

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 121-Rod
Caracterización de lisozimas de
Rodríguez García, Rosalía.
1031543



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Rosalía Rodríguez García

**Caracterización de lisozimas de
diferentes especies.**

121 Caracterización de lisozimas de diferentes especies/Rosalía Rodríguez García

FJM
Uni-
121
Rod
121

Fundación Juan March
Serie Universitaria

121



Rosalía Rodríguez García

Caracterización de lisozimas de diferentes especies.



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, 1977, individual
Departamento de BIOLOGIA
Centro de trabajo: Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias
de la Universidad Complutense, Madrid.*

Depósito Legal: M - 13568 - 1980
I.S.B.N.: 84 - 7075 - 163 - 8
Impresión: Gráficas Ibérica, Tarragona, 34 - Madrid-7

Este trabajo se ha realizado bajo la dirección del Profesor D. Angel M. Municio a quien quiero expresar mi más sincera gratitud por el interés y la ayuda prestados.

Asímismo quiero hacer constar mi agradecimiento a mis compañeros de equipo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense, y muy especialmente a D. Rafael Pérez Castells y al Dr. José G. Gavilanes, por su valiosa colaboración.

Quiero igualmente mostrar mi reconocimiento hacia la Fundación Juan March, que ha hecho posible la presente investigación, y que ha mostrado en todo momento el mayor interés en ella.

I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	3
PURIFICACION DE LISOZIMA	6
CARACTERIZACION MOLECULAR	8
COMPOSICION DE AMINOACIDOS	9
ESTUDIO CONFORMACIONAL	11
SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA REGION N-TERMINAL DE LA LISOZIMA DE <i>C. CAPITATA</i>	18
TRATAMIENTOS PROTEOLITICOS DE LA LISOZIMA DE <i>C. CAPITATA</i>	20
HIDROLISIS CON BROMURO DE CIANOGENO DE LA LISOZIMA DE <i>C. CAPITATA</i>	28
COMPORTAMIENTO INMUNOLOGICO DE LA LISOZIMA DE <i>C. CA- PITATA</i>	31
BIBLIOGRAFIA	34

INTRODUCCION

A comienzos de este siglo, y dentro de las nacientes investigaciones biológicas, comenzaron a desarrollarse toda una serie de estudios acerca de la acción de agentes antibacterianos. Tras algunos resultados que mostraban la presencia de actividades bacteriolíticas en diversas secreciones y tejidos, en 1922, Fleming concluyó que dichas actividades eran enzimas a las que denominó "Enzimas Líticas o Lisozimas". Desde entonces, el estudio de estos sistemas enzimáticos ha constituido uno de los más significados objetivos de numerosos grupos de investigación. La razón de este hecho estriba en la amplia distribución que esta enzima presenta en los seres vivos. Así, aunque en la actualidad la actividad bacteriolítica que exhibe la lisozima está totalmente definida en lo que a su expresión química se refiere, su función biológica no está suficientemente establecida.

Las lisozimas presentan dos actividades hidrolíticas: N-acetil-muramidasa sobre polisacáridos de paredes bacterianas y N-acetil-glucosaminidasa sobre polímeros de quitina. La primera de estas acciones de la lisozima podría indicar una participación de la enzima en los mecanismos generales de resistencia a infección bacteriana. Sin embargo, la acción lítica de la lisozima en estos procesos no está suficientemente esclarecida.

Los resultados obtenidos con las diferentes lisozimas aisladas han permitido establecer una relación de las propiedades que ha de presentar una proteína para que se la pueda considerar como lisozima. Estas propiedades se concretan en los siguientes puntos:

1. Alta basicidad. Se trata de proteínas cuyo punto isoeléctrico suele ser superior a 11.
2. Bajo peso molecular. Todas las aisladas presentan valores comprendidos entre 14000 y 25000 Dalton.
3. Estabilidad a pH ácido y alta temperatura.
4. Inestabilidad a pH básico. Pese a ello pueden presentar actividad incluso a pH 9.
5. Capacidad de lisis sobre suspensiones de Micrococcus lyso-deikticus. Es la característica esencial de este grupo de enzimas.

Dentro de las proteínas que cumplen estas características se han podido establecer distintos grupos atendiendo a sus propiedades comunes:

Tipo 1. Lisozimas con actividad primaria de muramidasa y débil actividad de quitinasa. A este grupo pertenecen la de clara de huevo de gallina y todas las humanas. Se les denomina lisozimas tipo C (chicken). Tienen un peso molecular de 14000-15000 Dalton y su aminoácido N-terminal es lisina.

Tipo 2. Lisozimas unicamente con actividad de muramidasa. A este grupo, denominado tipo G (goose), pertenece la de clara de huevo de ganso. Tienen asimismo un peso molecular de 14-15000 Dalton y su aminoácido N-terminal es arginina.

Tipo 3. Se trata de lisozimas que poseen fundamentalmente actividad de quitinasa. A este grupo pertenecen las lisozimas de plantas, con un peso molecular alrededor de 25000 Dalton y glicocola como residuo N-terminal.

Tipo 4. Configuran este grupo las lisozimas aisladas de bacteriófagos. Su peso molecular es del orden de 20000 Dalton y su

aminoácido N-terminal es metionina.

Tipo 5. Está constituido por la lisozima aislada de Chalaropsis. Su peso molecular es de 23000 Dalton y su aminoácido N-terminal es treonina.

Tipo 6. Se trata del último grupo definido hasta la fecha. A él pertenece la enzima de estrella de mar, con un peso molecular de 15500 Dalton y serina como aminoácido N-terminal.

Esta división se ha establecido en base a tres criterios fundamentales: estructura primaria, propiedades inmunológicas y características enzimáticas.

El objetivo del presente trabajo ha sido la caracterización estructural de dos nuevas lisozimas, la del insecto Ceratitis capitata y la de la tortuga Testudo graeca, purificada esta última en una sola etapa de afinidad funcional. Dicha caracterización se ha llevado a cabo en base a propiedades espectroscópicas de las citadas proteínas, de tal forma que la comparación se establece en base a estructuras de orden superior, secundaria y terciaria, lo que ofrece una nueva perspectiva para el estudio de este grupo de enzimas. Todos los estudios realizados han implicado también a la enzima de clara de huevo de gallina, la proteína más estudiada de las que configuran este grupo y, por consiguiente, perfectamente válida como referencia.

El estudio estructural realizado considera también la secuencia de aminoácidos de la enzima del insecto, así como la caracterización molecular de la proteína aislada de clara de huevo de tortuga. Lo expuesto a continuación se centra fundamentalmente en el comentario de los resultados obtenidos.

PURIFICACION DE LISOZIMA

La enzima aislada de huevo del insecto Ceratitis capitata se ha purificado según un esquema de cinco etapas: homogeneizado del material biológico en medio ácido, incubación a 65°C durante cinco minutos, cromatografía en Amberlita CG-50 realizada a pH 6.7, y sendas cromatografías de penetrabilidad en Sephadex G-25 medium y G-75 respectivamente (1). El tratamiento térmico que se introduce en este esquema de purificación, aprovechando la elevada estabilidad térmica de las lisozimas, es la primera vez que se emplea en la purificación de estas enzimas, siendo de crucial importancia para el aislamiento de la enzima de este material biológico. La proteína purificada en base a este esquema se muestra homogénea según los usuales criterios de pureza considerados para estos biopolímeros.

La purificación de la enzima de clara de huevo de tortuga se lleva a cabo en una única etapa, por cromatografía de penetrabilidad en Biogel A 0.5m. Este método de aislamiento en una sola etapa está basado en la interacción selectiva que se observa entre lisozimas y geles de agarosa (2). Es el resultado de la similitud estructural entre quitina, polisacáridos de paredes bacterianas y agarosa, lo que se traduce en una anormal retención de las lisozimas en soportes cromatográficos que contienen agarosa. Esta retención es función del contenido en agarosa del soporte para cromatografía de penetrabilidad que se considere, siendo máxima en Biogel A 0.5m con un 10% en este polisacárido. La anormal retención de estas enzimas, fruto de su afinidad funcional con el soporte cromatográfico, se manifiesta por un volumen de elu-

ción para las lisozimas muy superior al volumen total de la columna cromatográfica.

La posible aplicación de este procedimiento como método general para la purificación de lisozimas depende de dos factores: afinidad de la enzima considerada por los geles de agarosa y concentración de la proteína en el material biológico de partida. Afinidades bajas por el soporte cromatográfico se traducen en la necesidad de nuevas etapas de purificación. Por el contrario, una elevada afinidad puede conducir a una gran dificultad para la elución de la enzima del gel cromatográfico. Respecto al segundo de los factores citados, una baja concentración de lisozima en el material biológico de partida obligaría a cromatografiar grandes volúmenes de muestra, con las lógicas dificultades que esto entraña. En el caso de la enzima de insecto se presentan negativamente ambos factores, razón por la que no es viable el método de purificación en una sola etapa.

Las ventajas de la purificación de lisozima por cromatografía en geles conteniendo agarosa, son patentes si consideramos sus resultados finales. La enzima de clara de huevo de tortuga, purificada por este método, se obtiene con un rendimiento del 90%, mientras que la del insecto, purificada por un procedimiento convencional, sólo se consigue con un 58% de rendimiento.

El procedimiento empleado para la purificación de la enzima de clara de huevo de tortuga permite además la obtención de la proteína con elevada actividad específica, ya que durante el proceso de purificación se eliminan formas enzimáticas con menor afinidad por agarosa, análogo estructural del sustrato de la enzima.

Este hecho es patente si consideramos su aplicación a la enzima de clara de huevo de gallina. Esta, purificada por cromatografía en Biogel A 0.5m, se obtiene con un rendimiento del 100% y una actividad específica de 40783 unidades/ mg (3), valor superior a los normalmente descritos para esta enzima.

CARACTERIZACION MOLECULAR

En la tabla I se recogen los parámetros moleculares determinados para las lisozimas de C.capitata y T.graeca, en comparación con los descritos para la enzima de clara de huevo de gallina.

Tabla I. Características moleculares de las lisozimas de C.capitata y clara de huevo de tortuga y gallina.

	<u>C.capitata</u>	tortuga	gallina
Radio molecular(\AA)	22.6	19.1	19.1 (4)
Coefficiente de difusión(Fick)	9.5	11.2	11.2 (4)
Volumen específico parcial(cm^3/g)	0.736	0.728	0.703 (5)
E(0.1%, 1 cm)	0.405	1.640	2.635 (5)
Peso molecular	23200	14500	14000 (5)

La determinación del radio molecular o equivalente del radio hidrodinámico de la proteína se ha llevado a cabo por el procedimiento de Ackers (6). El coeficiente de difusión se determina en base a su relación con el radio molecular (7). El volumen específico parcial se ha determinado según el procedimiento de Cohn y Edsall (8). El valor de la densidad óptica para una disolución de las enzimas al 0.1% (p/v) a los 280 nm se ha determinado por

el método de Wetlaufer (9). El peso molecular se determina por cromatografía en columna de Sephadex G-200 calibrada y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS).

El radio molecular de la enzima del insecto es superior al de la enzima de clara de huevo, bien porque posea un peso molecular mayor, bien por alejarse su forma molecular de la esfericidad a lo que podrían contribuir los hidratos de carbono que posee la enzima tras el proceso de purificación (10).

COMPOSICION DE AMINOACIDOS

En la tabla II se recoge la composición de aminoácidos de las dos lisozimas estudiadas en comparación con la de clara de huevo de gallina. Los resultados que se consideran ya tienen en cuenta la descomposición que serina y treonina presentan en función del tiempo de hidrólisis, así como la lenta liberación de los residuos de valina e isoleucina. El contenido en triptófano se determina por métodos espectrofotométricos (11,12) y el de cisteína a partir de hidrolizados de la proteína carboximetilada. La determinación de la ausencia de grupos -SH libres se lleva a cabo mediante reacción con ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (13). Las diferencias más significativas, en lo que a la composición de aminoácidos se refiere, se pueden observar en el contenido en triptófano y cisteína. La enzima de C.capitata posee un único resido de triptófano, mientras que las de clara de huevo de tortuga y gallina presentan tres y seis respectivamente. Si consideramos que de los 6 sub-sitios que configuran el centro activo de la enzima de clara de huevo de gallina, uno de ellos, el C, está cons-

Tabla II. Composición de aminoácidos de lisozimas de diferentes orígenes.

aminoácido	<u>C.capitata</u>	tortuga	gallina ⁽¹⁵⁾	fago T 4 ⁽¹⁶⁾
aspártico	20 - 21	13	21	22
treonina	17	8	7	11
serina	12	13	10	6
glutámico	27	14	5	13
prolina	13	7	2	3
glicocola	17 - 18	9	12	11
alanina	13	8	12	15
cisteína	4	6	8	2
valina	10	11	6	9
metionina	2	1	2	5
isoleucina	14 - 15	6	6	10
leucina	15 - 16	9	8	16
tirosina	3	5	3	6
fenilalanina	5	6	3	5
histidina	5	2	1	1
lisina	23	11	6	13
arginina	9	7	11	13
triptófano	1	3	6	3

tituido fundamentalmente por residuos de triptófano (Trp 62 y 63) y que posiblemente el triptófano 108 esté también implicado en la catálisis; las diferencias en el contenido de este aminoácido podrían justificar las diferencias de actividad específica. La enzima del insecto, con un solo residuo de triptófano, posee una actividad específica de 36 unidades/mg, mientras que las de tortuga y gallina con 3 y 6 respectivamente, presentan 10000 y 40783 unidades/mg.

El mayor número de puentes disulfuro que presentan las enzimas de clara de huevo, 3 la de tortuga y 4 la de gallina, frente a 2 la del insecto, daría cuenta de una mayor estructuración para las dos lisozimas de vertebrados.

En esta tabla se ha incluido también la composición de aminoácidos de la enzima de fago T4, ya que, como se discutirá más adelante, es con esta enzima con la que presenta mayor homología estructural la lisozima del insecto, según se desprende de los datos de secuencia de aminoácidos.

ESTUDIO CONFORMACIONAL

Para este estudio se han considerado dicroísmo circular y espectroscopía de absorción ultravioleta, como métodos espectroscópicos de análisis de estructuras secundaria y terciaria.

En la figura 1 se recogen los espectros de dicroísmo circular, tanto en la región del ultravioleta lejano como próximo, de las lisozimas consideradas para este estudio.

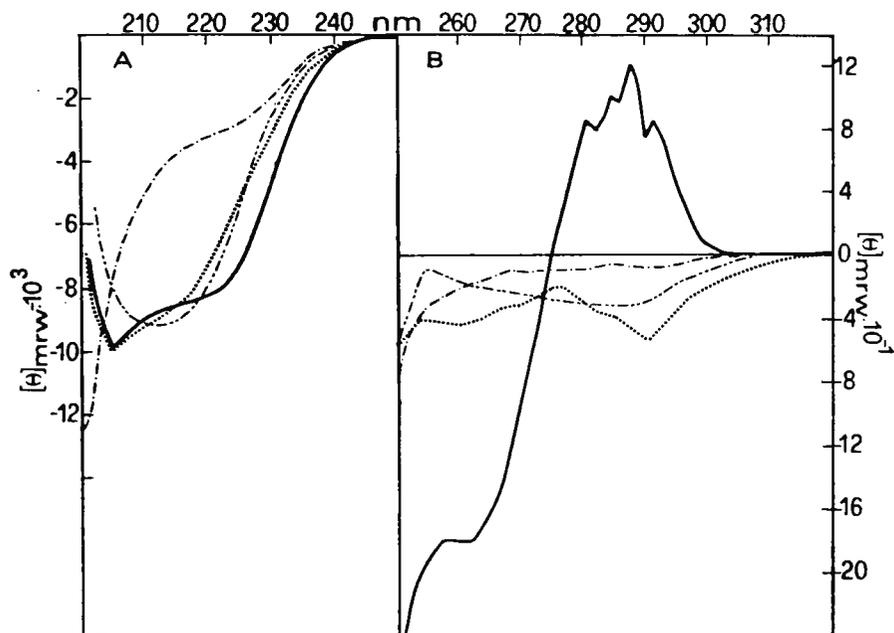


Figura 1. Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (A) y próximo (B), de las lisozimas de *C. capitata* (· · ·) y clara de huevo de gallina (—), tortuga (— — —) y paloma (— · — ·).

El análisis de los espectros en el ultravioleta lejano (figura 1A) según el método de Greenfield y Fasman (17) proporciona los valores de estructura secundaria que se recogen en la tabla III.

Tabla III. Porcentajes de estructura secundaria de lisozimas de diferentes orígenes.

	<u>C.capitata</u>	tortuga	gallina ⁽¹⁸⁾	paloma ⁽¹⁹⁾
α -hélice	7	38	41	29
estructura β	27	25	16	25
cadena estadística	66	37	43	46

La lisozima de clara de huevo de paloma se ha purificado por el mismo procedimiento descrito para la enzima de clara de huevo de tortuga (19).

Como se puede apreciar de estos resultados, así como de los espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano, el grado de estructuración de las tres enzimas de clara de huevo es superior al de la lisozima de insecto.

En la figura 1B se muestran los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta próximo para las cuatro lisozimas. La de clara de huevo de gallina presenta una banda dicroica positiva en la zona de los aminoácidos aromáticos. La estructura fina de esta banda ha sido asignada a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de triptófano (20-22). La elipticidad negativa que se manifiesta en la zona de 260-270 nm puede ser debida a transiciones 1L_a de los residuos de triptófano. En esta zona, las enzimas de C.capitata y clara de huevo de tortuga no presentan transiciones electrónicas asimétricas que se reflejen en el espectro de dicroísmo circular.

El hecho de que el único residuo de triptófano de la enzima de C. capitata no muestre actividad óptica indicaría una alta exposición de dicho residuo, no siendo afectado, por tanto, por el plegamiento de la cadena polipeptídica. Este hecho se traduciría en una elevada polaridad del microentorno de dicho residuo de triptófano.

En la enzima de clara de huevo de gallina resulta difícil asignar las transiciones electrónicas asimétricas de triptófano a residuos concretos en la cadena polipeptídica. Este problema es común a todas las proteínas con un número elevado de cromóforos potencialmente activos, como es el caso de esta enzima. Tanaka et al. (20) y Kuramitsu et al. (21) concluyen que ni el residuo Trp-62 ni el Trp-108 (residuos del centro activo de la enzima de clara de huevo de gallina; 14) contribuyen a la elipticidad de la proteína en la región del ultravioleta próximo, mientras que Cowburn et al. (22) sostienen que es el residuo Trp-108 el que más contribuye a la elipticidad en dicha zona. El hecho de que la enzima de clara de huevo de tortuga presente tres únicos residuos de triptófano y una actividad específica comparable a la de la enzima de gallina, así como el carácter homólogo de ambas proteínas, permite establecer que dichos residuos formen parte del centro catalítico de la enzima de clara de huevo de tortuga. Un razonamiento similar se podría establecer para la enzima del insecto respecto a su único residuo de triptófano. Estos datos apoyarían la hipótesis de Tanaka et al. (20) y Kuramitsu et al. (21), en el sentido de que no son los triptófanos del centro activo de la lisozima de clara de huevo de gallina los responsables del dicroísmo

circular que la enzima exhibe en la región de los aminoácidos aromáticos. Al no presentar dicroísmo circular en esta zona las lisozimas de insecto y clara de huevo de tortuga, no serán los triptófanos del centro activo los que proporcionen bandas dicroicas en esta región del espectro.

En base al razonamiento desarrollado, la banda dicroica negativa que en la zona del ultravioleta próximo presenta el espectro de la enzima de clara de huevo de paloma, se debería a transiciones electrónicas asimétricas de residuos de tirosina. Esta hipótesis se ve confirmada por la ausencia en dicho espectro de la banda de elipticidad negativa en la zona de 260-270 nm asignada a transiciones electrónicas de residuos de triptófano.

En la figura 2 se recogen los espectros de absorción ultravioleta para las lisozimas estudiadas. La enzima de clara de huevo de gallina presenta un máximo de absorción a 280 nm, observándose, asimismo, dos hombros claramente diferenciables a 275 y 289 nm. Tanto el aspecto cualitativo como cuantitativo de dicho espectro están de acuerdo con el elevado contenido en triptófano que presenta esta proteína (15). El alto coeficiente de extinción molar de este cromóforo a 280 nm ($5550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (9) y los seis residuos de triptófano que presenta esta proteína dan cuenta de su elevada densidad óptica a la longitud de onda considerada. El hombro a 289 nm es, asimismo, reflejo del alto contenido en triptófano. El hecho de que la lisozima de clara de huevo de gallina presente doble número de triptófanos que de tirosinas, así como el menor coeficiente de extinción molar de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de este último ($1340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 280 nm) (9), contribu-

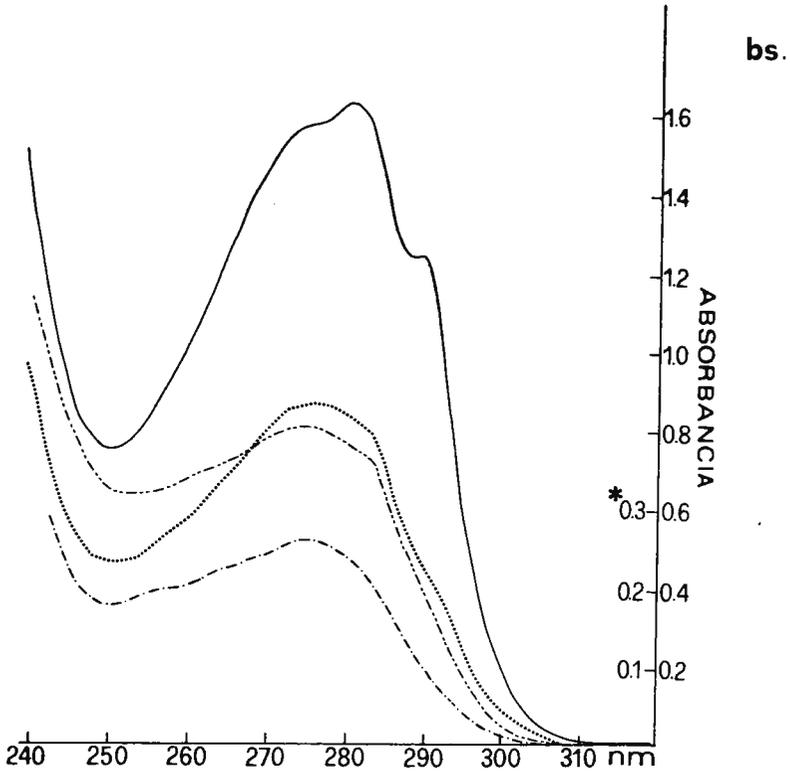


Figura 2. Espectros de absorción de las lisozimas de *C. capitata* (- · - ·) y clara de huevo de gallina (—), tortuga (- - -) y paloma (- · -).

yen a la configuración final del espectro de absorción de la proteína.

La enzima de clara de huevo de tortuga presenta un máximo de absorción a 277 nm y hombros ligeramente diferenciados a 260 y 282 nm. El desplazamiento hacia el azul experimentado por el máximo de absorción, en relación con el de clara de huevo de gallina, puede ser debido al mayor contenido en tirosina que presenta aquella enzima. El menor número de triptófanos justificaría la

ausencia de hombro significativo alrededor de 290 nm.

La lisozima de clara de huevo de paloma presenta un máximo de absorción a 278 nm, dos hombros poco manifiestos a 257 y 265 nm, así como uno claramente diferenciado a 290 nm. En este caso, a diferencia de la enzima de clara de huevo de tortuga, el hombro a 290 nm aparece claramente diferenciado. La lisozima de paloma, aún teniendo el mismo número de triptófanos que la de clara de huevo de tortuga, presenta menos tirosinas (19), razón por la que la absorción de triptófano se manifiesta con mayor intensidad.

El espectro de absorción de la lisozima del insecto C.capitata presenta un máximo de absorción a 275 nm. Asimismo, se observan cuatro hombros a 283, 268, 264 y 258 nm. Las características de este espectro son justificables en base al reducido contenido en aminoácidos aromáticos que presenta la proteína, 1 residuo de triptófano y 3 de tirosina. El hecho de que el máximo de absorción de la proteína aparezca a menor longitud de onda que en las otras enzimas, probablemente se debe a que esta lisozima presenta la mayor relación Tyr/Trp, 3, mientras que para las de clara de huevo de tortuga, paloma y gallina es 1.67, 1.00 y 0.50 respectivamente.

En la figura 3 se recoge el resultado del análisis por primera derivada de los espectros de absorción ultravioleta. Como se puede apreciar en esta figura, el máximo correspondiente al primer punto de inflexión de los espectros aparece en la enzima de C.capitata desplazado hacia menores longitudes de onda con respecto a las proteínas de clara de huevo. Esto indicaría un microentorno de mayor polaridad para el único residuo de triptófano de la

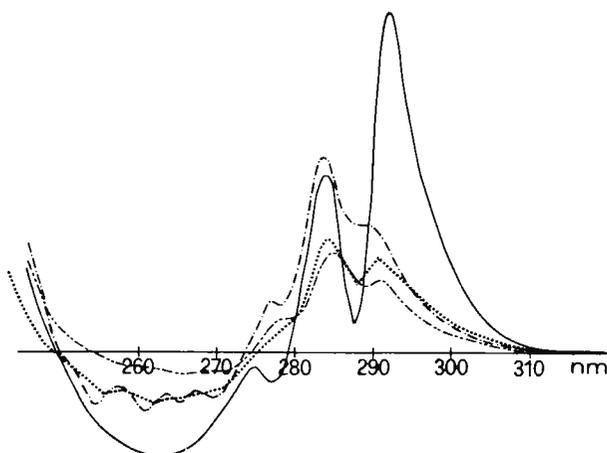


Figura 3. Representación gráfica de la primera derivada de los espectros de absorción ultravioleta de las lisozimas de C. capitata (- · -) y clara de huevo de gallina (—), tortuga (---) y paloma (---).

enzima del insecto, ya que en esta zona del espectro la máxima contribución se debe a este tipo de residuos. Este resultado podría indicar un carácter más superficial para dicho triptófano, bien debido a una menor estructuración de la proteína o bien, caso de encontrarse éste situado en el centro activo, mostrar una menor hidrofobicidad. Hay que destacar el papel catalítico esencial que desempeñan los residuos de triptófano en la enzima de clara de huevo de gallina (14). El carácter homólogo de ambas proteínas hace esperar que el único triptófano de la enzima del insecto forme parte del centro activo. Este resultado está de acuerdo con el obtenido por dicroísmo circular en el ultravioleta próximo, en el sentido de una elevada exposición del residuo de triptófano de la enzima de C. capitata.

Los gráficos de primera derivada para las lisozimas de tortuga y paloma son muy similares, como cabía esperar en base al idéntico contenido en triptófano que presentan ambas proteínas. Las diferencias que presentan en el contenido en tirosina son menos importantes debido a la menor contribución espectral de este cromóforo.

En resumen, las tres lisozimas de clara de huevo presentan estructuras secundarias similares, considerando las limitaciones del método de cálculo, en base a las medidas de dicroísmo circular. Asimismo, pueden presentar similar estructura terciaria, aunque las diferencias en estructura primaria serían las responsables de la ausencia de actividad óptica en el ultravioleta próximo para la enzima de clara de huevo de tortuga, y de la banda dicroica negativa en la lisozima de paloma. La lisozima del insecto presenta claramente una distinta estructura secundaria, con gran proporción de cadena estadística. Este hecho, así como su mayor peso molecular parecen indicar que las diferencias de elipticidad por residuo en el ultravioleta próximo reflejarían, no sólo una distinta secuencia de aminoácidos, sino además diferente estructura terciaria con respecto a las otras tres lisozimas.

SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA REGION N-TERMINAL DE LA LISOZIMA DE CERATITIS CAPITATA

La determinación se ha realizado por método automático en Sequencer Beckman 890 B. El programa empleado para la determinación es el 060275 de Beckman Instruments (Palo Alto, California, USA) modificado para las características del instrumento emplea

do. Fundamentalmente se ha incrementado la duración de las etapas en las que se produce vacío en la copa de reacción, con objeto de conseguir una máxima eliminación de disolventes y reactivos. El programa empleado es de 56 etapas y su duración aproximada de dos horas (23). La identificación de las feniltiohidantoinas obtenidas por conversión en medio ácido de las anilino-tiazolinonas producidas en la degradación secuencial, se ha llevado a cabo por los procedimientos siguientes: cromatografía gas-líquido (24,25), cromatografía en placas de poliamida (26) y cromatografía en placas de sílica-gel (23). La identificación de las feniltiohidantoinas correspondientes a histidina y arginina se ha llevado a cabo por los reactivos de Pauly (27) y fenantrenoquinona (28).

Los resultados de esta determinación se recogen en la figura 4, en la que aparecen además las secuencias de las regiones N-terminal de las enzimas de bacteriófagos y clara de huevo de gallina. Como se puede apreciar en dicha figura, las secuencias de mayor homología con respecto a la enzima del insecto son las de fago T4 y T2. Las posiciones 1, 3, 4, 15 y 20 de la secuencia de aminoácidos son coincidentes para las tres enzimas.

Como se puede apreciar en los 30 primeros residuos de la lisozima de C.capitata existe un elevado contenido en valina, isoleucina y prolina, aminoácidos que presentan gran dificultad para la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los que intervienen. Esta puede ser la causa de un brusco descenso en el rendimiento del proceso a partir del residuo 22, de tal forma que sólo es posible la identificación de 8 residuos más.

Figura 4. Secuencia N-terminal de la lisozima de C.capitata en comparación con las de las enzimas de bacteriófagos y clara de huevo de gallina.

<u>C.capitata</u>	Met-Gln-Ile-Phe-Val ⁵ -Lys-Thr-Leu-Thr-Gly ¹⁰ -Lys-Thr-
fago T4 (29)	Met-Asn-Ile-Phe-Glu-Met-Leu-Arg-Ile-Asp-Glu-Gly-
fago T2 (29)	Met-Asn-Ile-Phe-Glu-Met-Leu-Arg-Ile-Asp-Glu-Gly-
fago λ (29)	Met-Val-Glu-Ile-Asn-Asn-Glu-Arg-Lys-Ala-Phe-Leu-
gallina (15)	Lys-Val-Phe-Gly-Arg-Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-
<u>C.capitata</u>	-Ile-Thr-Leu-Glu-Val-Glu-Pro ¹⁵ (Asp) ²⁰ Asp-Thr-Ile-Asp-
fago T4	-Leu-Arg-Leu-Lys-Ile-Tyr-Lys-Asp-Thr-Glu-Gly-Tyr-
fago T2	-Leu-Arg-Leu-Lys-Ile-Tyr-Lys-Asp-Thr-Glu-Gly-Tyr-
fago λ	-Asp-Met-Leu-Ala-Trp(Asx,Asx,Thr,Ser,Glx,Gly,Gly,
gallina	-Lys-Arg-His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg-Gly-Tyr-Ser-
<u>C.capitata</u>	⟨Pro⟩Val ²⁵ (Asp)Ala-Arg-Ile ³⁰ -
fago T4	-Tyr-Thr-Ile-Gly-Ile-Gly-
fago T2	-Tyr-Thr-Ile-Gly-Ile-Gly-
fago λ	,Arg,Glx,Lys,...
gallina	-Leu-Gly-Asn-Trp-Val-Cys-

TRATAMIENTOS PROTEOLITICOS DE LA LISOZIMA DE C.CAPITATA

En este sentido se han considerado hidrólisis tríptica y quimotríptica de la enzima del insecto. En ambos tratamientos la relación lisozima a enzima proteolítica ha sido de 100:1. Con el fin de obtener resultados válidos para la determinación de la estructura primaria de la enzima de insecto, se han utilizado preparaciones de tripsina carentes de actividad quimotríptica

(tripsina tratada con TPCK, 1-tosilamido-2-fenil-etil-clorometilcetona, inhibidor quimotriptico) y de quimotripsina tratada con TlCK, $N\alpha$ -tosil-L-lisil-clorometano, inhibidor triptico. Ambas digestiones se han llevado a cabo durante 4 horas y a una temperatura de incubación de 37°C .

La separación de los péptidos resultantes de ambos tratamientos proteolíticos se lleva a cabo en primera instancia, y como parte de la caracterización estructural de la proteína, en un sistema doble de electroforesis y cromatografía. Las condiciones de desarrollo de estos mapas peptídicos son las previamente descritas (23). La cantidad de proteína necesaria para poder visualizar los péptidos obtenidos con el reactivo de ninhidrina empleado es de 5 nmoles.

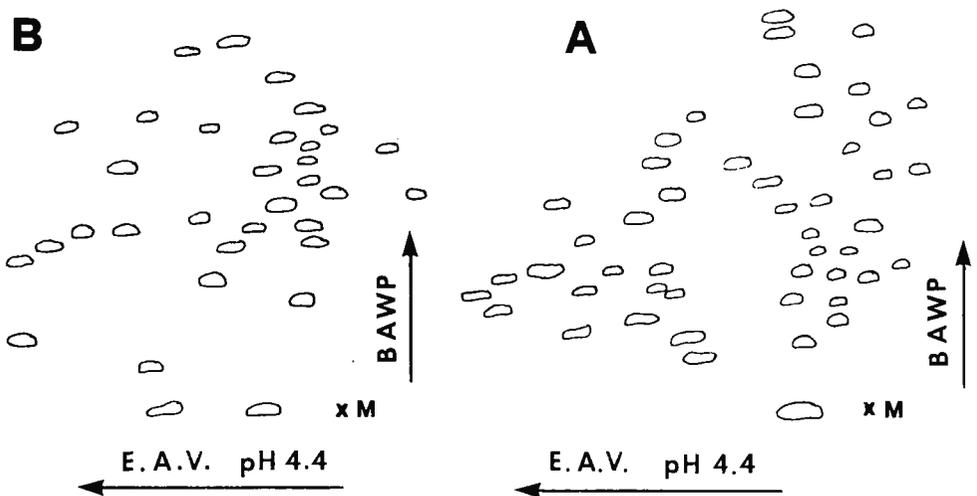


Figura 5. Mapas peptídicos, triptico (A) y quimotriptico (B) de la lisozima de C. capitata.

En la figura 5 se recogen los mapas tríptico y quimotríptico de la lisozima de C.capitata. Como se puede apreciar, el mapa tríptico presenta 48 péptidos. Si consideramos el número de residuos que contiene la enzima del insecto susceptibles de ataque por tripsina (23 lisinas y 9 argininas, total 32) y el número de péptidos trípticos obtenidos, vemos que éste es bastante superior a lo esperado. Sin embargo hay que considerar algunos aspectos de carácter experimental que presenta la hidrólisis tríptica. En primer lugar, hay que tener presente la existencia de determinadas secuencias que no son susceptibles de hidrólisis por tripsina. Uno de estos casos es la secuencia -Lys-Pro-. Esto en principio reduciría el número de posibles péptidos trípticos. Sin embargo, hay que considerar que dos residuos básicos (lisina y arginina) sucesivos no son susceptibles de ataque con un rendimiento del 100%, lo que incrementa el número de péptidos. Así, de una secuencia A-B-C-Lys-Lys-D- por hidrólisis tríptica se podrían obtener los fragmentos A-B-C-Lys, A-B-C-Lys-Lys, Lys, D-... Indudablemente la proporción en que aparecerían estos péptidos no sería la misma, traduciéndose esto en que los menos abundantes aparecerían menos intensos tras el revelado con el reactivo de ninhidrina. Según esto, la intensidad del color resultante del revelado con ninhidrina podría considerarse como criterio válido para detectar péptidos procedentes de roturas poco significativas o inespecíficas; sin embargo, esto no es posible ya que la intensidad del color producido por reacción con ninhidrina depende en gran parte del aminoácido N-terminal del péptido. Así, péptidos cuyo aminoácido N-terminal es

isoleucina presentan un color poco intenso aunque se encuentren en cantidad muy apreciable. Por ello, la única posibilidad de eliminar péptidos procedentes de rupturas menos específicas consiste en la determinación cuantitativa de su composición de aminoácidos. De cualquier forma todo mapa peptídico presentará siempre un importante componente de péptidos procedentes de este tipo de rupturas.

En el mapa quimotriptico de la enzima del insecto el número de péptidos visualizados es de 33. Si consideramos el número de residuos teóricamente susceptibles a un ataque quimotriptico (15-16 leucinas, 3 tirosinas, 5 fenilalaninas y 1 triptófano, total 24-25) también se aprecia que el número de péptidos obtenidos es ligeramente superior. La razón probablemente es similar a la comentada para la hidrólisis triptica, aunque en este caso al ser menos específica la quimotripsina es más difícil obtener conclusiones válidas.

Un hecho general a todo tipo de hidrólisis y que contribuye a incrementar el número de péptidos visualizados mediante un mapa bidimensional, es relativo a los péptidos que contienen metionina. Este aminoácido puede sufrir oxidaciones parciales que originan metionina sulfona, de manera que los péptidos que contengan este aminoácido y se encuentren parcialmente oxidados presentarán idéntica movilidad electroforética (primera dimensión) pero distinto R_f cromatográfico (segunda dimensión) aumentando de esta forma el número observado de péptidos. De cualquier forma, este factor será de menor importancia en la enzima del insecto, ya que sólo posee dos residuos de metionina.

Con el objeto de aislar la suficiente masa como para poder llevar a cabo la secuenciación de los distintos péptidos trípticos, se ha procedido a una hidrólisis tríptica con fines preparativos. Se han digerido, en las condiciones previamente descritas, 400 nmoles (aproximadamente 10 mg) de lisozima del insecto. Los fragmentos resultantes, todos ellos solubles en medio ácido, se separan inicialmente mediante cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-25 medio. Las fracciones recogidas, de 0.7 ml, se miden a 230 y 280 nm, a fin de disponer de datos sobre la relación tamaño a contenido en aminoácidos aromáticos de los distintos péptidos. En la figura 6 se recoge el resultado de la citada lectura espectrofotométrica.

Con el fin de evaluar el número de componentes peptídicos presentes en cada fracción de la cromatografía anterior, una alícuota de cada una de aquellas se somete a cromatografía en capa fina sobre gel de sílice, en un sistema de butanol, ácido acético, agua, piridina (BAWP). El resultado del revelado de la placa con el reactivo de ninhidrina se recoge también en la figura 6. En determinados casos, esta etapa descrita como analítica, puede aplicarse con carácter preparativo para la purificación de péptidos fraccionados previamente por cromatografía de penetrabilidad o de intercambio iónico.

Como resultado de estas etapas cromatográficas se han obtenido con suficiente pureza una serie de péptidos trípticos de la lisozima de C. capitata, que se han secuenciado de forma manual. Este proceso se ha llevado a cabo con isotiocianato de ⁴N,N-dimetilaminoazofenilo (DABITC) (30). Este reactivo origina degra-

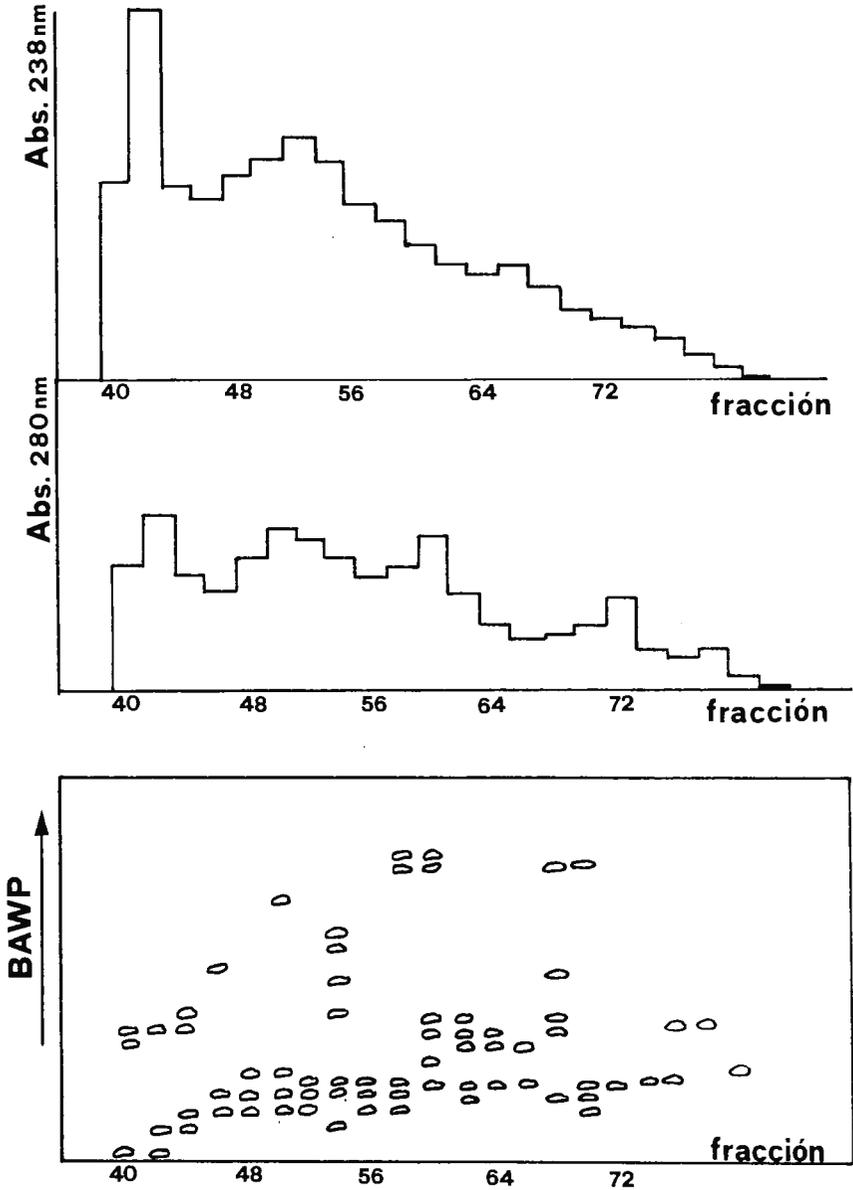


Figura 6. (A) Perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G-25 medium (1 x 190 cm), equilibrada en ácido acético 1 M, correspondiente a una hidrólisis triptica de lisozima de *C. capita*. (B) Cromatografía en capa fina de las fracciones del anterior eluido cromatográfico.

daciones secuenciales en forma análoga al clásico reactivo de Edman (isotiocianato de fenilo, PITC), pero con la particularidad de que las correspondientes dimetilamino-azobenceno-tiohidantoínas son coloreadas a diferencia de las feniltiohidantoínas que origina el PITC. Este hecho incrementa sensiblemente el límite de detección de los derivados obtenidos en el proceso de degradación secuencial, disminuyendo paralelamente la cantidad de péptido necesaria para llevar a cabo la secuencia manual.

No obstante, el DABITC presenta el inconveniente de que no proporciona rendimientos del 100% en las etapas de degradación secuencial. Por ello, y con el fin de eliminar este claro inconveniente que se traduciría en contaminaciones por residuos que deberían estar ya separados del péptido residual, el DABITC se emplea acoplado con PITC (isotiocianato de fenilo). De esta forma, el rendimiento de la etapa de degradación conjunta es del 100% y la sensibilidad del proceso se incrementa notablemente debido a la presencia del DABITC.

Como resultado de los procesos de secuenciación manual se han obtenido las estructuras primarias de una serie de péptidos trípticos de la lisozima de C. capitata. En la tabla IV se recogen las secuencias obtenidas.

En la figura 7 se recogen las posiciones que ocupan los anteriores péptidos secuenciados manualmente, en el mapa tríptico de la lisozima del insecto. Para llegar a esta asignación ha sido necesario eluir los correspondientes péptidos del mapa tríptico y proceder a su secuenciación manual. Por consiguiente, estos péptidos secuenciados se comportan como bandas homogéneas tras

la separación bidimensional que configura el mapa peptídico.

Tabla IV. Secuencia de aminoácidos de péptidos trípticos de lisozima de C.capitata.

T-2: LYS-LYS	T-8: LYS-ASP-LYS
T-3: LYS-ASN-LYS	T-10: LEU-GLY-SER-ARG
T-4: LYS	T-11: THR-LEU-THR-GLY-LYS
T-5: ARG	T-13: ALA-ASP-GLN-TYR-LYS
T-6: ALA-SER-LYS	

La numeración de estos péptidos trípticos se ha realizado atendiendo a su posición en el mapa peptídico de la proteína, y de forma independiente de la posición que ocupan en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

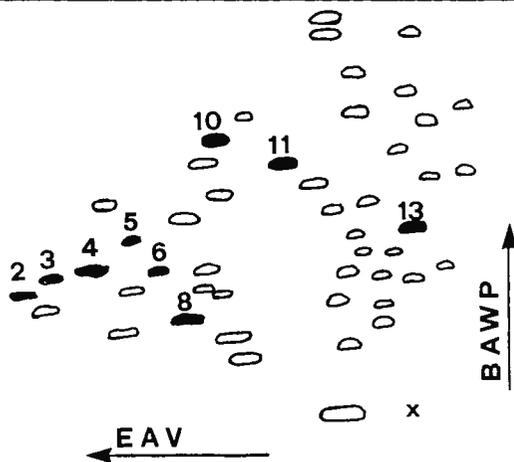


Figura 7. Localización de los péptidos secuenciados manualmente sobre el mapa tríptico de la lisozima del insecto C.capitata.

Es de destacar el hecho de que la secuencia del péptido tríptico T-11 es coincidente con la de las posiciones 7 a 11 de la región N-terminal de la proteína nativa, determinadas por secuencia automática. Asimismo, T-4 y T-5 corresponden a los aminoácidos básicos, lisina y arginina libres. Los péptidos T-2 y T-3 ponen de manifiesto el hecho anteriormente descrito, relativo

a la existencia de puntos de hidrólisis inespecíficos desde un punto de vista teórico, y que contribuía a incrementar el número de péptidos resultantes de un tratamiento proteolítico. Así, para la secuencia que presenta T-3 el único péptido que cabía esperar es Asn-Lys.

HIDROLISIS CON BrCN DE LA LISOZIMA DE C. CAPITATA

La degradación con BrCN se ha llevado a cabo durante 47 horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. El análisis electroforético de los fragmentos resultantes revela la existencia de dos bandas de movilidad inferior a la de la proteína intacta, en las condiciones en las que se realiza esta electroforesis en gel de poliacrilamida (31). Asimismo, este análisis electroforético no revela prácticamente la existencia de proteína intacta. Este resultado es de gran interés si se considera la estrategia de secuencia para la proteína del insecto. Esta lisozima posee solamente dos residuos de metionina, uno de los cuales se encuentra en la posición N-terminal de la cadena polipeptídica. El hecho de que la ruptura por BrCN transcurra con un rendimiento próximo al 100% permite la obtención, en gran rendimiento, de dos péptidos de gran utilidad para el solapamiento de las secuencias de aminoácidos de estructuras de menor tamaño molecular. Conviene recordar la existencia de secuencias, como -Met-Ile- no atacables por BrCN (32), o bien de otras en las que el rendimiento es muy bajo; tal es el caso de la secuencia -Met-Thr- que suele presentar rendimientos de tan sólo 30%.

Con objeto de disponer de masa suficiente para posteriores estudios, se ha procedido a la separación preparativa de los pép

tidos resultantes del tratamiento con BrCN. Se ha empleado para ello una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G25. En la figura 8 se recoge el resultado de esta etapa.

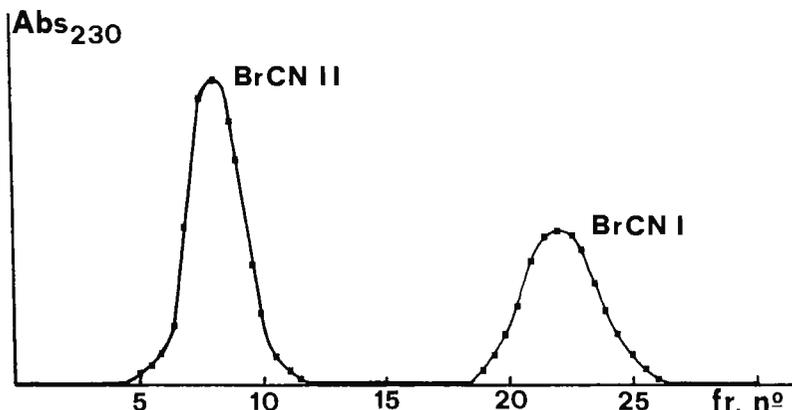


Figura 8. Perfil del eluido de la cromatografía en Sephadex G25 (1 x 200 cm), equilibrada en $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 0.1 M, correspondiente a la hidrólisis con BrCN de la lisozima del insecto C. capitata.

Como se puede observar en la figura, en el eluido se aprecian dos picos claramente diferenciables y correspondientes a cada una de las dos bandas obtenidas en electroforesis en gel de poli-acrilamida para el hidrolizado con BrCN. Si se considera que el eluido de la cromatografía se ha registrado a 230 nm y que por consiguiente la absorción medida tendrá como contribución mayoritaria la del enlace peptídico, se puede concluir que el péptido designado como BrCN-II contiene aproximadamente las dos terceras partes de la cadena polipeptídica.

Sobre los dos péptidos purificados se ha procedido a un análisis de secuencia automática en las condiciones empleadas para la determinación sobre la proteína intacta. Como resultado de

este proceso se ha comprobado que el péptido BrCN-I contiene la región N-terminal de la cadena polipeptídica. Referente al péptido BrCN-II la secuenciación automática de su región N-terminal ha proporcionado el resultado que se recoge en la figura 9.

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la región N-terminal del péptido BrCN-II obtenido a partir de la lisozima de C. capitata.

Asn-Lys-Glu-Phe-Glu-Lys-Val-Thr-	-Gly-Asp-Ala-
5	10

Como se deduce de este resultado, la hidrólisis de la proteína por BrCN transcurre a través del enlace Met-Asn, además del enlace Met-Gln correspondiente a la región N-terminal de la cadena polipeptídica.

Los criterios de identificación empleados en el análisis de las correspondientes feniltiohidantoínas resultantes de las etapas de degradación secuencial, proporcionan resultados negativos para la posición 9 del péptido BrCN-II. Con objeto de eliminar la posibilidad de un error instrumental en este ciclo de secuencia, se ha repetido el proceso tres veces obteniéndose idéntico resultado. Este hecho puede ser debido a diferentes causas. En primer lugar puede tratarse de un aminoácido de los fácilmente degradables en el proceso de conversión de la anilino-tiazolinona a feniltiohidantoína. Este es el caso de treonina, serina, prolina y triptófano, normalmente. Puede tratarse también de un residuo modificado covalentemente, por ejemplo

un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrocarbonado, que presente como resultado de esta modificación un comportamiento cromatográfico anómalo y por consiguiente no identificable como tal aminoácido por los criterios usuales de análisis. También puede suceder que, como resultado de la citada modificación se incremente la hidrofobicidad del residuo y sea eliminado en las etapas de lavado dentro del proceso de secuencia automática. Conviene recordar que la proteína nativa contiene un componente hidrocarbonado (10).

A partir del residuo 10 el rendimiento del proceso de degradación experimenta un descenso muy apreciable, hasta tal punto que el residuo correspondiente a la posición 13 resulta imposible de identificar. Este hecho también se ha comprobado repetidas veces con el mismo resultado. Ello puede ser debido a varias razones entre las que se pueden reseñar dos de ellas. Si el residuo 9 de la secuencia fuese una prolina, los enlaces peptídicos en los que interviene este aminoácido serían difíciles de hidrolizar, por lo que el rendimiento global del proceso desciende sensiblemente. Asimismo, puede suceder que el péptido residual, tras la novena etapa de degradación sea poco polar y se elimine en parte con los disolventes de lavado del proceso de secuencia automática. De cualquier manera, la razón de este descenso en el rendimiento se desconoce.

COMPORTAMIENTO INMUNOLOGICO DE LA LISOZIMA DE C. CAPITATA

El primer punto de los estudios realizados a este respecto ha sido la obtención del correspondiente antisuero para la lisozima de C. capitata. Para ello se ha empleado proteína de los mis-

mos lotes empleados para la secuenciación automática y cuya elevada pureza ha sido comprobada por esta técnica. Conviene recordar la elevada pureza, superior al 95% que requiere una muestra para su análisis por secuenciación automática, ya que de lo contrario se obtendrían resultados de muy difícil interpretación. El resultado de los estudios por inmunodifusión doble bidimensional (33) para distintas preparaciones de lisozima del insecto muestra una única banda de inmunoreacción.

Con objeto de obtener datos acerca de la existencia de esta enzima lítica en los distintos estados de desarrollo del insecto C. capitata se ha procedido a su detección por métodos inmunológicos. Para ello se han considerado homogeneizados de huevo, larva, pupa y adulto del insecto, obtenidos en idénticas condiciones, y se han sometido a inmunodifusión doble bidimensional frente a antilisoizima del insecto en fase de huevo. En todos los casos se ha partido de la misma masa de material biológico, independientemente del estado de desarrollo. El resultado muestra la ausencia de reacción inmunológica en todos los estados excepto en huevo. Esto indica la ausencia en los demás estados de lisozima con características antigénicas similares a las de huevo. Este resultado es importante, si tenemos en cuenta que se ha detectado actividad lítica en el estado de adulto (34), lo que indicaría la existencia de más de un tipo de lisozima en el insecto, o bien una única enzima que evolucionaría a lo largo del desarrollo.

A fin de comprobar de forma cuantitativa el resultado anterior se ha procedido a la realización del correspondiente radioin-

munoensayo, previa yodación de la proteína por el método de la cloramina T. El resultado final ha sido el mismo.

Por último, destacar la falta de carácter antigénico de los fragmentos resultantes de la hidrólisis con bromuro de cianógeno, como se puede deducir de la ausencia de reacción inmunológica frente a antilisozima nativa. Sin embargo, este hecho podría atribuirse a la desnaturalización, o incluso modificación química, desaminación, de los fragmentos resultantes, durante el proceso de hidrólisis, ya que éste se realiza en ácido fórmico al 70%. También hay que considerar que este proceso se realiza en presencia de 0.1% 2-mercaptoetanol y la reducción de los puentes disulfuro podría modificar el carácter antigénico de los péptidos resultantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Fernández-Sousa, J.M., Gavilanes, J.G., Municio, A.M., Pérez-Aranda, A. y Rodríguez, R. European J.Biochem. (1977) 72, 25-33.
2. Fernández-Sousa, J.M. y Rodríguez, R. Biochem.Biophys.Res.Commun. (1977) 74, 1426-1431.
3. Fernández-Sousa, J.M., Pérez-Castells, R. y Rodríguez, R. Biochim.Biophys.Acta (1978) 523, 430-434.
4. Sober, H.A. en "Handbook of Biochemistry". The Chemical Rubber Co. Cleveland. Ohio (1968)
5. Mitchell, W.M. y Hash, J.H. J.Biol.Chem. (1969) 244, 17.
6. Ackers, G.K. Biochemistry (1964) 5, 723-730.
7. Leach, S. (ed.) en "Physical Principles and Techniques in Protein Chemistry" Academic Press (1969).
8. Cohn, E.J. y Edsall, J.T. en "Proteins, amino acids and Peptides" Reinhold ed. (1943) 370-381.
9. Wetlaufer, D.B. Advan.Protein Chem. (1962) 17, 303-390.
10. Pérez-Castells, R y Rodríguez, R. (1979) no publicado.
11. Beaven, G.H. y Holiday, E.R. Advan.Protein Chem. (1952) 7, 319-382.
12. Edelhoch, H. Biochemistry (1967) 6, 1948-1954.
13. Ellman, G.L. Arch.Biochem.Biophys. (1959) 82, 70-77.
14. Phillips, D.C. Sci. Am. (1966) 215, 78-90.
15. Canfield, R.E. J.Biol.Chem. (1963) 238, 2698-2707.
16. Tsugita, A. e Inouye, M. (1968) J.Mol.Biol. 37, 201-212.
17. Greenfield, N. y Fasman, G.D. Biochemistry (1969) 8, 4108-4116.

18. Chen, Y-H., Yang, J.T. y Chau, K.H. Biochemistry (1974) 13, 3350-3359.
19. Pérez-Castells, R. y Rodríguez, R. (1979) no publicados.
20. Tanaka, F., Forster, L.S., Pal, P.K. y Rupley, J.A. J.Biol. Chem. (1975) 250, 6977-6982.
21. Kuramitsu, S., Ikeda, K., Hamaguchi, K., Fujio, H., Amano, T., Miwa, S. y Nishina, T. (1974) J.Biochem. (Tokio) 76, 671-683.
22. Cowburn, D.A., Brew, K. y Gratzner, W.B. Biochemistry (1972) 11, 1228-1234.
23. Rodríguez, R. Memoria Fundación J.March. Biología (1977).
24. Horning, E.C., van der Heuvel, W.J.A. y Greech, B.G. Methods Biochem. Anal. (1963) 11, 69.
25. Pisano, J.J., Bronzert, T.J. y Brower, H.B. Anal. Biochem. (1972) 45, 43.
26. Summers, M.R., Smyters, G.W. y Crozslaw, S. Anal. Biochem. (1973) 53, 624.
27. Yamada, S. e Itano, H.A. Biochim. Biophys. Acta (1966) 130, 538.
28. Mann, T. y Leone, E. Biochem. J. (1953) 53, 140.
29. Tsugita, A. (1972) en "The Enzymes" vol. 5 (P.Boyer, ed.) 343-411 Academic Press.
30. Whitmann-Liebold, B. Comunicación personal (1978).
31. Panyim, S. y Chalkley, R. Arch. Biochem. Biophys. (1969) 130, 337-346.
32. Fernández-Sousa, J.M., Gavilanes, J.G., Municio, A.M., Paredes, J.A., Pérez-Aranda, A. y Rodríguez, R. Biochim. Bio-

phys. Acta (1975) 393, 358-367.

33. Ouchterlony, O. (1958) en *Progress in Allergy*, vol.V (Kallos Karger ed.) N.York.
34. Pérez-Castells, R. y Rodríguez, R. (1979) no publicado.



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Marrón

(Filosofía, Teología, Historia, Artes Plásticas, Música, Literatura y Filología)

- | | | | |
|----|---|----|---|
| 1 | Fierro, A.:
Semántica del lenguaje religioso. | 60 | Alcalá Galvé, A.:
El sistema de Servet. |
| 10 | Torres Monreal, F.:
El teatro español en Francia (1935-1973). | 61 | Mourão-Ferreira, D., y Ferreira, V.:
Dos estudios sobre literatura portuguesa contemporánea. |
| 12 | Curto Herrero, F. Fco.:
Los libros españoles de caballerías en el siglo XVI. | 62 | Manzano Arjona, M.:
Sistemas intermedios. |
| 14 | Valle Rodríguez, C. del:
La obra gramatical de Abraham Ibn Ezra. | 67 | Acero Fernández, J. J.:
La teoría de los juegos semánticos. Una presentación. |
| 16 | Solís Santos, C.:
El significado teórico de los términos descriptivos. | 68 | Ortega López, M.:
El problema de la tierra en el expediente de Ley Agraria. |
| 18 | García Montalvo, P.:
La imaginación natural (estudios sobre la literatura fantástica norteamericana). | 70 | Martín Zorraquino, M.ª A.:
Construcciones pronominales anómalas. |
| 21 | Durán-Lóriga, M.:
El hombre y el diseño industrial. | 71 | Fernández Bastarreche, F.:
Sociología del ejército español en el siglo XIX. |
| 32 | Acosta Méndez, E.:
Estudios sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico. | 72 | García Casanova, J. F.:
La filosofía hegeliana en la España del siglo XIX. |
| 40 | Estefanía Álvarez, M.ª del D. N.:
Estructuras de la épica latina. | 73 | Meya Llopart, M.:
Procesamiento de datos lingüísticos. Modelo de traducción automática del español al alemán. |
| 53 | Herrera Hernández, M.ª T.:
Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham. | 75 | Artola Gallego, M.:
El modelo constitucional español del siglo XIX. |
| 54 | Flaquer Montequi, R.:
Breve introducción a la historia del Señorío de Bultrago. | 77 | Almagro-Gorbea, M., y otros:
C-14 y Prehistoria de la Península Ibérica. |

- 94 Falcón Márquez, T.:
La Catedral de Sevilla.
- 98 Vega Cernuda, S. D.:
J. S. Bach y los sistemas contrapuntísticos.
- 100 Alonso Tapia, J.:
El desorden formal de pensamiento en la esquizofrenia.
- 102 Fuentes Florido, F.:
Rafael Cansinos Assens (novelista, poeta, crítico, ensayista y traductor).
- 110 Pitarch, A. J., y Dalmases Balañá, Nuria:
El diseño artístico y su influencia en la industria (arte e industria en España desde finales del siglo XVII hasta los inicios del XX).
- 113 Contreras Gay, J.:
Problemática militar en el interior de la península durante el siglo XVII. El modelo de Granada como organización militar de un municipio.
- 116 Laguillo Menéndez-Toñosa, R.:
Aspectos de la realeza mítica: el problema de la sucesión en Grecia antigua.
- 117 Janés Nadal, C.:
Vladimir Holan. Poesía.
- 118 Capel Martínez, R. M.ª:
La mujer española en el mundo del trabajo. 1900-1930.
- 119 Pere Julià:
El formalismo en psicolingüística: Reflexiones metodológicas.

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Calculador en una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santjuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugastl Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de *saccharomyces cerevisiae*.
- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.

- 48 García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 Trillas, E., y Alsina, C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.
- 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 $4H_c$ 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.^a D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moltner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II 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 Agullar 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 Álvarez, 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 morfométrico, óptico y ultraestructural de los Inmucitos 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.ª:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.
- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirotrópica.

Serie Roja

(Geología, Ciencias Agrarias, Ingeniería, Arquitectura y Urbanismo)

- 3 Velasco, F.:
Skarns en el batolito de Santa Olalla
- 6 Alemán Vega, J.:
Flujo inestable de los polímeros fundidos.
- 9 Fernández-Longoria Pinazo, F.:
El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.
- 13 Fernández García, M.ª P.:
Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.
- 15 Ruiz López, F.:
Proyecto de inversión en una empresa de energía eléctrica.
- 23 Basterreche Alfaro, M.:
Un modelo simple estático.
- 24 Martín Sánchez, J. M.:
Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo.
- 31 Zapata Ferrer, J.:
Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.
- 33 Ordóñez Delgado, S.:
Las Bauxitas españolas como mena de aluminio.
- 35 Juvé de la Barreda, N.:
Obtención de series aneuploides en variedades españolas de trigo común.
- 36 Alarcón Álvarez, E.:
Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.
- 38 Lasa Dolhagaray, J. M., y Silván López, A.:
Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera.
- 41 Sandoval Hernández, F.:
Comunicación por fibras ópticas.
- 42 Pero-Sanz Elorz, J. A.:
Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.
- 43 Santiago-Alvarez, C.:
Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus.
- 46 Ruiz Altisent, M.:
Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica.
- 58 Serradilla Manrique, J. M.:
Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros.
- 64 Farré Muntaner, J. R.:
Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido.
- 79 Fraga González, B. M.:
Las Giberelinas. Aportaciones al estudio de su ruta biosintética.
- 81 Yáñez Parareda, G.:
Sobre arquitectura solar.
- 83 Díez Viejobueno, C.:
La Economía y la Geomatemática en prospección geoquímica.
- 90 Pernas Galí, F.:
Master en Planificación y Diseño de Servicios Sanitarios.
- 97 Joyanes Pérez, M.ª G.:
Estudios sobre el valor nutritivo de la proteína del mejillón y de su concentrado proteico.
- 99 Fernández Escobar, R.:
Factores que afectan a la polinización y cuajado de frutos en olivo (Olea europaea L.).
- 104 Oriol Marfá I Pagés, J.:
Economía de la producción de flor cortada en la Comarca de el Mesesme.

- 109 García del Cura, M.^a A.:
Las sales sódicas, calcosódicas y magnésicas de la cuenca del Tajo.
- 112 García-Arenal Rodríguez, F.:
Mecanismos de defensa activa en las plantas ante los patógenos. Las Fitotoalexinas en la interacción Phaseolus vulgaris-Botrytis cinerea.
- 114 Santos Guerra, A.:
Contribución al conocimiento de la flora y vegetación de la isla de Hierro (Islas Canarias).
- 120 Vendrell Saz, M.:
Propiedades ópticas de minerales absorbentes y su relación con las propiedades eléctricas.

Serie Azul

(Derecho, Economía, Ciencias Sociales, Comunicación Social)

- 17 Ruiz Bravo, G.:
Modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos.
- 34 Durán López, F.:
Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obreros y empleados.
- 37 Lázaro Carreter, F., y otros:
Lenguaje en periodismo escrito.
- 74 Hernández Lafuente, A.:
La Constitución de 1931 y la autonomía regional.
- 78 Martín Serrano, M., y otros:
Seminario sobre Cultura en Periodismo.
- 85 Sirera Oliag, M.^a J.:
Las enseñanzas secundarias en el País Valenciano.
- 108 Orizo, F. A.:
Factores socio-culturales y comportamientos económicos.

