

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA IZTAPALAPA BIBLIOTECA**

Division de Ciencias Biológicas y de la Salud

**PROTEINAS ACEPTORAS DE
CALMODULINA
EN ESPERMATOCITOS
PRIMARIOS DE RATA**

Tesis que Presenta

ALMA DELIA OCHOA VALDES

Para la obtención del grado de Maestría en

Biología Experimental

1995

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología en el Centro Médico Siglo XXI bajo la tutoría de la M. en C. Raquel Trejo Albarrán y la asesoría de la Dra. Adela Mújica del Departamento de Biología Celular en el CINVESTAV y del M. en C. Joaquín Herrera Muñoz del laboratorio de Mecanismos de Regulación Hormonal del Departamento de Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa cuenta con el apoyo de CONACYT, según Convenio PFPN/66/92)", por considerársele un posgrado con nivel de excelencia.

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios, a través de la beca con número de registro 81594

Agradezco al IMSS el apoyo económico que me brindo durante la realización de la fase experimental de mis estudios de maestría, a través de la beca otorgada con número de matrícula 10234047

Durante la realización de un trabajo experimental, son muchas las personas que de alguna u otra manera hacen posible su cumplimiento, a todas y cada una de ellas gracias mil.

Quiero agradecer de forma muy especial a la Dra. Adela Mújica del Departamento de Biología Celular en el CINVESTAV por haberme permitido trabajar en su laboratorio en la identificación de las `proteínas que interaccionan con calmodulina y al Dr. Enrique Hernández por su amable asesoría en la realización de electrotransferencias, tinción con plata y "overlay" con CaM-Biot .

También quiero agradecer a Lourdes Perez Moreno, responsable del bioterio de la UAM-Iztapalapa quien me facilitó varios lotes de ratas, y a Jorge Lodigiani Rodríguez fotógrafo de la UAM-Iztapalapa por las fotografías de los "overlay"

Deseo dedicar ésta tesis a mis padres, por que gracias a su cariño apoyo y ejemplo, he podido dar cada uno de los pasos, grandes o pequeños hacia una de las metas que me he forjado en la vida, por que logre llegar o no, se que siempre estaran con migo; a mi esposo José por su gran apoyo y comprensión, primero como compañero de laboratorio y después como compañero de mi vida. A mi abuelita Isabel por su interés en mi vida académica; a mi abuelito Miguel por su ejemplo de fortaleza; a mis hermanas Paty, Gaby y Martha por que han sido y son las mejores amigas que he tenido; a mi hermano Raúl por los momentos felices que nos dio su niñez y los que espero nos de su madurez. A mis sobrinos José Luis, Karen, Yesica, Lupita, Manolo, Jesús y Ma. Teresa, por que han llenado de amor y felicidad mi vida y a alguien que ahora mismo está con migo llenando de esperanza todo mi ser, mi hijo.

INDICE

I INTRODUCCION	1
1 EL CALCIO Y SU FUNCION BIOLOGICA EN LA CELULA	1
1.1 El calcio en las células	
2 CALCIO COMO REGULADOR INTRACELULAR	2
2.1 Concentración intracelular del calcio en condiciones basales	
2.2 Factores que disparan el incremento de la concentración de calcio intracelular	
2.3 Concentración intracelular de calcio en las células activadas	
3 MECANISMOS DE ACCION DEL CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO	6
3.1 Proteínas Aceptoras de calcio	
3.1.1 Proteínas Hélice-asa-Hélice o "EF-Hand"	
3.1.2 Anexinas	
4 CALMODULINA	8
4.1 Dominios de unión a calcio	
4.2 Hélices	
4.3 Conformación de CaM	
4.3.1 Cambios conformacionales inducidos por calcio	
4.3.1.1. Exposición de dominios hidrofóbicos	
5 CALMODULINA Y CICLO CELULAR	14
5.1 Localización de CaM durante el ciclo celular	
5.2 Concentración de CaM durante el ciclo celular	
5.2.1 Concentración de CaM durante la meiosis	
5.3 Efecto de las mutaciones de CaM en la progresión del ciclo celular	

6 INTERACCION DE CaM CON PROTEINAS BLANCO	19
6.1 Proteínas activadas por CaM en forma calcio-dependiente	
6.2 Proteínas que interaccionan con CaM en forma calcio-independiente	
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
III HIPOTESIS	23
IV OBJETIVOS	23
OBJETIVO GENERAL	
OBJETIVOS ESPECIFICOS	
V MATERIAL Y METODOS	25
1 Obtención de células dispersas y purificación de espermatozoides primarios de rata en la primera profase meiótica	25
2 Aislamiento y purificación de núcleos de espermatozoides primarios de rata	27
2.1 Obtención de la fracción nuclear a partir de un homogeneizado total del tejido y purificación de los núcleos por centrifugación en gradientes de sacarosa.	
2.2 Obtención de la fracción nuclear mediante el uso de Tritón X-100	
2.3 Obtención de núcleos por choque hipotónico a partir de los espermatozoides primarios obtenidos por la técnica de Alemán y col.	
3 Criterios de pureza de los núcleos de espermatozoides primarios	28
3.1 Contenido de ADN	
3.2 Actividad de la G6Pasa	
3.3 Actividad de la LDH	
4 Extracción y purificación de CaM	30
4.1 Preparación de una columna de sefarosa-CaM	
5 Purificación por cromatografía de afinidad de proteínas testiculares que unen a CaM en forma dependiente de calcio por cromatografía de afinidad	31

6 Identificación de las proteínas que unen a CaM en células germinales testiculares	3 2
6.1 CaM marcada con biotina	
6.2 CaM marcada con 125 I	
7 Identificación de la actividad de proteínas cinasas	3 3
VI RESULTADOS	3 5
1 Obtención de espermatoцитos primarios y de los núcleos de estos	3 5
2 Aislamiento y purificación de los núcleos de espermatoцитos primarios	3 5
2.1 Obtención de la fracción nuclear a partir de un homogeneizado total del tejido y purificación de los núcleos por centrifugación en gradientes de sacarosa.	
2.2 Obtención de la fracción nuclear mediante el uso de Tritón X-100	
2.3 Obtención de núcleos por choque hipotónico a partir de los espermatoцитos primarios obtenidos por la técnica de Alemá y col.	
3 Determinación de la pureza de los núcleos aislados	3 7
3.1 Contenido de ADN	
3.2 Actividad de la G6Pasa	
4 Purificación de la CaM por cromatografía de afinidad	4 0
5 Purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas de unión a CaM e identificación de éstas por electroforesis	4 1
6 Identificación de las proteínas que unen a CaM	4 6
6.1 CaM marcada con biotina	
6.2 CaM marcada con 125 I	
7 Determinación de la actividad de proteínas cinasas	5 1
VII DISCUSION	5 7
VIII CONCLUSIONES	6 4
IX BIBLIOGRAFIA	6 6

INTRODUCCION

1 EL CALCIO Y SU FUNCION BIOLOGICA EN LA CELULA

1.1 El Calcio En Las Células

El calcio, está presente en los organismos vivos en una proporción veinte veces mayor que en la corteza terrestre. Se ha descrito que los principales papeles biológicos del calcio son:

i) un papel estructural ya que los precipitados de fosfato y de carbonato de calcio son los mayores constituyentes inorgánicos de las estructuras esqueléticas de la mayoría de los animales. El calcio también puede unirse a otros componentes de la membrana como los fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos, jugando así un papel en el mantenimiento de la estructura y función de todas las células eucarióticas y tejidos.

ii) como portador de carga eléctrica pues se sabe que el calcio puede conducir una importante cantidad de corriente durante el potencial de acción en células tanto de vertebrados como de invertebrados.

iii) como cofactor para proteínas y enzimas extracelulares tanto en eucariontes como en procariontes ya que algunas enzimas extracelulares requieren calcio para estabilizar o maximizar su actividad. Entre estas proteínas se encuentran algunas proteasas como la colagenasa, alfa amilasa, ADNasa I y fosfolipasa A, así como ciertas enzimas involucradas en la coagulación de la sangre como el factor II o protrombina, factor IV, factor IX o de Christmas, factor X o de Stuart y la transglutaminasa.

iv) como regulador intracelular; el cambio en la concentración de calcio dentro de las células media la respuesta de éstas hacia un estímulo. El estímulo puede ser físico, eléctrico o químico.

Así pues, el número de fenómenos donde el calcio intracelular es el disparador de la actividad de la célula es muy amplio (revisado por Campbel, 1983).

2. EL Ca^{2+} COMO REGULADOR INTRACELULAR

2.1 Concentración Intracelular Del Ca^{2+} En Condiciones Basales

Aunque la concentración total de calcio es similar a la del medio extracelular ($\geq 10^{-3}$ M), la concentración de calcio libre o ionizado en el citosol normalmente es muy baja, $\leq 10^{-7}$ M, alrededor de 1000 a 10000 veces inferior a la concentración de calcio en el medio extracelular. Esto se debe a que la mayor parte del calcio de las células está unido a otras moléculas o secuestrado en vesículas intracelulares. Esto da como resultado la formación de un enorme gradiente en la concentración de calcio libre a través de la membrana plasmática de las células.

Para mantener este gradiente la célula cuenta con varios mecanismos, entre ellos la bomba de calcio o Ca^{2+} -ATPasa unida a la membrana plasmática y la Ca^{2+} -ATPasa unida a la membrana del retículo endoplásmico, que utilizan energía de la hidrólisis del ATP para bombear calcio fuera de la célula o hacia el interior de las vesículas del retículo endoplásmico respectivamente. El calcio también atraviesa la membrana por medio de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, $\text{Ca}^{++}/\text{Ca}^{++}$ y por medio de canales de calcio. En conjunto esas bombas y sistemas intercambiadores mantienen un bajo nivel de calcio intracelular (0.1 mM) (Carafoli, 1994; Mc Clesky, 1994).

2.2 Factores Que Disparan El Incremento De La Concentración De Calcio Intracelular

Se sabe que la mayoría de los receptores membranales de factores de crecimiento o citocinas sufren un cambio de conformación cuando unen a su ligando en la superficie celular. Este cambio conformacional conduce a la generación de una señal intracelular, debido a su acoplamiento con segundos mensajeros como el calcio. El aumento en la concentración de Ca^{++} intracelular que se observa después de la activación de las células por las citocinas puede deberse a la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática provocando un flujo transitorio de iones calcio hacia el citosol o bien a la liberación de Ca^{++} de almacenes intracelulares a través de la formación de IP_3 .

En estas condiciones se observa que el incremento en el calcio intracelular es bifásico. El incremento inicial resulta de un efecto directo del IP_3 sobre los organelos intracelulares de almacenamiento de calcio (Berridge, 1993). Esta liberación de calcio intracelular es transitoria y es seguida por un incremento sostenido en la concentración intracelular de este ión debido a la entrada de calcio a través de la membrana plasmática (Putney y col., 1981; Putney y Bird, 1993).

Se ha sugerido que el mecanismo predominante por el cual el IP_3 activa la entrada de calcio a través de la membrana plasmática está acoplada al agotamiento de los almacenes intracelulares de calcio. A este fenómeno se le ha llamado proceso capacitador de la entrada de calcio y se han propuesto dos mecanismos para explicarlo. Uno de ellos propone la participación de un mensajero que puede ser producido o liberado al citoplasma cuando se agotan los almacenes de calcio intracelular y que posteriormente se difunde a la membrana plasmática para activar la entrada de calcio. La liberación o acción en la membrana plasmática de este mensajero puede involucrar mecanismos dependientes de GTP. El segundo mecanismo postula que el agotamiento de las reservas de calcio de los almacenes intracelulares origina un cambio conformacional en el organelo y/o en sus proteínas de superficie y este cambio conformacional es transmitido a los canales de calcio de la membrana plasmática (Putney, 1986; Putney, 1990; Irvine, 1990; Putney y Bird, 1993).

2.3 Concentración Intracelular De Ca^{2+} En Células En División

En ovocitos de erizo de mar se ha observado que existe un incremento en la concentración de Ca^{++} libre intracelular de $0.11 \mu\text{M}$ a $1.95 \mu\text{M}$ a los 12 segundos después de la fertilización, luego de lo cual se llega al valor inicial de $0.11 \mu\text{M}$. Durante la migración pronuclear a los 10-12 minutos ocurre un segundo incremento con un valor promedio de 665 nM . La reducción en la concentración externa de calcio no afecta este aumento ni los cambios subsecuentes, lo cual sugiere que el incremento obedece a la liberación de calcio desde almacenes intracelulares. Se han identificado otros cambios de este ión durante el primer ciclo de división del huevo, uno asociado con el periodo de la síntesis de ADN, otro ocurre a los 50-60 min durante el rompimiento de la envoltura nuclear (REN), con un valor promedio de 404 nM , un tercer aumento a los 70 min con un valor promedio de 410 nM que ocurre durante la transición de la metafase a la anafase y finalmente un incremento asociado con la citocinesis con un valor promedio de 412 nM (Poenie y col., 1985).

Steinhardt y Alderton (1988) han mostrado que la inyección de amortiguadores con quelantes de calcio impide el incremento transitorio de la concentración de calcio libre intracelular que está relacionado con el REN originando el bloqueo de este proceso así como la progresión de la mitosis. La subsecuente inyección de calcio o la recuperación normal de altos niveles de este ión permiten el reestablecimiento de estos procesos. Además el incremento artificial de calcio por inyección a tiempos tempranos provoca un REN temprano. Lo anterior deja ver que el incremento en la concentración de calcio libre intracelular precedente al REN es un punto regulador esencial requerido para la entrada a la mitosis.

Keith y col., (1985) han medido los niveles de calcio libre en células epiteliales PtK2 usando quin-2, detectando un 50% de decremento a través de la mitosis. Ellos han observado que la concentración de calcio intracelular es de 53 nM durante la profase y de 27 nM durante la prometafase y que esta baja concentración permanece durante la metafase y anafase hasta estados tardíos de la telofase y que su valor incrementa nuevamente en la interfase. Sin embargo, los autores

proponen que el decremento en la concentración de este ion puede reflejar su secuestro dentro de compartimentos y que algunos de estos iones secuestrados pueden ser liberados localmente.

Esta propuesta de liberación local de calcio ha sido confirmada por Ratan y col., (1986) quienes encontraron que el valor de calcio libre intracelular de células PtK2 en interfase es de 83 nM (cuya distribución es homogénea menos en el núcleo) y en la metafase es de 46 nM. La separación de las cromátidas hermanas durante la transición de la metafase a la anafase es acompañada por un incremento de calcio en la región polar del huso a 140 nM, en tanto que en la zona media del huso es de 74 nM. Estas observaciones demostraron la existencia de cambios localizados en la concentración de calcio libre. Se piensa que en la transición de metafase/anafase, el calcio puede ser localmente liberado a los polos del huso y modificar diferencialmente el ensamble/desensamble de los microtúbulos (Ratan y Shelanski, 1986).

Otras observaciones han mostrado que la entrada restringida de calcio o la modificación del transporte de este ion durante la mitosis, prolonga el tiempo de transición de la metafase (Hepler, 1985);

Kao y col (1990) estudiaron diferentes líneas celulares para definir si los cambios en la concentración de calcio libre intracelular eran eventos que expresaban todas las células en división durante la mitosis y la interfase. Observaron que durante la interfase el incremento en calcio intracelular es fortuito e impredecible, mientras que durante la mitosis el aumento de calcio intracelular está altamente relacionado con el rompimiento de la envoltura nuclear en la profase y con la transición de la metafase a la anafase. Con base en sus resultados propusieron que el Ca^{2+} juega un papel esencial en el rompimiento de la envoltura nuclear, pues el decremento de este ion puede bloquear dicho proceso. Sin embargo, el papel del Ca^{2+} durante la transición de la metafase a la anafase es auxiliar, ya que la entrada a la anafase puede ocurrir en ausencia de cambios observables en la concentración de este ion, y propusieron que el calcio puede ser requerido por procesos subsecuentes a esta transición o bien ser requerido de manera indirecta.

El análisis de los resultados obtenidos con las líneas celulares estudiadas, demostró que el incremento global de Ca^{2+} durante el proceso mitótico no es un fenómeno común a todas las células.

La no universalidad del incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} durante la mitosis, apoya resultados previos que señalan que más que un incremento global en la concentración de calcio libre intracelular, es un incremento local el requerido para la progresión de este proceso. Dicho incremento puede ser el resultado de la movilización del Ca^{2+} secuestrado en almacenes cercanos al aparato mitótico y que son calcio sensibles (Ratan y col., 1986; Kao y col., 1990)

3 MECANISMO DE ACCION DEL CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO

El aumento en la concentración de calcio libre por acción de un agente externo es transitorio por lo que su señal puede ser transmitida solamente por aquellas proteínas aceptoras capaces de unirlo con alta afinidad en ese intervalo de concentraciones que va de $2-8 \times 10^{-7}$ M. El complejo formado entre estas proteínas intracelulares y el calcio libre, puede interactuar más tarde con una proteína blanco para modificar su función. Finalmente todo este proceso lleva a una respuesta fisiológica de la célula o tejido estimulado (Cox y col., 1980; Smith y col., 1990; Heizman y Hunziker, 1991).

Además de la respuesta temprana dada por las proteínas aceptoras de calcio, el aumento en la concentración de calcio intracelular puede generar una respuesta sostenida a través de la activación de la proteína cinasa C (PCC). El incremento transitorio en la concentración de calcio libre intracelular permite la activación de la PCC por el diacil glicerol y su asociación con la membrana plasmática. (Putney y col., 1981; Putney y Bird, 1993).

Se sabe que la forma citosólica de la PCC es relativamente inactiva pero que cuando se asocia con la membrana plasmática y está en contacto con fosfolípidos de ésta, incrementa su actividad y expresa sensibilidad a la concentración de calcio libre. Esta forma de la PCC asociada a la membrana plasmática, participa en el mantenimiento de la respuesta celular por tiempos más prolongados amplificando la señal dada por calcio (Rasmussen, 1984).

3.1 Proteínas Aceptoras Del Calcio

Como ya se mencionó la traducción de la señal dada por el incremento en la concentración de calcio libre intracelular hacia una respuesta intracelular depende de las proteínas capaces de unir a calcio en el rango de concentraciones al que se presenta en las células activadas. Estas proteínas pueden ser subdivididas en dos grupos basándose en las características estructurales: 1) proteínas con la estructura hélice-asa-hélice ("EF-Hand") tales como la calmodulina, troponina C, parvalbúmina, oncomodulina, proteínas S-100 y calbindinas, 2) la familia de las anexinas, proteínas que interactúan con fosfolípidos y membranas celulares de una manera calcio dependiente (Heizmann y Hunziker, 1991).

3.1.1 Proteínas Hélice-Asa-Hélice o "EF-Hand"

En estas proteínas el calcio se une en la región de 12 aminoácidos que forman el asa, seis de los cuales participan en la unión de calcio a través de sus átomos de oxígeno (Kretsinger, 1976).

La mayoría de las proteínas de esta familia presentan más de una copia de la estructura hélice-asa-hélice (de 2 a 8). Por ejemplo, la parvalbúmina presenta 2, la calmodulina y troponina C presentan 4, la calbindina D 28 K tiene 6 y la proteína LpS, de 35 kD de Lytechinus pictus tiene 8 veces esta estructura (Heizman y Hunziker, 1991).

3.1.2 Anexinas

Esta familia de proteínas son capaces de unirse a fosfolípidos y a membranas de manera calcio dependiente (Crompton y Dedman, 1990; Concha y col., 1993). Estas proteínas se han demostrado en vertebrados, invertebrados y plantas superiores. Tienen una gran homología entre sí y presentan una secuencia de 70 aminoácidos altamente conservada.

Las anexinas no contienen la estructura típica de unión a calcio, se ha sugerido que en el segmento de 70 aminoácidos está el sitio de unión a calcio coordinado dentro de una estructura discontinua α -hélice unida a un anillo. Se ha observado que las anexinas poseen secuencias de aminoácidos que semejan estructuras EF mutadas (Heizmann y Hunziker, 1991).

4 CALMODULINA

Calmodulina es una proteína ácida que pertenece a la familia de proteínas con estructura EF con 4 sitios de unión a calcio y estable al calor que consiste de una sola cadena polipeptídica de 148 aminoácidos, con 16700 daltones de peso molecular. Fue descubierta como una proteína activadora de la fosfodiesterasa por Cheung y Kakiuchi de manera independiente en 1970 (Cheung, 1970; West, 1981; Sellinger, 1984).

Calmodulina está presente en casi todos los organismos eucariontes, encontrándose en mayor proporción en cerebro, testículo, espermatozoides y en el órgano eléctrico de las anguilas. Es una proteína altamente conservada a lo largo de la escala evolutiva (Cheung, 1980; 1982; Means y Dedman, 1980).

Se sabe que el sitio I es altamente homólogo al sitio III, en tanto que el sitio II es altamente homólogo al sitio IV. El 70% de los aminoácidos de los sitios I y III así como de los sitios II y IV son idénticos. Esto sugiere que CaM surgió por la duplicación de un gen (Means, 1982).

Estos dominios tienen diferente afinidad por calcio. La mayoría de los autores han reportado que los sitios I y II son de alta afinidad con constantes de asociación cercanas a 10^{-5} M y los sitios III y IV son de baja afinidad con constantes de asociación de 10^{-6} M.

La unión de Ca^{2+} a CaM es secuencial y ordenada, se ha propuesto que la unión a los dominios se da en el siguiente orden: II→I→III→IV (Kilhoffer y col., 1983).

Se sabe que existe una cooperatividad positiva entre los sitios de unión a calcio, ya que la ocupación de los dos primeros dominios está acompañada por un cambio conformacional que facilita la unión del tercero y cuarto ión calcio. Cuando el segundo y tercer ión se unen, se da la exposición de dominios hidrofóbicos (Tanaka y Hidaka, 1980). Se ha demostrado que la molécula de CaM con 3 iones unidos puede unirse y modificar la actividad de su enzima blanco (Crouch y Klee, 1980; Cox, 1980).

4.2 Hélices

La molécula de CaM contiene 7 hélices (I-VII) que abarcan de los residuos 7-19, 29-39, 46-55, 65-92, 102-112, 119-128 y 138-148 respectivamente (Babu y col., 1985; Babu y col., 1988). La naturaleza polar o hidrofóbica de los aminoácidos que constituyen estas regiones permite la polarización de la hélice en una parte hidrofóbica y una hidrofílica. Las regiones hidrofóbicas se encuentran flanqueadas por regiones de potencial electrostático altamente negativo, las cuales son excelentes candidatos como sitios de unión para hélices anfifílicas cargadas positivamente (Cox y col., 1980; Babu y col., 1985; O'Neil y DeGrado, 1990; Voguel y col., 1990; Meador y col., 1992)

Dentro de estas hélices los residuos de fenilalanina, son residuos de gran importancia. Ohya y Botstein (1994) al substituir estos residuos por alanina, identificaron cuatro tipos de funciones en las

que pueden estar involucrados la organización de actina, la localización intracelular de CaM en la división nuclear y gemación.

Se sabe que existen 8 residuos de lisina en la molécula de CaM de mamíferos, de ellos la Lys⁷⁵ contiene el grupo amino más reactivo en la molécula de CaM saturada con calcio y se encuentra localizada en la hélice central de la molécula. Lys⁷⁷, es otro de los residuos de lisina de mayor accesibilidad y que se encuentra en la hélice central (Babu y col., 1988). La accesibilidad de estas lisinas se ha utilizado en la producción de derivados de CaM, como la CaM-biotinilada y la calmodulina-¹²⁵I marcada con el reactivo de Bolton y Hunter usados como sondas para detectar las proteínas que unen a CaM (Chafouleas y col., 1979).

En cuanto a la hélice central de CaM se sabe que ésta sirve como una unión flexible que permite que los dos dominios globulares de CaM se puedan mover como cuerpos semirígidos para formar un sitio de unión capaz de acomodar una amplia variedad de péptidos y enzimas blanco. Así los dos dominios globulares de CaM son capaces de interactuar simultáneamente con su péptido blanco (O'Neil y DeGrado, 1990).

Con respecto a la longitud de la hélice central, se sabe que la disminución en longitud de 2 o 4 residuos tiene poco efecto en la afinidad por CaM de las proteínas blanco (Persechini y col., 1991).

Los residuos de metionina juegan un papel muy importante en las funciones mediadas por calmodulina. Se ha demostrado que el 46% de la superficie de los dominios hidrofóbicos que expone calmodulina es ocupado por residuos de metionina, en las posiciones 36, 71, 72, 76, 109, 124, 144 y 145 (O'Neil y DeGrado, 1990).

4.3 Conformación De La Calmodulina

La estructura cristalográfica de CaM muestra a una molécula con 2 dominios globulares estructuralmente similares, cada uno de los cuales contiene un par de sitios de unión a Ca²⁺ cargados negativamente y separados por una región α -hélice (sitios I a IV). Se ha observado que la

porción central en presencia de calcio se dobla y permite que los dos dominios globulares se acerquen e interaccionen simultáneamente con una región del péptido blanco (Babu y col., 1988; Meador y col., 1993).

4.3.1 Cambios Conformacionales Inducidos Por Ca^{2+}

La unión de calcio a la molécula de CaM produce cambios conformacionales que afectan la absorbancia, fluorescencia y espectro de dicroísmo circular de sus residuos de tirosina.

En ausencia de calcio, CaM tiene un contenido de α -hélice del 30-35%, 20% β -plegada y 50% de enrollamiento al azar (determinado por su espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano). Cuando el calcio se une a la CaM, se da un cambio en el espectro de dicroísmo, este cambio corresponde a un incremento en el contenido de α -hélice del 5-8% con su correspondiente decremento en el enrollamiento al azar. Se sabe que estos cambios en su espectro de dicroísmo circular ocurren bajo la unión de los 2 primeros iones calcio por CaM (Klee, 1977, La Porte y col., 1980).

Por otra parte, en ausencia de calcio, CaM presenta un espectro de absorción en el UV con un máximo a 277 nm y un hombro a 282 nm correspondiente al espectro de tirosina además de múltiples picos a 253, 258.5, 265 y 268.5 nm característicos de la absorción de fenilalanina. Cuando el calcio se une a esta molécula, hay un decremento en el espectro de absorción UV, lo anterior está relacionado con cambios en el entorno del residuo 138 de tirosina pues bajo estas condiciones este residuo se expone en mayor grado, lo cual afecta algunos o todos los residuos de fenilalanina dando como resultado un incremento en el contenido de α -hélice (Klee, 1977; Richman y Klee, 1979).

También se ha visto que la unión de calcio a CaM incrementa la fluorescencia de los residuos 99 y 138 de tirosina (Chao y col., 1984).

En cuanto a los cambios de movilidad electroforética de CaM inducidos por la unión de calcio, se ha observado que CaM migra más lentamente en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes en presencia de calcio que en presencia de EGTA, probablemente debido al

decremento en la carga neta bajo su unión con este ión. Bajo condiciones desnaturalizantes (con SDS), CaM migra más rápidamente en presencia de Ca^{2+} que en presencia de EGTA, lo anterior tal vez debido a un cambio hacia una forma más compacta de CaM (Chao y col., 1984).

4.3.1.1 Exposición De Dominios Hidrofóbicos

Se ha demostrado que la unión de Ca^{2+} a CaM origina la exposición de dominios hidrofóbicos y se ha propuesto que estos dominios permiten la formación del complejo proteína-proteína entre CaM y sus proteínas blanco en presencia del ión calcio (Klee, 1977; LaPorte y col., 1980).

La superficie hidrofóbica de la calmodulina está constituida de 14 residuos de aminoácidos en cada una de las dos regiones de esta molécula (tabla 1). Once de estos residuos pertenecen a 4 de las α -hélices 2 de ellos a las asas de unión a calcio y un residuo a la región que conecta los dos dominios globulares (Babu y col., 1988).

Tabla 1. RESIDUOS INVOLUCRADOS EN LA FORMACION DE LA SUPERFICIE HIDROFOBICA DE CaM.

REGION N-TERMINAL	REGION C-TERMINAL
<p>Fenil alanina: 19,68 Isoleucina: 27,52,63 Leucina: 32,48 Valina: 35,55 Metionina: 36,51,71,72 Prolina: 43</p>	<p>Fenilalanila: 92,141 Isoleucina: 100,125 Leucina: 105,116 Valina: 108,121,136 Metionina: 109,124,144,145 Alanina: 128</p>

La exposición de estos dominios fue demostrada por algunos autores estudiado los cambios conformacionales de CaM inducidos por calcio usando colorantes fluorescentes que interaccionan con dominios hidrofóbicos de proteínas. Así por ejemplo se ha visto que la intensidad de fluorescencia del 8-anilino-1-naftalensulfonato (Ans), 9-antróilcolina (9AC) y N-fenil-1-naftilamina

incrementaron drásticamente cuando CaM está saturada con Ca^{2+} . En contraste CaM tiene muy poco efecto en el espectro de emisión en presencia de EGTA y Ca^{2+} solo no tiene efecto alguno en la fluorescencia de estos ligandos (LaPorte y col., 1980)

Tanaka y Hidaka (1980), usaron 2-p-toluidinilnaftaleno-6-sulfonato (TNS) para mostrar la exposición de dominios hidrofóbicos; basados en el hecho de que el TNS interacciona con porciones hidrofóbicas de proteínas realizaron un análisis cinético de la inhibición por TNS de la activación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (una proteína blanco de CaM) mostrando que el TNS puede interaccionar con CaM en presencia de calcio e inhibir a la cinasa, compitiendo con esta por su unión con CaM. Estos resultados sugirieron que Ca^{2+} se une a CaM induciendo un cambio conformacional que expone dominios hidrofóbicos (Tanaka y Hidaka, 1980).

Gopalakrishna y Anderson (1982) observaron que la CaM puede unirse a residuos hidrofóbicos de fenil-sefarosa en presencia de calcio pero no en presencia de EGTA. También observaron que el uso de NaCl 2M no permitía la elución de CaM, indicando que la unión no se debía a interacciones iónicas. Sin embargo CaM sí podía ser eluida con detergentes no iónicos como el Tritón X-100 al 1% o etilenglicol al 50% demostrando así la expresión de dominios hidrofóbicos en la superficie de CaM en presencia de calcio.

5 CALMODULINA Y CICLO CELULAR

Davis y col., (1986) observaron que la ausencia del gene de CaM es letal en levaduras, lo anterior demostró por primerá vez en cualquier organismo que CaM es una proteína esencial para la vida. Esta observación es apoyada por estudios que muestran que calmodulina es una proteína que actúa como mediadora de un amplio espectro de funciones celulares y de enzimas dependientes de calcio (Cheung, 1980; Means y Dedman, 1980; Smith y col., 1990; Means y col., 1991).

5.1 Localización De Calmodulina Durante El Ciclo Celular

Se sabe que en células PtK2 en interfase, CaM está presente en el citoplasma en las fibras de tensión y que está ausente en el núcleo (Dedman y col., 1978; Welsh y col., 1978).

Se ha demostrado que calmodulina se asocia a un subgrupo de microtúbulos resistente a drogas y a bajas temperaturas y se ha sugerido que puede tener un efecto estabilizador independiente de calcio en los microtúbulos del cinetocoro (Welsh y col., 1979; Deery y col., 1984; Sweet y Schroeder, 1988)

Welsh y col., (1979) usando células PtK2 y CHO han reportado que durante la profase, la CaM se encuentra cerca de los centriolos; durante la prometafase y la metafase está concentrada en la parte media del huso mitótico y durante la citocinesis está en el surco de división. La localización de CaM durante la mitosis sugiere que puede estar interaccionando con cierto tipo de microtúbulos o con proteínas asociadas a ellos en el aparato mitótico. Se ha demostrado que CaM regula el efecto del calcio en el ensamble/desensamble de microtúbulos (Welsh y col., 1978) y se ha propuesto que participa en el movimiento de cromosomas en la anafase (Welsh y col., 1979). La localización de CaM en el huso mitótico también ha sido demostrada en células de plantas superiores (Vantard y col., 1985; Sweet y Schroeder, 1988))

Además se ha observado que la distribución de CaM en el huso mitótico en ausencia y presencia de Ca^{2+} es igual, lo cual apoya la hipótesis de que CaM interacciona con el aparato mitótico de forma Ca^{2+} -independiente (Sweet y Schroeder, 1988).

Se ha propuesto que CaM libre de calcio regula la estabilidad de los microtúbulos del cinetocoro antes de la anafase. Pero durante la anafase CaM puede mediar la desestabilización dependiente de calcio de dichos microtúbulos permitiendo el movimiento de los cromosomas hacia los polos del huso (Sweet y col., 1988). Estos planteamientos son apoyados por experimentos de microinyección en células en división. La inyección del complejo Ca^{2+}/CaM en cantidades elevadas en células en prometafase temprana produjo un retraso en la progresión a la anafase. Este efecto no fue producido por CaM libre de calcio. La inyección de calcio solo a diferentes concentraciones,

también produjo un retraso, pero menor al producido por el complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. A los cinco minutos después de la microinyección de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se observó un acortamiento en los túbulos del cinetocoro y de los microtúbulos interpolares pero no de los microtúbulos astrales (Keith, 1987).

Durante la interfase CaM puede localizarse tanto en el citoplasma como en el núcleo, siendo su concentración en este último de entre 1-10 mM dependiendo de la célula o tipo de tejido. Se ha propuesto que CaM podría atravesar la envoltura nuclear por difusión pasiva a través de los poros nucleares, sin embargo se ha demostrado que existe un factor en el citoplasma que la transporta al núcleo. Se ha sugerido que el equilibrio en la distribución nucleocitoplásmica de CaM puede ser determinado por la afinidad, concentración y localización de proteínas blanco en el núcleo y en el citoplasma (Pruschy y col., 1994).

En células en proliferación se ha observado que CaM puede asociarse a la matriz nuclear y estimular la actividad de algunas enzimas (Serratosa y col., 1988; Pujol y col., 1989; Veer Reddy y col., 1992).

También se ha observado que CaM cambia de localización durante la reacción acrosomal. Durante la capacitación CaM está uniformemente distribuida en el acrosoma del espermatozoide y durante la reacción acrosomal se compartamentaliza en la región ecuatorial y postacrosomal de la cabeza del espermatozoide (Trejo y Mújica, 1990).

5.2 Concentración De CaM Durante El Ciclo Celular

La concentración de CaM en el inicio del proceso mitótico en células CHO-K1 en mitosis es de $158 \text{ ng}/10^6$ céls. En G1 temprana, esta concentración se reduce a la mitad; En la transición G1/S los niveles de CaM se incrementan alcanzando el valor de $158 \text{ ng}/10^6$ céls. Este incremento durante G1/S es independiente de la duración de G1 (Chafouleas y Means, 1982).

Rasmussen y Means (1987) han estudiado los efectos del incremento en el nivel de CaM en el ciclo celular utilizando células transformadas de ovario de ratón C127 con el virus del papiloma

bovino como vector de expresión del gene de calmodulina. Observaron que el incremento intracelular de CaM origina un acortamiento del ciclo celular, debido a la reducción de la duración de G1. Estos resultados sugirieron que la velocidad del ciclo celular es sensible a la concentración de CaM intracelular. Esta observación fue confirmada usando vectores que expresan ARN silvestre y antisentido para CaM. La progresión del ciclo celular fue afectada por el incremento o decremento transitorio en los niveles de CaM y tanto la fase G1 como la de mitosis son sensibles a cambios en la concentración intracelular de CaM (Rasmussen y Means, 1989).

Ohya y Aranku (1989) utilizando levaduras mutantes deficientes en la expresión de CaM observaron que no completaban su división nuclear y el huso no se elongaba. También observaron que las células deficientes en CaM presentaban pérdida de material genético y una segregación anormal de los cromosomas.

La producción de mutantes termosensible que expresan bajos niveles de CaM ha permitido confirmar que CaM es requerida para la segregación normal de cromosomas, durante el proceso mitótico (Davis, 1992).

5.2.1. Concentración De CaM Durante La Meiosis

A diferencia de lo que ocurre en las células somáticas, donde la síntesis de CaM se realiza durante la transición G1/S pero no en la mitosis, las células germinales sintetizan CaM durante la meiosis. En ovocitos de Xenopus cuando se abole el bloqueo en la transición de G2 a la profase de la primer división meiotica por progesterona, se observa un aumento del 28-70% en el contenido de CaM (Cartaud y Ozon, 1980).

En las células meióticas maculinas se observa que el contenido de CaM aumenta durante la primera profase meiótica, los espermatoцитos leptoteno presentan la mitad del contenido de CaM determinado en espermatoцитos paquiteno (D'Agostino y col., 1983; Trejo y col., 1985; Slaughter y col., 1987)

Estas observaciones sugieren que a diferencia de las células que se multiplican por mitosis, el proceso meiótico va acompañado por una síntesis de CaM durante la profase de la primera división tanto en las células meióticas femeninas como masculinas.

*También se observó que el bloqueo de la meiosis en ovocitos de *Xenopus* podía desaparecer por la inyección de CaM. Por lo que se sugirió que CaM juega un papel muy importante también en la meiosis (Cartaud y Ozon, 1980).*

Además, se ha observado que durante la profase meiótica CaM experimenta un cambio de localización en el gameto masculino, pasando del citoplasma al núcleo cuando se alcanza el estadio de diploteno y permanece en ese compartimento hasta la etapa de espermatidas tipo Golgi (Trejo y col., 1985). En estos estadios, la presencia de CaM en el núcleo sugiere funciones para esta proteína en eventos nucleares tales como condensación de cromatina y regulación del flujo de calcio entre el núcleo y el citoplasma. Además en estas células CaM está presente en partes muy definidas lo cual parece ser fundamentalmente importante para la regulación durante la espermatogénesis (Weinman, 1986).

5.3 Efecto De Las Mutaciones De CaM En La Progresión Del Ciclo Celular

Cuando la arginina 116 de CaM es substituida por fenilalanina, las mutantes de Schizosaccharomyces pombe son viables y no muestran defectos en su crecimiento, pero sí existe una deficiencia en su esporulación, durante la encapsulación, luego de la segunda división meiótica. Otras mutaciones en la posición 116 tales como la substitución por serina o ácido aspártico, muestran un efecto en la esporulación similar al provocado por fenilalanina 116 (Takeda y col., 1989).

En modelos experimentales utilizando levaduras que expresan solo la mitad NH_2^+ o COO^- terminal de la molécula de CaM no se han observado modificaciones en la proliferación celular. Estos efectos se observaron solamente cuando el nivel de expresión de la molécula era varias veces más

alto, comparado con el nivel de CaM en condiciones normales. Estos resultados dan evidencias de que la unidad estructural de CaM (el par de estructuras EF-Hand de cada una de sus mitades) y no su estructura global es suficiente para realizar sus funciones en la proliferación. Aunque la mitad de la CaM puede ser suficiente para sostener la proliferación celular, se demostró que otras funciones celulares sí fueron afectadas por la ausencia de CaM íntegra.

Las células con la mitad de CaM mostraron un fenotipo sensible a la temperatura, debido posiblemente a cambios en la afinidad por calcio así como en su interacción con las proteínas blanco y en su estabilidad (Sun y col., 1991).

La sustitución de una o más fenilalaninas por alanina en levaduras, ha revelado distintas funciones esenciales para estos residuos de fenilalanina; así por ejemplo, se ha encontrado que Fen 16 y 19 son determinantes para la localización subcelular de CaM, Fen 65 y 68 están involucradas en la división nuclear, Fen 89 y 140 están involucradas en la formación de brotes o yemas y Fen 92 en la organización de actina (Ohya y Botstein, 1994).

En levaduras con mutaciones en donde el aspartato de la posición 1 y el glutamato de la posición 12 dentro de las asas de unión a calcio han sido substituidas por residuos no polares se observa que esta proteína no muestra los cambios conformacionales ni de movilidad electroforética en presencia de calcio a altas concentraciones. Sin embargo estas levaduras mutantes no mostraron cambios o alteraciones durante la proliferación celular (Geiser y col., 1991).

6 INTERACCIONES DE CaM CON PROTEINAS BLANCO

6.1 Proteínas Activadas Por CaM En Forma Ca²⁺ Dependiente

Se considera que el cambio conformacional dependiente de calcio es el responsable de la capacidad de CaM para interaccionar con diferentes proteínas (Crouch y Klee, 1980).

Cox y col, (1980) propusieron que la interacción de CaM con enzimas blanco ocurre sólo después de un mínimo de 3 calcio unidos a CaM e identifican a $\text{CaM} \cdot \text{Ca}^{2+}_3$ y $\text{CaM} \cdot \text{Ca}^{2+}_4$ como las únicas especies activas para la fosfodiesterasa, adenilato ciclasa y $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPasa}$ (Crouch y Klee, 1980; Cox y col., 1980; Cox, 1983).

CaM interacciona con más de 20 enzimas en forma calcio dependiente incluyendo proteínas cinasas tales como la cinasa de la cadena ligera de miosina, fosforilasa cinasa, proteína cinasa II, y NAD cinasa; fosfatasa de proteínas, proteínas motoras y componentes del citoesqueleto, fosfolipasa A₂, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$ de membrana plasmática, glucógeno sintasa y guanilato ciclasa entre otras (Means y Dedman, 1980; Cohen y Klee, 1988).

6.2 Proteínas Que Interaccionan Con CaM En Forma Ca^{2+} Independiente

La capacidad de algunas proteínas para unir CaM en ausencia de calcio ha sido observada por varios autores utilizando proteínas renaturalizadas después de electroforesis y CaM marcada con ¹²⁵I. Algunas de ellas son: la proteína de 110 kD de las células epiteliales del intestino (Gleney y Weeber, 1980), la fosforilasa cinasa de hígado (Cohen y col., 1978), la troponina I de músculo (Olwin y col., 1982), P-57 de cerebro (Andreason y col., 1983; Cimler y col., 1985), la adenilato ciclasa de bacteria (Greenlee y col., 1982; Kilhoffer y col., 1983), las proteínas de 110 y 97 kD de vesículas con reacción acrosomal (Hernández y col., 1994) así como una isoforma de la miosina-1 de 105 kD que une a CaM en presencia de EGTA (Colucio, 1994).

También se ha observado que CaM estimula a la adenilato ciclasa de Bordetella pertussis tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} libre (Greenlee y col., 1982). Se ha observado que altas concentraciones de CaM pueden activar la adenilato ciclasa de Bordetella pertussis en presencia de EGTA. Es decir que existen dos mecanismos de activación de la enzima por CaM: uno de alta afinidad, calcio dependiente y otro de baja afinidad, que aparentemente no requiere calcio (Kilhoffer y col., 1983).

Incluso, la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} /CaM puede convertirse en una enzima independiente de calcio y de CaM después de autofosforilarse (Saitoh y Schwartz, 1985; Miller y Kennedy, 1986; Colbran y col., 1988, 1989).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Calmodulina es la principal proteína aceptora de calcio en células no musculares (Cheung, 1980; Means y Dedman, 1980; Chafouleas y Means, 1982; Rasmussen y Means, 1989; Means y col., 1991). Esta proteína es esencial para la vida, pues las células que carecen de este gene no son viables (Davis y col., 1986).

Existen evidencias que muestran la participación de CaM tanto en su forma libre como formando complejo con calcio en la proliferación celular.

En levaduras y hongos se ha demostrado que las funciones relacionadas con la progresión del ciclo celular y la segregación de cromosomas durante la mitosis son sensibles al nivel intracelular de CaM y que estas funciones no dependen de la formación del complejo Ca^{2+}/CaM .

No se han identificado las proteínas que unen a CaM en forma Ca^{++} independiente en el huso mitótico ni su participación en la migración de los cromosomas durante la división celular.

*En ovocitos de *Xenopus* se ha demostrado que la separación de las cromátidas hermanas es estimulada por Ca^{2+}/CaM a través de la activación de la proteína cinasa II (Lorca y col., 1991; 1993; 1994; Morin y col., 1994)*

También se sabe que CaM se sintetiza en la transición G1/S y durante la profase de la primera división meiótica.

Se ha visto que además de estos cambios en el contenido de calmodulina, existe un cambio de localización en la profase de la meiosis I en las células germinales masculinas, pasando del citoplasmática a nuclear (Lagace y col., 1981; Trejo y col., 1985).

También se detectó un incremento en las proteínas capaces de unir CaM en forma calcio dependiente durante la aparición de espermatoцитos primarios (Trejo y col., 1985)

Dado que la fosforilación es un importante mecanismo de regulación por el cual puede amplificarse la señal dada por Ca^{2+} es importante definir si durante la profase meiótica se expresa la actividad de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+}/CaM .

HIPOTESIS

1. *En núcleos de espermatoцитos primarios de rata en la primera profase meiótica existen tres tipos de proteínas que unen a calmodulina: a) dependientes de calcio, aquellas que se unen a CaM solo en presencia de calcio; b) independientes de calcio, las que se unen a CaM tanto en presencia como en ausencia de calcio y c) calcio inhibidas, las que se unen a CaM solo en presencia de EGTA.*
2. *Los espermatoцитos primarios de rata en profase meiótica presentan actividad de proteína cinasa estimulada por Ca^{2+} -CaM.*

OBJETIVO GENERAL

Identificación de las proteínas aceptoras de CaM en el núcleo de espermatoцитos primarios de rata durante la primera profase meiótica, así como identificación de actividad de proteínas cinasas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. *Purificación por cromatografía de afinidad de las proteínas que unen a CaM en forma calcio dependiente.*
2. *Identificación de las proteínas que unen a CaM en forma calcio dependiente, calcio-independiente y en ausencia de calcio por "Overlay" con: a) CaM marcada con biotina y b) CaM marcada con ^{125}I .*
3. *Detección de actividad de proteína cinasa activada por Ca^{2+} /CaM.*

MATERIAL Y METODOS

1 OBTENCION DE CELULAS TESTICULARES DISPERSAS Y PURIFICACION DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS DE RATA EN LA PRIMERA PROFASE MEIOTICA.

La obtención de las células testiculares se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Alemán y col., (1978). La dispersión de las células fue conseguida por acción de la colagenasa seguida de un tratamiento mecánico con pipeta Pasteur. En algunos experimentos se usaron estas células sin otro tratamiento. Las células dispersas fueron enjuagadas y resuspendidas en solución salina amortiguada (NaCl 115 mM, Hepes 20 mM pH 7.4).

Para la obtención de los espermatozoides primarios se incluyó una centrifugación de las células dispersas en gradientes de densidad de Dextrán T 500-MEM (7, 11 y 13.3 % p/v). Los espermatozoides primarios fueron obtenidos en las interfase que se forma entre las soluciones al 7-11 y 11-13.3 % del gradiente.

Para eliminar el Dextrán fueron resuspendidos en más MEM y se centrifugaron a 1900 X g. La pastilla final fue lavada también con solución salina.

Todos los pasos descritos se realizaron a temperatura ambiente y empleando soluciones filtradas y/o esterilizadas por filtración en membranas Millipore con 0.22 mm de diámetro de poro.

La composición de las poblaciones celulares obtenidas después de la centrifugación en gradientes de Dextrán-MEM ha sido descrita por Alemán y col., (1978) y Trejo y col., (1995) y se presentan en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. COMPOSICION DE LA POBLACION DE CELULAS DISPERSAS DE TESTICULO DE RATA DE 21 DIAS DE EDAD (Trejo y col., 1995).

TIPO CELULAR	COMPOSICION
Espermatogonias	5.11 ± 1.17
Espermatocitos Primarios Leptoteno	7.37 ± 5.11
Espermatocitos Primarios Paquiteno	65.43 ± 3.09
Total de Espermatocitos	72.80 ± 2.18
Total de Células Germinales	80.21 ± 5.24
Células de Sertoli	7.00 ± 4.45
Células de Leydig	11.25 ± 3.81

Tabla 3. COMPOSICION DE LAS POBLACIONES CELULARES OBTENIDAS MEDIANTE LA TECNICA DE ALEMAN Y COL., (1978).

TIPO CELULAR	COMPOSICION (capas 2 y 3)
Espermatogonias	5.42 ± 3.33
Espermatocitos Primarios Leptoteno	3.14 ± 1.06
Espermatocitos Primarios Paquiteno	80.38 ± 6.1
Total de Espermatocitos	84.03 ± 4.42
Total de Células Germinales	89.45 ± 6.27
Células de Sertoli	2.07 ± 0.60
Células de Leydig	1.66 ± 1.25

2 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE NUCLEOS DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS DE RATA

2.1 Obtención De La Fracción Nuclear A Partir De Un Homogeneizado Total Del Tejido Y Purificación De Los Núcleos Por Centrifugación En Gradientes De Sacarosa.

A partir de un homogeneizado total de testículo de rata al 10% p/v (resuspendido en solución salina) de 21 días de edad se obtuvo la pastilla nuclear por centrifugación a 770 x g 10 min a 4° C. La pastilla fue recuperada y colocada sobre gradientes discontinuos de sacarosa-MEM (0.585, 0.8775 y 1.17 M), los tubos se centrifugaron a 40 000 x g 60 min. Los núcleos se recuperaron en la interfase de 0.8775 y 1.17 M de sacarosa.

Posteriormente se decidió resuspender la pastilla nuclear utilizando NaHSO₃ 40 mM, MgCl₂ 2 mM, Hepes 20 mM a pH 7.2 como recomendaron Jagadesware y col., (1983).

Para evitar la aglutinación de material se decidió incluir citrato de sodio 20 mM y acetato de sodio 40 mM (Bush y Daskal, 1977) en la preparación de los gradientes discontinuos de densidad con sacarosa a las concentraciones mencionadas, centrifugando bajo las mismas condiciones.

2.2 Obtención De La Fracción Nuclear Mediante El Uso De Tritón X-100

También se intentó la purificación de los núcleos a partir del homogeneizado total. El testículo se homogeneizó y los núcleos se colectaron por centrifugación como en el método anterior. La pastilla nuclear se trató con Tritón X-100 (Birnie, 1978). Se probaron diferentes concentraciones de Tritón X-100 al 1, 0.5 y 0.25 % a diferentes tiempos de incubación desde 120 hasta 30 minutos.

2.3 Obtención De Núcleos Por Choque Hipotónico A Partir De Los Espermatoцитos Primarios .

Los espermatoцитos primarios obtenidos por la técnica de Alemón y col., la pastilla celular fue resuspendida en solución hipotónica ($MgCl_2$ 5 mM, HEPES 10 mM, ITS 100 $\mu g/ml$, PMSF 5 μM , Leupeptina 20 μM , TLCK 2 μM , pH 7.5) a 4 °C durante 15 minutos. Al término de este tiempo, los núcleos fueron recuperados por centrifugación a 55 xg 10 minutos. El botón fue resuspendido en solución salina y colocado sobre un colchón de sacarosa 0.8 M , HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, ITS 100 mg/ml, pH 7.5 el tubo se centrifugó a 40000 x g 60 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en solución salina, se alicuotó y se mantuvo a - 75° C hasta ser usada.

3 CRITERIOS DE PUREZA DE LOS NÚCLEOS DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS

3.1 Contenido de ADN

Para determinar el contenido de ADN de las muestras, se siguió la técnica descrita por Thomas y Farquhar (1978) que se basa en una hidrólisis ácida que libera a la desoxirribosa del ADN. La desoxirribosa reacciona con ácido diaminobenzóico y el complejo resultante se cuantificó por fluorescencia. Esta técnica tiene un rango de sensibilidad que va de 0.1 a 10 mg de ADN. Para las determinaciones aquí realizadas se uso el rango que va de 0.1 a 1 mg de ADN.

3.2 Actividad De La Glucosa 6 Fosfatasa

La presencia de contaminantes de retículo endoplasmático fue evaluada mediante la determinación de la G6Pasa. La actividad de la glucosa 6 fosfatasa fue determinada en la población de espermatozoides primarios, en los núcleos purificados de estas células y en el sobrenadante obtenido durante el choque hipotónico. La determinación se hizo tomando alícuotas de 100 µg de proteína de cada fracción, en un volumen de incubación final de 0.5 ml. Se utilizó el medio de incubación descrito por Nordlie, (1979) y por Díaz Ponce y Trejo (1993).

El medio de incubación empleado contenía MES 50 mM e Imidazol 137 mM a pH 6.5 (300 µl) y CdI₂ 2.5 mM (5 µl). La reacción se inició por la adición de Glucosa 6 Fosfato 25 mM (50 µl) y por incubación a 37° C 60 minutos. La reacción se detuvo con HClO₄ al 6 % (1 ml) enfriado previamente a 4°C. Se centrifugó a 85 x g durante 15 minutos. El Pi liberado se determinó por el método de Bonting y col, (1964) en 1 ml del sobrenadante. El complejo colorido formado por el Pi fue cuantificado por técnicas de espectrofotometría a 700 nm. Para determinar el tiempo cero de la reacción se agregó el HClO₄ antes de agregar el sustrato.

3.3 Actividad De Deshidrogenasa Láctica

La presencia de constituyentes citoplásmicos en la muestra de núcleos purificados fue evaluada tomando como base la actividad de deshidrogenasa láctica. La determinación de la actividad enzimática fue realizada utilizando lactato de litio y NAD⁺ como sustratos. La aparición de NADH fue seguida a 340 nm. Los resultados obtenidos (Trejo, 1995 observaciones no publicadas) muestran una contaminación con elementos del citoplasma de 6.06 ± 4.44 % (n=4).

4 EXTRACCION Y PURIFICACION DE CALMODULINA

La extracción y purificación de CaM de testículo de toro se realizó de acuerdo a Gopalakrishna y Anderson (1982) y Dedman y Kaetzel (1983). La pureza de la CaM fue determinada por electroforesis. El cambio de movilidad electroforética en presencia y ausencia de calcio se consideró como criterio para definir la actividad biológica de la CaM después de ser purificada.

4.1 Preparación De Una Columna De Sefarosa-CaM

Se pesaron 0.5 g de sefarosa activada con bromuro de cianógeno (CNBr) y se dejó hidratar en HCl 1 mM, posteriormente la sefarosa activada fue lavada con 100 ml de HCl filtrado en membranas milipore al vacío. La sefarosa húmeda fue recuperada y puesta en contacto con 2 mg de calmodulina disuelta en 1 ml de amortiguador de acoplamiento (NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3), esta mezcla se agitó suavemente por inversión 5 horas a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4° C; se centrifugó a 300 xg 5 minutos y el sobrenadante, que contenía a la calmodulina no acoplada se retiró, la pastilla obtenida fue resuspendida en 2 ml de amortiguador de acoplamiento y centrifugada a 300 x g 5 minutos, esta última pastilla se resuspendió en glicina 200 mM a pH 2.7, agitando suavemente por inversión una hora a temperatura ambiente (para bloquear los sitios activos residuales). Finalmente la sefarosa con la calmodulina acoplada se vació a una columna (Kaetzel y Dedman, 1983).

5 PURIFICACION DE PROTEINAS TESTICULARES QUE SE UNEN A CaM EN FORMA DEPENDIENTE DE Ca²⁺ POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Una muestra de células dispersas totales del testículo de rata de 21-24 días de edad, que contenía 24.14 mg de proteína fue homogeneizada con 25 ml de amortiguador de homogeneización (TRIS 50 mM, NaCl 0.4 M, EDTA 50 mM, 2-mercaptoetanol 7 μ M, PMSF 5 μ M, leupeptina 20 μ M y TLCK 2 μ M). La mezcla fue agitada suavemente por inversión una hora a 4° C, posteriormente se adicionó más amortiguador de extracción y se centrifugó a 16000 x g 75 minutos. El sobrenadante se dializó toda la noche a 4° C contra: Tris 10 mM, acetato de magnesio 1 mM, NaCl 0.2 M y 2-mercaptoetanol 7 mM a pH 7.4. Posteriormente se centrifugó a 4300 x g 20 minutos y el sobrenadante se aplicó a una columna de CaM-Sefarosa equilibrada previamente y a 4° C con NaCl 0.2 M, CaCl₂ 1 mM y TRIS 10 mM a pH 7.4.

La columna se lavó con amortiguador de baja concentración de sales (NaCl 0.2 M, CaCl₂ 1 mM, TRIS 10 mM, pH 7.4); con amortiguador de alta concentración de sales (NaCl 0.5 M, CaCl₂ 1 mM, TRIS 10 mM, pH 7.4) y nuevamente con amortiguador de baja concentración de sales. Se eluyó con amortiguador de baja concentración de sales sin calcio y con EGTA 3 mM, colectándose fracciones de 20 gotas a las que se les determinó su D.O. a 280 nm, reuniéndose las de los valores más altos.

Los pesos moleculares de las proteínas que se unieron en forma dependiente de calcio a CaM aquí obtenidas fueron identificados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % teñidos con plata.

222879

6 IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS NUCLEARES QUE UNEN A CaM

Se trabajó tanto con los núcleos purificados de las células totales como con los de los espermatoцитos primarios. La identificación de los tres tipos de proteínas que unen a CaM: a) las calcio-dependientes, b) las calcio-independientes y c) las calcio-inhibidas fueron identificadas usando dos sondas CaM marcada con biotina y CaM marcada con ^{125}I .

6.1 CaM Marcada Con Biotina

Las muestras nucleares solubilizadas fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 8 % y transferidas a papel de nitrocelulosa (PNC). Tanto el gel como el PNC fueron equilibrados previamente con amortiguador de transferencia (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20 % v/v, pH 8.3). La transferencia se realizó a 360 miliamperes constantes durante 7 horas o toda la noche a 4 °C.

Posteriormente, los sitios reactivos inespecíficos se bloquearon incubando el papel de nitrocelulosa (PNC) una hora con albúmina sérica de bovino (ASB) al 5 % diluida en TBS- Ca^{2+} : Tris 50 mM, NaCl 0.2 M, MgCl_2 50 mM y CaCl_2 0.5 mM o EGTA 2 mM (TBS-EGTA), pH 7.5. Para detectar la presencia de proteínas blanco de CaM se incubó dos horas a 37 °C con calmodulina biotinilada (CaM-Biot) diluida en TBS- Ca^{2+} o TBS-EGTA. El exceso de CaM-Biot no unida fue eliminado por lavados con TBS conteniendo Tween-20 al 0.05 % (TBS-T) 2 veces por 10 minutos. Al término de este tiempo, la unión de CaM-Biot a las proteínas de los espermatoцитos y sus núcleos fue detectada utilizando avidina-peroxidasa o estreptoavidina-fosfatasa alcalina diluidas en TBS-T y ASB al 5 % incubando durante una hora a 37° C.

En el caso de haber incubado con avidina-peroxidasa, el PNC se lavó con TBS-T 2 veces 10 minutos, con TBS 2 veces 5 minutos y finalmente con solución de fosfatos (NaHPO_4 50 mM, pH 7.4, durante 15 minutos). El color de las bandas se desarrolló incubando con amortiguador de

preincubación: 30 ml de diaminobencidina (DAB), más 0.9 ml de NiCo, más 150 ml de peróxido de hidrógeno al 1 %.

DAB: 30 mg de DAB en 60 ml de amortiguador de fosfatos, agitados 30 minutos antes de usarlos y filtrados.

NiCo: 20 mg de cloruro de níquel y 20 mg de cloruro de cobalto en 2 ml de agua

Después de lo anterior, el PNC se lavó 4 veces 5 minutos con amortiguador de fosfatos, 2 veces 5 minutos con agua destilada y se dejó secar el PNC al aire.

En el caso de haber incubado con estreptoavidina-fosfatasa alcalina, el PNC se lavó 3 veces 15 minutos con TBS, seguido por un lavado de 15 minutos con amortiguador del sustrato (TRIS 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 50 mM, CaCl₂ 0.5 mM o EGTA 2 mM, pH 9.5), las bandas se detectaron incubando una hora con nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3 indol fosfato (NBT/BCIP) en amortiguador del sustrato y lavando finalmente con agua (Klee y col., 1980; Glenney y Weber, 1983; Gershoni y Palade, 1983; Billingsley y col., 1985)

6.2 CaM Marcada Con ¹²⁵I

Para detectar a las proteínas de unión a CaM usando como sonda CaM marcada con ¹²⁵I, se siguió la técnica descrita por Glenney y Weber (1980) tanto en papel de nitrocelulosa como en geles de poliacrilamida-SDS al 8%. La actividad específica de la CaM-¹²⁵I fue de 93.3 µCi/µg y se adicionaron 5 µCi para 3 carriles en cada gel.

7 IDENTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINAS CINASA

Las células testiculares totales o de los espermatozoides primarios (150 µg de proteína) de testículo de rata de 21-24 días de edad, resuspendidas en solución salina, fueron colocadas en

tubos previamente enfriados, y se agregaron los siguientes medios (Kelly y col., 1987; Hardie, 1982; Hardie y Cohen 1982).

Medio con EGTA; Hepes 10 mM, MgCl₂ 5 mM, EGTA 0.5 mM, DTT 0.5 mM, pH 7.2

Medio con Calcio; Hepes 10 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 2 mM, DTT 0.5 mM, pH 7.2

Medio con Ca²⁺-CaM; Hepes 10 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 2 mM, CaM 2 mg/100 µl, DTT 0.5 mM, pH 7.2

Posteriormente se agregaron en alícuotas de 25 µl NaF 25 mM y/o Na₃VO₄ 1 mM (concentraciones finales para un volumen final de incubación de 0.5 ml) como inhibidores de fosfatasas, la reacción se inició agregando 50 µl de una solución de ATP 100 mM. La mezcla anterior se mantuvo 5 minutos a 4° C, luego de este tiempo, la reacción se detuvo con TCA al 30 % más Pi 5 mM y se filtró a través de filtros Millipore GS de 0.22 mm (usando una bomba de vacío) y se enjuagó el tubo que contenía la mezcla con 10 ml de TCA más Pi; estos 10 ml de lavado, también fueron filtrados. Posteriormente el filtro se colocó en un vial, se dejó secar y se agregó líquido de centelleo para realizar el conteo de radioactividad. Los tiempos cero, se realizaron agregando primero el TCA más Pi y después el ATP más ATP-P³² (Kelly y col., 1987; Hardie, 1982; Hardie y Cohen 1982).

RESULTADOS

1 OBTENCION DE CELULAS DISPERSAS Y PURIFICACION DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS DE RATA EN LA PRIMERA PROFASE MEIOTICA

Siguiendo la técnica de Alemán y col., (1978) se dispersaron las células de testículo de rata de 21 días de edad y se obtuvo una población con 70 % de espermatoцитos primarios (tabla 2), al pasar por los gradientes de dextran-MEM la proporción de células meióticas aumentó al 85-90 % (tabla 3).

2 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS NUCLEOS DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS.

2.1 Obtención De La Fracción Nuclear A Partir De Un Homogeneizado Total Del Tejido Y Purificación De Los Núcleos Por Centrifugación En Gradientes De Sacarosa.

Este método fue descartado para la purificación de los núcleos debido a la formación de grandes agregados del material después de la centrifugación, ya que esto impedía el conteo de núcleos para determinar el contenido de ADN/núcleo y con ello confirmar o no su origen en los espermatoцитos primarios.

En el método de Bush y Daskal (1977), todo el material se recuperó en el fondo del tubo, no se separó en ninguna de las interfases. Al observar el material recuperado en el botón se vio que la integridad de los núcleos se había perdido. Por lo tanto no se utilizó tampoco este método.

2.2 Obtención De La Fracción Nuclear Mediante El Uso De Tritón X-100

Por este método no se logró una adecuada separación de los núcleos. Se deshacían los agregados pero los núcleos se rompían.

El citrato al igual que el tritón X-100 tuvieron un efecto deletereo en la estructura nuclear. La aglutinación del material tampoco pudo evitarse con EDTA 1 mM.

Estos resultados mostraron que la obtención de núcleos de espermatocitos primarios a partir del homogeneizado total de testículo no es adecuada.

2.3 Obtención De Núcleos Por Choque Hipotónico A Partir De Los Espermatocitos Primarios.

Una vez obtenida la población de espermatocitos primarios por la técnica de Alemán y col, los núcleos fueron aislados siguiendo la técnica de Birnie (1978).

Los componentes citoplásmicos fueron eliminados por tratamiento hipotónico seguido de centrifugación sobre un colchón de sacarosa 0.8 M a 40000 x g 60 minutos a 4°C.

Los núcleos así obtenidos no formaron agregados y permanecieron íntegros. El rendimiento de espermatocitos primarios como de sus núcleos se muestra en la tabla 4.

La pureza de los núcleos así obtenidos fue determinada aplicando 3 criterios: a) el contenido de ADN para definir el origen tetraploide de los núcleos purificados, b) la actividad de G6Pasa como marcadora de elementos del retículo endoplásmico, c) la actividad de LDH como marcadora de elementos citoplásmicos.

Tabla 4. RENDIMIENTO

ESPERMATOCITOS PRIMARIOS/g TEJIDO	NUCLEOS /g TEJIDO
$41.38 \times 10^6 \pm 1.867 \times 10^6$ $n=7$	$25.49 \times 10^6 \pm 2.738 \times 10^6$ $n=3$

3 DETERMINACION DE LA PUREZA DE LOS NUCLEOS AISLADOS DE CELULAS TESTICULARES

3.1 Contenido De ADN

Este contenido se determinó por el método descrito por Thomas y Faquhar (1978). Los resultados obtenidos para las células dispersas y para los núcleos de estas células se muestran en la tabla 5. En esta tabla se puede observar que el contenido promedio de ADN por célula o núcleo es muy similar al reportado para estas células que se encuentran en la primera profase meiótica y que tienen un contenido de ADN de $4n$ (14 pg/núcleo). Las desviaciones representan el promedio de 7 determinaciones en el caso de las células dispersas y de 5 para los núcleos de estas.

Tabla 5. CONTENIDO DE ADN EN CELULAS DISPERSAS Y LOS NUCLEOS DE ESTAS

pg ADN/célula	pg ADN/núcleo
12.16 ± 5.6 $n=7$	14.78 ± 2.76 $n=5$

3.2 Actividad De La Glucosa 6 Fosfatasa

La actividad de la glucosa-6-fosfatasa determinada en las células dispersas de testículo de rata y en los núcleos después del choque hipotónico se muestra en la tabla 6. Con este criterio se puede decir que los núcleos no presentan contaminación con retículo endoplásmico ni aparato de Golgi. En la tabla se muestran los resultados obtenidos con una preparación de células dispersas de testículo de rata de 21 días de edad. Los resultados representan el promedio de dos determinaciones cada una por duplicado.

La actividad de G6Pasa fue determinada también en la población enriquecida en espermatoцитos primarios después de la centrifugación en gradientes de Dextrán-MEM y en los núcleos purificados a partir de estas células. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos. La actividad específica en los núcleos fue del 13 % respecto a la actividad de los espermatoцитos primarios antes de fraccionarse. Los datos que se muestran representan el promedio de 2 determinaciones por triplicado.

Con base en las determinaciones del contenido de ADN/núcleo correspondiente a una célula tetraploide, se puede decir que los núcleos purificados provienen de los espermatoцитos primarios. Por otra parte dadas la baja actividad de LDH y de G6Pasa que se determinó en esta fracción, se puede afirmar que las proteínas presentes en la fracción nuclear representan en un 90 % a las proteínas propias de los núcleos de los espermatoцитos primarios.

Tabla 6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GLUCOSA-6-FOSFATASA EN CELULAS DISPERSAS DE TESTICULO DE RATA Y EN LOS NUCLEOS DE ESTAS.

MUESTRA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μ moles Pi/mg prot hr)
Células Totales	0.01975 \pm 0.002
Núcleos	0
Choque Hipotónico	0.02038 \pm 0.000

Tabla 7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA 6 FOSFATASA EN ESPERMATOCITOS PRIMARIOS DE RATA Y DE LOS NUCLEOS DE ESTOS.

MUESTRA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (μ mol Pi/mg prot hr)
Espermatocitos Primarios	0.538 \pm 0.05
Núcleos	0.072 \pm 0.02
Choque Hipotónico	0.235 \pm 0.006

4 PURIFICACION DE CALMODULINA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

El patrón de elusión de la columna de fenil-sefarosa con EDTA 4 mM se observa en la gráfica 1. En dicha gráfica se puede observar un incremento en la absorción a 280 nm que corresponde a las fracciones 22 a 35.

Estas fracciones fueron separadas en dos grupos; por un lado las fracciones 22, 23, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 y por otro lado las fracciones 24, 25, 26, 27, 28 y 29. Ambos grupos fueron dializados contra solución salina boratos a pH 8.4 y se midieron sus D.O. a 280 nm el primer grupo mostró una densidad de 0.174 y el segundo de 0.503. Dado que el coeficiente de extinción de la CaM es de 0.221 a esa longitud de onda, y tomando en cuenta los volúmenes obtenidos de dichos grupos de fracciones, se obtuvieron 9.44 mg de CaM para el primer grupo y 20.48 mg para el segundo, es decir un total de 29.92 mg de CaM a partir de 250 g de tejido.

Para corroborar que en el pico obtenido al eluir la columna, sólo había una proteína y que ésta era calmodulina, se determinó el espectro de absorción de 220 a 320 nm de la muestra obtenida. El resultado se muestra en la gráfica 2, donde puede verse los cambios en la absorción debido a los residuos de tirosina y fenilalanina (Klee, 1977; Richman y Klee, 1979)).

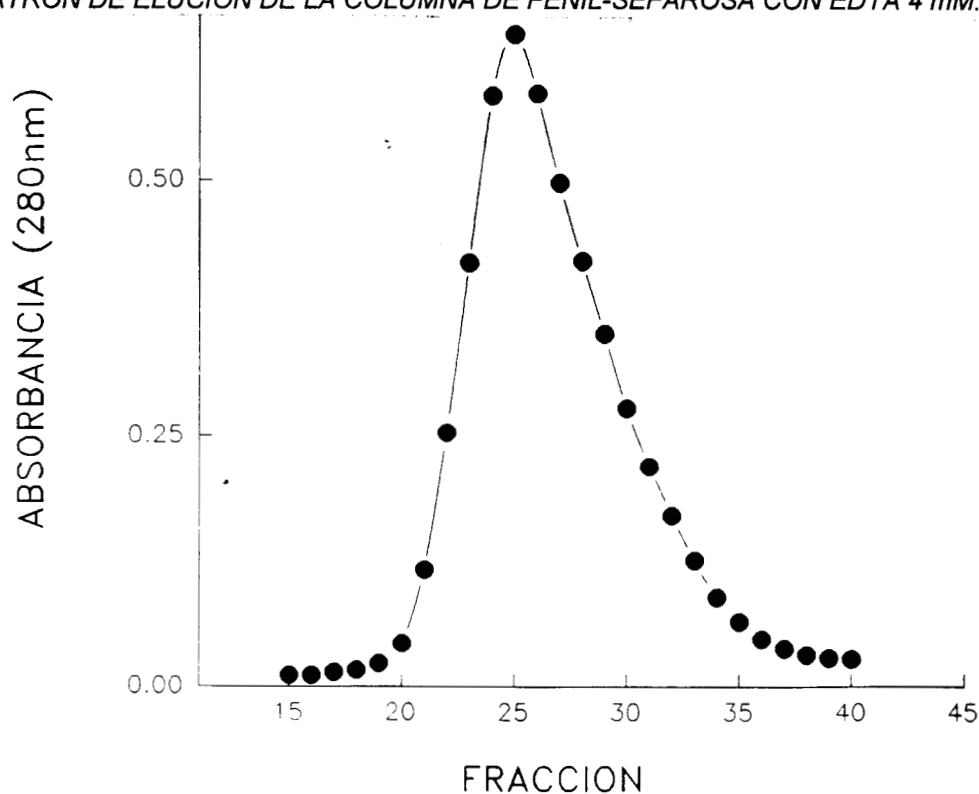
También se determinó el comportamiento electroforético de la muestra eluida con EDTA, en un gel de poliacrilamida-SDS al 10 % en presencia y ausencia de calcio . Este análisis mostró que en presencia de calcio CaM tiene mayor movilidad electroforética y aparece como una proteína de menor peso molecular comparada con la migración que muestra en presencia de EGTA (fig. 2). Este comportamiento caracteriza a calmodulina y es indicador de su cambio conformacional en presencia de calcio (Chao y col, 1984).

5 PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE LAS PROTEINAS QUE UNEN A CaM E IDENTIFICACION DE ESTAS POR ELECTROFORESIS

La presencia de proteínas aceptoras de CaM en forma calcio dependiente en la fracción extraída con NaCl 0.4 M fue determinada por cromatografía de afinidad.

Las fracciones eluidas de la columna de CaM-Sefarosa mostraron un pico de absorción a 280 nm (gráfica 3), dicho pico corresponde a la fracción 14, misma que mostró una absorbancia de 0.083 y que presentó una cantidad de proteína igual a 88.3 µg (en 0.94 ml). Al analizar electroforéticamente la muestra de este pico en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % teñidos con azul de coomassie, no se pudo observar ninguna banda; por este motivo se decidió concentrar la muestra por filtración bajo centrifugación y posteriormente se liofilizó. La muestra resultante (4 µg de proteína en 50 µl), se analizó electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 10 % teñidos con plata (figura 3). Este análisis, permitió observar dos bandas, que corresponden a pesos moleculares de 66 y 57 kDa.

Gráfica 1. PATRON DE ELUCION DE LA COLUMNA DE FENIL-SEFAROSA CON EDTA 4 mM.



222879

Gráfica 2. ESPECTRO DE ABSORCION DE CALMODULINA-EDTA.

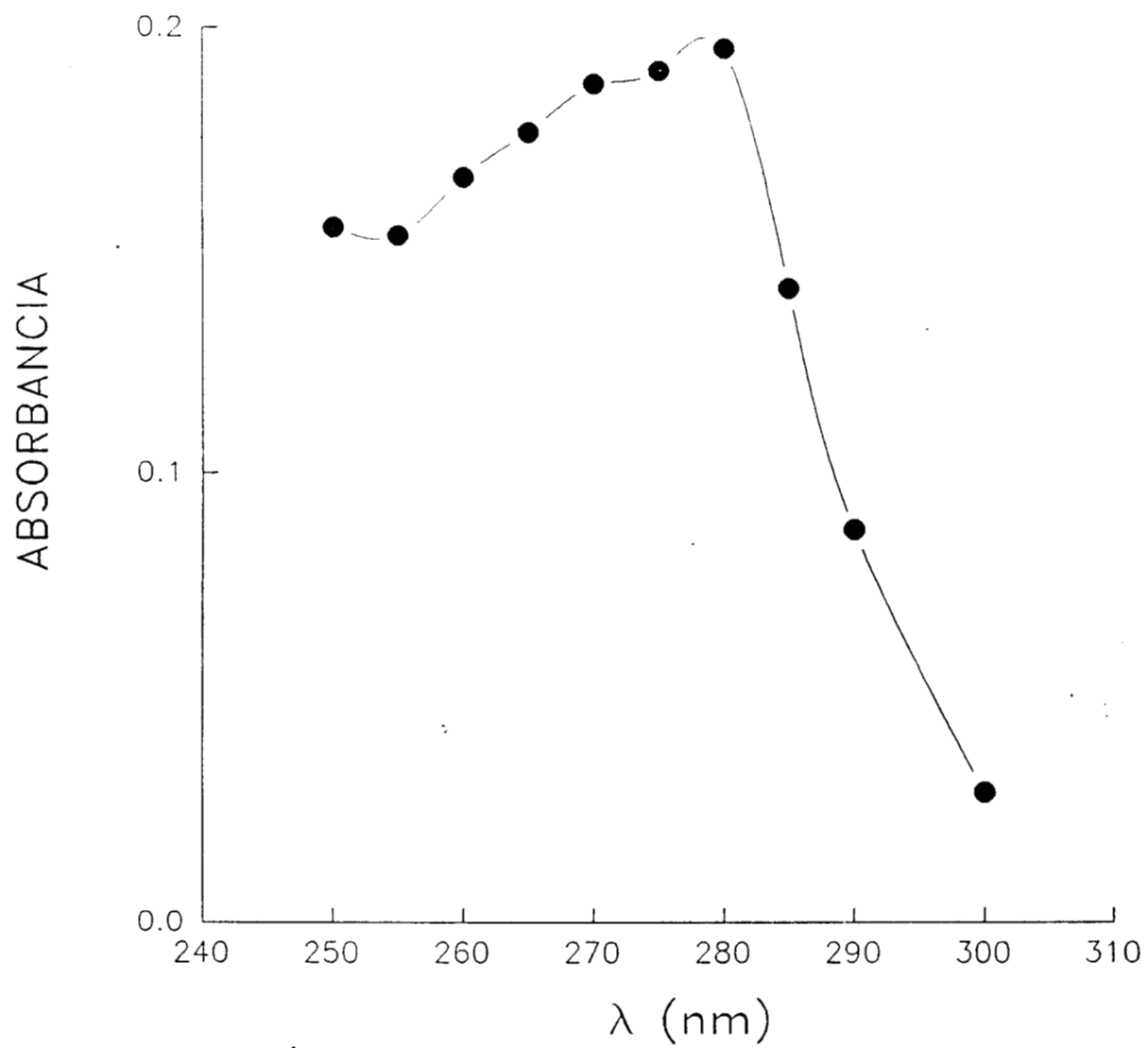
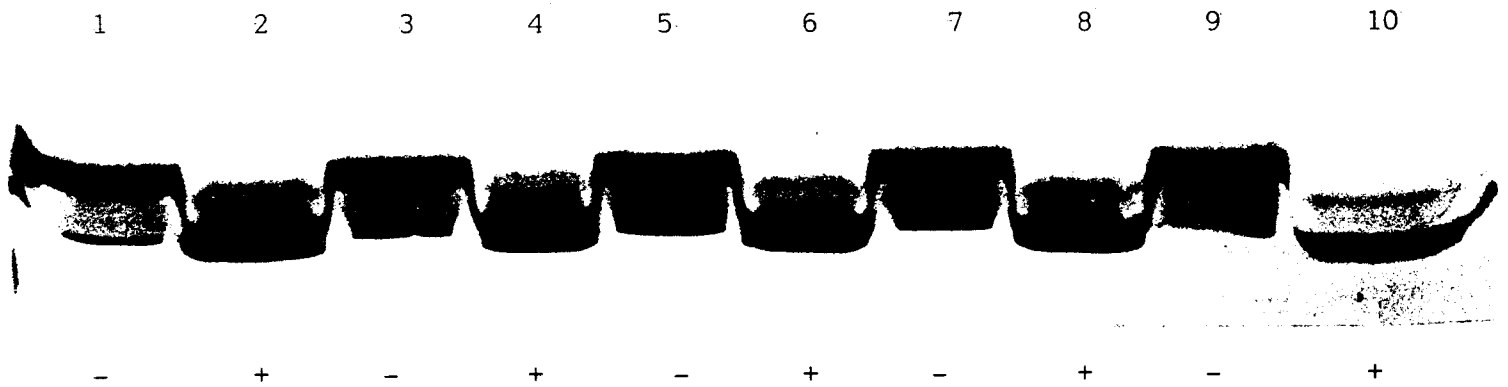


Figura 2. CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LA MUESTRA ELUIDA CON EDTA 4 mM DE LA COLUMNA DE FENIL-SEFAROSA.



Muestras en presencia de Ca²⁺ (+) o de EGTA (-); calentadas 6 min a 90°C (1 y 2), 3 min (3, 4, 7 y 8) y sin calentar (5, 6, 9 y 10)

Gráfica 3. PATRON DE ELUCION DE LA COLUMNA DE CaM-SEFAROSA

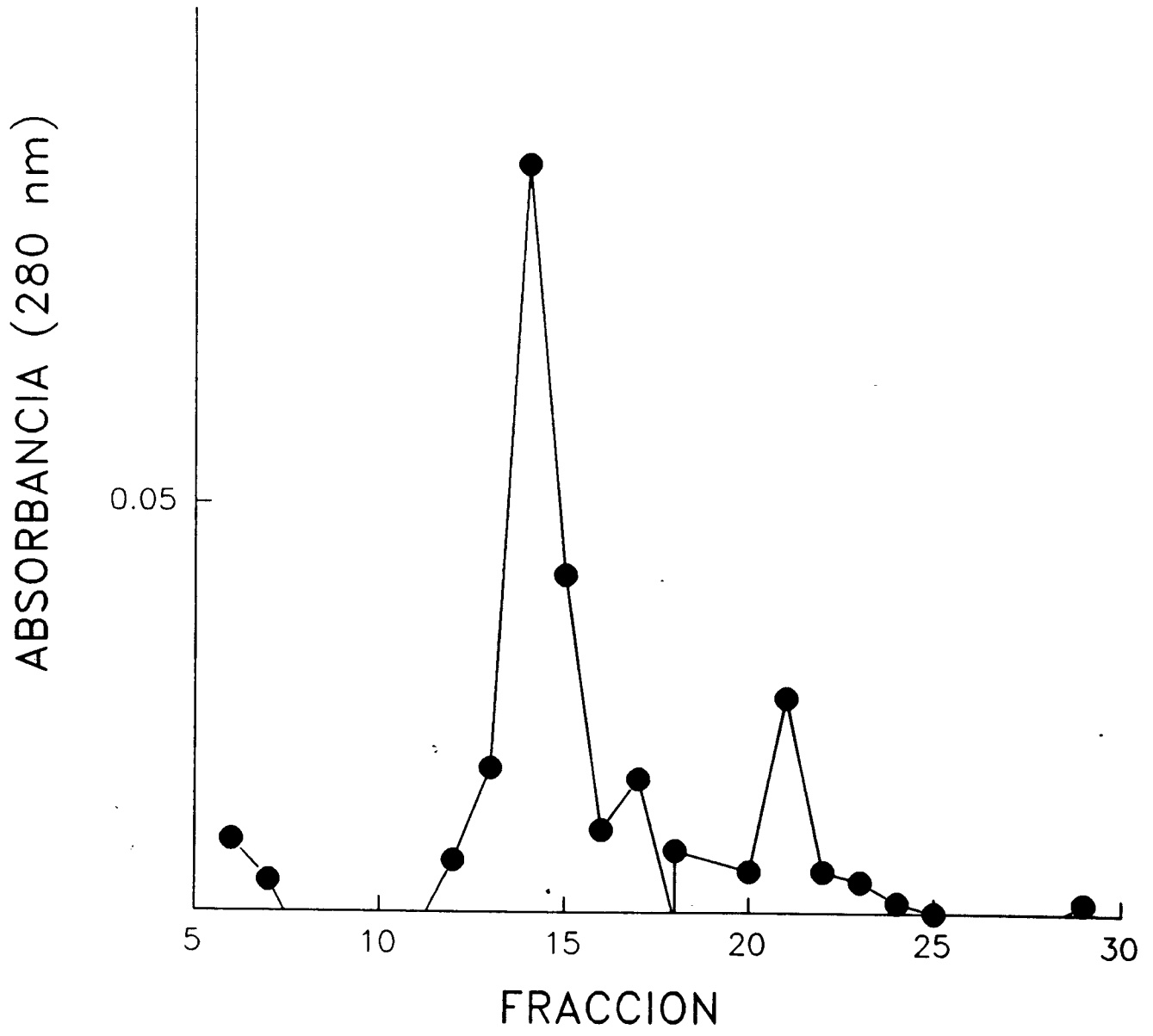
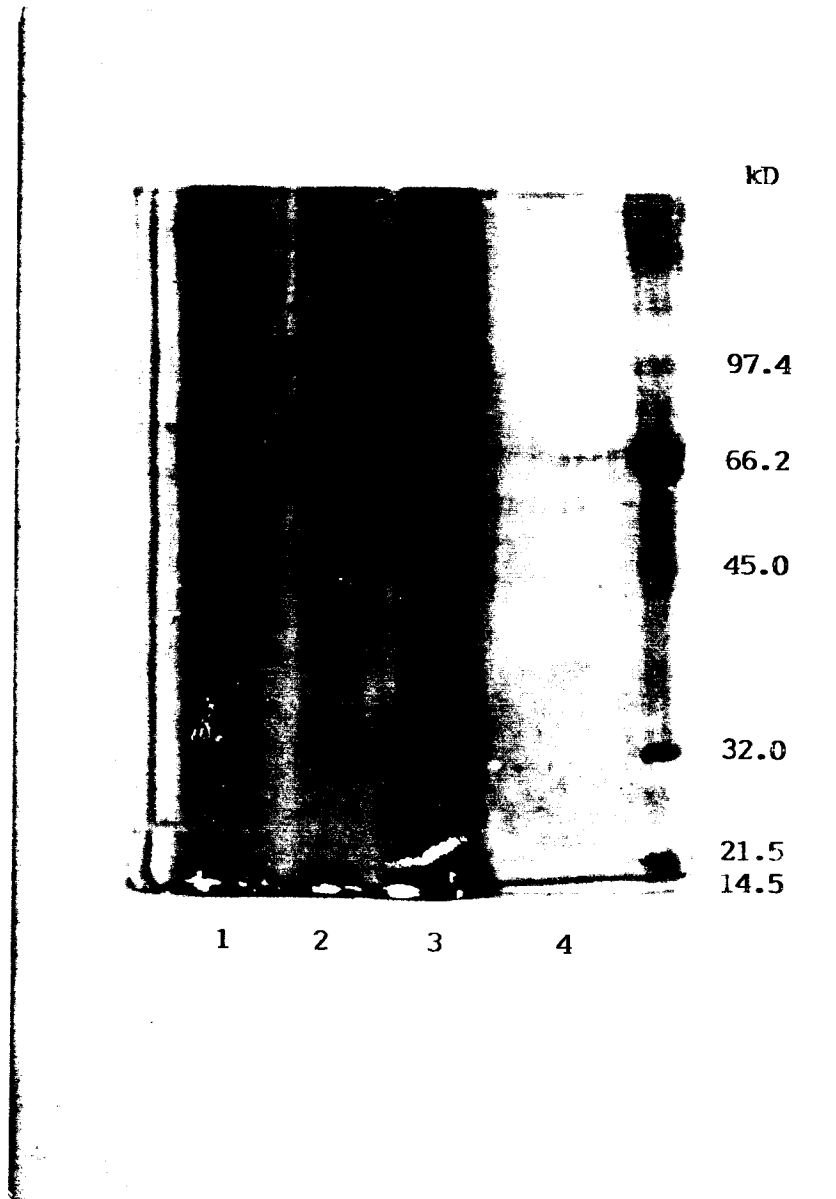


Figura 3. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS DE UNION A CaM OBTENIDAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.



Proteínas (100 μ g) detectadas en núcleos 1 y 2, y en células enteras 3. Proteínas (2 μ g) con capacidad de unión a CaM obtenidas por cromatografía de afinidad.

6 IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS QUE UNEN A CALMODULINA EN CELULAS GERMINALES TESTICULARES

6.1 CaM Marcada Con Biotina

En este sistema de detección de proteínas que unen a CaM (CaMBP) se utiliza como sonda un derivado biotinilado de calmodulina, ésta aún conserva su capacidad para activar a la fosfodiesterasa. La biotina se incorpora en los residuos de lisina de la CaM (Bayer y Wilchek, 1990). La unión de la CaM-biotinilada a las proteínas de los espermatoцитos fue detectada por la unión de avidina o estreptoavidina acoplada a peroxidasa o a fosfatasa alcalina.

Antes de usar esta sonda se definió si la CaM biotinilada efectivamente era activa biológicamente, tomándose como criterio el cambio en movilidad electroforética en presencia y ausencia de calcio. La CaM biotinilada en presencia de calcio migró como un complejo de menor peso molecular que en presencia de EGTA (figura 4). Este comportamiento fue idéntico al reportado para la CaM nativa, es decir sin modificaciones covalentes en su estructura, capaz de unirse a sus proteínas blanco y regular su actividad.

Fig. 4 CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LA CaM BIOTINILADA



Patrón electroforético de la calmodulina biotinilada, en presencia de EGTA (1) o de calcio (2).

Se detectaron varias proteínas capaces de unir a CaM-biotinilada en presencia y ausencia de calcio tanto en el núcleo como en los espermatoцитos sin fraccionar (fig. 5). En presencia de calcio, se detectaron 3 bandas con peso molecular aparente de 105, 74 y 68 kD presentes en la fracción de núcleos purificados (carril 4) y en los espermatoцитos totales (carril 3). También se observó una banda de 133 kD en las células totales.

En presencia de EGTA se observaron 5 bandas; los núcleos mostraron que las proteínas de 107, 79, 71 y 62 kD de peso molecular, eran capaces de unir a CaM-biotinilada en ausencia de calcio (carril 2). En los espermatoцитos completos sólo se detectaron las bandas correspondientes a 107 y 71 kD. También se observó una banda de 137 kD (carril 1).

Para demostrar la especificidad del método de detección de las proteínas que unen a CaM se realizó un experimento donde no se incluyó la incubación con la sonda, solamente se usó estreptoavidina acoplada a fosfatasa alcalina (fig. 6). En estas condiciones se detectaron complejos coloridos en las bandas de 130 y 58 kD en presencia y ausencia de calcio tanto en las células totales como en los núcleos. Lo anterior mostró la existencia de unión inespecífica del complejo estreptoavidina-fosfatasa alcalina, especialmente en presencia de calcio.

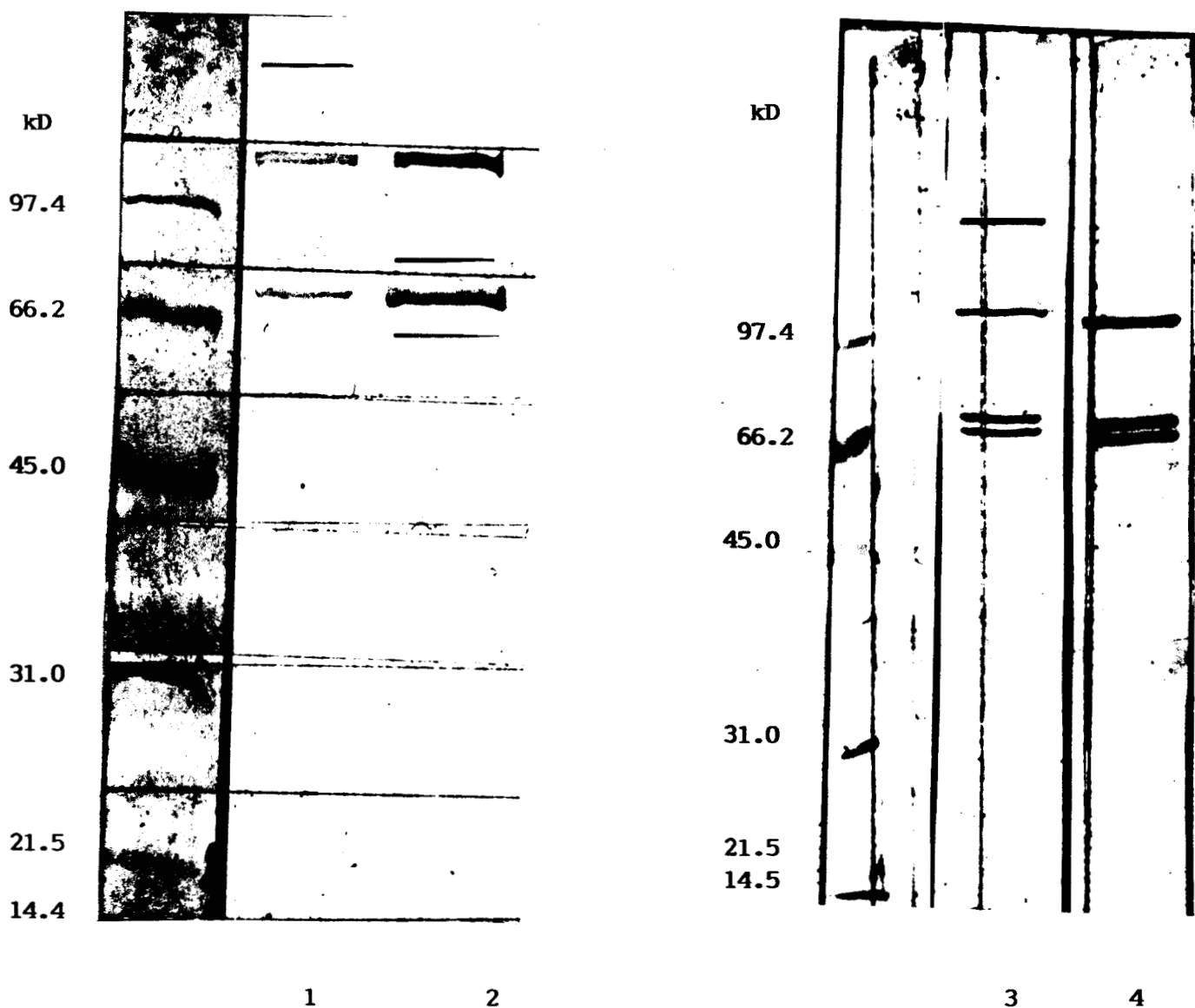
Se realizó otro control al que no se le agregó ni CaM-Biot ni estreptoavidina-fosfatasa alcalina para definir si los sustratos de la fosfatasa alcalina (NBT y BCIP) no eran utilizados por una fosfatasa alcalina endógena. No se observó reacción en estas condiciones (carriles 11-14 de la figura 6).

La estreptoavidina o la avidina se unieron a dos proteínas de los espermatoцитos primarios y de sus núcleos purificados, independientemente de si habían sido incubados con CaM-biotinilada, en presencia o ausencia de calcio. Se detectaron precipitados coloridos en las bandas de 125 y 35 kD (fig. 7).

Estos resultados sugerían que los espermatoцитos primarios presentaban proteínas con biotina o bien glicoproteínas tipo lectinas que unían inespecíficamente a la avidina. Aunque estas bandas no corresponden a los pesos de las proteínas identificadas previamente (fig 5), la no

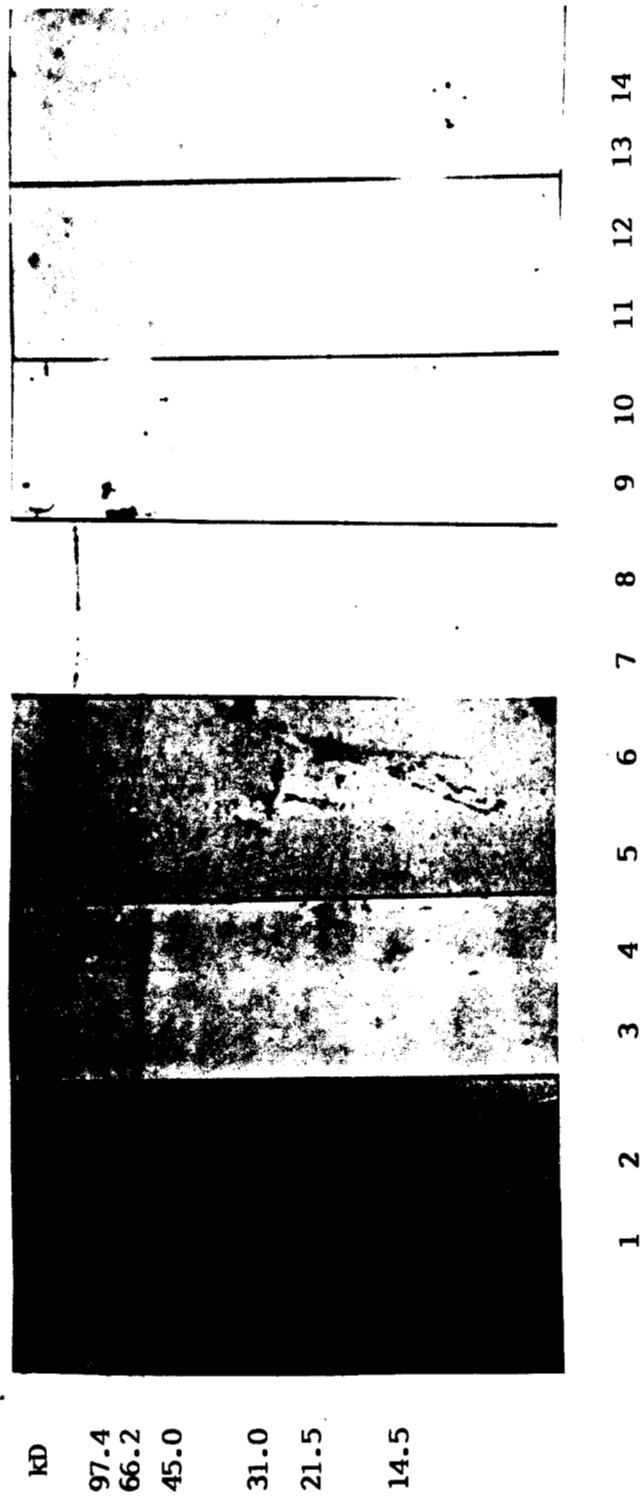
reproducibilidad del método señalaba la participación de otros factores no identificados que no daban certeza a la identificación de las proteínas que unen a CaM en los espermatoцитos primarios o en sus fracciones subcelulares.

Figura 6. DETECCIÓN POR OVERLAY DE LAS PROTEINAS DE UNION A CaM USANDO COMO SONDA CaM-BIOTINILADA Y AVIDINA-PEROXIDASA.



Identificación de las proteínas de unión a CaM con CaM-Biot y avidina peroxidasa en presencia y ausencia de calcio: carriles 1 y 3 células totales (CT) , carriles 2 y 4 núcleos (Nuc)

Figura 6. DETECCION DE LAS PROTEINAS DE UNION A CaM POR OVERLAY CON CaM-BIOT Y ESTREPTOAVIDINA-FOSFATASA ALCALINA



Patrones de proteína totales: CT 1 y Nuc 2. Muestras con CaM-Biot y Calcio: CT 3 y Nuc 4. Con CaM-Biot y EGTA: CT 5 y Nuc 6. Controles sin CaM-Biot con calcio: CT 7 y Nuc 8. Sin CaM-Biot con EGTA: CT 9 y Nuc 10. Controles sin CaM-Biot y sin estreptoavidina; con calcio: CT 11 y Nuc 12; con EGTA: CT 13 y Nuc 14.

Figura 7. IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS DE UNION A CaM CON AVIDINA PEROXIDASA.



Muestras con caM-Biot con calcio: CT 1 y Nuc 2; con EGTA: CT 3 y Nuc 4. Controles sin CaM-Biot con calcio, CT 5 y Nuc 6; con EGTA: CT 7 y Nuc 8

6.2 CaM Marcada Con ^{125}I .

Utilizando este derivado radioactivo de calmodulina se detectaron las proteínas capaces de interaccionar con CaM en presencia y ausencia de calcio presentes en los espermatoцитos primarios de rata.

La unión de CaM- ^{125}I se realizó en proteínas transferidas a papel de nitrocelulosa, se encontraron tres proteínas de peso molecular de 123, 115 y 108 kD capaces de unir CaM en forma calcio dependiente tanto en espermatoцитos primarios como en sus núcleos. En ausencia de calcio, con EGTA, no se observaron bandas.

Cuando la detección de las proteínas con capacidad para unir a CaM- ^{125}I se realizó en muestras de espermatoцитos primarios y de los núcleos de estos directamente en el gel, sin transferirlas a PNC (tabla 8 y fig. 8) se detectaron otras proteínas que unieron a CaM en forma Ca^{2+} -dependiente, con pesos moleculares de 62, 55, 43 y 29 kD y un grupo de proteínas de 136-109 kD (carriles 5 y 6). De ellas, dos fueron específicas de núcleo: 62 y 43 kD (carril 6). En estas fracciones también se detectaron dos proteínas capaces de unir a CaM en presencia y ausencia de Ca^{2+} , con pesos moleculares de 32 y 21 kD (carriles 8 y 9). En el sobrenadante obtenido por choque hipotónico de los espermatoцитos primarios, se detectó un grupo de proteínas de 136-109 kD y dos bandas de 55 y 29 kD unieron CaM solo en presencia de Ca^{2+} (carriles 4 y 7).

7 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINAS CINASAS

222879

La característica funcional más importante de la CaM es su capacidad para modificar la actividad de numerosas enzimas, ya sea por interacción directa del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ con la enzima o en forma indirecta activando el proceso de fosforilación-defosforilación de otras proteínas. De ahí la importancia de determinar la actividad de cinasas en el presente modelo de trabajo.

Las células dispersas de testículo de rata de 21 días de edad mostraron incorporación de

P^{32} al material precipitado con TCA al 30%. La adición de calcio produjo una disminución del 50% en la actividad observada solo con Mg^{2+} . Sin embargo la adición de CaM en presencia de calcio aumentó la actividad a un nivel 2 veces mayor al obtenido con Mg^{2+} (tabla 9). Los resultados muestran el promedio de 2 experimentos por triplicado.

Es muy importante aclarar que no se usaron sustratos exógenos, por lo que la incorporación de P^{32} puede reflejar autofosforilación y/o fosforilación de sustratos endógenos.

La actividad de proteína cinasa en los espermatoцитos primarios purificados en gradientes de Dextran-MEM fue determinada en presencia y en ausencia de los inhibidores de fosfatasas NaF y vanadato. En la gráfica 4 se observa que en ausencia de los inhibidores no existe diferencia significativa en la actividad determinada solo con Mg^{2+} -EGTA; con Ca^{2+} o Ca^{2+} /CaM.

En presencia de los dos inhibidores, la actividad detectada fue muy baja en comparación con la actividad en presencia de sólo uno de los inhibidores. Además no hubo diferencia significativa en la actividad estimulada por Ca^{2+} /CaM en comparación con la actividad basal en presencia de Ca^{2+} . Sin embargo en estas condiciones la actividad fue 3 veces mayor a la observada sólo con Mg^{2+} .

En cuanto a la actividad en presencia de fluoruro de sodio, se detectó que la actividad de proteína cinasa fue más alta que en ausencia de inhibidores. La adición de calcio inhibió en 40% la incorporación de P^{32} y la inclusión de CaM revirtió los efectos del calcio.

La adición de vanadato produjo una ligera disminución en la incorporación de P^{32} , comparada con la actividad en ausencia de inhibidores.

Estos resultados sugieren que la fosforilación de sustratos endógenos y/o la autofosforilación de las proteínas cinasas presentes son afectadas por NaF y vanadato. La adición de NaF podría proteger de la defosforilación en mayor magnitud que lo que protegería la adición de vanadato. Sin embargo el efecto del NaF no se observa cuando se adiciona simultáneamente con el vanadato.

Hay que hacer notar que solo en presencia de NaF, calmodulina incrementó 2 veces la incorporación de P^{32} .

Finalmente la actividad en presencia de vanadato no mostró diferencia significativa en presencia de EGTA, Ca^{2+} o Ca^{2+} /CaM.

Tabla 8. PROTEINAS DE UNION A CaM USANDO COMO SONDA CaM- I^{125} EN ESPERMATOCITOS PRIMARIOS DE RATA EN PROFASE MEIOTICA

Ca ²⁺			EGTA		
Esp. Prim.	Nuc.	C.H.	Esp. Prim.	Nuc.	C.H.
136-109	136-109	136-109			
62	62				
55	55	55			
43	43				
32	32		32	32	
29	29	29			
21	21		21	21	

Esp. Prim., espermatocitos primarios

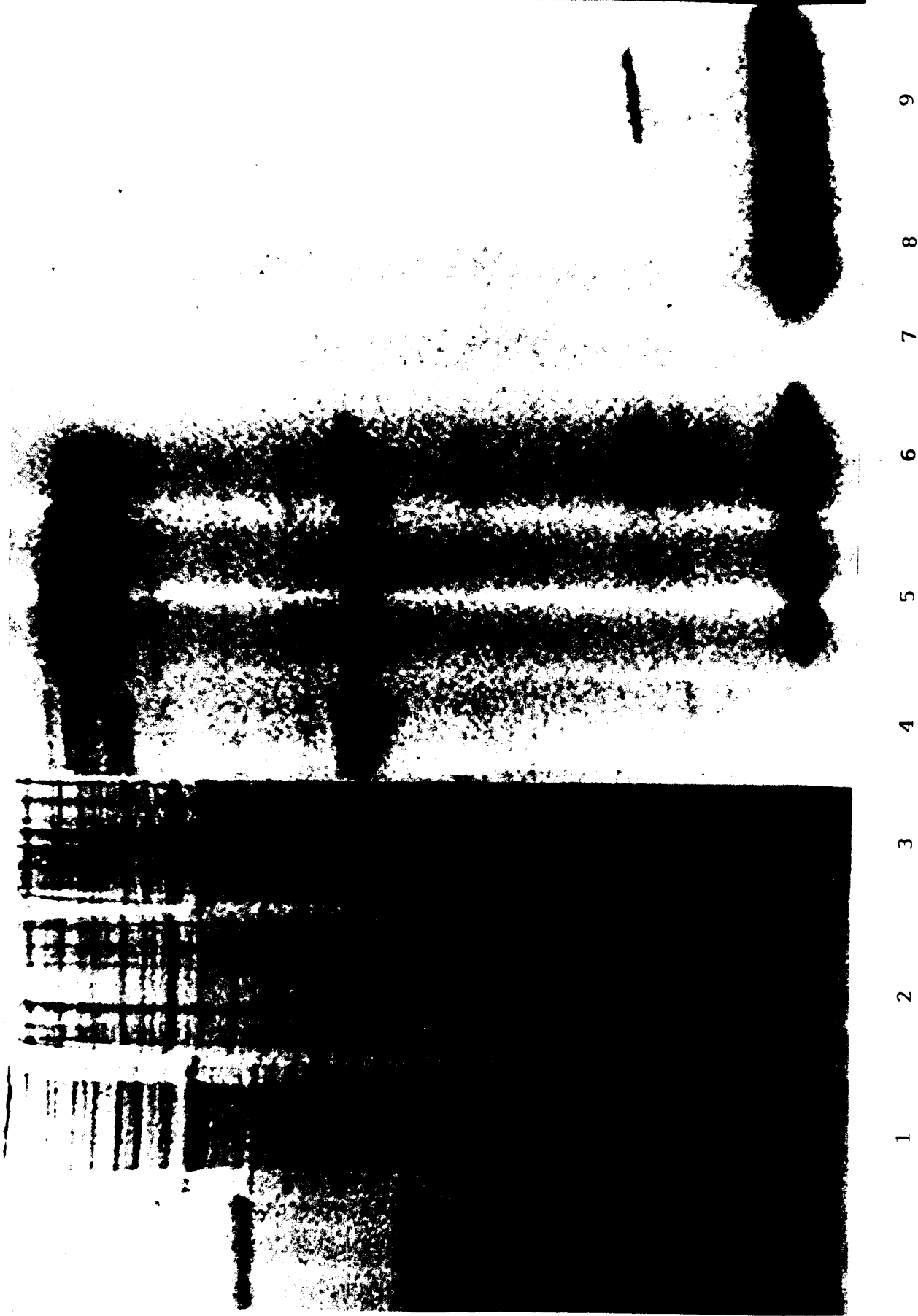
Núc., núcleos

C.H., choque hipotónico

Azul De Coomassie

Ca²⁺

EGTA



kD

97.4

66.2

45.0

31.0

21.5

14.5

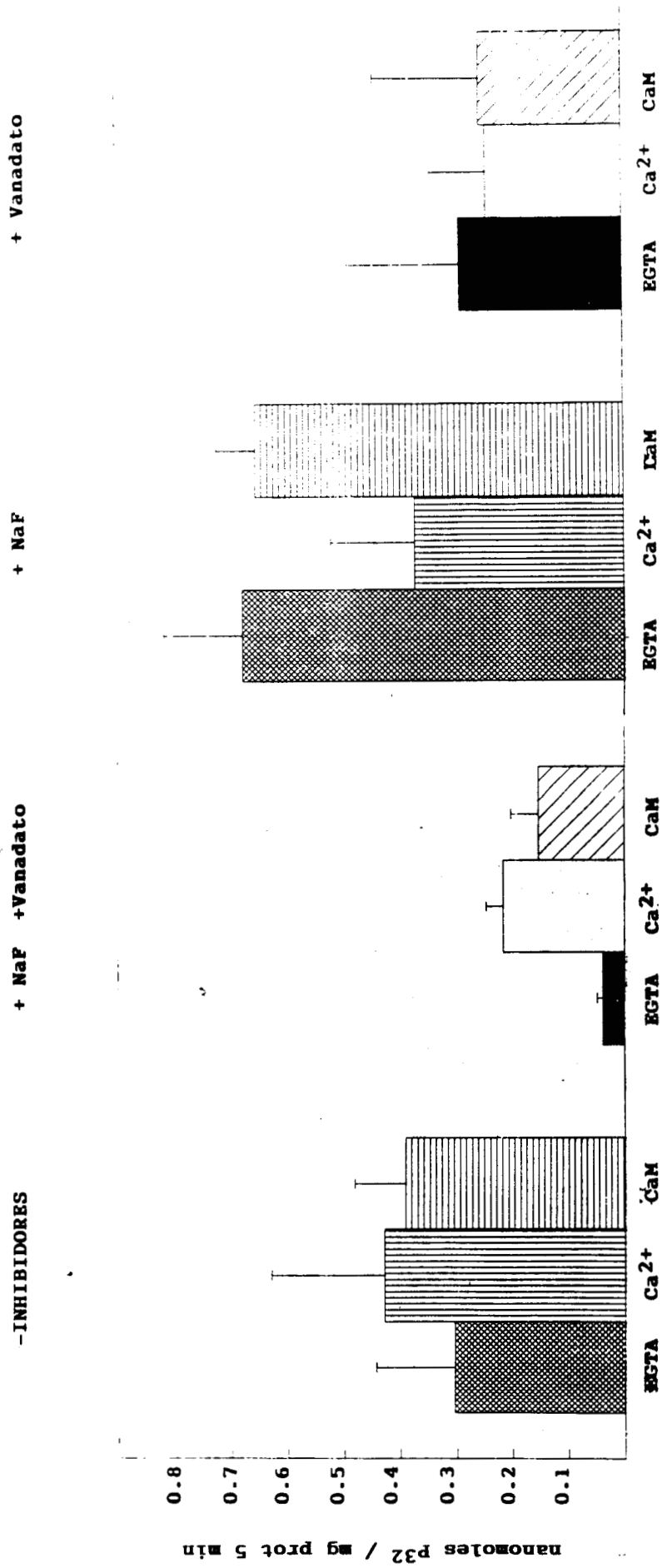
1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig 8. PROTEINAS DE UNION A CaM USANDO COMO SONDA CaM-125. Proteínas totales Choque hipotónico (CH) 1, CT 2 y Nuc3. Proteína en presencia de calcio: CH 4, CT 5 y Nuc 6. En presencia de EGTA: CH 7, CT 8 y Nuc 9.

Tabla 9. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINAS CINASAS EN CELULAS DISPERSAS DE TESTICULO DE RATA.

MEDIO	ACTIVIDAD (nmol P ³² /mg prot 5 min)
EGTA	0.1396 ± 0.0014 n=2
Ca ²⁺	0.0698 ± 0.0030 n=2
Ca ²⁺ /CaM	0.2783 ± 0.0105 n=2

Gráfica 4. ACTIVIDAD DE PROTEINAS CINASAS DE ESPERMATOCITOS PRIMARIOS DE RATA



DISCUSION

En el presente trabajo se demostró la presencia de proteínas que unen a CaM en forma calcio dependiente y calcio independiente, tanto en el núcleo como en los espermatoцитos primarios sin fraccionar. Además se purificaron por cromatografía de afinidad dos proteínas que unen CaM en forma calcio dependiente de las células germinales masculinas, sus pesos moleculares fueron de 54 y 62 kD, debido a su bajo rendimiento solamente pudieron ser identificadas por tinción con plata.

El uso de estreptoavidina o avidina para detectar la unión de CaM-biotinilada no permitió la identificación de las proteínas blanco de CaM, pues se encontró una unión inespecífica de la avidina y de la estreptoavidina a diferentes proteínas de los espermatoцитos primarios.

La unión inespecífica de conjugados de biotina o avidina puede deberse a:

- i) Unión inespecífica a proteínas que contienen biotina endógena.*
- ii) Unión inespecífica de avidina a lectinas endógenas.*
- iii) Unión inespecífica de avidina a macromoléculas a través de interacciones iónicas no específicas o interacciones hidrofóbicas.*
- iv) Unión inespecífica de otros componentes en el sistema de detección además de biotina o avidina.*

Se ha demostrado que algunos tejidos tales como riñon, hígado, páncreas, y cerebro presentan biotina endógena (LeVine y Macklin, 1988). La biotina es un cofactor de diferentes enzimas en mamíferos, dos de ellas son la acetil coenzima A carboxilasa y la piruvato carboxilasa, las cuales participan en la producción de ácidos grasos. La presencia de estas enzimas en el testículo es probable, debido a la importancia del metabolismo de lípidos (Johnson, 1970; LeVine y Macklin, 1988). Los resultados de este trabajo sugieren que las células germinales del testículo podrían presentar conjugados de biotina con proteínas endógenas, pero se requieren más experimentos para demostrarlo.

La unión inespecífica ocasionada por las lectinas endógenas no puede ser invocada para explicar los resultados obtenidos con estreptoavidina. A diferencia de la avidina, la estreptoavidina no contiene carbohidratos, los cuales son requeridos para la unión a lectinas endógenas (Duhamel y

Whitehead, 1990).

Muchos tejidos contienen lectinas asociadas a proteínas de la superficie celular. Muchas lectinas endógenas reconocen residuos de α -manosa o β -galactosa. Las lectinas específicas de galactosa no participan en la unión inespecífica ya que ni la avidina ni las enzimas usadas en sus conjugados contienen residuos de galactosa. Sin embargo debido a que la avidina contiene un 10 % de carbohidratos que incluyen a manosa, esto podría explicar la unión de la avidina a las lectinas endógenas (Duhamel y Whitehead, 1990).

Este problema podría haberse eliminado por dilución del conjugado de avidina en α -metil-D-manosa 200 mM, para saturar el sitio de unión de la lectina endógena (Duhamel y Whitehead, 1990).

La unión inespecífica debida a interacciones iónica e hidrofóbicas no fue descartada en estos experimentos.

Cuando las proteínas de unión a CaM fueron detectadas usando como sonda CaM- I^{125} , se detectaron sólo 2 tipos de proteínas: i) proteínas dependientes de Ca^{2+} y ii) proteínas independientes de Ca^{2+} , las cuales se unen a CaM tanto en presencia como en ausencia de calcio.

La CaM- I^{125} empleada en estos experimentos fue marcada con el reactivo de Bolton y Hunter que reacciona con grupos amino libres de la CaM para formar amidas. Este método tiene la ventaja de que la marca es introducida en grupos amino libre y no en residuos de tirosina como en otros métodos de marcaje (Chafouleas y col., 1979).

Lo anterior es de gran importancia, sobre todo si se considera que los residuos de tirosina están presentes en el dominio de unión de CaM con sus proteínas blanco. La modificación de los grupos amino libres tanto por adición de I^{125} como por la unión de biotina produce derivados de CaM que pueden unirse a fenil sefarosa en forma calcio dependiente y de modificar su movilidad electroforética en presencia y ausencia de calcio respectivamente.

Se ha reportado que 5 de los 7 residuos de lisina de CaM están localizados en la porción NH_2 terminal y que algunos están involucrados en la conexión de las 2 mitades de la molécula. El número y la posición de los grupos amino libres modificados covalentemente en CaM podrían modificar su cambio conformacional en presencia de calcio y con ello su interacción con proteínas blanco (revisado por Hernández y col., 1994).

La modificación de las lisinas por el I^{125} produce una sonda análoga a la CaM-biotinilada sin las desventajas de la inespecificidad.

Las proteínas que unen a CaM en forma calcio dependiente que fueron purificadas por cromatografía de afinidad, parecen haber sido detectadas también por overlay con CaM- I^{125} . Esta técnica de overlay permitió detectar además distintos tipos de proteínas. Lo anterior podría deberse a una mayor sensibilidad al usar CaM- I^{125} . Las proteínas detectadas por cromatografía de afinidad podrían representar a las proteínas más abundantes que reconocen a una forma de CaM parcialmente inmovilizada por su unión a la sefarosa.

Algo muy importante de mencionar, es el hecho de que la detección de las proteínas aceptoras de CaM por "overlay" depende de la renaturalización de las proteínas que previamente fueron desnaturalizadas por el SDS usado en la electroforesis (Glennay y Weber, 1980). Así, las proteínas capaces de unir a la CaM marcada con ^{125}I representan a las proteínas que fueron suficientemente renaturalizadas, como para exponer sus sitios de unión a CaM (revisado por Hernández y col., 1995).

En cuanto a las proteínas que unen a CaM, detectadas en los espermatozoides, hay que recordar que existen varios trabajos que muestran la importancia de las proteínas que unen a CaM en forma calcio independiente durante la mitosis. La división nuclear puede desarrollarse normalmente en células mutantes con CaM incapaz de unir calcio con alta afinidad. Una de las funciones realizadas por las proteínas que unen CaM en forma calcio independiente se relaciona con la estabilización de los microtúbulos del cinetocoro (Sweet y col., 1988; Geiser y col., 1991; Davis, 1992), pero se desconoce la identidad de las proteínas blanco de CaM en ausencia de calcio y las funciones que realizan en la mitosis

En células meiótica masculinas se ha detectado la presencia de diferentes proteínas capaces de interaccionar con Ca^{2+} -CaM. Jones y col. (1991) y Means y col., (1991) han identificado una proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} -CaM, llamada proteína cinasa IV (CaM-PCIV). El gene se expresa en bazo, cerebro y testículo pero en este órgano el transcrito primario es diferencialmente procesado en dos ARNm para producir la cinasa dependiente de CaM y una proteína de 18.735 kD que une a CaM conocida como calsperrina. De las proteínas testiculares que une a CaM, la

calspermina es una de las más abundantes y carece de actividad catalítica.

El ARNm de la CaM-PCIV se expresa por primera vez en células meióticas tempranas en espermátocitos preleptoteno y su expresión declina en las espermátides y en espermatozoides maduros. El ARNm de calspermina aparece en estadios más avanzados de la meiosis en espermátocitos primarios en paquiteno y su nivel se incrementa en células que han completado la meiosis.

El peso molecular de la proteína cinasa IV, determinado por electroforesis es de 61 kD (Means y col., 1991). En los espermátocitos primarios y en los núcleos purificados de estas células se detectó una proteína de 62 kD capaz de interactuar con CaM marcada con 125 sólo en presencia de Ca^{2+} . La similitud del peso molecular de esta proteína con el peso detectado por electroforesis para la cinasa activada por Ca^{2+} -CaM tipo IV del testículo, sugiere que la banda de 62 kD detectada en las células meióticas masculinas y en la fracción nuclear podría corresponder a esta cinasa.

La calspermina ha sido identificada como una proteína que interactúa con CaM en forma calcio dependiente (Ono y col., 1984, 1987 y 1989). Esta es una proteína que migra en un campo electroforético en condiciones desnaturizantes como una banda de 32 kD. En los espermátocitos primarios y en la fracción nuclear se detectó la presencia de una proteína de 32 kD capaz de unir CaM- 125 en presencia y ausencia de calcio. La unión de esta sonda a la banda de 32 kD en presencia de calcio sugiere que esta podría tratarse de la calspermina, aunque habría que tomar en cuenta que esta proteína es predominante en células postmeióticas y se ha propuesto como proteína específica de células haploides (Ono y col., 1989).

La proteína cinasa II dependiente de CaM es una cinasa multifuncional que ha sido detectada principalmente en cerebro, en el núcleo de neuronas y en el núcleo de células en proliferación (Bachs y col., 1990). Su actividad se ha relacionado con el rompimiento de la membrana nuclear de ovocitos fecundados (Baitinger y col., 1990) y en la separación de cromátides hermanas durante la metafase (Lorca y col., 1991, 1993, 1994; Morin y col., 1994).

Las subunidades de esa proteína cinasa tienen capacidad para unir CaM en forma calcio dependiente y las isoformas estudiadas presentan un peso molecular que va de 50-60 kD. El

testículo presenta isoformas específicas de algunas subunidades. Las bandas de 55 y 62 kD detectadas en este trabajo podrían estar relacionadas con esta proteína cinasa II.

Estos datos y la demostración de la presencia de una actividad de proteína cinasa activada por Ca^{2+} -CaM en espermatoцитos primarios sugieren que una o varias de estas cinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM fueron detectadas por la unión de CaM- ^{125}I y por la incorporación de ^{32}P .

La banda de 21 kD junto con la de 32 kD aquí detectadas corresponden a proteínas que unen a CaM- ^{125}I en forma calcio independiente y pueden ser homólogas de otras proteínas que unen CaM en forma calcio independiente detectadas en el espermatozoide (Hernández y col., 1994). Sin embargo no se ha identificado la función que podrían realizar estas proteínas.

Recientemente se ha demostrado por microscopia electrónica, que las células germinales poseen proteínas que unen a CaM y los pesos moleculares corresponden a proteínas mayores de 50 kD (Morya y col., 1993).

También se puede mencionar que la unión de CaM- ^{125}I en la región de 61 kD podría deberse a la presencia de la subunidad α de la calcineurina (Nishio y col., 1992).

Los pesos moleculares de algunas proteínas detectadas por overlay con CaM- ^{125}I son 240, 150, 130, 120, 65, 60, y 40 kD. En los núcleos de los espermatoцитos en división meiótica aquí usados se detectaron 4 bandas con pesos moleculares semejantes: 136, 109, 61 y 43 kD. En hígado se demostró que la banda de 130 kD corresponde a la cinasa de la cadena ligera de la miosina. Esta misma proteína podría haber sido detectada en los espermatoцитos primarios y en la fracción nuclear como la banda de 136 kD.

La banda de 60 kD se identificó en los hepatocitos como caldesmon, en el caso de las células germinales en meiosis, cabría la posibilidad de que también hubiera sido detectada en la zona de peso molecular de 62 kD.

222879

También se ha identificado una proteína de 62 kD que une CaM en forma calcio dependiente que participa en la segregación de las cromátides durante la metafase (Dismore y Sloboda, 1989).

La regulación de la transcripción es uno de los procesos controlados directa e indirectamente por Ca^{2+} -CaM. La fosforilación de factores transcripcionales por proteínas cinasas dependientes de

Ca^{2+} -CaM (Kapiloff y col., 1991; Sheng y col., 1991) es una forma indirecta de regulación. Sin embargo se ha demostrado que algunos factores de transcripción modifican su unión al ADN por interacción directa con el complejo Ca^{2+} -CaM (Conellussen y col., 1994).

Dada la importancia de la fosforilación de proteínas por acción de las cinasas activadas por Ca^{2+} -CaM sería relevante la identificación del tipo de cinasa presente en los espermatoцитos primarios y en la fracción nuclear.

El nivel de actividad de proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM de las células germinales del testículo de rata es similar al reportado por Gorelick y col., (1987) para la cinasa dependiente de CaM del citosol de cerebro de rata, la cual es capaz de fosforilar tubulina y proteínas asociadas a microtúbulos.

La actividad de proteínas cinasas en espermatoцитos primarios de rata mostró, que la actividad dependiente de Mg^{2+} era inhibida por la adición de Ca^{2+} y que la adición de CaM revertía el efecto inhibitor inducido por calcio.

Usando solamente NaF el efecto inhibitor del calcio prevalece, en tanto que en presencia de vanadato solo o con NaF, el calcio no induce una inhibición de la incorporación de P^{32} a las proteínas de estas células germinales.

La actividad de proteínas cinasa fue determinada en ausencia de sustratos exógenos, por lo tanto la incorporación de P^{32} refleja tanto la autofosforilación como la fosforilación de sustratos endógenos.

La adición de vanadato produjo una menor fosforilación que cuando el NaF estuvo presente, probablemente debido a que su efecto inhibitorio es sobre fosfatasas de tirosina y ésta podría no estar fosforilada. Esto es inesperado ya que la presencia de tirosina cinasa en las células germinales masculinas ha sido reportada, una tirosina cinasa específica de testículo llamada ferT ha sido reportada por Keshet y col., (1990). La aparición del transcrito de esta cinasa en testículo de ratón a los 18-21 días de edad coincide con la progresión de las células germinales hacia estados medios o tardíos de la meiosis.

La incorporación de P^{32} a las proteínas en ausencia de inhibidores es la resultante de la actividad de las cinasas y de las fosfatasas de proteínas presentes en los espermatoцитos. La

inhibición de las fosfatasas por NaF dio como resultado un aumento en el P³² incorporado a proteínas. En apoyo a esta observación se encuentra lo reportado por Kitagawa y col., (1990), quienes han encontrado una alta expresión de ARNm que codifica para PP-1 y PP-2A coincidente con el proceso de división meiótica, alcanzando mayores niveles en espermátocitos que en espermátides y sugirieron que PP-1 y PP-2A juegan un papel importante en la espermatogénesis. Es importante señalar que en las muestras inhibidas por NaF el calcio disminuyó la fosforilación. Esto sugiere la posibilidad de que el calcio inhiba a la cinasa; no así, el Ca²⁺-CaM.

La presencia de fosfatasas dependiente de Ca²⁺ o Ca²⁺-CaM no es aparente en los espermátocitos primarios ensayados ya que no hubo inhibición de la fosforilación con respecto a los valores observados en las muestras en presencia de EGTA.

CONCLUSIONES

1. *El aislamiento de núcleos de espermatoцитos primarios debe hacerse a partir de las células dispersas. El uso de la pastilla nuclear a partir de un homogeneizado total del tejido no permite la purificación de núcleos intactos.*
2. *Para la purificación de los núcleos no se recomienda el uso de agentes como el citrato (quelante de cationes divalentes), DTT (agente modificador de grupos SH), MgSO₄, ni detergentes como el triton X-100.*
3. *El uso de sacarosa 0.8 M permite la recuperación de núcleos intactos después del choque hipotónico. El uso de sacarosa 2.4 M no permite la recuperación de estos núcleos.*
4. *Las células dispersas de testículo de rata en la primera profase meiótica poseen proteínas que se asocian a CaM de forma Ca²⁺ dependiente, identificadas por cromatografía de afinidad que corresponden a pesos moleculares de 62 y 54 kD.*
5. *El uso de estreptoavidina o avidina para detectar la unión de CaM- Biotinilada no permitió la identificación de las proteínas blanco de CaM debido a la unión inespecífica de la avidina y estreptoavidina a diferentes proteínas de los espermatoцитos primarios. Así pues, los espermatoцитos primarios de rata parecen poseer proteína con biotina endógena.*
6. *Los espermatoцитos primarios de rata en la primera profase meiótica poseen proteínas que se unen a CaM en forma calcio dependiente e independiente: Proteínas calcio dependientes identificadas por unión a CaM-I¹²⁵ (136-109, 62, 55, 43 y 29 kD); proteínas calcio independientes identificadas por unión a CaM-I¹²⁵ (32 y 21 kD).*
7. *Los núcleos de espermatoцитos primarios de rata en la primera profase meiótica poseen proteínas*

que se unen a CaM de forma calcio dependiente e independiente: Proteínas calcio dependientes identificadas por unión a CaM- 125 I (62 y 43 kD); proteínas calcio independientes identificadas por unión a CaM- 125 I (32 y 21 kD).

8. Los espermatoцитos primarios de rata, presentan actividad de diferentes proteínas cinasas.

9. Calmodulina incrementó la actividad de cinasas dependientes de calcio tanto en células dispersas (con NaF + vanadato) como en espermatoцитos primarios (con NaF).

BIBLIOGRAFIA

Alemán, V., Trejo, R., Morales, E., Hernández-Jauregui, P. and Delhumeau-Ongay, G. (1978) A simple and rapid technique to isolate enriched populations of spermatocytes and spermatids from immature rat testis. *J. Reprod. Fert.* 55:67-95

Andreasen, T. J., Luetje, C. W., Heideman, W. and Storm, D. R. (1983) Purification of a novel calmodulin binding protein from bovine cerebral cortex membranes. *Biochem.* 22:4615-4618.

Babu, Y. S., Sack, J. S., Greenhough, T. J., Bugg, C. E., Means, A. R. and Cook, W. J. (1985) Tree dimensional structure of calmodulin *Nature* 315:37-40

Babu, Y. S., Bugg, C. E. and Cook, W. J. (1988). Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 204:191-204.

Bachs, O., Lanini, L., Serratosa, J., Coll, M. J., Bastos, R., Aligué, R., Rius, E. and Carafoli, E. (1990). Calmodulin-binding proteins in the nuclei of quiescent and proliferatively activated rat liver cells. *J. Biol. Chem.* 665(30):18595-18600.

Baintinger, C., Alderton, J., Poenie, M., Schulman, H. and Steinhardt, R. A. (1990) Multifunctional Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase is necessary for nuclear envelope break down. *J. Cell. Biol.* 11:1763-1773.

Bayer, E. A. and Wilchek, M. (1980) *Methods. Biochem. Anal.* 26:1

Bayer, E. A. and Wilchek, M. (1990) Biotin-binding protein:overview and prospects. *Methods in enzymology* 184:49-51

Billingsley, M. L., Pennypacker, K. R., Hooveer, C. G., Brigati, D. J. and Kincard, R. L. (1985). A rapid and sensitive method for detection and quantification of calcineurin and calmodulin-binding proteins using biotinylated calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7585-7589.

Bennett, M. K., Erondy, N. E. and Kennedy, M. B. (1983) Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase is highly concentrated in brain. *J. Biol. Chem.* 258:12735-

12744.

Bennett, V. (1985) *The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells.* *Annu. Rev. Biochem.* 54:273-304.

Billingsley, M. L., Pennypacker, K. R., Hooveer, C. G., Brigati, D. J. and Kincard, R. L. (1985). *A rapid and sensitive method for detection and quantification of calcineurin and calmodulin-binding proteins using biotinylated calmodulin.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7585-7589.

Bers, G. and Garfin, D. (1985) *Bio Techniques* 3:276

Billingsley, M. L., Pennypacker, K. R., Hooveer, C. L. and Kincard, R. L. (1987) *Bio Techniques* 5:22

Birnie, G. D. (1978) *Isolation of nucleic from animal cells in culture, in Methods in Cell Biology. Vol. XVII, Chapter 2. Edited by Stein, G. and Stein J. Academic Press. pp 21-24.*

Bonting, S. L., Coravagio, L. L., Canady, M. R. and Howking, N. H. (1964) *Studies on sodium potassium activated ATP.* *Arch. Biochem. Biophys.* 95:416-423.

Busch, H. and Daskal, Y (1977) *Isolation of nucleic and preparation of chromatin I. in Methods in Cell Biol. Vol. XVI. Chapter 1. Edited by Stein, G. and Sten J. Academic Press. pp 1-16.*

Carafoli, E. (1994) *Biogenesis:Plasma membrane calcium ATPase:15 years of work on the purified enzyme.* *FASE B J.* 8:993-1002.

Cartaud, A. and Ozon, R (1980) *Xenopus leavis oocyte calmodulin in the process of meiotic maturation.* *J. Biol. Chem.* 255:9404-9408.

Campbell, A.K. (1983). *Intracellular calcium its universal role as a regulator.* John Wiley & Sons Lim.

Chafouleas, J. G., Dedman. J. R., Munjoal, R. P. and Means, A. R. (1979) *Calmodulin development and application of a sensitive radioimmunoassay* *J. Biol. Chem.* 254:10262-10267

Chafouleas, J. G. and Means, A. R. (1982). *Calmodulin is an important regulatory molecule in cell proliferation. Ions Cell Proliferation and cancer.*

Chafouleas, J. G., Lagace, L., Bolton, W. E., Boyd III, A. e: and Means, A. R. (1984). *Changes in*

calmodulin and its mRNA accompany reentry of quiescent (G₀) cells into the cell cycle. Cell. 36:73-81.

Channing, C. P., Pomerantz, S. H., Bae, I. H., Evans, V. W. and Atlas, S. J. (1982). Action of hormones and other factors upon oocyte maturation. Adv. Wxp. Med. Biol. 147:189-210.

Chao, S., Suzuki, Y., Zysk, J. R. and Cheung, W. Y. (1984) Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. Molecular Pharmacology 26:75-82.

Cheung, W. Y. (1970). Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38:533-538.

Cheung, W. Y. (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation Science 207:19-27

Cheung, W. Y. (1982). Calmodulin:an overviw. Fed. Proc. 41(7):2253-2257.

Cimler, B. M., Andreasen, T. J., Andreasen, K. J. and Storm, D. R. (1985) P-57 is a neural specific calmodulin-binding protein. J. Biol. Chem. 260:10784-10788.

Clermont, Y. and Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. Am. J. Anat. 100:241-265.

Cohen, P., Burchel, A., Foulkes, J. G., Cohen, P. T. W., Vanam, T. C. and Naim, A. C. (1978) Identification of the Ca²⁺-dependent modulator protein as the fourth subunitit of rabitt skeletal muscle phosphorylase kinase. FEBS Letters 92:287-293.

Cohen, P. (1981). Stimulation of enzyme activities by fragments of calmodulin. Febs Letters. 130 (1):141-145.

Cohen, P. and Klee, C. B. (1988) Calmodulin in molecular aspects of cellular regulation. Elsevier, Amsterdam, Netherlands Vol: 5

Colbran, R. J., Fong, L., Schworer, C. M. and Soderling, T. R. (1988). Regulatory interaction of the Calmodulin-binding, inhibitory, and autophosphorilation domains of Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II. J. Biol. Chem. 263(34):18145-18151.

Colbran, R. J., Smith, M. K., Schworer, C. M., Fong, Y. and Soderling, T. R. (1989). Regulatory

domain of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 264(9):4800-4804.

Colicchio, L. M. (1994). Differential calmodulin binding to three myosin-1 isoforms from liver. *J. Cell. Science.* 107:2279-2284.

Concha, N. O., Head, J. F., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. and Seaton, B. A. (1993). Tar annexin V crystal structure:Ca²⁺-induced conformational changes. *Science.* 261:1321-1324.

Conzelman, K. A. and Mooseker, M. S. (1987). The 110-kD protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated MgATPase. *J. Cell. Bio.* 105:313-324

Corneliussen, B., Holm, M., Waltersson, Y., Onions, J., Hallberg, B., Thornell, A. and Grundstrom, T. (1994) Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains *Nature* 368:760-764

Cox, J. A. (1983). Sequential events in calmodulin on binding with calcium and interaction with target enzymes. *Fed. Proc.* 43(15):3000-3004.

Cox, J. A., Comte, M., Malnoë, A., Burger, D. and Stein, E. A. (1980). Metal ions in biological systems **17** Calcium and its role in biology. Ed. Sigel. Chapter 6 pp 216-255

Crouch, T. H. and Klee, C. B. (1980). Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. *Biochem.* 19:3692-3698.

Crumpton, M. J. and Dedman, J. R. (1990). Protein terminology tangle. *Nature.* 345:212.

Davis, T. N., Urdea, M. S., Masiarz, F. R and Thorner, J. (1986) Isolation of the yeast calmodulin gene:calmodulin is an essential protein. *Cell* 47:423-431.

Davis, T. N. (1992). A temperature-sensitive calmodulin mutant loses viability during mitosis. *J. Cell. Biol.* 118(3):607-617.

Dedman, J. R., Welsh, M. J. and Means, A. R. (1978) Ca²⁺ dependent regulator:production and characterization of a mono specific antibody. *J. Biol. Chem.* 253:7515-7521.

Dedman, J. R. and Kaetzel, M. A. (1983). Calmodulin purification and fluorescent labeling. *Meth. Enzymol.* 102:1-8.

Deery, W. J., Meand, A. R. and Brinkley, B. R. (1984) Calmodulin-microtubule association in cultured mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 98:904-910.

Díaz-Pnce, M., Trejo, R. (1993) Characterization of the testicular glucose-6-phosphatase. *Arc. Med. Res.* 24:107

Dismorée, J. H. and Sloboda, R. D. (1989) Microinjection of antibodies to a 62 kd mitotic apparatus protein arrests mitosis in dividing Sea urchin embryos. *Cell* 57:127-134.

Duhamenl, R. C. and Whitehead, J. S. (1990). Prevention of nonspecific binding of avidin. *Meth. Enzymol.* 184:201-209

Durham, A. C. H and Walton, J. M (1982) Calcium ion and the control of proliferation in normal and cancer cells *Biosci. Rep* 2 pp 15-30

Edelman, A. M. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 56:567-613.

Feinberg (1985) Calmodulin level and cAMP-dependent protein kinase activity in rat spermatogenic cells and hormonal control of spermatogenesis. *Devel Biol.* 108:179-184.

Fong, Y., Taylor, W. L., Means, A. R. and Soderling, T. R. (1989). Studies of the regulatory mechanism of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 264(28):16759-16763.

Geiser, R. J., Tuinen, D., Brokerhoff, S.E., Netf, M. M. and Davis, T. N. (1991). Can calmodulin function without binding calcium. *Cell.* 65:949-959.

Gershoni, J. M. and Palade, G. E. (1983) Protein blotting principles and applications *Anal. Bioche.* 131:1-15

Gleney, J. R. Jr and Weber, K, (1980) Calmodulin-binding proteins of the microfilaments present in isolated brush borders and microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 255:10551-10554.

Glenney, J. R. and Weber, K. (1983) Detection of calmodulin-binding polypeptides separated in SDS-polyacrylamide gels by a sensitive (125)calmodulin gel overlay assay *Meth in Enzimol* 102:204-210.

Gopalakrishna, R. and Anderson, W. B. (1982). Ca^{2+} induced hydrophobic site on

calmodulin:application for purification of calmodulin by phenil-sepharose affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104:830-836.

Gorelick, F. S., Chang, A. and Jamieson, D. (1987). Calcium-calmodulin-stimulated protein kinase in developing pancreas

Green, N. M. (1990). Avidin and streptavidin. *Meth. Enzymol.* 184:51-67.

Greenlee, D. V., Andreasen, T. J. and Storm, D. R. (1982). Calcium-independent stimulation of *Bordetella pertussi* adenilate cyclase by calmodulin. *Biochem.* 21:2759-2764.

Guerrier, P., Moreau, M., Meijer, L., Mazzei, G., Vilanc, J. P. and Dube, F. (1982). In membranes in growth and development". A. R. Liss.

Hanson, P. I. and Schulman, H. (1992). Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca^{2+} /Calmodulin-protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267(24):17216-17224.

Hardie, D. G. (1982). Cyclic nucleotide and Ca^{2+} -independent protein kinases. *Meth. Enzymol.* pp 474-481.

Hardie, D. G. and Cohen, P. (1982). Ca^{2+} - and calmodulin-dependent protein kinases. *Meth. Enzymol.* pp 487-495.

Heizmann, C. W. and Hunziker, W. (1991). Intracellular calcium-binding proteins:move sites than insights. *TIBSS.* 16:98-103.

Hepler, P. K. (1985). Calcium restriction prolongs metaphase in dividing *Tradescantia* stamen hair cells. *J. Cell. Biol.* 100:1363-1368.

Hepler, P. K. (1989). Calcium transients during mitosis:observations in flux. *J. Cell. Biol.* 109:2567-2573.

Hernández, O. E., Trejo, R., Espinoza, A. M., Gonzalez, A. and Mújica, A. (1994) Calmodulin binding proteins in the membrane vesicles released during the acrosome reaction and in the perinuclear material in isolated acrosome reacted sperm heads *Tissue Cell* 26:849-865

Hope-Cookk, G. and Wolff, J. (1983) Calcium independent activation of adenylate cyclase by calmodulin. *Eur. J. Biochem.* 133:11-15.

Houri, H. P. and Bucher, K. (1986). Immunoblotting with monoclonal antibodies:importance of blocking solution. *Anal. Biochem.* 159:386-389.

Howe, C. L. and Mooseker, M. S. (1983). Characterization of the 110 kD actin-calmodulin-, and membrane-binding protein from microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 97:974-985.

Irvine, R. F. (1990) Quantal Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates-a possible mechanism

Jagadeswar, B., Brahmachair, S. K. and Styanarayana, M. R., Structural organization of the meiotic prophase cromatin in the rat testis (1983) *J. Biol. Chem* 258:13478-13485.

Johnson, A. D. *The Testis II Biochemistry, 4. Testicular Lipids*, Eds. A. D. Johnson, W. R. Gomes, N. L. Vandermark, Academic. Pres, London, pp 194-153.

Jones, H. P., Lenz, R. W., Palevitz, B. A. and Cornier, M. J. (1980) Calmodulin localization in mammalian spermatozoa *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:2772-2776.

Jones, D. A., Glod, J., Wilson-Shaw, D., Hahn, W. E. and Sikela, J. M. (1991). cDNA sequence and differential expression of the mouse Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase IV gene. *FEBS.* 289(1):105-109.

Kakiuchi, S. and Yamazaki, R. (1970). Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41:1104-1110.

Kao, J. P. Y., Alderton, J. M., Tsien, R. Y. and Steinhardt, A. (1990). Active involvement of Ca^{2+} in mitotic progression of swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 111:183-196.

Kato, M., Hagwara, M. and Hidaka, H. (1992). Identification of a 80 kDa calmodulin-binding protein as a new Ca^{2+} /Calmodulin-dependent kinase by renaturation blotting assay (RBA). *Biochem. J.* 281:339-342.

Keit, C. H., Maxfield, F. R. and Shelanski, M. L (1985) Intracellular free calcium levels are reduced in mitotic PtK2 ephitelial cells. *Cell. Biol.* 82:800-804.

Keith, C., DiPaola, M., Maxfield, F. R. and Shelanski, M. L. (1983) Microinjection of Ca-Calmodulin causes a localized depolymerization of microtubules. *J. Cell. Biol.* 97: 1918-1924.

Keith, C. H. (1987) Effect of microinjection calcium-calmodulin on mitosis in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskel* 7:1-9

Kelly, P. T. and Vernon, P. (1985) Changes in the subcellular distribution of calmodulin-kinase II during brain development. *Dev. Brain. Res.* 18:211-214.

Kelly, P. T., Shields, S., Conway, K., Yip, R. and Burgin, K. (1987) Developmental changes in calmodulin-kinase II activity at brain synaptic junctions: alterations in holoenzyme composition. *J. Neurochem.* 49(6):1927-1940.

Keshet, E., Itin, A., Fischman, K. and Nir, U. (1990). The testis-specific transcrip (ferT) of the tyrosine kinase FER is expressed during spermatogenesis in a stage-specific manner. *Mol. Cel. Biol.* 10(9):5021-5025.

Kilhoffer, M. C., Demaille, J. G. and Gerard, D. (1980). Phosphorylated protein involved in the regulation of RNAr syntesis in CHO cells recovering from heat shock. *FEBS Lett.* 116:261-270.

Kilhoffer, M., Harech, J. and Dedmalle, J. G. (1983). Ion binding to calmodulin. *Mol. Cell. Biochem.* 51:31-54.

Kapiloff, M. S., Mathis, J. M., Nelson, C. A., Lin, C. R. and Rosenfeld, M. G. (1991) Calcium/calmodulin dependent protein kinase mediates a pathway for transcriptional regulation *Biochem.* 88:3710-3774.

Kitagawa, Y., Sasaki, K., Shima, H., Shibuya, M., Sugimura, T and Nagaol, M. (1990) Protein phosphatases possibly involved rat spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Ress. Comm.* 171:230-235

Kimura, K., Katoh, N., Sakurada, K. and Kubo, S. (1985). Phosphorylation of high mobility group 1 protein by phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein kinase from pig testis. *Biochem. J.* 227:271-276.

Klee, C. B. (1977) Conformational accompanying the binding of Ca²⁺ to the protein activator of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase *Biochem* 16:1017-1024

Klee, C. B., Crouch, T. H., Richman, P. G. (1980) *Calmodulin* Ann. Rev. Biochem. 49:489-515

Kosaha, Y., Ogita, K., Ase, K., Nomura, H., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1988). *The heterogeneity of protein kinase C in various rat tissues.* Biochem. Biophys. Res. Comm. 151(3):973-981.

Kretsinger, R. H. (1976) *Calcium-binding proteins* Ann. Rev. Bioche 239-266

Kretsinger, R. H. (1979). *The informational role of calcium in the cytosol.* Advances in Cyclic Nucleotide Research. 11:1-26.

Laemmli, (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature. 227:680-685.

LaPorte, D. C., Wierman, B. M. and Storn, D. R. (1980). *Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin.* Biochem. 19:3814-3819.

Larson, R. E., Goldenring, J. R., Vallano, M. L. and DeLorenzo, R. J. (1985). *Identification of endogenous calmodulin-dependent kinase and calmodulin-binding proteins in cold-stable microtubule preparations from rat brain.* J. Neurochem. 44(5):1566-1574.

LeVine III, H. and Sahyoun, N. E. (1988). *Two types of brain calmodulin-dependent protein kinase II: morphological, biochemical and immunochemical properties.* Brain Research. 439:47-55.

LeVine, S. M. and Macklin, W. B. (1988). *Biotin enrichment in oligodendrocytes in the rat brain.* Brain Res. 444:199-203.

Lickteig, R., Shenolikar, S., Denner, L. and Kolly, P. T. (1988) *Regulation of Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II by Ca²⁺/Calmodulin-independent autophosphorylation.* J. Biol. Chem. 263(35):19232-19239.

Lorca, T., Galas, S., Fesquet, D., Devault, A., Cavadore, J and Dorée, M. (1991) *Degradation of the proto-oncogene product p³⁹ mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase.* EMBO. J. 10:2087-2093.

222879

Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquer, D., Cavadore, J., Mery, J., Means, A. and Doée, M: (1993) *Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of*

Xenopus eggs Nature 366:270-273

Lorca, T., Abrieu, A., Means, A., Dorée, M. (1994) Ca^{2+} is involved through type II calmodulin dependent protein kinase in cyclin degradation and exit from metaphase *Biochem. Biophys. Acta* 1223:325-332.

Lukas, T. J., Harech, J., Lau, W., Craig, T. M., Zimmer, W. E., Shattuck, R. L., Shoemaker, M. O. and Watterson, D. M. (1988). Calmodulin and calmodulin-regulated protein kinases as transducers of intracellular calcium signals. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 211

Lukas, T. J., Wallen-Friedman, M., Kung, C. and Watterson, D. M. (1989) *In vivo* mutations of calmodulin: a mutant *Paramecium* with altered ion current regulation has an isoleucine to threonine change at residue 136 and an altered methylation state at lysine residue 115 *Proc Natl. Acad. Sci.* 86:7331-7335.

Maller, J. L. and Krebs, E. G. (1977). Progesterone stimulated cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit of adenosine-3',5'-monophosphate dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252:1712-1718.

Manalan, A. S. and Klee, C. B. (1984). *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*. 18. Edited by P. Greengard and G. A. Robinson. Raven Press. New York. pp. 227-278.

Martin, R. B. *Metal ions in biological calcium and its role in biology*. Ed. Nedmund Singel.

Masui, Y. (1992) *Towards understanding the control of the division cycle in animal cells*. *Biochem. Cell. Biol.* 70:920-945.

McCleskey, E. W. (1994) Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 4:304-312

Meador, W. E., Means, A. R. and Quijoch, F. A. (1992). Target enzyme recognition by calmodulin: 2.2 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science*. 257:1251-1254.

Meador, W. E., Means, A. R. and Quijoch, F. A. (1993). Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of X-ray structures. *Science*. 262:1718-1821.

Means, A. R., Dedman, J. R., Tindall, D. J. and Welsh, M. J. (1978). Hormonal regulation of sertoli

cells. *Int. J. Androl. Suppl* 2:403-421.

Means, A. R. and Dedman, J. R. (1980) Calmodulin- and intracellular calcium receptor. *Nature* 285:73-77

Means, A. R., Tash, J. S. and Chafouleas, J. G. (1982). Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol. Rev.* 62(1):1-39.

Means, A. R., Cruzalegui, F., LeMagueresse, B., Needleman, D. S., Slaughter, G. R. and Ono, T. (1991). A novel Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase and a male germ cell-specific calmodulin-binding protein are derived from the same gene. *Mol. Cel. Bio.* 11(8):3960-3971.

Miller, S. G. and Kennedy, M. B. (1986). Regulation of brain type II Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca^{2+} -triggered molecular switch. *Cell* 44:861-870

Morin, N., Abrieu, A., Lorca, T., Martin, F. and Dorée, M. (1994). The proteolysis-dependent metaphase to anaphase transition: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates onset of anaphase in extracts prepared from unfertilized *Xenopus* eggs. *EMBO J.* 13(8):4343-4352.

Moriya, M., Katagiri, C. and Yagi, K. (1993) Immuno-electron microscopic localization of calmodulin and calmodulin-binding protein to the mouse germ cells during spermatogenesis and maturation *Cell and Tissue Res* 271:441-451.

Morril, G. A. and Kostallow, A. B. (1986). *The role of calcium in meiosis in "calcium and cell function"*. Ed. W. Y. Cheung Academic Press.

Muramatsu, T., Giri, P. R., Higuchi, S. and Kincard, R. L. (1992) Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:529-533

Newton, D. L., Oldewurtel, M. D., Krinks, M. H., Shiloach, J. and Klee, C. B. (1984). Agonist and antagonist properties of calmodulin fragments. *J. Biol. Chem.* 259(7):4419-4426.

Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258:607-614.

Nishio, H., Matsui, H., Eton, S., Moia, L. J. M. P., Tokuda, M., Itano, T. and Hatase, O. (1992) Identification of testis specific calcineurin β subunit isoform by a monoclonal antibody and detection of

a specific six aminoacid sequence. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 182:34-38

Norbury, C. and Nurse, P. (1992) *Animal cells cycles and their control.* *Annu. Rev. Biochem.* 61:441-4470.

Nordlie, R. C. (1979) *Multifuntional glucose-6-phosphatase:cellular biology.* *Life Sci.* 24:2397-2404.

Oakley, B. R., Kirsch, D. R. and Morris, N. R. (1989). *A simplified ultrasensitive silver stain for detecting protein in polyacrylamide gels .* *Anal. Biochem.* 105:361-363.

Ono, T., Korde, Y., Arai, Y. and Yamashiita, K. (1984) *Heat-stable calmodulin binding protein in rat testis* *J. Biol. Chem.* 259:9011-9016.

Ono, T., Korde, Y., Arai, Y. and Yamashita, K. (1987) *Tissue specificity of calpermin:A heat stable Mr 32,000 calmodulin-binding protein* *Archives of Biochem. and Biophys* 255:102-108.

Ono, T., Slaughter, G. R., Cook, R. G. and Means, A. R. (1989) *Molecular cloning sequence and distribution of rat calspermin, a high affinity calmodulin-binding protein* *J. Biol. Chem.* 264:2081-2087.

Ohya, Y. and Anarahu, Y. (1989). *A galactose-dependent cmd 1 mutant of Saccharomyces cerevisiae:involment of calmodulin in nuclear division.* *Curr. Genet.* 15:113-120.

Ohya, Y and Botstein, D. (1994) *Diverse essential functions relevated by complementing yeast calmodulin mutants.* *Science* 263:963-966

Olwin, B. B., Keller, C. H. and Storm, D. R. (1982) *Interaction of a fluorescent N-danzylaridine derivate of troponin I with calmodulin in the absence and presence of calcium.* *Biochem.* 21:5669-5675.

O'Neal, S. G., Rhoads, D. B. and Racker, E. (1979). *Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and other ATPases.* *Biochem. Biophys. Res. Comn.* 89(3):845-850.

O'Neil, K. T. and DeGrado, W. F. (1990). *How calmodulin binds its targets:sequence independent recognition of amphiphilic α -helices.* *Tibs.* 15:59-64.

Orellana, O., Jedlichi, E., Allende, C. C. and Allende, J. E. (1984). *Properties of acyclic nucleotide phosphodiesterase of amphibian oocytes that is activated by calmodulin and calcium, by triptic*

proteolysis and by phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 231:345-354.

Picard, A. and Dorée, M. (1983). Is calcium the second messenger of 1-methyl adenine in meiosis reinitiation of starfish oocytes. Exptl. Cells. Res. 145:325-337.

Persechini, A., Kretsinger, R. H. and Davis, T. N. (1991) Calmodulins with deletions in the central helix functionally replace the native protein in yeast cells Proc. Natl. Acad. Sci. 88:449-452

Poenie, M., Alderton, J., Tsien, R. Y and Steinhardt, R. A. (1985) Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle. Nature 315:147-149

Poenie, M., Alderton, J., Steinhardt, R. and Tsien, R. (1986). Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell and onset of anaphase Science. 233:886-889.

Pruschy, M., Ju, Y., Spitz, L. Carafoli, E. and Goldforb, D. S. (1994) Facilitated nuclear transport of calmodulin in tissue culture cells. J. Cell. Biol. 127:1527-1536.

Pujol, M. J., Soriano, M., Aligué, R., Carafoli, E. and Beach, O. (1989). Effect of alpha-adrenergic blockers on calmodulin association with the nuclear matrix of rat liver cells during proliferative activation. J. Biol. Chem. 264:8863-8865.

Putkey, J. A., Draetta, G. F., Slaughter, G. R., Klee, C. B., Cohen, P., Stull, J. T. and Means, A. R. (1986). Genetically engineered calmodulins differentially activate target enzymes. J. Biol. Chem. 261(21):9896-9903

Putney, J. W. Jr, Poggioli, J and Weiss, S. J. (1981) Receptor regulation of calcium release and calcium permeability in parotid gland cells. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 296:37-45

Putney, J. W. and Bird, G. J. (1993). The signal for capacitative calcium entry. Cell. 75:199-201.

Putney, J. W., Jr (1986) Cell calcium 7:1-12

Putney, J. W. Jr, (1990) Cell calcium 11:611-624

Rasmussen, H., Kojima, I., Kojima, K., Zawalich, W. and Apeldorf, W. (1984) Calcium as intracellular messenger: sensitivity modulation, C-kinase pathway, and sustains cellular response. Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phosph. Res 18:159-193

Rasmussen, C. D. and Means, A. R. (1987). Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation. *EMBO J.* 6:39615-3968.

Rasmussen, C. D. and Means, A. R. (1989) Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO J.* 8:73-82

Ratan, R. R. and Shelanski, M. L. (1986). Calcium and the regulation of mitotic events. *TIBS.* 11:456-459.

Ratan, R. R., Shelanski, M. L. and Maxfield, F. R. (1986). Transition from metaphase to anaphase is accompanied by local changes cytoplasmic free calcium in Pt K2 kidney epithelial cells. *Proc. Natl. Acad.* 83:5136-5140.

Reddy, G. P. V., Reed, W. C., Deacon, D. H. and Quesenberry, P. J. (1992). Growth factor-dependent proliferative stimulation of hematopoietic cells is associated with the modulation of cytoplasmic and nuclear 68-Kd calmodulin-binding protein. *Blood.* 79(8):1946-1953.

Richman, P. G. and Klee, C. B. (1979) Specific perturbation by Ca^{2+} of tyrosyl residue 138 of calmodulin. *J. Biol. Chem.* 254:5372-5376.

Rostas, J. A. and Dunkley, P. R. (1992). Multiple forms and distribution of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II in brain. *J. Neurochem.* 59(4):1191-1202.

Sacks, D. B., Davis, H. W., Crimmins, D. L. and McDonald, J. M. (1992). Insulin-stimulated phosphorylation of calmodulin. *Biochem. J.* 286:211-216.

Sahyoun, N., LeVine III, H., Bronson, D., Siegel-Greenstein, F. and Cuatrecasas, P. (1985). Cytoskeletal calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 260(2):1230-1237.

Saitoh, T. and Schwartz, J. (1985) Calcium/calmodulin-dependent protein phosphorylation in the neurons system of aplysia. *J. Neurosci.* 4:1618-1625

Schwarer, C. M., Colbran, R. J. and Soderling, T. R. (1986) Reversible generation of a Ca^{2+} -independent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J. Biol. Chem.* 261:8581-8584

Sefton, B. M. and Hunter, T. (1984). Tyrosine protein kinases. *Advances in cyclic nucleotide and*

protein phosphorylation research. vol. 18.

Sellinger, M. and Weiss, B. (1981). Interaction of endorphin and other opioid peptides with calmodulin. Molecular Pharmacology. 21:86-91.

Sellinger-Barnette, M. and Weiss, B. (1984). Interaction of various peptides with calmodulin. Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research. 16. Edited by S. J. Strada and W. J. Thompson. pp. 261-276.

Serratosa, J., Pujol, M. J., Bachs, O. and Carafoli, E. (1988). Rearrangement of nuclear calmodulin during proliferative liver cell activation. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 150(3):1162-1169.

Sheng, M., Thompson, M. A. and Greeberg, M. E. (1991) CREB: A Ca^{2+} -regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases Science 252:1427-2430.

Shenolikar, S., Lickteig, R., Hardie, D. G., Soderling, T. R., Hanley, R. M. and Kelly, P. T. (1986). Calmodulin dependent multifunctional protein kinase. Eur. J. Biochem. 161:739-747.

Slaughter, G. R., Needleman, D. S and Means, A. R. (1987) Developmental regulation of calmodulin, actin, and tubulin RNAs during rat testis differentiation. Biology of reproduction 37: 1259-1270.

Smith, V. L., Kaetzel, M. A. and Dedman, J. R. (1990). Stimulus response coupling: the search for intracellular calcium mediator proteins. Cell Regulation. 1:165-172.

Soderling, T. R., Fukunaga, K., Rich, D. P., Fong, Y. L., Smith, K. and Colbran, R. J. (1990). Regulation of brain Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II. The Biology and Medicine of Signal Transduction, edited by Yasutomi Nishizuka et al. Raven Press New York. pp 206-211.

*Starovasnik, M. A., Davis, T. N. and Klevit, R. E. (1993) Similarities and differences between yeast and vertebrate calmodulin: an examination of the calcium-binding and structural properties of calmodulin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem 32:3261-3270.*

Steinberger, E. and Duckett, G. E. (1967). Hormonal control of spermatogenesis. J. Reprod. Fert. (suppl)2:75-96.

Steinhardt, R. A. and Alderton, J. (1988) Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope

breakdown in the Sea Urchion embryo Nature 332:364-366

Sun, G., Ohya, Y. and Anraku, Y. (1991). Half-calmodulin is sufficient for cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 266(11):7008-7015.

Sweet, W. D. and Schroeder, F. (1988). in: *Lipid domains and the relationship to membrane function.* Alan R. Liss, Inc.

Tanaka, T. and Hidaka, H. (1980). Hydrofobic regions function in calmodulin-enzyme(s) interactions. *J. Biol. Chem.* 255(23):11078-11080.

Takeda, I., Imai, Y. and Yamamoto, M. (1989) Substitution at position 116 of *Shizosaccharomyces pombe* calmodulin decrease its stability under nitrogen starvation and result in a sporulation deficient phenotype *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:9737-9741.

Tash, J. S, Kretsinger, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B. and Means, A. R. (1988) Identification characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm *J. Cell. Biol.* 106:1625-1633

Thiry, P., Vandermers, A., Vandermers-Piret, M., Rathé, J. and Christophe, J. (1980). The activativa of brain adenylate cyclase and brain cyclic-nucleotide phosphodiesterase by seven calmodulin derivates. *Eur. J. Biochem.* 103:409-414.

Thomas, P. S. and Farquhar, M. N. (1977). Specific measurement of DNA in nucleic acids using diaminobenzoic acid. *Anal. Biochem.* 89:35-44.

Thorne-Tjomslund, G., Clermont, Y. and Tang, X. (1991) Glucose-6-phosphatase activity of endoplasmic reticulum and golgi apparatus in spermatocytes and spermatid of the rat: an electron microscopic cytochemical study. *Biol. Cell.* 71:33-41.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.

Trejo, R. (1982). ATPasa- (Ca+Mg) y calmodulina durante la espermatogénesis. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM.

Trejo, R., Turner, R. and Dedman, J. R. (1985). Changes in calmodulin mRNA levels during rat spermatogenesis. *J. Cell. Biol.* 101(part. 2):369

Trejo, R. and Mújica, A (1990) Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation and acrosome reaction in Guinea pig spermatozoa *Molecular Reproduction and Development* 26:366-376

Trejo, R., Valadez-Salazar, A., Delhumeau, G. (1995) Effects of quercetin on rat testis aerobic glycolysis. *Canad. J. Physiol Pharmacol* (en prensa)

VanBerkum, M. F. A., George, S. E. and Means, A. R. (1990). Calmodulin activation of target enzymes. *J. Biol. Chem.* 265(7):3750-3756.

Vantard, M., Lambert, A., Mey, J., Picquot, P. and Eldik, L. J. V: (1985) Characterization and immunocytochemical distribution of calmodulin in higher plant endosperm cell *J. Cell. Biol.* 101:488-499

Veer Reddy, G. P., Reed, W. C., Deacon, D. H. and Queensberry, P. J. (1992) Growth factor-dependent proliferative stimulation of hemetopoietic cells is associated with the modulation of cytoplasmic and nuclear 8 kd calmodulin-binding protein *Blood* 79:1946-1955

Voguel, H. J., Huque, E. M. and Hiraoki, T. (1990). Characterization of the surface of calmodulin by NMR. *The biology and medicine of signal transduction. Edited by Yasutomi Nishizuka et al. Raven Press. New York.*

Volonté, C., Nichols, R. A. and Greene, L. A. (1992). Rapid measurement of protein kinase and phosphatase activities by slot-filtration. *Biotechniques.* 12(6):854-863.

Wallace, R. W., Tallant, E. A., Dockter, M. E. and Cheung, W. Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:1845

Wasserman, W. J. and Smith, L. D. (1981). Calmodulin triggers the resumption of meiosis in amphibian oocytes. *J. Cell. Biol.* 89:389-394.

Welsh, M. J., Dedman, J. R., Brinkley, B. R. and Means, A. R. (1978) Calcium-dependent regulator protein: localization in mitotic apparatus of eukaryotic cells *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1867-1871

Welsh, M. J., Dedman, J. R., Brinkley, B. R. and Means, A. R. (1979) Tubulin and Calmodulin *J. Cell. Biol.* 81:624-634

Weinman (1986) Calmodulin immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem* 34:1181-1193

Weisten, H. and Mehler, E. L. (1994). Ca^{2+} -binding and structural dynamics in the functions of calmodulin. *Annu. Rev. Physiol.* 56:213-236.

West, W. L. (1981). Calmodulin-regulated enzymes: modifications by drugs and disease. *Fed. Proc.* 89(7):2251-2252.

Wilchek, M. and Bayer, E. A. (1990). Introduction to avidin-biotin technology. *Meth. Enzymol.* 184:5-9.

Winkler, M. A., DeWitt, L. M., Cheung, W. Y. (1987) *Hypertension* 9:217

Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1985) Self-regulation of calmodulin-dependent protein kinase II and glycogen synthase kinase by autophosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129:213-219.

Yamauchi, T., Sekihara, S. and Ohsako, S. (1990). Subcellular distribution of α and β subunit proteins of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II expressed in Chinese hamster ovary cells. *FEBS.* 266(1,2):55-58