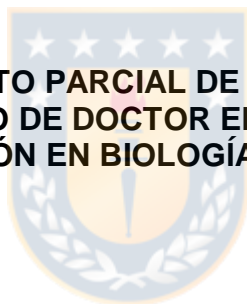


**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA ADENILIL CICLASA
DE OOCITO DE *Xenopus laevis*,
ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN.**

TESIS DE DOCTORADO

**ENTREGADA A LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**

**EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE ESPECIALIZACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**



POR

MARCELA ELIANA TORREJÓN QUEZADA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN OLATE ARAVENA

JUNIO 2000

X-gal : 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido



RESUMEN

El objetivo general de este trabajo de tesis fue caracterizar a nivel molecular una adenilil ciclasa (A.C.) de oocito de *Xenopus laevis* y su interacción con otros componentes que participan en el sistema de transducción de señal. Para ello utilizamos sistemas de expresión en células en cultivo (sistema heterólogo), el cual nos permitió realizar estudios de actividad de A.C. en respuesta a GppNHp, forskolina, AlF_4^- y $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Posteriormente, los estudios realizados a través de la técnica de doble híbrido, nos permitieron analizar la interacción entre las regiones

citósicas C1 y C2 de la A.C. de *X. laevis* y las subunidades $G\alpha s$ silvestres, mutantes y quimeras.

Se obtuvo el gen completo que codifica para una adenilil ciclasa (A.C.) de oocito de *X. laevis*. El cDNA posee un tamaño de 4.372 pares de bases y contiene un marco de lectura abierto para una proteína de 1.355 aminoácidos. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida con secuencias de A.C. de mamífero, mostró un bajo índice de identidad (19,7%-24,2%), excepto con la A.C. de tipo IX de ratón (70%). A través de análisis de transcripción reversa y PCR se detectó expresión del mRNA durante la oogénesis, pero no durante estados tempranos de la embriogénesis (mórula y blástula), indicando probablemente su participación en el proceso de maduración. La expresión de la A.C. de *X. laevis* en células en cultivo COS-7 y HEK293 resultó en un aumento de la actividad basal, la cual fue estimulada notoriamente por Gpp(NH)p y NaF, pobremente por forskolina e insensible a calcio-calmodulina. Este tipo de regulación es similar al mostrado por la A.C. de tipo IX de ratón, por lo que ambas A.C. representarían una nueva isoforma de A.C. Utilizando el sistema de doble híbrido en levadura se analizó la interacción física entre los dominios C1 y C2 de la A.C. y la proteína $G\alpha s$. Se encontró interacción entre C2 y entre C1 y C2, pero no entre C1, lo que está de acuerdo con las estructuras cristalinas previamente descritas para este tipo de complejos. También se observó interacción solamente entre el dominio C2 y la especie activa de $G\alpha s$ ($G\alpha$ -GTP), lo que concuerda plenamente con estudios previos de tipo cristalográfico y bioquímicos.

Todos estos resultados indican que la A.C. de *X. laevis* pertenece a un nuevo isotipo de enzima dentro de esta gran familia de proteínas que es regulada positivamente por la especie activa de la proteína $G\alpha s$ a través de su dominio citosólico C2.