalítica. BIRNBAUMER *et al.* (2) sugieren que el magnesio actuaría como inhibidor por interacción con un *locus* alostérico, o bien suprimiendo la activación por los guanil-nucleótidos. GARBERS y JHONSON (10) hablan de una activación alostérica del sistema enzimático por el ion en la adenil-ciclasa solubilizada con Lubrol PX, aumentando la  $V_{max}$  ap. y disminuyendo la  $K_M$  ap.

Nuestros resultados señalan el papel del magnesio como sustrato, formando el MgATP y confirmando que el ATP libre inhibe el sistema adenil-ciclasa. Sólo la adición de cantidades de  $Mg^{2+}$  iguales a las de ATP suprime este efecto inhibitorio. Si el  $Mg^{2+}$  sólo sirviese para secuestrar el ATP libre, se llegaría a un *plateau* cuando todo el ATP estuviese saturado. En nuestros experimentos se observa un *plateau* (fig. 1 c), pero a niveles de  $Mg^{2+}$  muy superiores a los presentes de ATP, cuando la reacción



a pH 7,4 está muy desplazada hacia la derecha, con lo que el ATP queda totalmente saturado con concentraciones de magnesio no muy superiores a las suyas. Parece, por tanto, que el ion  $Mg^{2+}$  estimula nuestro sistema a través de actuar como sustrato.

La figura 2 muestra cómo se ejerce este estímulo, aumentando la  $V_{max}$  ap. y disminuyendo la  $K_M$  ap. para el MgATP.

La acción del NaF parece ser la de disminuir la  $K_M$  ap. manteniendo constante la  $V_{max}$  ap. No queda claro, sin embargo, por qué la adenil-ciclasa es estimulada por un ion fisiológicamente tan extraño como el  $F^-$ . Ambos iones,  $Mg^{2+}$  y  $F^-$  se

interactúan estimulando cada uno la acción del otro, disminuyendo su  $K_a$  ap. y aumentando la  $V_{max}$  ap.

### Resumen

Se estudia la adenil-ciclasa de corteza renal de rata sensible a la parathormona. Se demuestra que el  $Mg^{2+}$  actúa como estimulador en un locus específico aumentando ligeramente la  $V_{max}$  aparente que pasa de 50 a 60 nmol de AMP<sub>c</sub> por gramo de proteína cuando la concentración de  $Mg^{2+}$  pasa de 3,25 a 16 mM y disminuyendo la  $K_M$  ap. de 2 a 0,4 mM.

El fluoruro disminuye la  $K_M$  aparente que pasa de 5 mM, cuando la concentración de NaF es de 0 a 2 mM cuando es de 2 mM.

El ion  $Mg^{2+}$  también disminuye la  $K_a$  ap. para el NaF.

### Bibliografía

1. ARCHER, J. A. GORDEN, P., GOVIN, J. R., LESNIAK, M. A. y ROTH, J.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, 36, 627-633, 1973.
2. BIRNBAUMER, L.: En «Receptors and hormone action» (L. Birnbaumer y B. W. O'Malley, eds.). Vol. 1. Academic Press. Nueva York, 1977, p. 491.
3. BRAUN, T. y BIRNBAUMER, L.: En «Comprehensive Biochemistry» (M. Florkin y E. Stotz, eds.). Vol. 25. Elsevier. Amsterdam, 1975, p. 70.
4. CAMPS, J., LLORENS, A., CASTELLOTE, A. y RIVERA-FILLAT, F.: *Endocrinología*, 27, 137-142, 1980.
5. CANTERBURY, J. M., LEVEY, G. S. y REISS, J.: *J. Clin. Invest.*, 52, 524-527, 1973.
6. CUATRECASAS, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 1264-1271, 1971.
7. CHABARDÈS, D., IMBERT-TEBOUL, M., GAGNAN-BRUNETTE, M. y MOREL, F.: En «Endocrinology of calcium metabolism». (D. H. Copp y R. V. Talmage, eds.) Excerpta Medica. Amsterdam, 1978, pp. 209-215.
8. DRUMMOND, G. I. y DUNCAN, L.: *J. Biol. Chem.*, 245, 976-983, 1970.
9. FELDMAN, H. y ROBBARD, D.: En «Principles of Competitive Protein-Binding Assays». (W. D. Odell y W. H. Daughaday, eds.) J. B. Lippincott Co., Filadelfia, 1971, pp. 160-161.
10. GARBERS, D. L. y JOHNSON, R. A.: *J. Biol. Chem.*, 250, 8449-8456, 1975.
11. GILMAN, A. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 305-312, 1970.
12. KAHN, C. R. y ROTH, J.: *Amer. J. Clin. Pathol.*, 65, 656-668, 1975.
13. KOLATA, G. B.: *Science*, 201, 895-897, 1978.
14. LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-270, 1951.
15. MANGANIELLO, V. C. y VAUGHAN, M.: *J. Biol. Chem.*, 251, 6205-6209, 1976.
16. MARCUS, R. y AURBACH, G. D.: *Endocrinology*, 85, 801-810, 1969.
17. O'BRIEN, R. D., EDEFRAWI, M. E. y EL-DEFRAWI, A. T.: *Ann. Rev. Pharmacol.*, 12, 19-40, 1972.
18. ROBISON, G. A., BUTCHER, R. W. y SUTHERLAND, E. W.: *Cyclic AMP*. Academic Press, Nueva York, 1971.
19. TOVEY, K. C., OLDHAM, K. G. y WHELAN, J. A. M.: *Clin. Chim. Acta*, 56, 221-234, 1974.

