

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;
Física; Geología; Historia; Ingeniería;
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares
que se reparte gratuitamente a investigadores,
Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 156-Gel
Estudio de la fosforilasa Kinasa de
Gella Tomás, F. Javier.
1031532



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

F. Javier Gella Tomás

Estudio de la fosforilasa kinasa de
hígado y leucocitos: purificación,
características y regulación de su
actividad.

156 Fosforilasa kinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad/F. J. Gella Tomás

FJM
Uni-
156
Gel
156

Fundación Juan March
Serie Universitaria



156

F. Javier Gella Tomás



Estudio de la fosforilasa kinasa de
hígado y leucocitos: purificación,
características y regulación de su
actividad.



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de España, 1979, individual.
Departamento de MEDICINA, FARMACIA y VETERINARIA.
Centro de trabajo: Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Barcelona.*

Los textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por
los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal: M - 20234 - 1981

I.S.B.N. : 84 - 7075 - 203 - 0

Impresión: Gráficas Ibérica, Tarragona, 34, Madrid-7

En el trabajo experimental aquí presentado han participado los Sres. P. Aymerich, P. Benedicto y J. Beleta, como parte de sus respectivas Tesis Doctorales.

INDICE

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	5
INTRODUCCION.....	6
I. MATERIALES Y METODOS	10
1. Obtención y separación de leucocitos	10
2. Obtención de extractos hepáticos y leucocitarios	10
3. Determinación de actividad fosforilasa kinasa	10
4. Determinación de proteína	12
5. Electroforesis en gel de poliacrilamida	12
6. Unidades	13
7. Materiales	13
II. RESULTADOS	14
1. Regulación de la actividad fosforilasa kinasa en extractos crudos de hígado y leucocitos	14
2. Purificación de la fosforilasa kinasa hepática	17
2.1. Precipitación isoléctrica	17
2.2. Centrifugación a alta velocidad	17
2.3. Precipitación con polietilenglicol	17
2.4. Cromatografía en DEAE-celulosa.....	18
2.5. Primera gel filtración	19
2.6. Cromatografía en sepharosa-histona	19
2.7. Segunda gel filtración	19
3. Purificación de la fosforilasa kinasa de linfocitos	20
4. Examen electroforético de las fosforilasas kinasas purificadas	24
5. Peso molecular de la fosforilasa kinasa hepática y leucocitaria	27
6. Caracterización de los enzimas purificados	27
6.1. pH óptimo	27
6.2. Efecto del magnesio y del fluoruro	28
6.3. Efecto de diversos azúcares	28

6.4. Efecto de las concentraciones de sustratos fosforilasa b y ATP . . .	28
6.5. Efecto de los cationes divalentes	32
6.6. Dependencia de calcio	34
6.7. Efecto de la protein kinasa dependiente de AMP cíclico	34
7. Identificación y purificación de un inhibidor de la fosforilasa kinasa hepática	34
7.1. Purificación parcial del inhibidor	36
8. Caracterización del inhibidor de la fosforilasa kinasa hepática	38
8.1. Acción inhibitoria frente al tiempo de actuación	38
8.2. Efecto de los inhibidores de fosfatasas	38
8.3. Efecto de la protein kinasa dependiente de AMP cíclico	42
8.4. Efecto del factor inhibitorio sobre la fosforilasa kinasa muscular. .	42
III. DISCUSION	44
IV. BIBLIOGRAFIA	49

RESUMEN

La fosforilasa kinasa de extractos hepáticos y leucocitarios muestra la notable diferencia, respecto a la muscular, de activar se muy poco cuando se estimula con proteín kinasa.

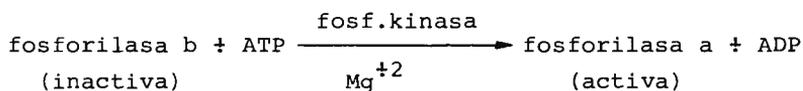
Nosotros hemos purificado el enzima hepático y linfocitario hasta un estado cercano a la homogeneidad. Ambos enzimas mostraron unas características similares. El peso molecular estimado fué de 180-200.000, muy inferior al de la fosforilasa kinasa muscular. El enzima mostraba actividad máxima entre pH 7,0 y 8,8, ensayado con concentraciones óptimas de ATP-Mg⁺² (equimoleculares) Tanto el exceso de Mg⁺² como de ATP inhibían la actividad del enzima, aunque el efecto del primero podía ser anulado en presencia de FNa 50 mM. Las Km para los sustratos fosforilasa b y ATP eran de 5-9 µM y 70-100 µM, respectivamente. El glucógeno a concentraciones superiores al 1% mostraba un claro efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática, mientras que la glucosa-1-fosfato y la glucosa-6-fosfato no mostraban efecto alguno. Diversos cationes divalentes afectaban la velocidad de reacción. A diferencia del enzima muscular, la fosforilasa kinasa de hígado o leucocitos no mostraba dependencia total de calcio, ya que podía detectarse una actividad residual en presencia de elevadas concentraciones de EGTA.

Se ha identificado también la existencia de un inhibidor de la fosforilasa kinasa hepática. Este inhibidor ha sido parcialmente purificado. El estudio de las características del inhibidor nos ha permitido identificarlo como una fosforilasa kinasa fosfatasa, ya que su efecto resulta disminuido por los inhibidores de fosfatasas, es revertido por la proteín kinasa activa y es capaz de fosforilar e inactivar a la fosforilasa kinasa muscular purificada a homogeneidad.

INTRODUCCION

El enzima fosforilasa kinasa ocupa un puesto clave en la regulación del metabolismo del glucógeno, tanto en hígado como en músculo, ya que en este enzima convergen mecanismos de regulación y nerviosos. Desde 1955, fecha en que se identifica el enzima (1) la mayor parte de las aportaciones al conocimiento de este sistema provienen del grupo de Fischer y Krebs, a los que se agrega posteriormente el inglés Cohen. Estos grupos han logrado purificar a homogeneidad, caracterizar y establecer los mecanismos que regulan a este enzima en músculo esquelético.

La fosforilasa kinasa muscular está constituida por cuatro subunidades distintas denominadas α , β , γ y δ (2,3,25). La composición del holoenzima parece ser $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$. El enzima es responsable en los tejidos de activar a la glucógeno fosforilasa en respuesta a señales hormonales o nerviosas. Esta activación se lleva a cabo por fosforilación:



La activación de la fosforilasa coincide con la inactivación de la glucógeno sintasa, de lo que resulta una degradación neta de glucógeno en respuesta a la señal fisiológica. Los trabajos del grupo de Krebs entre 1959 y 1973 (3,4,5,6) demostraron que la sincronización entre activación de la glucógeno fosforilasa e inactivación de la sintasa era debida a la existencia de un enzima: proteín kinasa, capaz de fosforilar tanto a la sintasa (inactivándola) como a la fosforilasa kinasa (activándola). Asimismo, enlazaba su descubrimiento con el previo de Sutherland al observar que la proteín kinasa mostraba actividad únicamente en presencia de AMP cíclico, el cual a su vez se formaba a nivel

de membrana como respuesta a la adrenalina. Por otra parte, varios autores habian descrito activación de la glucógeno fosforilasa sin aumento previo en los niveles de AMP cíclico durante la estimulación eléctrica del músculo (7). El mecanismo de esta activación fue puesto finalmente en evidencia por Ozawa (8) quien demostró que los niveles de calcio liberados del retículo sarcoplásmico que estimulan la contracción muscular, activan a su vez a la fosforilasa kinasa, que es totalmente inactiva en ausencia de calcio. La subunidad δ o "calmodulina" parece ser la responsable del efecto del calcio sobre el enzima (25). En presencia de trazas fisiológicas de calcio el enzima puede aún aumentar varias veces su actividad cuando es fosforilado por la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico. Esta kinasa introduce primero un grupo fosfato en la subunidad β , lo que resulta en una activación de la fosforilasa kinasa, y mas lentamente un segundo grupo fosfato en la subunidad α (2,3). La fosforilación de la subunidad α , permite entonces que una fosfatasa específica actúe defosforilando la subunidad β e inactivando de nuevo al enzima (9). Las dos formas de la fosforilasa kinasa: activa-fosforilada e inactiva-defosforilada pueden identificarse al mostrar esta última actividad a pH 8,6, siendo inactiva a pH 6,8.

En el tejido hepático la situación parecía ser notablemente distinta. Hasta 1975 se pensaba que la actividad fosforilasa kinasa de hígado no era modulada por ión calcio como lo es su homónima muscular. En ese año, no obstante, Khoo y Steinberg (10) pudieron demostrar una inactivación del enzima en ausencia de calcio. Otros autores confirmaron posteriormente este hecho, aunque la inactivación en ausencia de calcio nunca llegaba a ser total (11). Por otra parte, no se ha descrito ninguna purificación considerable de la fosforilasa kinasa hepática, por lo que su estructura molecular es desconocida. Un punto de discusión actual se refiere a la posible regulación de la fosforilasa kinasa hepática por fosforilación-defosforilación como el isoenzima muscular. Por una parte, los trabajos de Van de Verwe y col. (26) y de Vandenhede y col. (12) muestran evidencia

de una activación de la fosforilasa kinasa hepática por la proteín kinasa dependiente de AMP cíclico en extractos crudos hepáticos. Debe señalarse no obstante que la activación mostrada por estos trabajos (0,5 a 1 vez) parece pequeña en comparación con las 20 a 40 veces que se activa la fosforilasa kinasa muscular por efecto de la proteín kinasa. Por otra parte, Chrisman y col. (27), trabajando con una fracción particulada de glucógeno, y Vandenheede y col. (28) con un enzima parcialmente purificado, describen una ahora notable activación de la fosforilasa kinasa por efecto de la proteín kinasa. En contraste con estos resultados, otros autores han purificado formas del enzima hepático que claramente carecen de la propiedad de regulación covalente por proteín kinasa (29, 30, 31). Frente a esta discrepancia de resultados se han ofrecido dos teorías: 1. Que en el transcurso de la purificación se pierde, en determinados pasos, algún factor esencial para la fosforilación del enzima por proteín kinasa (29) y 2. Que las formas purificadas no activables son precisamente la forma activa y fosforilada del enzima por lo que sería necesario un tratamiento previo con la fosfatasa adecuada para inactivar el enzima y ver entonces su reactivación con proteín kinasa (27). Resulta también interesante destacar que se ha demostrado activación de la proteín kinasa, fosforilasa kinasa y fosforilasa "in vivo" como respuesta a la administración de glucagon (11,13). Los recientes trabajos del grupo de Exton (14,15,16) han profundizado en estos estudios "in vivo" alcanzando las conclusiones de que los agonistas β -adrenérgicos como el glucagon estimulan la glucogenolisis hepática via aumento de AMP cíclico, activación de la fosforilasa kinasa (sin evidencia "in vitro") y activación de la fosforilasa en una cascada de eventos similar a la conocida en músculo. Por el contrario, los α -adrenérgicos como la adrenalina, no aumentan el nivel de AMP cíclico (en contradicción con los trabajos de Sutherland que le valieron el premio Nobel) sino que activan la glucogenolisis probablemente mediante la estimulación por el calcio de la fosforilasa kinasa. Debemos resaltar de nuevo que no ha sido posible demostrar hasta el momento una activación

clara de la fosforilasa kinasa hepática purificada por la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico, por lo que el mecanismo de la estimulación β -adrenérgica de la glucogenolisis en hígado dista de ser comprendido en su totalidad por el momento.

Tanto en músculo como en hígado, la regulación del metabolismo del glucógeno está íntimamente relacionada con la función fisiológica de estos tejidos: contracción y mantenimiento de la glucemia, respectivamente. En ambos casos existen señales químicas (Ca^{+2}) y hormonales que modulan metabolismo y función de forma coordinada. En el tercer tipo celular objeto de nuestra atención, los leucocitos, tal coordinación es desconocida por el momento. El papel que los leucocitos juegan en los procesos de la inmunidad celular, cada día mejor conocidos desde el punto de vista molecular, destaca la importancia de los estudios metabólicos de estas células. El sistema de enzimas que controla la síntesis y degradación de glucógeno en leucocitos parece relacionarse con el sistema hepático más que con el muscular (17,18,32). Pese a encontrarse en leucocitos la mayor parte de enzimas conocidos en otros tejidos, se han encontrado interesantes diferencias con respecto a los isoenzimas de músculo e hígado, mucho más estudiados (18,32,33). Asimismo, la información concerniente a las señales químicas o de tipo hormonal que regulan el metabolismo en leucocitos es escasa o nula. Procesos como la división celular (linfocitos), quimiotaxis y fagocitosis (granulocitos) deben correlacionarse con modificaciones metabólicas que permitan el necesario aporte energético o de sustratos. Tales modificaciones en el metabolismo deben originarse por cambios en las actividades enzimáticas en respuesta a la situación fisiológica. De nuevo aquí, y en especial en lo que hace referencia a la glucogenolisis como aporte energético, debe la fosforilasa kinasa desempeñar un papel relevante por su capacidad, demostrada en otros tejidos, de responder tanto a señales nerviosas como hormonales. La especial situación de los leucocitos como células individualizadas y libres, hace imposible un control nervioso con lo que la función reguladora del calcio puede presentar aquí nuevos e interesantes aspectos.

MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION Y SEPARACION DE LEUCOCITOS:

Las muestras de sangre de cerdo, obtenidas en el Matadero Municipal de Barcelona, se recogieron y procesaron para la obtención de linfocitos y polimorfonucleares según un método descrito por nosotros previamente (20). En esencia la técnica consiste en la obtención de leucocitos totales mediante sedimentación en dextrano de los eritrocitos y posterior separación de leucocitos mononucleados y polimorfonucleares por centrifugación en barrera de densidad con Ficoll-Pielograf (ó urografín).

2. OBTENCION DE EXTRACTOS HEPATICOS Y LEUCOCITARIOS.

- Los conejos, en ayuno de 24 horas, fueron sacrificados por administración endovenosa de 1 ml de tiopental (250 mg/ml) y exanguinación inmediata. El hígado era homogenizado con 4 volúmenes de tampón fosfatos 50 mM pH 7,0, ditiotreititol 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM en una trituradora de cuchillas durante 1 minuto a 4°C. El homogenado así obtenido se centrifugaba a 11.000 g durante 45 minutos, recogiendo el sobrenadante que se filtraba a través de gasa y lana de vidrio para obtener el extracto crudo.

- Los leucocitos aislados se resuspendían en tampón fosfatos 20 mM pH 7,0, sacarosa 5% a una concentración de $1-2 \times 10^8$ células/ml. La homogenización se realizaba por congelación-descongelación y homogenización manual en un Potter-Elvehjem. El homogenado era entonces centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C para obtener el extracto crudo (sobrenadante).

3. DETERMINACION DE ACTIVIDAD FOSFORILASA KINASA:

La actividad fosforilasa kinasa se determinó utilizando dos

métodos distintos:

- Método A: Medición de la actividad fosforilasa a.

El ensayo, descrito por Vandenheede y col. (13), consta de dos reacciones sucesivas. En la primera de ellas la fosforilasa kinasa activa, por fosforilación, a la fosforilasa b muscular (inactiva) presente en la mezcla de reacción. La reacción se iniciaba agregando a 30 μ l de la muestra a ensayar, 20 μ l de un reactivo con 3,5 mg/ml de fosforilasa b muscular, ATP 2,5 mM, acetato magnésico 2,5 mM, ditiotreititol 2,5 mM y tampón trietanolamina 50 mM pH 7,0. Trás la incubación apropiada a 30°C, se tomaban 20 μ l de la mezcla de reacción que se diluían con 400 μ l de tampón EDTA 10 mM, FNa 100 mM, ditiotreititol 1 mM, ácido 2(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 50 mM pH 6,1, en baño de hielo. Los efectos conjuntos de la dilución, el descenso de pH y temperatura y la acción quelante del EDTA sobre el Mg^{+2} , detenían de forma efectiva la reacción fosforilasa kinasa. Se procedía entonces a ensayar la actividad de la fosforilasa a formada mediante una reacción de transferencia de C^{14} -glucosa-1-fosfato a glucógeno según la técnica descrita por Gilboe y col. (34).

- Método B: Medición de la fosforilación de la fosforilasa.

Este método descrito por Reimann y col. (35), se basa en medir la incorporación de fósforo-32 a la fosforilasa b muscular a partir de P^{32} -ATP, por acción de la fosforilasa kinasa. A 60 μ l de la muestra a ensayar se les añadían 20 μ l de un primer reactivo con 17,5 mg/ml de fosforilasa b muscular, ditiotreititol 5 mM y trietanolamina 100 mM pH 7,0. La reacción se iniciaba con la adición de 20 μ l de acetato magnésico 5 mM, $ATP-P^{32}$ 5mM (1 μ Ci). Trás la incubación apropiada a 30°C, se tomaban 50 μ l que se depositaban sobre un cuadrado de 2x2 cm de papel Whatman 31 ET. Los papeles se sumergían en un vaso de precipitados con ácido tricloroacético al 10%, pirofosfato sódico al 8% en baño de hielo, que se mantenía en agitación constante. La fosforilasa con P^{32} incorporado precipitaba sobre el

papel, en tanto que el ATP-P³² no utilizado pasaba al líquido de lavado. Tras 20 minutos de lavado, se reemplazaba el líquido por tricloroacético al 5%, procediéndose a dos lavados consecutivos de 20 minutos cada uno. Finalmente, los papeles se lavaban con etanol 96% durante 5 minutos y se secaban. Para el contaje de radioactividad se introducía cada papel en un vial con 10 ml de líquido de centelleo (0,1 g/l de POPOP, 4 g/l PPO en tolueno). En cada serie se preparaban blancos de fosforilación endógena omitiendo la fosforilasa b de la mezcla de reacción.

4. DETERMINACION DE PROTEINA.

Se utilizó el método de Lowry y col. (36) con precipitación de proteínas y utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Se realizó según la técnica descrita por Shapino y Weber (37,38). Para ello se preparó una solución A compuesta por 22,5 g de acrilamida, 0,6 g de metilénbisacrilamida en 100 ml de agua. Una solución B con 30 g de Tris y 144 g de glicina para 1 litro de agua. La solución C se preparaba con 333 ml de solución B, 3 g de dodecilsulfato sódico (SDS) y 667 ml de agua. Los geles se preparaban mezclando 10 ml de solución A, 10 ml de solución C, 10 ml de persulfato amónico 2,4 mg/ml y 40 µl de N,N,N', N' tetra metiletildiamina. Una vez vertida la solución en los tubitos, se aceleraba el proceso de polimerización con luz ultravioleta.

Las muestras se preparaban mezclando 30 µl (concentración aproximada de proteína 0,25 mg/ml) con 20 µl de SDS 1%, sacarina 25%, azul de bromofenol 0,05%, solución B 25 ml% y β-mercaptoetanol 10%. Se llevaban entonces a 100°C de 2 a 5 minutos y se aplicaban a la parte superior de los geles. Los tubos se acababan de llenar con solución 3 diluida 1:3, al igual que las cubetas del aparato de electroforesis, aplicán-

dose una corriente de 1,5 mA por tubo durante unas tres horas. Se extraían entonces los geles, tiñéndose en azul de Coomassie 0,25%, acético 10%. La decoloración de los geles se realizaba con metanol 40%, acético 7%.

6. UNIDADES.

La Unidad de actividad fosforilasa kinasa se define como la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de fosforilasa b en fosforilasa a por minuto de incubación (Método B) o como la cantidad de enzima que transforma 1 Unidad de fosforilasa b en fosforilasa a por minuto de incubación (Método A).

La Unidad de actividad fosforilasa se define como la cantidad de enzima que incorpora 1 μ mol de glucosa-1-fosfato a glucógeno por minuto de incubación.

7. MATERIALES.

El ATP-P³² se preparó a partir de fosforo-32 obtenido de Amersham utilizando la técnica descrita por Glynn y Chappell (23).

La fosforilasa b se purificó a homogenidad a partir de músculo de conejo según describen Fisher y Krebs (22).

La fosforilasa kinasa muscular se purificó a homogenidad a partir de músculo de conejo mediante la técnica descrita por Cohen (2).

La protein kinasa dependiente de AMP cíclico (subunidad catalítica) se purificó a homogenidad a partir de músculo de conejo como describen Bechtel y col. (24).

La Sepharosa-histona se preparó siguiendo la técnica descrita por Cuatrecasas (40).

El AMP, ATP, AMPc, Glucógeno, Glucosa-1-fosfato e Histona se obtuvieron de Sigma Chem. Co.

La Agarosa-ATP fue suministrada por PL Biochemicals.

El Dextrano, Ficoll, Sephadex y Sepharosa se obtuvieron de Pharmacia Fine Chemicals.

El Pielograf fue suministrado por Juste S.A.Q.F.

Todos los demás reactivos empleados fueron de calidad suficiente para los fines en que se emplearon.

RESULTADOS

1. REGULACION DE LA ACTIVIDAD FOSFORILASA KINASA EN EXTRACTOS CRUDOS DE HIGADO Y LEUCOCITOS.

Los estudios realizados en extractos crudos hepáticos o de leucocitos mostraron en todos los casos una gran similitud de resultados, por lo que en la descripción de los experimentos no mencionaremos el origen tisular de los extractos, dando por entendido que los resultados aplican tanto a hígado como leucocitos.

Cuando se realizó un estudio de la actividad fosforilasa kinasa en los extractos en relación con el tiempo, pudo observarse que la actividad no era lineal con el tiempo (Figura 1). Esta no linealidad era especialmente destacada en los extractos de leucocitos polimorfonucleares, donde el tiempo de velocidad de reacción constante rara vez sobrepasaba los 10 minutos. Como la adición de ATP no aumentaba el tiempo de linealidad y del segundo sustrato de la reacción, fosforilasa b, se había consumido menos de un 10% cuando la velocidad de reacción ya decaía, cabe pensar en efectos proteolíticos o de fosfatasas (inactivan la fosforilasa kinasa en músculo) endógenas, responsables de la caída de actividad del enzima con el tiempo de incubación.

Con objeto de profundizar en los conceptos señalados en el párrafo anterior se ensayó el efecto del floruro, conocido inhibidor de fosfatasas, sobre la actividad del enzima. Los re-

sultados, representados en la Figura 1, mostraron que el fluoruro sódico no afectaba en gran medida la actividad fosforilasa kinasa en concentraciones inferiores a 100 mM, inhibiendo notablemente a partir de este valor.

Es conocido el efecto activador, mediante reacción de fosforilación, que la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico ejerce sobre la fosforilasa kinasa de músculo. También se han descrito activaciones más discretas del enzima hepático por proteína kinasa. Cuando adicionamos ATP-Mg^{+2} y AMP cíclico a los extractos en preincubación se obtuvo únicamente una activación máxima de un 50% en el caso de los extractos hepáticos. La activación de la fosforilasa kinasa era aún menor o nula en el caso de extractos de leucocitos. Adicionando teofilina 5 mM (inhibidor de la fosfodiesterasa) o sustituyendo el AMP cíclico por subunidad catalítica de proteína kinasa, no se obtuvieron activaciones mayores de la fosforilasa kinasa.

Una posible explicación a la pequeña o nula activación de la fosforilasa kinasa por la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico podría ser que el enzima estuviese ya, tras la homogenización del tejido, en su forma activada por fosforilación. En este caso, mediante la actuación de la fosfatasa adecuada sería posible observar una clara inactivación de la actividad fosforilasa kinasa. No obstante, la simple preincubación de los extractos, técnica utilizada frecuentemente para defosforilar proteínas por fosfatasas endógenas, tampoco permitió observar modificaciones en la actividad del enzima. La adición de Mg^{+2} o Mn^{+2} , conocidos activadores de fosfatasas, no modificó los resultados.

Los resultados obtenidos en extractos crudos tisulares muestran pues que la fosforilasa kinasa hepática y de leucocitos presenta características diferenciales con respecto al enzima muscular, en el sentido de que no se manifiesta la existencia de formas activa e inactiva, utilizando técnicas que revelan la existencia de tales formas en tejido muscular. Por tales mo-

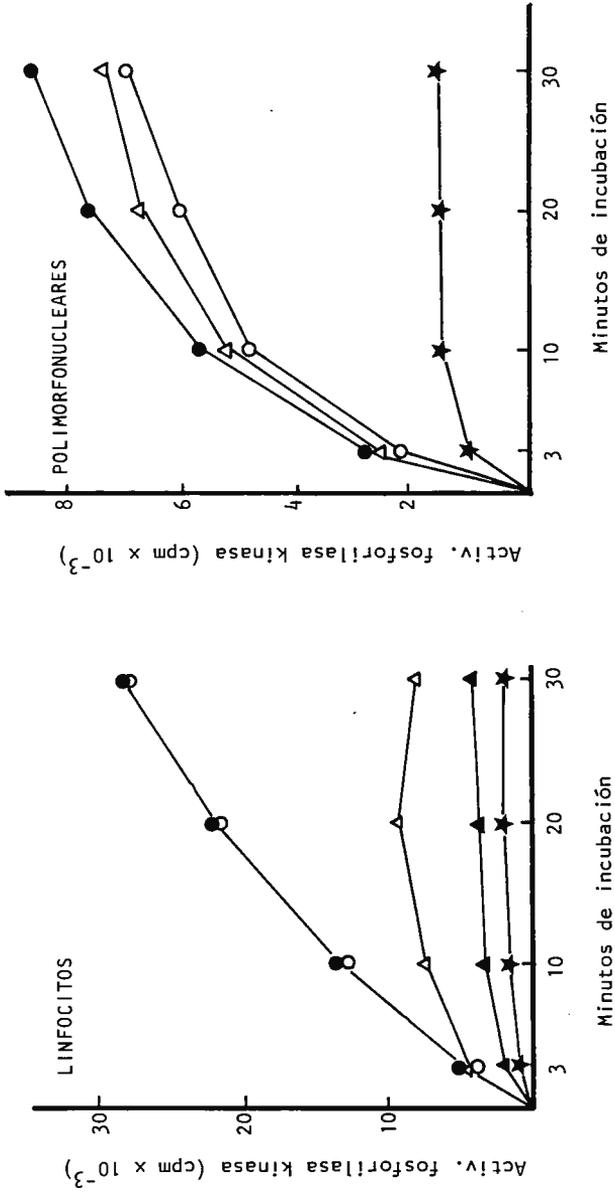


FIGURA 1. EFECTO DEL ION FLUORURO. Se representa la actividad fosforilasa kinasa de extractos crudos de linfocitos y polimorfonucleares frente al tiempo de incubación y sin adiciones (O), con FNa 50 mM (●), 100 mM (Δ), 150 mM (▲) y 200 mM (★).

tivos se decidió emprender la purificación del enzima con el ánimo de que la eliminación de otros enzimas o proteínas que pudieran enmascarar o impedir las transformaciones de formas, permitiera aclarar la situación. Se escogió purificar la fosforilasa kinasa de linfocitos y no de polimorfonucleares debido a la dificultad en la obtención de grandes cantidades de células y a que la actividad específica era mucho mayor en linfocitos (859 mU/mg proteína) que en polimorfonucleares (257 mU/mg proteína).

2. PURIFICACION DE LA FOSFORILASA KINASA HEPATICA

La fosforilasa kinasa hepática fué purificada a partir de extractos crudos hepáticos obtenidos según se describe en Materiales y Métodos.

2.1 PRECIPITACION ISOLECTRICA: El extracto hepático se ajustaba mediante adición gota a gota de ácido acético 1 N, a 4°C y con agitación continua. El extracto a pH 5,2 era a continuación centrifugado a 11.000 g durante 30 minutos. El sobrenadante de la centrifugación se desechaba y el sedimento se resuspendía en 1/2 del volumen de extractos con tampón fosfatos 50 mM pH 7,4, sacarosa 5%, ditiotreitól 1 mM (tampón A). El pH del sedimento resuspendido se ajustaba a 7,4 mediante adición de Tris 2M (pH no ajustado) gota a gota y con agitación continua.

2.2 CENTRIFUGACION A ALTA VELOCIDAD: El precipitado resuspendido en el paso anterior era entonces centrifugado a 95.000 g durante 2,5 horas. Se recogía el sobrenadante de la centrifugación, desechándose el sedimento que mostraba solo una pequeña proporción de la actividad fosforilasa kinasa.

2.3 PRECIPITACION CON POLIETILENGLICOL: El sobrenadante de la centrifugación a alta velocidad era a continuación precipitado mediante la adición de polietilenglicol al 50% hasta obte-

ner una concentración final del 14%. Tras unas dos horas se centrifugaba para separar el precipitado (que se desecheba) del sobrenadante. El sobrenadante obtenido se diluía convenientemente en tampón A hasta rebajar la concentración de polietilenglicol al 8%. Seguidamente se ajustaba el pH de la solución a 6,0 mediante adición de acético 1 N gota a gota, con lo que se conseguía una nueva precipitación de proteínas. El líquido se centrifugaba inmediatamente a 11.000 g durante 20 minutos, recuperándose en este caso la actividad fosforilasa kinasa en el sedimento. Este era recogido y resuspendido en 1/5 del volumen original de extracto crudo utilizando tampón A.

2.4 CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA: El último precipitado de polietilenglicol resuspendido, era mezclado con 2 volúmenes de DEAE-Celulosa, previamente equilibrada en tampón A. Trás unos 30 minutos de agitación suave, el gel era transferido a un embudo de placa filtrante, recogiénose el líquido con proteínas no retenidas por el gel. A continuación se lavaba la celulosa con 10 volúmenes de tampón A en el mismo embudo. Finalmente, se transfería el gel a una columna apropiada, donde era empacado y posteriormente eluido con un gradiente de ClNa en tampón A de 0 a 0,5 M. El volúmen total del gradiente era de 4 veces el volúmen del gel empacado. Se recogían fracciones que eran ensayadas (Figura 2). La actividad fosforilasa kinasa eluía en un pico único que era recogido y concentrado mediante precipitación con sulfato amónico (50% de saturación). El precipitado de sulfato amónico era resuspendido en 1/150 volúmen del extracto crudo original utilizando tampón A. En este paso de concentración se obtuvieron a menudo fuertes pérdidas de actividad fosforilasa kinasa, presumiblemente por inestabilidad del enzima ante elevadas concentraciones salinas. Otras formas de concentración, distintas a la precipitación con sulfato amónico, pueden ser tan válidas o incluso mejores que la utilizada por nosotros.

2.5 PRIMERA GEL FILTRACION: La fracción obtenida de DEAE-celulosa concentrada (típicamente 15 a 20 ml, cuando se parte de 4 hígados de conejo), era entonces dializada durante 4-6 horas frente a 4 litros de tampón A y seguidamente aplicada a una columna de Ultrogel AcA 34, previamente equilibrada con el mismo tampón A (Figura 3). Se recogieron fracciones en las que se analizaba actividad fosforilasa kinasa y proteína. La actividad eluía en un pico retardado que era inmediatamente recogido. En algunas preparaciones se ha observado un pequeño pico de actividad fosforilasa kinasa con elevado peso molecular que eluía con el volumen de vacío de la columna. El pico retardado recogido se dializaba a continuación frente a 2 cambios de 5 litros de tampón trietanolamina 20 mM pH 7,4, sacarosa 5%, ditiotreitól 1 mM (Tampón B) durante toda la noche.

2.6 CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA-HISTONA: La fracción dializada se mezclaba con 1/3 de su volumen de Sepharosa-histona previamente equilibrada en el mismo tampón B. Tras agitar suavemente la mezcla durante 30 minutos, se empacaba el gel, recogiénose el eluido que no mostraba actividad fosforilasa kinasa. El gel era a continuación lavado con 10 volúmenes de tampón B y finalmente se eluían las proteínas con un gradiente salino de 0 a 0,5 M ClNa en tampón B. La actividad enzimática eluía en un amplio pico poco separado de las otras proteínas. No obstante, la gran cantidad de proteína eliminada por no ser retenida al gel hacían provechoso este paso (Figura 4). El pico de actividad era recogido e inmediatamente concentrado utilizando una unidad de concentración por ultrafiltración al vacío "Millipore". El volumen final quedaba reducido a 1-2 ml.

2.7 SEGUNDA GEL FILTRACION: La fracción anterior concentrada era aplicada a una columna de Ultragel AcA 34 previamente equilibrada en tampón B. Se recogieron fracciones que eran analizadas. La actividad fosforilasa kinasa eluía en la mis-

ma posición que en la primera gel filtración, (Figura 5) mientras que más proteína quedaba excluida por la columna y eluía por tanto por delante. El pico de actividad, sumamente inestable en este paso, era inmediatamente recogido y concentrado de nuevo por ultrafiltración. Al enzima concentrado se le añadía glicerol hasta una concentración final del 50% lo que aumenta notablemente su estabilidad. Este enzima se conservaba a -30°C y fué utilizado para los experimentos de caracterización.

El resumen general de la purificación con los rendimientos de cada paso se especifican en la Tabla 1.

3. PURIFICACION DE LA FOSFORILASA KINASA DE LINFOCITOS

El proceso de purificación de la fosforilasa kinasa de linfocitos que utilizamos, es en algunos aspectos, muy similar al descrito para la kinasa hepática. No obstante, existen algunas diferencias interesantes de destacar:

- a. Se han suprimido los primeros pasos de precipitación iso-eléctrica, centrifugación a alta velocidad y precipitación con polietilenglicol debido a que, en los dos primeros, la recuperación de actividad fosforilasa kinasa era considerablemente inferior en el caso de los linfocitos que en extractos hepáticos. La precipitación con polietilenglicol fué desechada debido a que es de por sí un paso con escaso rendimiento de actividad (ver apartado 2.3). En el caso de los extractos de linfocitos donde la cantidad de tejido es muy limitada, se hacía aconsejable suprimir estos pasos.
- b. Se ha incluido una cromatografía en Agarosa-ATP. Este paso fue también ensayado para la purificación del enzima hepático pero mostraba características muy poco repetitivas, por lo que fué desechado. Por el contrario en la

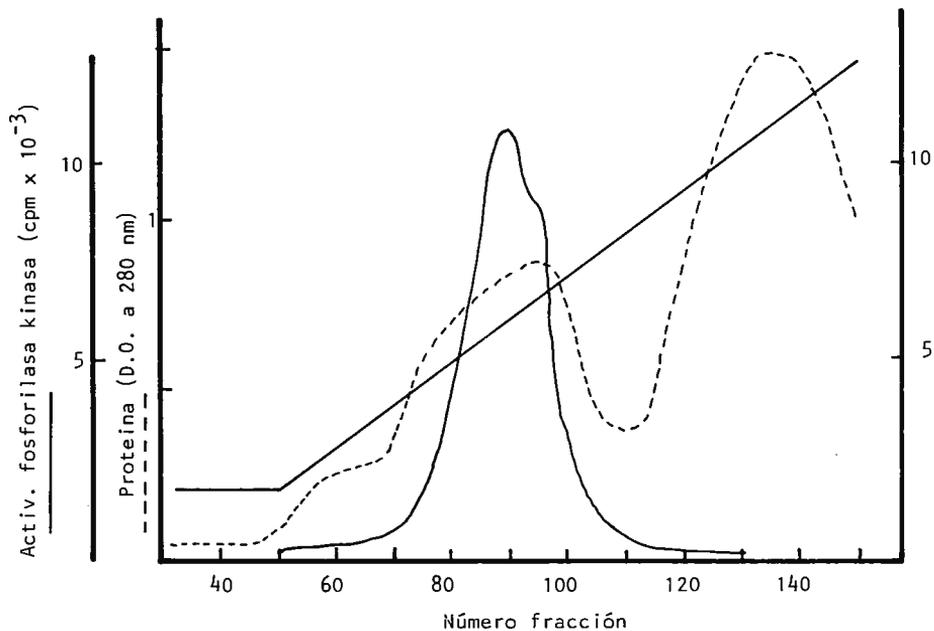


FIGURA 2. CROMATOGRAFIA DE FOSFORILASA KINASA HEPATICA EN DEAE-CELULOSA.

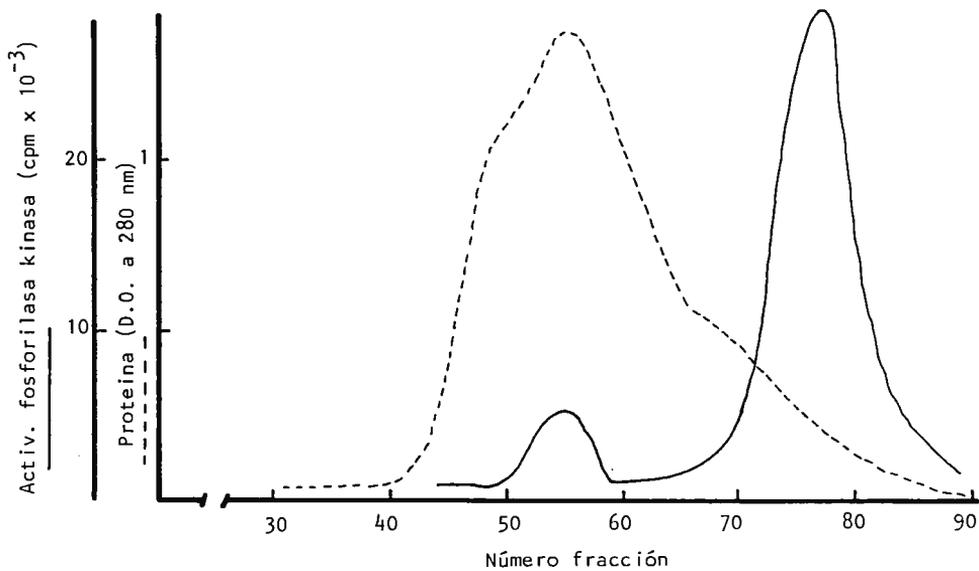


FIGURA 3. PRIMERA GEL FILTRACION DE FOSFORILASA KINASA HEPATICA.

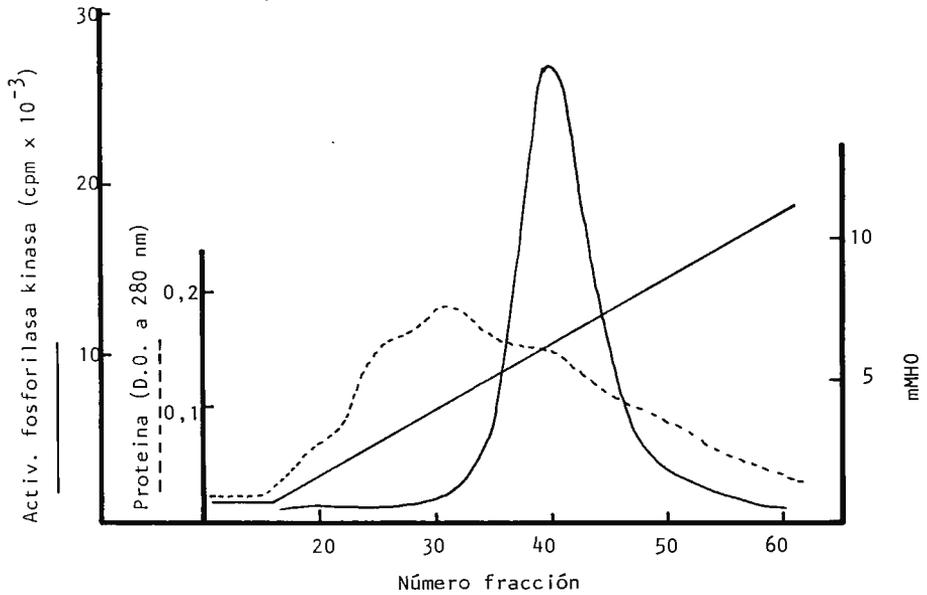


FIGURA 4. CROMATOGRAFIA DE FOSFORILASA KINASA HEPATICA EN SEPHAROSA-HISTONA.

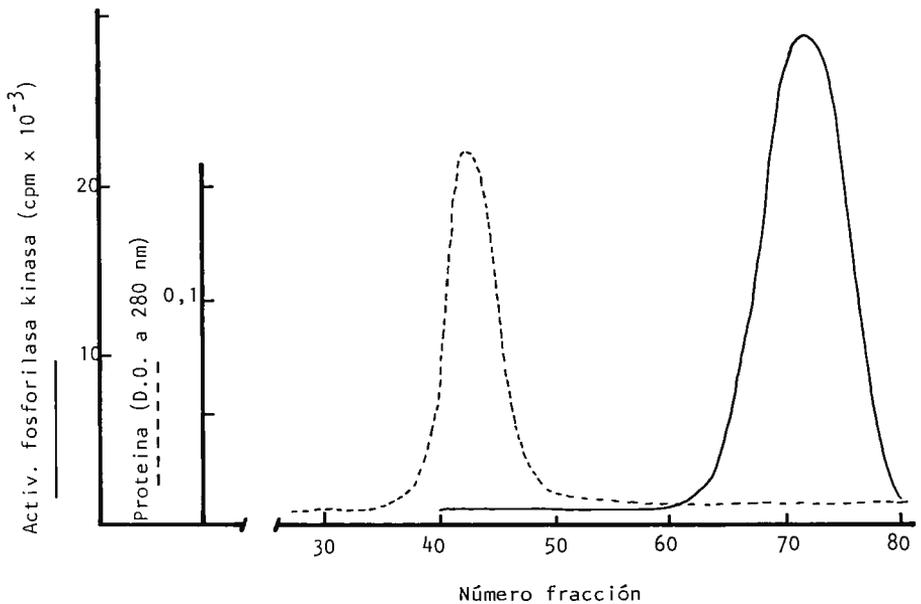


FIGURA 5. SEGUNDA GEL FILTRACION DE FOSFORILASA KINASA HEPATICA.

	VOLUMEN	PROTEINA	ACTIVIDAD	ACT. ESPECIF.	RENDIMIENTO	PURIF.
	ml	mg	U	U/mg prot.	%	veces
EXTRACTO CRUDO	1280	46.080	28.500	0,62	100	1,0
PRECIP. pH 5,2	744	18.414	35.600	1,93	125	3,1
SOBRENAD. CENTRIF.	640	8.000	29.600	3,7	103	6,0
SOBRENAD. PEG	887	3.526	19.100	5,4	70	8,7
PRECIP. PEG	300	923	11.100	12,0	39	19,4
DEAE-CELULOSA	272	408	11.700	28,7	39	46,3
PRECIP. $SO_4(NH_4)_2$	5	81	1.650	20,4	6	32,9
1ª. ULTROGEL	33	12	2.030	164	7	265
SEPHAROSA-HISTONA	2,4	2,8	1.090	389	4	628
2ª ULTROGEL	1,2	0,8	780	973	3	1570

TABLA 1. PURIFICACION DE LA FOSFORILASA KINASA HEPATICA

purificación de la fosforilasa kinasa de linfocitos se encontró utilizable esta cromatografía pese a las dificultades que se detallan a continuación.

CROMATOGRAFIA EN AGAROSA-ATP: Las fracciones activas recogidas tras la cromatografía en Sepharosa histona fueron dializadas frente a 4 l de tampón MES 20 mM pH 6,5, acetato magnésico 2 mM, ditiotreititol 1 mM (tampón D) durante 4-6 horas. El dializado del paso anterior se introducía lentamente en una columna con 5 ml de Agarosa-ATP, previamente equilibrada en tampón D. Seguidamente se lavaba la columna con unos 50 ml de tampón D y a continuación se eluía con un gradiente salino de 0 a 0,8 M de ClNa en tampón D, con un volumen total de 75 ml.

Las fracciones activas fueron recogidas y concentradas por diálisis frente a Sacarosa al 70%.

Diversos intentos realizados en este paso de eluir la actividad fosforilasa kinasa con ATP o eliminando progresivamente el Mg^{+2} del tampón, resultaron inconsistentes y de poca reproducibilidad. La elución adoptada con ClNa, aunque proporciona un ancho pico de actividad y resulta notablemente menos específica, permitía obtener resultados reproducibles entre distintas preparaciones así como recobrar la mayor parte de la actividad enzimática. El proceso preparativo se resume en la tabla 2 con los rendimientos y purificación obtenida en cada paso.

4. EXAMEN ELECTROFORETICO DE LAS FOSFORILASAS KINASAS PURIFICADAS.

El examen electroforético de la fosforilasa kinasa purificada realizado según se describe en Materiales y Métodos con SDS reveló la presencia de una banda principal de Peso

	VOLUMEN ml	PROTEINA mg	ACTIVIDAD U	ACT.ESPECIF. U/mg prot.	RENDIMIENTO %	PURIF. veces
EXTRACTO CRUDO	130	699	793	1,1	100	1,0
DEAE-CELULOSA	128	122	697	5,7	88	5,2
SEPHAROSA-HISTONA	75	30	576	19,2	72	17,5
AGAROSA-ATP	34	7	360	53,7	45	48,8
SEPHADEX G-200	27	1	308	302,0	38	275

TABLA 2: ESQUEMA DE LA PURIFICACION DE LA FOSFORILASA KINASA DE LINFOCITOS.

Molecular 90.000 y de otras dos bandas de menor intensidad con Pesos Moleculares de 73.000 y 40.000. Como marcadores de pesos moleculares se emplearon fosforilasa b muscular (Mr 97.412), seroalbúmina bovina (Mr 68.000), subunidad catalítica de la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico (Mr 41.000) y peroxidasa (Mr 39.800).

Por otra parte la electroforesis en SDS del enzima purificado de leucocitos mostró también tres bandas, pero de pesos moleculares 98.000, 90.000 y 86.000. Las tres bandas mostraban una intensidad similar. Como proteínas marcadoras se utilizaron las mismas señaladas en el párrafo anterior.

La electroforesis en gel de poliacrilamida sin SDS del enzima hepático reveló la presencia de dos bandas, una de mayor intensidad y otra muy tenue.

De todas estas observaciones electroforéticas puede ser deducido que tanto en el caso de la fosforilasa kinasa purificada de extractos hepáticos, como en la de origen leucocitario, no se ha obtenido el enzima homogéneo. No obstante, puede especularse que la banda de peso molecular 90.000 podría ser la fosforilasa kinasa ya que es la única banda que se repite en las dos purificaciones de los distintos tejidos. Esto siempre y cuando se considere que el enzima de linfocitos y hepático son idénticos, punto que parece apoyar las características de purificación del enzima, así como sus propiedades que serán descritas más adelante.

Si efectivamente la banda de peso molecular 90.000 coincide con la fosforilasa kinasa y teniendo en cuenta la intensidad de la coloración de las distintas bandas, el enzima hepático tendría una pureza del 70-80% por un 30-35% el de linfocitos. Ambos estarían constituidos por una o más subunidades de peso molecular 90.000.

5. PESO MOLECULAR DE LA FOSFORILASA KINASA HEPATICA Y LEUCOCITARIA.

El peso molecular de las fosforilasas kinasas purificadas a partir de hígado de conejo y de linfocitos de cerdo fué evaluado por gel filtración en Sephadex G-200. Como proteínas marcadoras de pesos moleculares se emplearon: peroxidasa (Mr 40.000), fosfatasa alcalina (Mr 80.000), seroalbúmina bovina (Mr 68.000), aldolasa (Mr 160.000) y fosforilasa b (Mr 194.000).

Tanto la fosforilasa kinasa de linfocitos como la hepática eluyeron con un mismo volumen de elución al que le correspondía un peso molecular de 180-200.000. Si el enzima estuviera constituido por subunidades de peso molecular 90.000 según se discutió en el apartado anterior, su estructura de holoenzima sería la de un dímero.

6. CARACTERIZACION DE LOS ENZIMAS PURIFICADOS.

Se estudiaron diversas características cinéticas de los enzimas purificados de hígado y leucocitos. Los resultados obtenidos fueron en general muy similares con enzima de uno u otro tejido por lo que en los apartados siguientes se describirá solamente la experimentación para uno de los enzimas, entendiendo que los resultados aplican también al otro si no se especifica lo contrario.

6.1 pH OPTIMO: El pH óptimo variaba según la concentración de Mg^{+2} del ensayo. Cuando la concentración del catión era equimolecular con la de ATP (1 mM), se obtenía un amplio óptimo de pH entre 7,0 y 8,8. Por el contrario, en ensayos con concentraciones de Mg^{+2} superiores a las de ATP, se

obtenía un óptimo a pH 5,8 (figura 6).

6.2 EFECTO DEL MAGNESIO Y DEL FLUORURO: En ausencia de FNa en la mezcla de reacción, se obtenía un óptimo de Mg^{+2} a concentraciones equimoleculares con la de ATP. El exceso de iones magnesio inhibían fuertemente la actividad enzimática. El fluoruro a concentraciones cercanas a 50 mM, era capaz de eliminar la inhibición ocasionada por el exceso de magnesio (figura 7). Concentraciones de fluoruro superiores a 100 mM eran inhibitorias, incluso en presencia de 10 veces exceso de Mg^{+2} sobre la concentración de ATP en la mezcla de ensayo.

6.3 EFECTO DE DIVERSOS AZUCARES: El glucógeno ha sido descrito como activador de la fosforilasa kinasa muscular. Cuando ensayamos el efecto del glucógeno hepático sobre la fosforilasa kinasa del mismo origen, encontramos una clara acción inhibitoria del polisacárido sobre la actividad enzimática, que llegaba a ser de cerca de un 50% a concentraciones superiores al 1%. La glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato, que también ejercen efectos sobre el enzima muscular actuando a nivel del sustrato fosforilasa b, no ejercían efecto alguno sobre la fosforilasa kinasa de hígado (figura 8).

6.4 EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATOS FOSFORILASA b Y ATP: La K_m de la fosforilasa kinasa de hígado y leucocitos para su sustrato fosforilasa b se detalla en la tabla 3 donde se comparan estos valores con el descrito para la kinasa de origen muscular. No se observaron diferencias de afinidad utilizando fosforilasa b de músculo o de hígado. La K_m del enzima para su otro sustrato ATP fue evaluada en dos condiciones experimentales distintas (enzima hepático): con concentraciones siempre equimoleculares de ATP- Mg^{+2} y en presencia de exceso de Mg^{+2} y FNa 50 mM para contrarrestar la inhibición por exceso del catión. Las

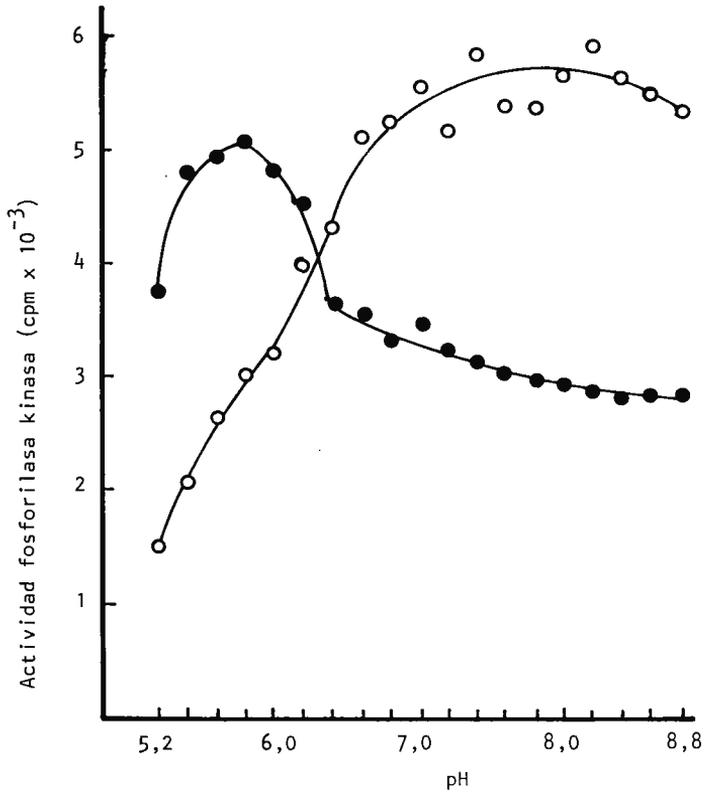


FIGURA 6. EFECTO DEL pH. Se representa la actividad fosforilasa kinasa purificada de leucocitos, obtenida a distintos valores de pH (tampón trietanolamina-MES 40 mM) y ensayada con ATP 1 mM - Mg⁺⁺ 1 mM (○) y con ATP 1 mM - Mg⁺⁺ 10 mM (●).

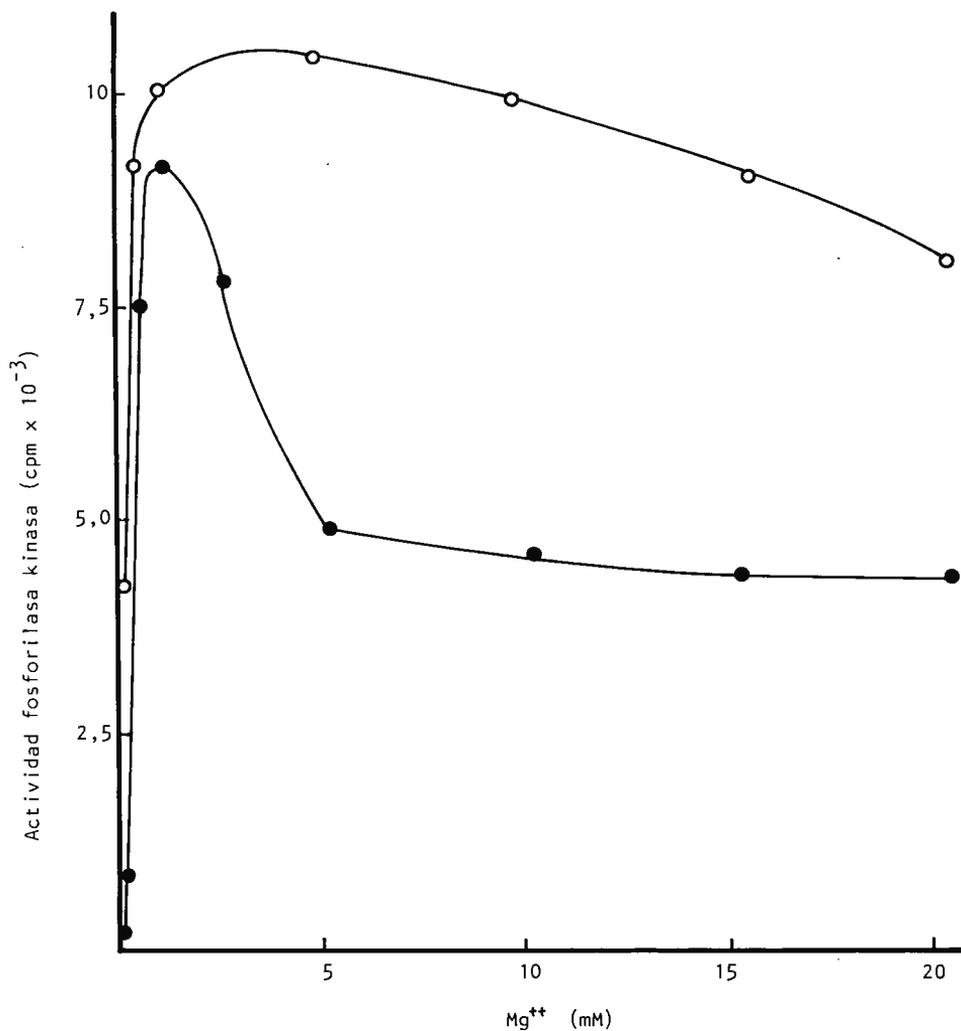


FIGURA 7. EFECTO DEL Mg⁺⁺. Se representa el efecto de concentraciones crecientes de Mg⁺⁺ sobre la actividad fosforilasa kinasa purificada ensayada con ATP 1 mM y en ausencia (●) o en presencia (○) de FNa 50 mM.

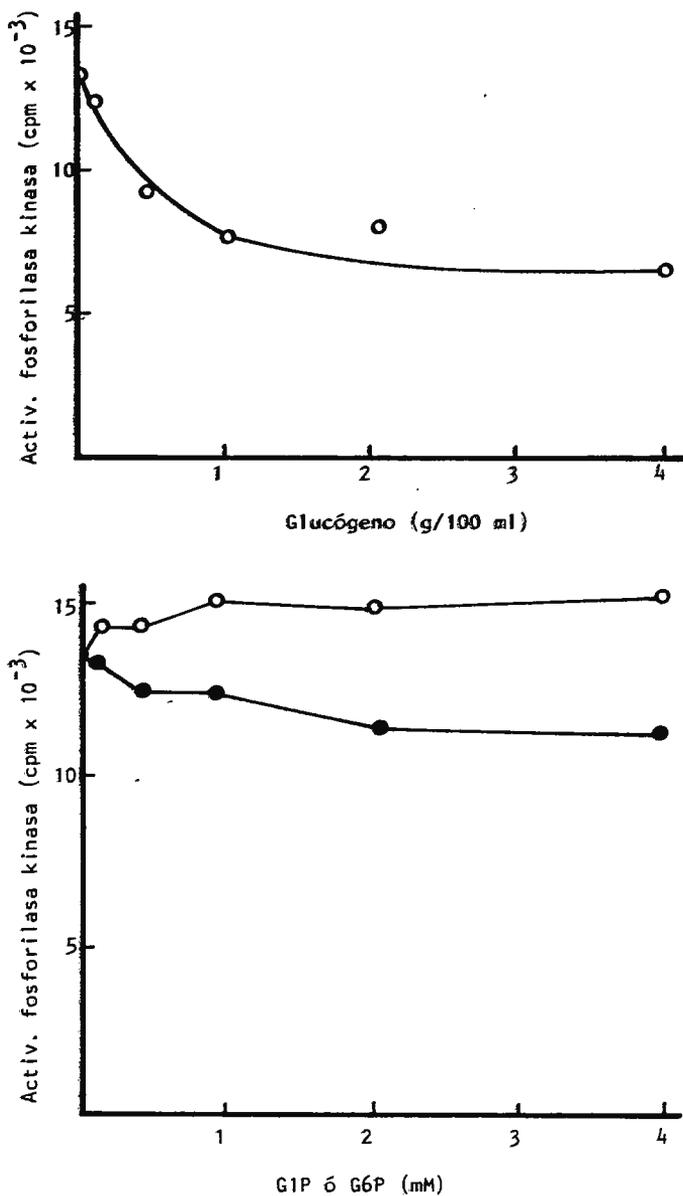


FIGURA 8. EFECTO DE DIVERSOS AZUCARES. Se representa la actividad fosforilasa kinasa obtenida frente a concentraciones crecientes de glucógeno, glucosa-1-fosfato (○) y glucosa-6-fosfato (●).

Km obtenidos se reflejan también en la tabla. El exceso de ATP sobre la concentración de Mg^{+2} era en todos los casos inhibitorio.

FOSFORILASA KINASA	Km		
	FOSFORILASA b	ATP (exc. Mg^{+2})	ATP (Equim. Mg^{+2})
MUSCULAR activa	20 μM	0,24 mM	
inactiva	300 μM	0,24 mM	
HEPÁTICA	4,6 μM	0,066 mM	0,2 mM
LINFOCITOS	9 μM	0,10 mM	

TABLA 3. Constantes de Michaelis de las fosforilasas kinasas purificadas para los sustratos fosforilasa b y ATP. Se comparan los valores obtenidos con los descritos para el enzima muscular (4).

6.5 EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES: Diversos cationes divalentes inhibían la actividad enzimática. El Mn^{+2} y el Zn^{+2} mostraban un efecto significativo a concentraciones 100 veces inferiores a la Mg^{+2} presente en la mezcla de reacción, mientras que Sr^{+2} , Ba^{+2} y Ca^{+2} precisaban concentraciones mucho mayores para mostrar un efecto inhibitorio. Tales efectos (figura 9) pueden ser reflejo de una competición con el Mg^{+2} o bien debidos a un efecto directo sobre algún centro del enzima que afecte su actividad catalítica. En principio cabe suponer que el Sr^{+2} , Ba^{+2} y Ca^{+2} actúan por competición con el Mg^{+2} esencial para la actividad fosforilasa kinasa, mientras que el efecto del Mn^{+2} y Zn^{+2} que se revela a concentraciones muy inferiores a la de Mg^{+2} presente en la mezcla de reacción, podría ser debido a la actuación de

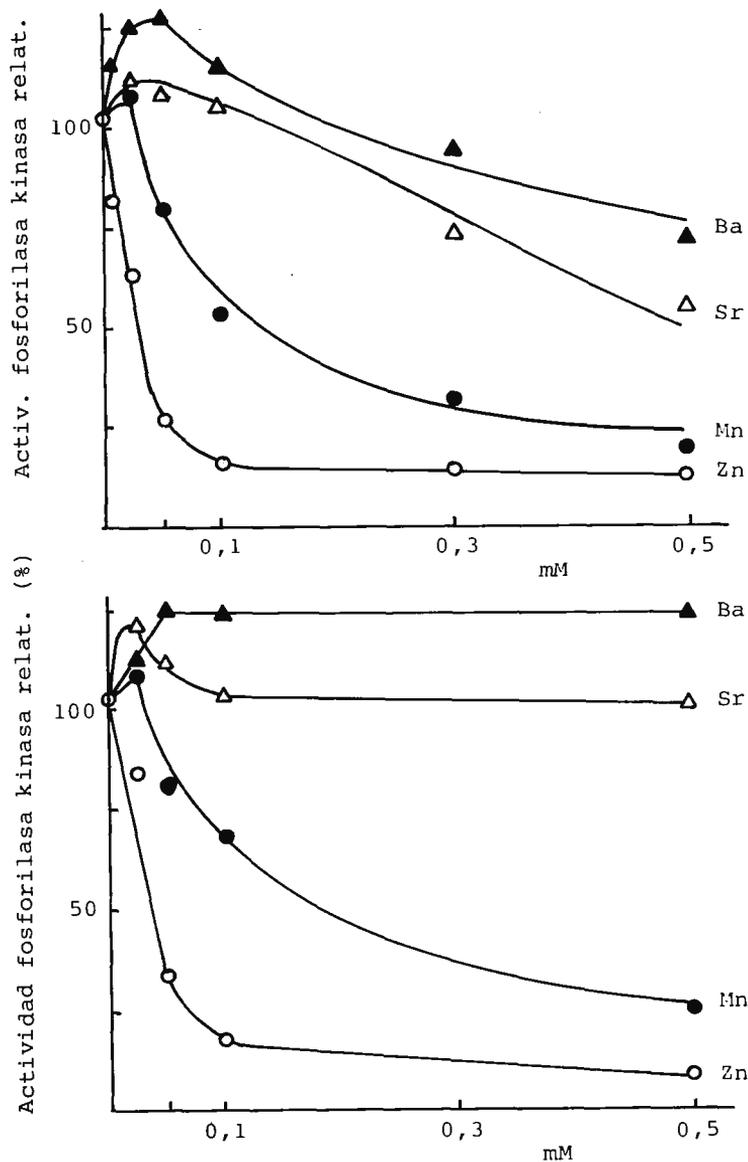


FIGURA 9. EFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES. Se representa el efecto de concentraciones crecientes de los cationes sobre la actividad del enzima hepático. Ensayo con Mg^{++} 1mM (arriba) y 10 mM (abajo).

estos cationes por algún otro mecanismo, tal vez desplazando al Ca^{+2} de su lugar de acción en el enzima (ver apartado siguiente).

6.6 DEPENDENCIA DE CALCIO: La fosforilasa kinasa muscular es un enzima totalmente dependiente de iones calcio para su actividad. La fosforilasa kinasa hepática parece ser solo parcialmente dependiente de calcio (10) aunque se han descrito formas que parecen totalmente independientes de este catión (29). Cuando ensayamos el efecto del EGTA, que lante relativamente específico de calcio, sobre la actividad de los enzimas purificados de linfocitos e hígado, se observó una clara inhibición que en ningún caso llegaba a ser total. La inhibición máxima obtenida en estas condiciones era de un 75-80% de la actividad enzimática (figura 10). La inhibición era revertida mediante la adición de iones Ca^{+2} .

6.7 EFECTO DE LA PROTEIN KINASA DEPENDIENTE DE AMP CICLICO: Cuando se ensayó el efecto de la subunidad catalítica de la proteín kinasa dependiente de AMP cíclico sobre las fosforilasas kinasas purificadas de hígado o leucocitos, no se observó modificación alguna de la actividad por este tratamiento. Ocasionalmente se obtuvieron activaciones de un 10% tras incubación del enzima con la proteín kinasa. En las mismas condiciones, la fosforilasa kinasa muscular se activa 20 a 40 veces.

7. IDENTIFICACION Y PURIFICACION DE UN INHIBIDOR DE LA FOSFORILASA KINASA HEPATICA.

El primer paso en la purificación de la fosforilasa kinasa hepática (ver apartado 2.1) consiste en la precipitación a pH 5,2 del extracto hepático. Se había observado repetidamente en este paso una recuperación de actividad enzimática

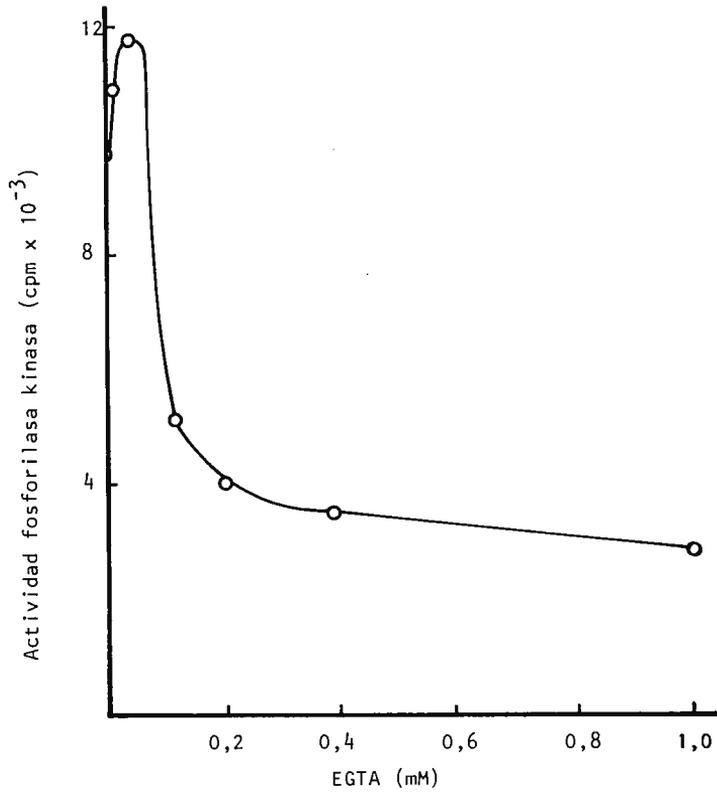


FIGURA 10. EFECTO DEL EGTA. Se representa la actividad fosforilasa kinasa obtenida frente a concentraciones crecientes de EGTA.

en el sedimento superior al 100%, lo que indicaba la posible presencia de algún inhibidor en el sobrenadante desechado. Este extremo fue comprobado al observar que el sobrenadante inhibía la actividad fosforilasa kinasa del sedimento y, lo que era aún mas interesante, que la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico adicionada al sistema era capaz de revertir la inhibición (figura 11). La inhibición ocasionada por el sobrenadante desaparecía tras tratamiento de 2 minutos a 95°C, lo que hacía pensar en una posible naturaleza proteica del inhibidor.

7.1 PURIFICACION PARCIAL DEL INHIBIDOR: Siguiendo su actividad inhibidora sobre la fosforilasa kinasa hepática purificada se ha conseguido aislar parcialmente la actividad inhibidora mediante el siguiente proceso:

- a. El sobrenadante de la precipitación isoeléctrica, donde se identificó el inhibidor, se llevaba al 30% de saturación de sulfato amónico. El precipitado que aparecía se separaba por centrifugación y se añadía mas sulfato amónico al sobrenadante, que contenía la actividad inhibidora, hasta el 50% de saturación. Trás centrifugar nuevamente, se resuspendía el sedimento en 1/10 del volumen original con tampón B. El sedimento resuspendido contenía una fuerte actividad inhibidora.
- b. El precipitado anterior resuspendido se centrifugaba a 90.000 g durante 2 horas, recogién dose el sobrenadante.
- c. El sobrenadante de la centrifugación se aplicaba lentamente a una columna empacada con un volumen equivalente de DEAE-celulosa, previamente equilibrada en el mismo tampón B. El inhibidor quedaba retenido por el gel. Tras lavar con 5 volúmenes de tampón B, se eluía la columna con un gradiente salino de 0 a 0.5 M de ClNa en tampón B. Se obtenía así un perfil de inhibición que mostraba un pico de actividad inhibidora (figura 12). Se recogía el pico que fué seguidamente dializado frente a 5 l de tampón B.

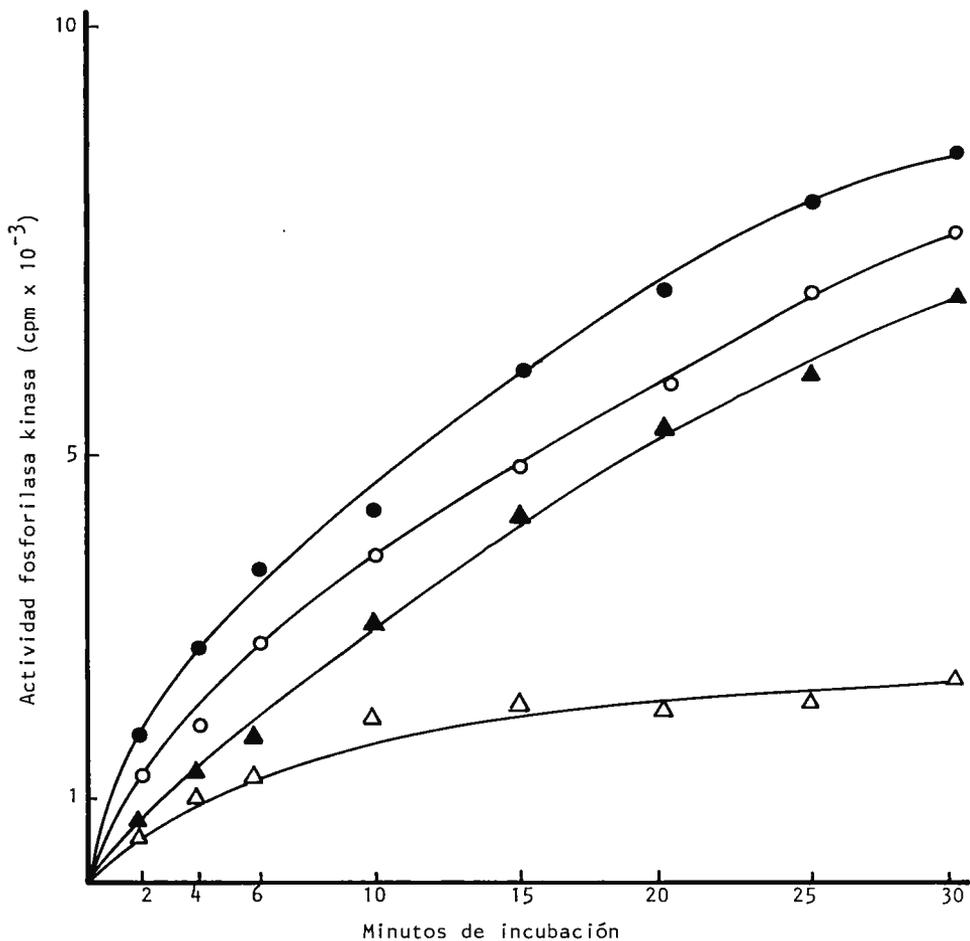


FIGURA 11. INHIBICIÓN DE LA FOSFORILASA KINASA HEPÁTICA POR EL SOBRENADANTE DE LA PRECIPITACIÓN A pH 5,2 Y REVERSIÓN DE LA INHIBICIÓN POR PROTEÍNA KINASA. Se representa la actividad fosforilasa quinasa en el tiempo de incubación, sin adiciones (○), en presencia de 6,5 µg/ml de subunidad catalítica de proteína quinasa (● ▲), y en presencia de sobrenadante de pH 5,2 (inhibidor) (▲ Δ).

- d. El dializado se introducía a continuación en una columna empacada con Sepharosa-histona previamente equilibrada en el mismo tampón B. Tras lavar con 5 volúmenes de tampón B se eluía la columna con un gradiente 0 a 0,9 M ClNa en tampón B. El volumen total del gradiente era de 10 veces el de la columna. La actividad inhibidora sobre la fosforilasa kinasa hepática aparecía en un único pico que se recogía y concentraba unas 10 veces utilizando ultrafiltración al vacío. (figura 13).
- e. El concentrado anterior se aplicaba a una columna de Sephadex G-200 previamente equilibrada en tampón B. La actividad inhibidora eluía de la columna en un único pico retardado que era recolectado y de nuevo concentrado por ultrafiltración al vacío. El inhibidor concentrado se mantenía estable durante varias semanas a -30°C .

8. CARACTERIZACION DEL INHIBIDOR DE LA FOSFORILASA KINASA HEPATICA.

El factor inhibidor parcialmente purificado según se detalla en el apartado anterior fué estudiado con el fin de averiguar las características de la inhibición ocasionada.

8.1 ACCION INHIBITORIA FRENTE AL TIEMPO DE ACTUACION: El descenso en la actividad fosforilasa kinasa, expresado como porcentaje de inhibición, aumentaba con el tiempo de exposición del enzima a la fracción inhibitoria (figura 14).

8.2 EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE FOSFATASAS: El ión fluoruro y el fosfato inorgánico era capaces de revertir la inhibición ocasionada por el factor inhibitorio (Tabla 4)

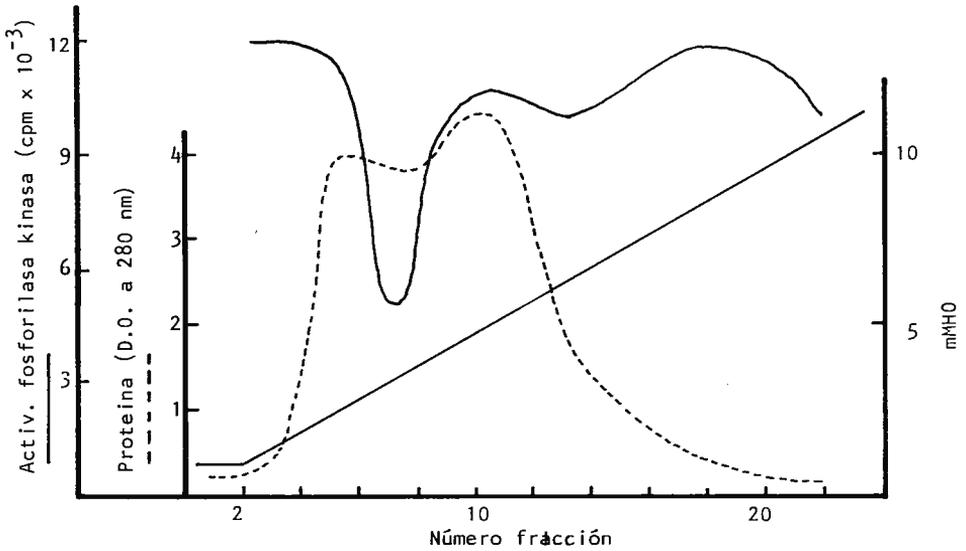


FIGURA 12. CROMATOGRAFIA DEL INHIBIDOR EN DEAE-CELULOSA.

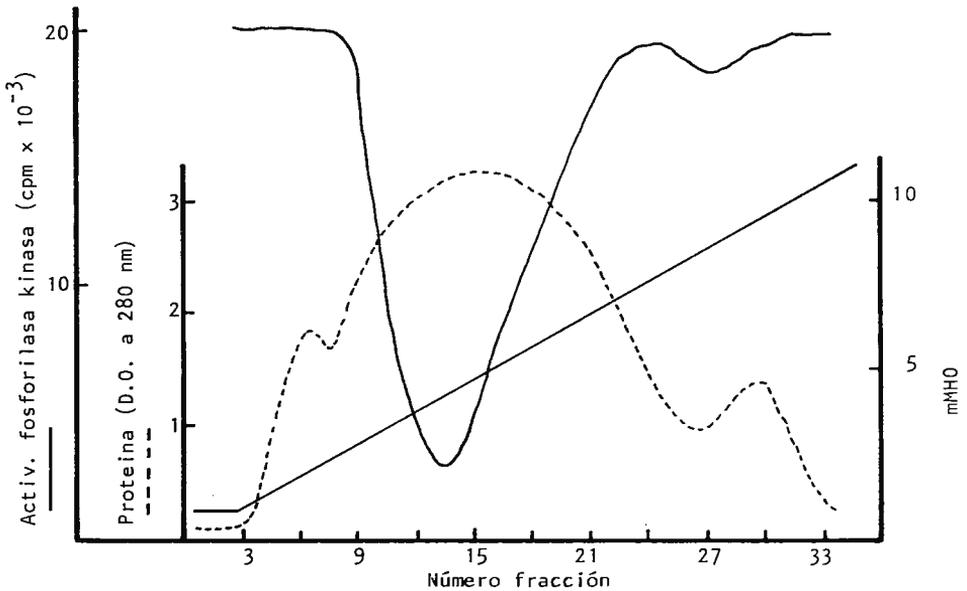


FIGURA 13. CROMATOGRAFIA DEL INHIBIDOR EN SEPHAROSA-HISTONA.

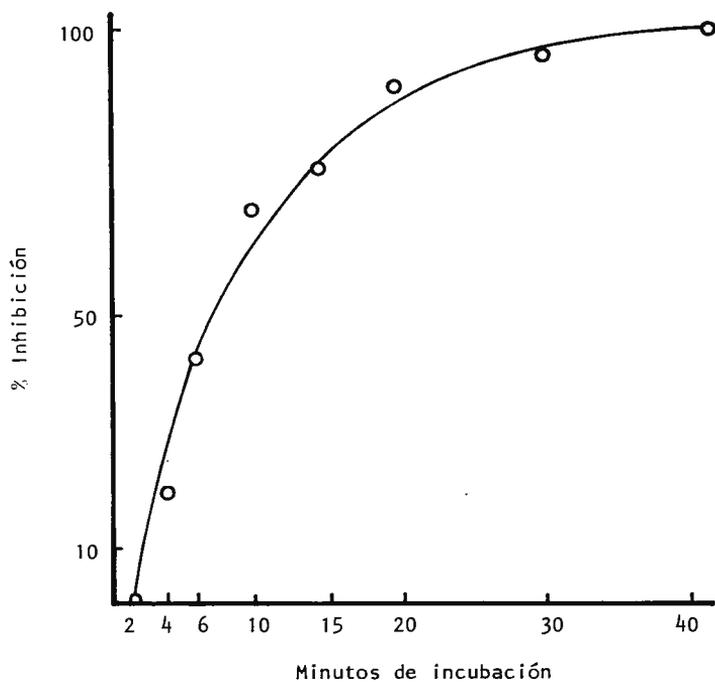


FIGURA 14. ACCION INHIBITORIA FRENTE AL TIEMPO DE ACTUACION. Se representa el porcentaje de inhibición de la fosforilasa quinasa hepática por una cantidad constante de inhibidor en función del tiempo de incubación.

% inhibición

Sin adiciones	80
+ FNa 50 mM	40
+ ClNa 50 mM	70
+ Pi 20 mM	40
+ Pi 50 mM	5
+ PPi 0,01 mM	35
+ PPi 0,5 mM	4

TABLA 4: EFECTO DE DIVERSAS SALES SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA PURIFICADA. Se expresa el porcentaje de inhibición mostrado por una cantidad constante de inhibidor sobre la fosforilasa kinasa hepática en presencia de diversas sales de las que se expresa su concentración final en la mezcla de ensayo.

Tanto el fluoruro como el fosfato inorgánico son conocidos inhibidores de fosfatasa.

8.3 EFECTO DE LA PROTEIN KINASA DEPENDIENTE DE AMP CÍCLICO: La subunidad catalítica de la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico (concentración final 6,5 µg/ml) era capaz de revertir la inhibición originada por el factor purificado. Esta reversión de la inhibición se producía tanto si se adicionaba la proteína kinasa a la mezcla de ensayo desde el comienzo de la preincubación como si se adicionaba tras un periodo en el que la actividad fosforilasa kinasa estaba ya casi inhibida (figura 15).

8.4 EFECTO DEL FACTOR INHIBITORIO SOBRE LA FOSFORILASA KINASA MUSCULAR: El efecto inhibitorio del factor purificado fué ensayado también sobre una fosforilasa kinasa de origen muscular, homogénea, y previamente activada por tratamiento con proteína kinasa según ha sido descrito (39). Se pudo comprobar que el inhibidor de la fosforilasa kinasa hepática, era también capaz de inhibir a la fosforilasa kinasa muscular con características similares a las descritas en los apartados anteriores. Cuando se examinó electroforéticamente la fosforilasa kinasa muscular, se observó que su inactivación en presencia del factor purificado transcurría de forma paralela a una defosforilación de las subunidades α y β , que originalmente contenían cada una un mol de fosfato-32 por mol de subunidad.

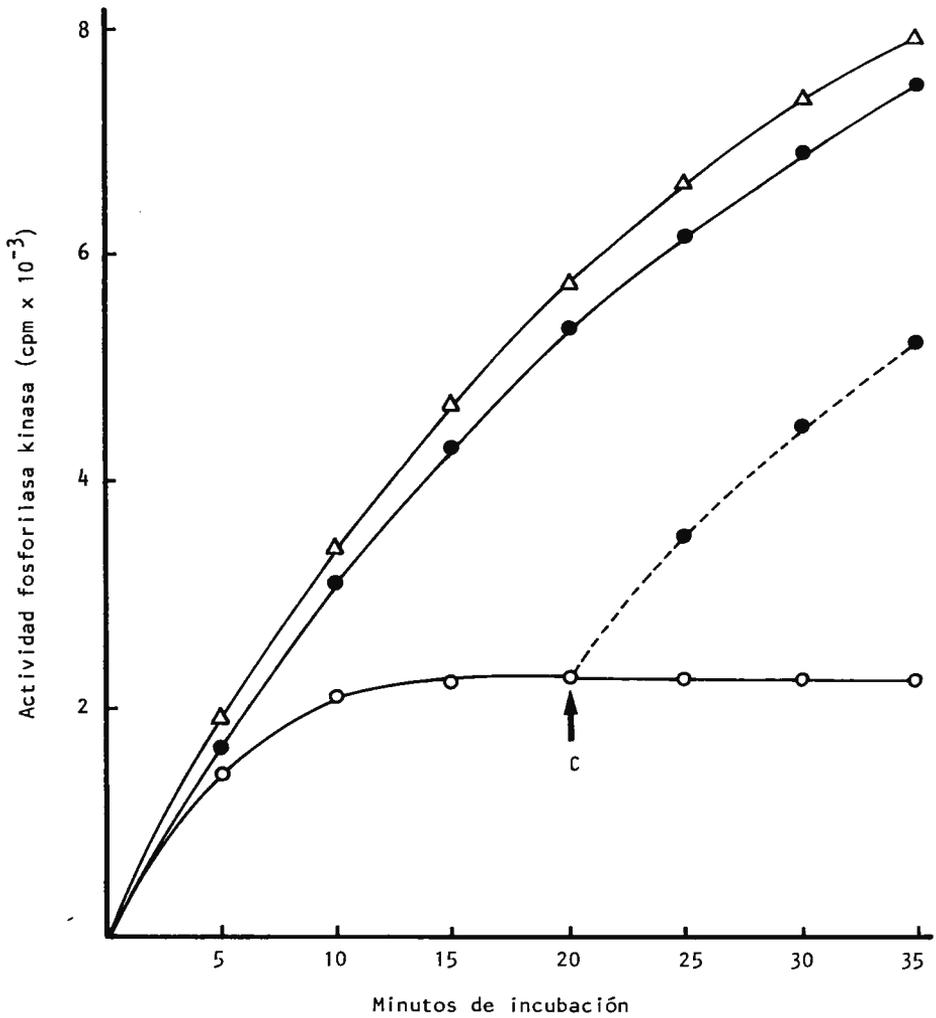


FIGURA 15. REVERSIBILIDAD DE LA INHIBICION EN PRESENCIA DE PROTEIN KINASA DEPENDIENTE DE AMP CICLICO. La actividad fosforilasa kinasa fué determinada sin adiciones (Δ), en presencia de inhibidor parcialmente purificado (\circ \bullet) y en presencia de proteín kinasas desde el mín 0 (\bullet) o el mín 20 (\bullet).

DISCUSION

Existe en estos momentos una notable discrepancia de opiniones acerca de las posibilidades de regulación covalente, esto es: por fosforilación-defosforilación, de la fosforilasa kinasa hepática. Mientras que la mayoría de autores coinciden en la existencia de una regulación por iones calcio de la actividad de este enzima, algunos de ellos son capaces de observar modificaciones adicionales de actividad por estimulación de la proteína kinasa dependiente de AMP cíclico (12,13,27,28) cuando otros no encuentran activación ni fosforilación alguna de la fosforilasa kinasa hepática por al proteína kinasa (29,30,31). Un fenómeno adicional que viene a complicar este asunto es la disparidad en pesos moleculares obtenidos por distintos investigadores para este enzima, lo que hace pensar en la existencia de varias formas moleculares o bien en un activo efecto proteásico capaz de reducir el tamaño de la molécula desde estadios muy tempranos de purificación. Para explicar las divergencias entre resultados se han apuntado tres teorías independientes:

1. "En el transcurso de la purificación, y desde los primeros pasos, se pierde algún factor esencial para la activación del enzima por la proteína kinasa" (29). Esta hipótesis no explicaría, no obstante, el escaso efecto del AMP cíclico o de la proteína kinasa observado en extractos crudos donde difícilmente se habría perdido ya ese "factor esencial". En nuestros experimentos con extractos hepáticos presentados en este trabajo tampoco hemos observado activaciones del enzima superiores a un 50% en estas condiciones, incluso adicionando un gran exceso de subunidad catalítica de la proteína kinasa. Estas activacio-

nes parecen muy pequeñas para que la Naturaleza se haya molestado en introducir un sistema de fosforilación-defosforilación de la molécula enzimática. Por otra parte, las activaciones que encontramos de la fosforilasa kinasa de leucocitos por proteín kinasa eran aún menores y rara vez sobrepasaban un 20%.

2."La reducción del tamaño de la fosforilasa kinasa hepática por proteolisis, aunque permite al enzima mantener su actividad, le hace perder la capacidad de regulación por fosforilación" (29,30). Aunque parece ser que efectivamente, la capacidad de activación por proteín kinasa parece desaparecer fundamentalmente cuanto menor es el peso molecular del enzima obtenido (29), se ha descrito al menos un caso (30) en que una fosforilasa kinasa de peso molecular semejante al del enzima muscular, no es activable por la proteín kinasa. En nuestro trabajo hemos obtenido fosforilasa kinasas purificadas a partir de hígado con un peso molecular de 200.000, que correspondería a los enzimas "pequeños". En ambos casos no hemos encontrado efecto destacable de la proteín kinasa sobre los enzimas purificados.

3."Las formas purificadas que no se activan por la proteín kinasa serían precisamente la forma activa del enzima" (27). Parte de nuestra experimentación se ha dedicado a esta tercera posibilidad. Suponiendo que el enzima se encontrase ya en su forma activa tras la homogenización del tejido, en contraste con la situación del músculo, pero en concordancia con estudios realizados por otros autores (13), sería posible estimular su defosforilación (inactivación) mediante técnicas que permiten la actuación de fosfatasas. No obstante, cuando realizamos estos ensayos nos fué imposible poner de manifiesto, en extractos crudos, modificación alguna de la actividad enzimática . Estos experimentos tampoco excluyen la ve-

rosimilitud de esta hipótesis, ya que la fosfatasa apropiada que debe inactivar al enzima puede estar fuertemente inhibida por algún mecanismo todavía no comprendido. Siguiendo esta misma línea de investigación encontramos que era posible poner de manifiesto la inactivación deseada del enzima cuando el extracto hepático había sido fraccionado por precipitación isoeléctrica y se mezclaba el precipitado resuspendido (fosforilasa kinasa) con una cantidad superior a la equivalente de sobrenadante. Esta inactivación o inhibición del enzima era además revertida por la proteína kinasa. El factor causante de esta inhibición ha sido notablemente purificado y se han estudiado las características de su acción: su efecto era progresivo con el tiempo, era inhibido por inhibidores de fosfatasas como el fluoruro y fosfatos y producía una inactivación de la fosforilasa kinasa hepática purificada que llegaba a ser prácticamente total, pero que podía ser revertido en cualquier momento por la adición de proteína kinasa. Todo ello nos llevó inmediatamente a pensar en una fosforilasa kinasa fosfatasa. Para despejar esta posibilidad se estudió el efecto del factor inhibitorio sobre la fosforilasa kinasa muscular comprobándose que la inactivación originada era provocada mediante la defosforilación del enzima, acción que corresponde al enzima fosforilasa kinasa fosfatasa que ha sido ya identificado en tejido muscular.

De toda la experimentación discutida en los párrafos anteriores se podría deducir que la fosforilasa kinasa hepática (o de linfocitos) se encuentra en su forma activa-fosforilasa en el momento de preparar los extractos y así se mantiene en el transcurso de la purificación. En los primeros pasos de tal purificación se separa el enzima capaz de inactivarla, acción que no parece ser

capaz de realizar en los extractos crudos por razones desconocidas. El enzima inactivador (fosforilasa kinasa fosfatasa), una vez purificado parcialmente, es capaz de inactivar reversiblemente a la fosforilasa kinasa hepática también purificada, pasándola a su forma inactiva-defosforilada. Una vez inactivado por este mecanismo, es posible ver un claro efecto de la proteína kinasa que reactiva de nuevo la fosforilasa kinasa mediante reacción de fosforilación. La evidencia mostrada en este trabajo apoyaría por tanto la tercera de las hipótesis mencionadas anteriormente.

Otro aspecto de nuestro trabajo se ha relacionado con la purificación de las fosforilasas kinasas de hígado y músculo. En ambos casos se ha conseguido un notable grado de purificación aunque no se ha obtenido en ninguno de los casos un enzima homogéneo hasta el momento, según ha evidenciado la electroforesis en gel de poliacrilamida de los enzimas purificados. Cabe, no obstante, destacar que en el caso del enzima hepático la electroforesis en poliacrilamida sin SDS mostraba únicamente dos bandas de proteína sin que se haya podido identificar cual de ellas correspondía al enzima purificado. El pequeño número de proteínas contaminantes nos permite especular con la posibilidad de que la banda principal obtenida en las electroforesis con SDS, que se correspondía con un peso molecular de 90.000 sea la fosforilasa kinasa, apoyándose en el hecho de que una banda de igual peso molecular aparece también en el examen electroforético de la fracción purificada a partir de linfocitos. Como el peso molecular aparente del holoenzima, determinado por gel filtración, es de 180.000-200.000, su subestructura molecular sería la de un dímero con dos subunidades idénticas de peso molecular 90.000. Estas especulaciones deberán ser confirmadas cuando se consiga purificar el enzima a homogeneidad, objetivo en el que continúan nuestros esfuerzos.

Diversas características cinéticas de los enzimas purificados a partir de hígado y de linfocitos nos mostraron también una gran similitud entre ambos. Cabe destacar el importante efecto inhibitorio del ión magnesio cuando se encuentra en la mezcla de reac-

ción a concentraciones superiores a la del ATP, aspecto en el que la fosforilasa kinasa hepática y linfocitaria se diferencian notablemente del enzima muscular que no es afectado por el exceso de catión. El efecto inhibitorio del Mg^{+2} podría asimismo explicar las diferencias en los perfiles de pH obtenidos cuando la concentración de Mg^{+2} era equimolecular con la de ATP y cuando el catión se encontraba en exceso respecto al nucleótido, si consideramos que posiblemente a pH bajos, el Mg^{+2} deja de inhibir al enzima obteniéndose un máximo de actividad que podría reflejar mas la desinhibición por Mg^{+2} libre que el propio efecto de la concentración de H^{+} sobre la actividad enzimática.

BIBLIOGRAFIA

1. Krebs, E.G. y Fisher, E.H.: *Biochim. Biophys. Acta* 20, 150 (1956).
2. Cohen, P.: *Eur. J. Biochem.* 34, 1 (1973).
3. Hayakawa, T., Perkins, J.P. y Krebs, E.G.: *Biochemistry* 12, 574 (1973).
4. Krebs, E.G., Love, D.S., Bratvold, G.E., Trayser, K. A., Meyer, W.L. y Fisher, E.H.: *Biochemistry* 3, 1022 (1964).
5. Walsh, D.A., Perkins, J.P.; Brostrom, C.O., Ho, E.S. y Krebs, E.G.: *J. Biol. Chem.* 246, 1968 (1971).
6. Walsh, D.A., Perkins, J.P. y Krebs, E.G.: *J. Biol. Chem.* 213, 3763 (1968).
7. Posner, J.B., Stern, J.R. y Krebs, E.G.: *J. Biol. Chem.* 240, 982 (1965).
8. Ozawa, E. y Ebashi, S.: *J. Biochem.* 62, 285 (1967).
9. Cihen, P. y Antoniw, J.F.: *Eur. J. Biochem.* 34, 43 (1973).
10. Khoo, J.C. y Steinberg, D.: *FEBS Lett.* 57, 68 (1975).
11. Shimazu, T. y Amakawa, A.: *Biochim. Biophys. Acta* 385, 242 (1975).
12. Vandenheede, J.R., Khandelwal, R.L. y Krebs, E.G.: *J. Biol. Chem.* 252, 7488 (1977).
13. Vandenheede, J.R., Keppens, S. y De Wulf, H.: *FEBS Lett.* 61, 213 (1976).
14. Hutson, N.J., Brumley, F.T., Assimacopoulos, F.D., Harper, S.C. y Exton, J.H.: *J. Biol. Chem.* 251, 5200 (1976).
15. Cherrington, A.D., Assimacopoulos, F.D., Harper, S.C., Corbin, J.D., Park, C.R. y Exton, J.H.: *J. Biol. Chem.* 251, 5209 (1976).

16. Assimacopoulos, F.D., Blackmore, P.F. y Exton, J.H.: J. Biol. Chem. 252, 2662 (1977).
17. Yunis, A.A. y Arimura, G.K.: Biochim. Biophys. Acta 118, 325 (1966).
18. Gella, F.J., Cussó, R., Domingo, A. y Rosell-Perez, M.: Int. J. Biochem. 9, 701 (1978).
19. Gella, F.J., Benedicto, P., Aymerich, P. y Concustell, E.: Special FEBS Meeting on Enzymes. Bubrovnik (1979).
20. Pequeroles, F., Gella, F.J. y Cussó, R.: Sangre 23, 600 (1978).
21. Gella, F.J. y Cussó, R.: Rev. Esp. Fisiol. 36, 1 (1980).
22. Fischer, E.H. y Krebs, E.G.: J. Biol. Chem. 231, 65 (1958).
23. Glynn, I.M. y Chappell, J.B.: Biochem. J., 90, 147 (1964).
24. Bechtel, P.J., Beavo, J.A. y Krebs, E.G.: J. Biol. Chem. 252, 2691 (1977).
25. Chen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T. W., Vanaman, T.C. y Nairn, A.C.: FEBS Lett. 92, 287 (1978).
26. Van de Werve, G., Van den Berghe, G. and Hers, H.G.: Euro. J. Biochem. 41, 97 (1974).
27. Chrisman, T.D. y Exton, J.H.: J. Biol. Chem. 255, 3270 (1980).
28. Vandenheede, J.R., Keppens, S. y De Wulf, H.: Biochim. Biophys. Acta 481, 463 (1977).
29. Chrisman, T.D., Vandenheede, J.R., Khandenwal, R.L., Gella, F.J., Upton, J.D. y Krebs, E.G.: Adv. Enz. Reg. 18, 145 (1980).
30. Sakai, K., Matsumura, S., Okimura, Y., Yamamura, H. y Nishizuka, Y.: J. Biol. Chem. 254, 6631 (1979).
31. Chrisman, T.D.: Fed. Proc. 37, 2295 (1978).

32. Borregaard, N.: *Biochim. Biophys. Acta* 568, 215 (1979).
33. Yunis, A.A. y Arimura, G.K.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 33, 119 (1968).
34. Gilboe, D.P., Larson, K.L. y Nutall, F.Q.: *Anal. Biochem.* 47, 20 (1972).
35. Reimann, E.M., Walsh, D.A. y Krebs, E.G.: *J. Biol. Chem.* 246, 1986 (1971).
36. Lowry, O.H., Rosburgh, N.J., Farr, A.J., Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
37. Shapino, A.L., Viñuela, E., Maizel, J.V.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 28, 815 (1967).
38. Weber, F.J. y Osbern, T.H.: *J. Biol. Chem.* 244, 4406 (1969).
39. Cohen, P. y Antoniw, J.F.: *FEBS Lett.* 34, 43 (1973)
40. Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.* 245, 3059 (1970).



FUNDACION JUAN MARCH

SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- | | | | |
|----|--|----|---|
| 2 | Mulet, A.:
Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua. | 28 | Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real. |
| 4 | Santluste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados. | 29 | Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias. |
| 5 | Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura. | 30 | Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas. |
| 7 | Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental. | 39 | Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. |
| 8 | Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos. | 44 | Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae. |
| 11 | Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular. | 45 | Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual. |
| 19 | Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética. | 47 | García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular. |
| 20 | Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos. | 48 | García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina. |
| 22 | Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información. | 49 | Trillas, E., y Alsina C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados. |
| 25 | I Semana de Biología:
Neurobiología. | 50 | Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados. |
| 26 | I Semana de Biología:
Genética. | 51 | Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora. |
| 27 | I Semana de Biología:
Genética. | | |

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de T_{λ} en el 4_{He} líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoelectrónica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M. D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminícos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 Il Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 Il Semana de Biología:
Botánica.
- 88 Il Semana de Biología:
Zoología.
- 89 Il Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfológico, óptico y ultraestructural de los linocitos en la enfermedad celíaca.
- 105 Llobera i Sande, M.:
Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:
Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.
- 107 Gallán Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.

- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirotrópica.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyña Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracla García, M.:
Estudio de cerámicas de Interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:
Aplicación de la espectroscopía de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.
- 136 Aragón Reyes, J. J.:
Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.
- 139 Genís Gálvez, J. M.:
Estudio citológico de la retina del camaleón.
- 140 Segura Cámara, P. M.:
Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.
- 141 Vicent López, J. L.:
Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.
- 143 Nieto Vesperinas, M.:
Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.
- 145 Arias Pérez, J.:
Encefalopatía portosistémica experimental.
- 147 Palanca Soler, A.:
Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.
- 150 Vioque Cubero, B.:
Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la aceituna.
- 151 González López, J.:
La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.
- 152 Calle García, C.:
Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.
- 154 Alberdi Alonso, M.^a T.:
Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).

