

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 (Castello, 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.

Estos trabajos 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.

Este trabajo fue realizado con una Beca de la Convocatoria de Programas, 1973, en equipo. Departamento de Biología. Centro de trabajo: Facultad de Ciencias de Granada y Facultad de Ciencias de Madrid.

Fundación Juan March



FJM-Uni 92-Cor
Estudios estructurales de la glucógen
Cortijo Mérida, Manuel.
1031603



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa *b*

Manuel Cortijo Mérida y
Francisco García Blanco

FJM

Uni-
92

Cor

92

Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b/Manuel Cortijo Mérida y Francisco García Blanco

Fundación Juan March

Serie Universitaria

92

Estudios estructurales
de la glucógeno
fosforilasa *b*



MANUEL CORTIJO MERIDA

FRANCISCO GARCIA BLANCO

Colaboradores:

Colaboradores:

Juan Llor Esteban
Juan S. Jiménez Martínez
Enrique López-Cantarero Vargas

Gerardo Echevarría Gorostidi
Carlos Gutiérrez Merino



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

Fundación Juan March (Madrid)

La Fundación Juan March no se solidariza necesariamente con las opiniones de los autores cuyas obras publica.

Depósito Legal : M - 13623 - 1979
I.S.B.N. 84 - 7075 - 128 - X
Ibérica, Tarragona, 34, - Madrid - 7

A nuestro maestro
Pr. A. Roig Muntaner

También quisiéramos expresar nuestro agradecimiento a la Fundación J. March que con su Ayuda - no sólo hizo posible este trabajo, sino que plantó la semilla que permitió empezar a trabajar con la glucógeno fosforilasa en nuestro país. Hoy en día esta semilla ha germinado en tres centros distintos con un total de una docena de tesis doctorales realizadas o en curso de realización y más de una veintena de publicaciones, que quizás sin ese apoyo inicial no hubieran podido llevarse a cabo.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	5
1.1. Generalidades	5
1.2. Antecedentes bibliográficos	7
2. MATERIALES Y METODOS	13
3. RESULTADOS	15
3.1. Sitio del PLP	15
3.2. Sitio del AMP	26
3.3. Modificación de tirosinas	40
4. DISCUSION	48
4.1. Sitio del PLP	48
4.2. Sitio del AMP	50
4.3. Modificación química	53
5. BIBLIOGRAFIA	56

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

Para entender el control metabólico en un sentido amplio, hemos de ser capaces de describir los diversos factores que determinan el flujo de sustratos a través de una determinada ruta metabólica. Es decir, la disponibilidad de sustratos y cofactores, la actividad catalítica de las enzimas que intervienen en dicha ruta, la cantidad de cada enzima presente, la demanda de sustrato inicial o intermedios por las diversas reacciones en competición, etc. El flujo a través de toda la ruta puede modularse mediante el enlace de moléculas efectoras en el sitio activo, o en otra parte, de cualquier enzima de dicha ruta metabólica.

El estudio de las propiedades de una enzima aislada es una etapa necesaria, y previa, para poder abordar el estudio de complejos multienzimáticos a un nivel molecular, y por lo tanto, el de una determinada ruta metabólica.

La enzima objeto de nuestro estudio es la glucógeno fosforilasa (E.C.2.4.1.1.) que regula la primera etapa de la ruta metabólica por la cual el glucógeno se transforma en glucosa-6-fosfato y de ésta en energía.

Aunque el equilibrio de la reacción catalizada por la fosforilasa es de cuatro a uno a favor de la síntesis del glucógeno, el bajo nivel de glucosa-1-

fosfato en la célula (debido a que el equilibrio de la fosfoglucomutasa es 17 a 1 a favor de la glucosa-6-fosfato) y la alta concentración de fosfato, aseguran que la reacción catalizada por la fosforilasa in vivo sea la rotura del glucógeno. Para el proceso de síntesis de glucógeno existe otra enzima, la glucógeno sintetasa.

Ambas enzimas están sometidas a un complicado sistema de control por mediación de varias enzimas interconvertibles. Una descripción detallada puede encontrarse en las varias revisiones que se han efectuado hasta la fecha (1-2).

Un resumen de los sitios más importantes de la glucógeno fosforilasa, así como su disposición espacial se da en la figura 1.

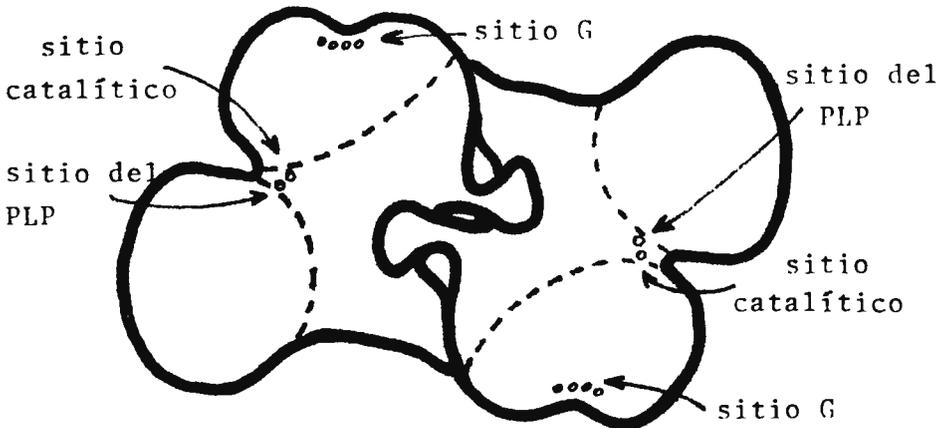


Fig. 1 Esquema de la estructura del dímero de glucógeno fosforilasa, de acuerdo con los datos de difracción de rayos X (4,5).

1.2 ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

De la naturaleza exacta de la reacción catalítica y el sitio activo, prácticamente no se conoce nada (1,2). Algunos estudios se han hecho con análogos de sustratos, pero sólo se han obtenido conclusiones muy generales.

Las propiedades físicas se conocen bastante bien, máxime desde que se dispone de resultados de difracción de rayos X, a una resolución de 3 Å (3,4). Se conoce la estructura primaria del protómero que está constituido por un total de 841 restos aminoácidos (5).

1.2.1 SITIO DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL

La presencia de cantidades estequiométricas de fosfato de piridoxal (PLP) en esta enzima es una importante característica que se ha preservado en el curso de la evolución (1). A causa del parecido entre las propiedades de absorción del sitio del PLP en fosforilasa y la de complejos formados entre el cofactor y ciertos aminoácidos, Kent, Krebs y Fischer (6) propusieron que, a pH neutro, el PLP se enlazaba a la proteína mediante una estructura de aldimina sustituida, implicando un grupo amino de la proteína y otro grupo X, que podría ser un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo y que nunca ha sido identificado.

Posteriormente, Shaltiel y Cortijo (7) rea

lizaron estudios de absorción y fluorescencia con fosforilasa b y con compuestos modelos. Estos resultados les llevaron a proponer que, a pH neutro, el PLP en la fosforilasa estaba formando una estructura de base de Schiff y embebido en una bolsa hidrofóbica. Posterior apoyo a esta hipótesis se obtuvo con el estudio de la fosforilasa reducida con NaBH_4 (8).

Honikel y Madsen (9) estudiaron los espectros de absorción y fluorescencia del PLP y algunos de los aductos que forma con aminas primarias en metanol, dioxano y cloroformo. Ellos concluyeron que la fosforilasa contiene una estructura de carbinolamina en la que el PLP está unido, además del grupo amino, a un grupo que posee un carácter nucleofílico.

En vista de las anteriores discrepancias - hemos pretendido demostrar de una forma inequívoca la forma de unión del PLP a la enzima, así mismo como encontrar la razón de la no reducibilidad de este cofactor con BH_4Na cuando se encuentra unido a la enzima a pH neutro.

1.2.2 SITIO DEL AMP

Desde los primeros estudios de Cori et.al. (10,11) con fosforilasa b de músculo de conejo, se observó que la actividad de la enzima únicamente era apreciable en presencia de adenosin-5'-monofosfato (AMP). El mecanismo de la activación y el papel exacto que juega en ella el AMP, permanece por ahora desconocido.

No obstante existen datos cinéticos (12,13) que demuestran la presencia de fuertes interacciones - homotrópicas y heterotrópicas entre el activador alostérico (AMP), el inhibidor alostérico y los sustratos y estudios de diálisis en el equilibrio que indican la existencia de competiciones entre el activador alostérico y el inhibidor, aunque dicha competición no parece que sea directa (12).

El hecho de que el AMP sea necesario para la activación de la enzima, y además sea un efector -- alostérico, hacía imprescindible, a nuestro juicio, un estudio sistemático con el fin de : a) Asignar a cada parte de la molécula de AMP, un papel determinado en el proceso de activación; y b) Estudiar la influencia estructural en la enzima, cuando en lugar de AMP, se trabaja con un análogo suyo.

La relación de los análogos utilizados, es la siguiente:

Modificación en la base

Nombre	Abreviatura	Grupo eliminado del AMP	Grupo añadido al AMP
Inosin-5'monofosfato	IMP	NH ₂ en 6	OH en 6
6-Cloroadenosin-5'-monofosfato	ClAMP	NH ₂ en 6	Cl en 6
6-N-Metiladenosin-5'monofosfato	N-6-Me-AMP	H en N en 6	CH ₃ en N en 6
1-N-Metiladenosin-5'-monofosfato	N-1-Me-AMP	-----	CH ₃ en 1

Modificación en el azúcar

Deoxyadenosin-5'-monofosfato	dAMP	OH en 2'	H en 2'
------------------------------	------	----------	---------

Deoxyinosin-5'	dIMP	NH ₂ en 6'	OH en 6'
-monofosfato		OH en 2'	H en 2'

Modificaciones en
la posición del
fosfato

Adenosina-3'- monofosfato	AMP-3'
------------------------------	--------

Adenosina-2'- monofosfato	AMP-2'
------------------------------	--------

1.2.3 GRUPOS FUNCIONALES

Aunque el estudio más directo de la reacción catalítica, consiste en estudiar la actividad enzimática en presencia o ausencia de efectores o de análogos de estos (ya mencionados anteriormente), es posible también abordarlo a partir de marcajes químicos y de esta forma localizar los grupos implicados en el proceso catalítico.

La fosforilasa tiene nueve grupos sulfhidrido que se valoran a diferente velocidad (14,15). Dos grupos, lo hacen a una velocidad similar a la de los compuestos modelos, lo que sugiere que son muy accesibles a los reactivos químicos. La pérdida de estos dos grupos, parece tener poco efecto sobre la estructura y actividad de la enzima. Otros dos grupos SH reaccionan mucho más lentamente que los anteriores, y su bloqueo da lugar una total inactivación de la enzima, así como a su disociación en monómeros. Los grupos restantes no reaccionan a velocidad apreciable, salvo en condicio-

nes de desnaturalización.

Diversos autores han demostrado que los -- grupos ϵ -amino de residuos de lisina son importantes -- para la estructura y actividad de la fosforilasa (16 -- 18). Anderson y Graves (19) han observado que la incu-- bación de la fosforilasa b con bajas concentraciones -- de 8-[m-(m-fluor sulfenilbenzamida)tio bencil adenina] -- da lugar a una especie activa en ausencia de AMP (26%) -- y que no fija el efector alostérico.

La importancia de las tirosinas en las pro-- piedades enzimáticas, no ha sido ampliamente estudia-- da, aunque recientemente ha sido descrita su posible -- implicación en la unión del AMP (20). Por esta razón -- hemos creído conveniente estudiar su importancia e im-- plicación en la actividad de la fosforilasa.

Dos reactivos han sido utilizados en el -- presente trabajo para el bloqueo de tirosinas. El te-- tranitrometano (TNM) y la sal de Fremy (SF).

1.2.3.1 Tetranitrometano

El tratamiento de tirosina con TNM da lu-- gar a nitrotirosina, que presenta a pH alcalino, una -- banda con un máximo a 428 nm y $\epsilon=4.100$. A pH ácido la -- banda se desplaza a 360 nm con un $\epsilon=2700$.

La reacción de tetranitrometano con la en-- zima, puede dar lugar a reacciones secundarias con los -- grupos sulfhidriilo, dando finalmente en algunos casos -- ácido cisteico (21).

1.2.3.2 Sal de Fremy

La sal de Fremy, nitrosodisulfonato potásico, $(NO(SO_3)_2K_2)$ reacciona con tirosina para dar lugar al correspondiente dopacromo, una quinona, (22) y ha sido utilizado para caracterizar dichos grupos en proteínas (22,23).

La sal de Fremy fué elegida, entre otros reactivos, para modificar los residuos de tirosina de la fosforilasa por las condiciones suaves en que se produce la reacción.

La sal de Fremy, además, no reaccionaba con β -mercaptoetanol (MF) ni cisteína, indicando con esto que la reaccionabilidad de los grupos tiol de fosforilasa no interferiría la interpretación de los resultados.

2. MATERIALES Y METODOS

La fosforilasa b de músculo de conejo fué preparada según el método de Fischer et. al. (24) modificado por Krebs et. al. (25), recristalizándola siempre al menos tres veces antes de su utilización.

El AMP se eliminaba de la fosforilasa pasando una disolución concentrada de enzima por una columna de Sephadex G-25 de 1,5 x 25 cm, o bien utilizando columnas de charcoal-sephadex G-25 (26) de 0,5 x 3 cm. Se consideraba eliminado el AMP cuando la relación $\Lambda_{260}/\Lambda_{280}$ era menor de 0,53.

La concentración de enzima se medía, una vez eliminado el AMP, a partir de su absorción a 280 nm utilizando un ϵ de 1,32 cm²/mg (13). La masa molecular por protómero fué tomada como 97000 (27).

La apoenzima se preparaba mediante el uso de L-cisteína en un medio deformante (28). La reconstitución con fosfato de piridoxal restauraba los niveles primitivos de actividad.

La albúmina, cristalizada, fué obtenida de Calbiochem. Su concentración era medida a partir de su absorción a 280 nm, usando un ϵ de 6,6.10² cm²/g. (29) a pH 7 y una masa molecular de 67.000 (30). Los ácidos grasos fueron eliminados siguiendo el método propuesto por Chen (31).

El AMP se obtuvo de Fluka, su concentración en disoluciones acuosas era determinada midiendo su absorción a 259 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 15.400 a pH neutro (32).

El PLP se obtuvo de Merck. Su concentración en disoluciones acuosas se medía a partir de su absorción a 388 nm., en NaOH 0,1 M.; coeficiente de extinción molar, 6.600 (33). Los complejos PLP-albúmina se formaban a pH 7 y concentración 2 mM durante 24 horas, diluyéndose a las condiciones necesarias en el momento del experimento.

La actividad enzimática se medía por los métodos de Helmreich y Cori (34), en el sentido de degradación del glucógeno y el de Hedrick y Fischer (35) en el de síntesis. En algunas ocasiones se usó el de Palter et.al. (36).

Las cisteínas se valoraron por el procedimiento de Ellman (37) con DTNB a una concentración de 2,5 mM. La cinética se seguía midiendo la absorción a 430 nm.

Se utilizaron indistintamente los espectrofotómetros Beckman modelo 25 y Coleman 55 en espectros copia visible-ultravioleta. Para RMN se usó un Perkin Elmer R12B y para fluorescencia un Aminco. Los espectros infrarrojos fueron realizados con un Perkin Elmer modelo 457.

Los análisis de aminoácidos se realizaron con un Jeol tipo GLC GAH. Los estudios de agregación de la enzima se realizaron con una centrífuga Beckman, Spinco Modelo E.

3. RESULTADOS

3.1 SITIO DEL PLP

En este apartado se ha pretendido demostrar de una forma inequívoca que la unión del PLP a la enzima, se efectúa por medio de una base de Schiff, y que dicha unión se realiza en un entorno hidrofóbico. Para ello hemos considerado necesario el estudio espectroscópico de modelos simples, al mismo tiempo que hemos pretendido encontrar una explicación al hecho de que la enzima, no pueda reducirse por BH_4Na a pH neutro.

3.1.1 ESPECTROSCOPIA

Los espectros de absorción del aducto formado por el PLP y la hexilamina se dan en la figura 2. En ella pueden observarse tres puntos isosbéticos a 266, 295 y 357 nm, que indican claramente la existencia de un equilibrio entre dos especies, A y B, con máximos a 415 y 335 nm, respectivamente.

Este equilibrio puede tomarse como un "proceso modelo" en el sentido descrito por Kosower (38) - pues convierte un ión dipolar (máxima interacción con el disolvente) en una especie neutra (mínima interacción con el disolvente). Por lo tanto podría usarse pa

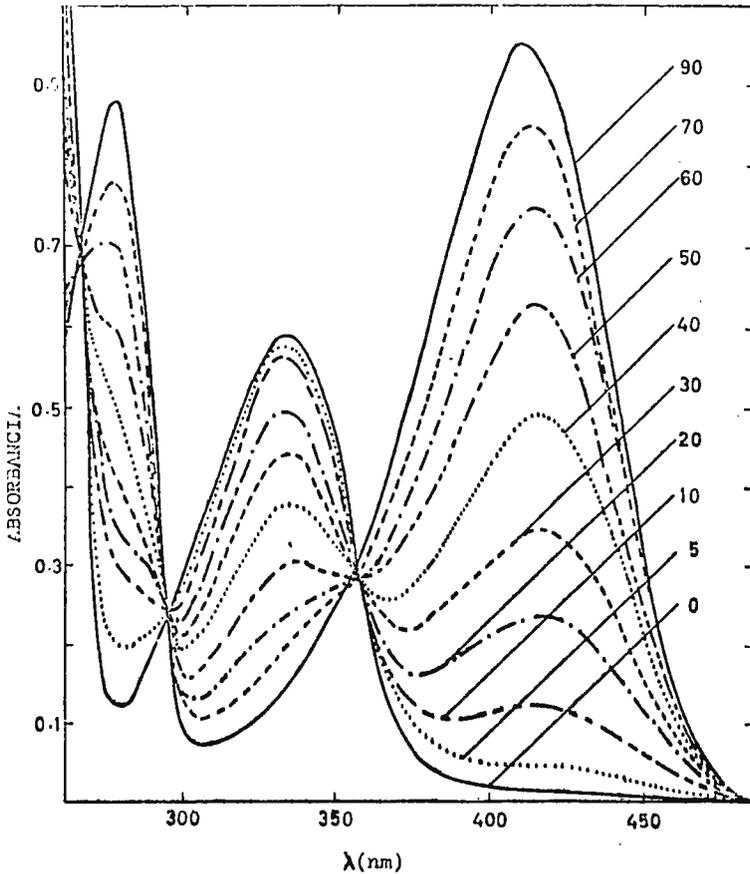


Fig. 2 Espectro de absorción de PLP (0,15 M)+n-hexilamina (0,01M) en mezcla dioxano-agua. Los números de la figura indican el porcentaje de agua (v/v) en cada caso.

ra medir la polaridad de los disolventes. El parámetro escogido por nosotros es la energía libre de Gibbs -- standard para dicho proceso, $\Delta G^\circ = -RT \ln K$, donde K es la constante de equilibrio entre las formas A y B. El cálculo de dicha constante, y por lo tanto de ΔG° , únicamente es posible si conocemos los coeficientes de ex

tinción, de las dos formas presentes A y B.

Si suponemos que los ϵ de las formas A y B a 335 nm y 415 nm respectivamente son cero, se obtiene (39)

$$A_{415} = C \epsilon_A - \frac{\epsilon_A}{\epsilon_B} A_{335}$$

Por lo tanto una representación de A_{415} -- frente a A_{335} debe de dar una línea recta, siempre que la concentración total permanezca constante. Ello es -- así, obteniéndose los valores de 8400 y 4000 para los coeficientes de extinción de las formas A y B respectivamente.

Si las suposiciones anteriores son correctas debe existir una correlación lineal entre los valores de ΔG° para cada disolvente y un parámetro que mida su polaridad, como por ejemplo el valor de Z de Kosower (38) de amplio uso en la bibliografía. En la figura 3 vemos que en efecto se obtiene una línea recta, cuyo ajuste por mínimos cuadrados nos da la ecuación:

$$Z = 87,7 + 9.08 \Delta G^\circ \text{ (Kcal/mol)}$$

Por lo tanto la medida de la razón de absorbancias a 335 y 415 nm del PLP unido a una proteína nos permite calcular ΔG° y de él la micropolaridad del sitio de -- unión.

Con objeto de decidir entre la base de --- Schiff y la carbinolamina se efectuaron espectros IR y de RMN del aducto formado por el PLP y la hexilamina. El espectro IR da una banda de absorción a 1650 cm^{-1} , típica de la vibración de tensión del grupo C=N.

A partir de su espectro RMN se obtiene una evidencia adicional de una configuración trigonal(sp^2)

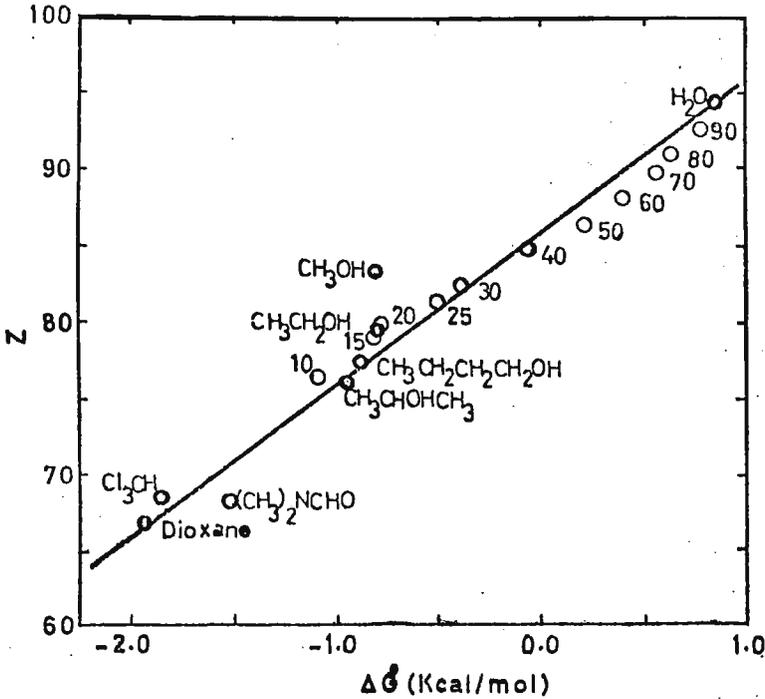


Fig. 3 Relación entre la energía libre de Gibbs estándar (ΔG°) y la polaridad del disolvente (Z).
 del carbono en 4'. Cuando se compara la posición de esta señal con la óxima del piridoxal (40) y sus bases de Schiff en agua (41) y en metanol (40), se concluye que la señal a 1 ppm se debe al proton del carbono 4' de la azometina en posición trans. Si fuese una carbonolamina aparecería a campos mayores. Por ejemplo: en el hidrato de PLP aparece a 3.5 ppm (40); en el aducto cisteína-piridoxal a 3,6 (41) y en los aductos del piridoxal con homocisteína e histidina aparece a 3.3 ppm (41).

Por último estudiaremos en este apartado la estequiometría de los complejos formados por el PLP con la albúmina. Esta fué obtenida por valoración de

albúmina con PLP, siguiendo el aumento de absorbancia a 335 y 415 nm, encontrándose que se formaba un complejo de estequiometría 1:1 (llamado sitio I) y otro complejo cuya estequiometría no se podía precisar bien -- (sitio II). Con el fin de precisar al máximo las condiciones experimentales de formación del complejo se realizaron así mismo las valoraciones por fluorescencia.

Como se puede observar en la figura 4, la valoración de albúmina con PLP a una concentración 6,2 μ M en proteína, y pH 7, fue llevada a cabo excitando las muestras a 280 nm (máximo de excitación de la albúmina) y a 330 nm (máximo de excitación del PLP). Las estequiometrías encontradas son 1:1 y 2:1 para los sitios I y II respectivamente. Además, la figura parece indicar que las constantes de disociación de estos complejos deben de ser muy bajas.

Las características espectrales del complejo I son similares a las del sitio del PLP en fosforilasa, el cual presenta también dos bandas a 335 nm y 415 nm, si bien la relación de absorbancias de ambas longitudes de onda, 335:415, es muy ligeramente superior en fosforilasa. Igualmente, tampoco es posible su reducción a pH 7 con NaBH_4 ; en ambos hechos basamos su utilización como modelo del sitio del PLP en fosforilasa.

3.1.2 POLAROGRAFIA

En este apartado se describen los resultados polarográficos tanto del complejo PLP/cisteína, co

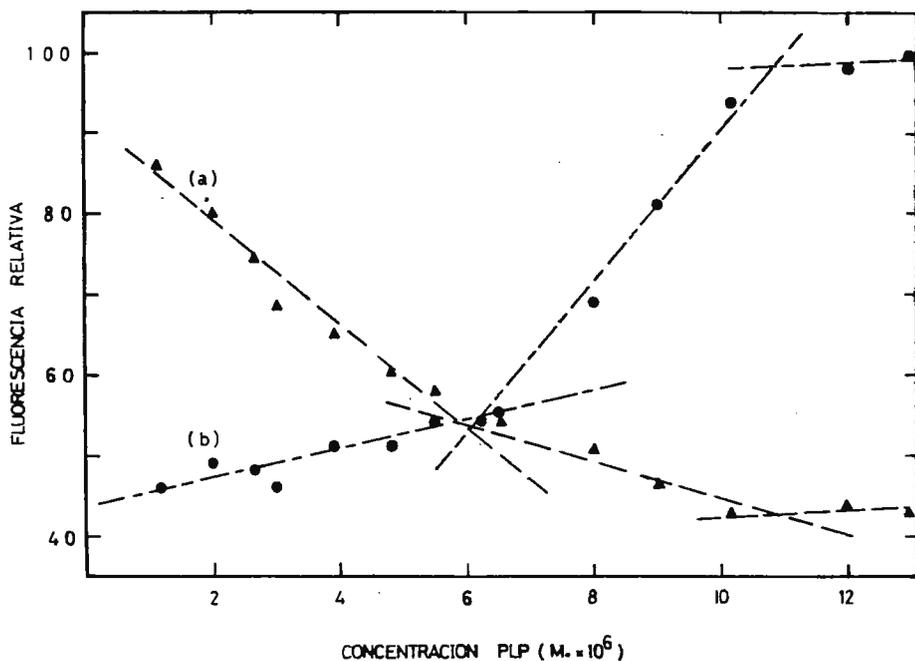


Fig. 4 Estequiometría del complejo PLP-albúmina.

(a) $E_x = 280 \text{ nm}$; $E_m = 350 \text{ nm}$; (b) $E_x = 330 \text{ nm}$; $E_m = 400 \text{ nm}$

mo de los dos complejos que forma con la albúmina y que han sido caracterizados en el apartado anterior. También se describen los obtenidos con fosforilasa a varios pH. Estos resultados junto al estudio previamente realizado con el PLP y sus bases de Schiff en función del pH y polaridad del medio (42) no sólo han confirmado la hipótesis sobre la forma de unión del PLP a la fosforilasa sino que han explicado satisfactoriamente su no reductibilidad con BH_4Na a pH neutro.

3.1.2.1 Complejo PLP-cisteína

Se efectuó a una concentración de complejo de 0,45 mM, en medio acuoso y utilizando como tampón - una disolución de fosfato 0,2M, pH 7 que servía a su vez como disolución de fondo.

En el polarograma aparecían dos ondas a potenciales de onda media de -0,74 y -1,38 voltios, atribuibles a las hidrogenolisis de los enlaces C-S y C-N (43).

Si el polarograma se efectúa en N,N' Dimetilformamida (DMF), las dos ondas aparecen a -0,39 y -1,61 voltios respectivamente.

3.1.2.2 Complejos PLP-albúmina

Los resultados obtenidos con el complejo - albúmina-PLP 1:1 se dan en la Tabla I.

TABLA I

Influencia del pH sobre la reducción del complejo PLP-albúmina (sitio I). (c=0.10mM).

pH	i (μ A)	-E _{1/2} (V)	n α
2,6	0,48	0,52	1,0
3,7	0,46	0,60	1,0
4,3	0,36	0,64	1,0
5,1	0,47	0,69	0,8
7,5	0,15	1,02	0,4
8,0	0,25	1,03	0,3

Los valores de intensidad (i), potencial -

de semionda ($E_{1/2}$) y $n\alpha$, para pH ácido, indican que la onda podría atribuirse a PLP libre en disolución. Como puede observarse, el valor de i disminuye a medida que el pH aumenta, lo cual es explicable, si consideramos que la disociación del complejo PLP-albúmina aumenta con la acidez (29). A pH neutro, aparece una onda a potencial mucho más negativo, muy diferente de la onda del PLP libre o de sus bases de Schiff, y que en principio podría pensarse que corresponde a la reducción del PLP en el sitio I. Como la intensidad de la onda no es proporcional a la concentración del complejo PLP-albúmina, el potencial de semionda varía ligeramente con ella, y los valores de $n\alpha$ son muy bajos es lógico pensar que la onda sea de tipo catalítico. Una confirmación a esta hipótesis se obtiene, al observar una variación del potencial de semionda con la columna de mercurio y el fondo utilizado.

En la bibliografía existe evidencia de que a veces, los protones o iones del medio se reducen más fácilmente adsorbidos que en disolución (44), dando origen a ondas catalíticas. Aquí existe la posibilidad de que la proteína catalice dicha reducción. Por esta razón, se ha procedido al estudio de albúmina sola.

En la tabla II se resumen los resultados obtenidos al hacer polarografía de albúmina a pH neutro

TABLA II
Polarografía de albúmina a pH neutro

h (cm)	i (μ A)	$-E_{1/2}$ (V)	$n\alpha$
12,5	0,48	1,11	0,4
24,5	0,72	1,12	0,4
34,5	0,55	1,075	0,4
34,5	0,56	1,05	0,3

la concentración fué 0,63 mM, excepto para la última - que fué 0,41mM.

Estos últimos resultados nos confirman la posibilidad apuntada anteriormente de que la onda obtenida corresponda a una reducción de los protones adsorbidos sobre la proteína y catalizada por la misma, y demuestran que el PLP en el sitio I del complejo con - albúmina no puede reducirse polarográficamente.

Los resultados obtenidos polarográficamente para el sitio II, a diferentes valores de pH se dan en la tabla III.

TABLA III

Influencia del pH sobre la polarografía del complejo - PLP-albúmina (sitio II). (c=0.10 mM).

pH	i (μ A)	-E 1/2 (V)	na
3,75	0,82	0,62	1,0
5,0	0,67	0,69	1,0
6,0	0,50	0,74	1,0
6,3	0,17	0,76	1,0
7,0	0,11	0,84	1,0

Comparando estos valores con los del sitio I (tabla I) se observa que a valores de pH entre 6 y 7 en los que ambos complejos son estables aparece una onda a -0,8 voltios, que puede atribuirse a la reducción del PLP en su sitio II.

3.1.2.3 Fosforilasa b

El polarograma de fosforilasa a pH neutro

(Tabla IV) muestra que los valores de $E_{1/2}$ y $n\alpha$ son -- idénticos a los del sitio I del complejo PLP-albúmina. La intensidad no obstante, es mucho mayor, lo que confirma que esta onda se debe a la reducción de protones unidos a la proteína, ya que la fosforilasa tiene un peso molecular mayor que la albúmina.

TABLA IV

Polarografía de holo y apofosforilasa a pH neutro.

enzima	i (μ A)	$-E_{1/2}$ (V)	$n\alpha$
holo (13 μ M)	1,52	1,03	0,29
apo (12 μ M)	1,51	1,07	0,30

Una confirmación de que esta onda no se debía a la reducción del PLP se obtuvo al hacer la polarografía de la apoenzima, que presenta una onda con -- las mismas características que la holoenzima (tabla IV).

Una razón de la imposibilidad de reducción del PLP sobre fosforilasa b podría ser debido a que el PLP se encuentra ocluido en el interior de la cadena polipeptídica.

La apoenzima se prepara haciendo reaccionar el PLP con cisteína, despues de que éste se "expona" por medio de un tampón "deformante" a baja temperatura (28). Por ello hemos intentado la reducción del PLP en presencia de citrato de imidazol a baja temperatura, pero sin añadir cisteína que se llevaría el PLP. En los polarogramas realizados en esas condiciones puede observarse una onda a un potencial de semionda menos negativo que el obtenido para las ondas de fosforilasa y apofosforilasa en glicerofosfato (tabla V), lo

que indica que otras sustancia electroactiva se está reduciendo en el electrodo.

El citrato de imidazol tanto a esta temperatura como a 25°C. no produce apreciables efectos sobre la onda de la apoenzima confirmando nuestra suposición.

TABLA V

Polarografía de fosforilasa en citrato de imidazol.

enzima	i(μA)	-E 1/2(V)	t.°C
holo	0,7	0,95	3
apo	1,7	1,07	3
apo	1,2	1,16	25

Fosforilasa 8μM en citrato de imidazol 0,4 M. pH neutro; Apofosforilasa 15μM en el mismo tampón.

3.2 SITIO DEL AMP

Con el fin de sistematizar los resultados, es conveniente hacer una división entre los análogos - con modificación en la base y aquellos en los que se - ha modificado el azúcar o la posición fosfato, ya que como veremos posteriormente sus efectos sobre la enzima son diferentes.

3.2.1 MODIFICACIONES EN LA PARTE BASICA

3.2.1.1 Estudios de diálisis

En estos estudios se ha pretendido verificar la competencia de los análogos por los sitios de unión a 25°C. Si tomamos como modelo el resultado obtenido para el desplazamiento de AMP radioactivo por AMP cualquier modificación química, salvo la introducción de un grupo metilo en posición 6, modifica la afinidad del compuesto por la enzima aunque es imposible conocer, por ahora, si dicha variación es atribuible a la modificación de un equilibrio transconformacional.

Desde el punto de vista del inhibidor alostérico, los resultados obtenidos son similares, es decir la glucosa-6-fosfato es desplazada con la misma eficiencia que el AMP, es decir según los valores de f_a de la Tabla VI.

TABLA VI

Resumen de los resultados del desplazamiento de AMPC¹⁴
por diferentes análogos a 25°C

Nucleótido	$10^4 K_{1/2}$	f_A
AMP	1,2	1,00
N-6-MeAMP	1,2	1,00
N-1-MeAMP	4,2	0,29
ClAMP	3,3	0,36
IMP	2,0	0,60

3.2.1.2 Estudios cinéticos

Los resultados se dan en la tabla VII, donde $K_{1/2}$ (act.) es la concentración necesaria para producir la mitad del máximo de actividad de cada nucleótido. En las medidas de actividad únicamente se han considerado velocidades iniciales, estando los valores máximos de actividad de los diferentes análogos referidos al 100% de AMP.

TABLA VII

Datos cinéticos de la interacción fosforilasa b-nucleótido a 25°C.

Nucleótido	Max.activ.	$10^4 K_{1/2}$ (act.)	cooperatividad. ¹⁰⁵
AMP	100	0,70	4,0
N-6-MeAMP	85	0,70	4,0
N-1-MeAMP	86	6,0	0,55
ClAMP	80	2,0	4,88

El índice de cooperatividad se ha tomado como la rela-

ción entre el incremento de actividad y el incremento de concentración correspondiente al cambio en actividad.

Puede observarse que la acción del N-6-MeAMP sobre la actividad es muy parecida a la del AMP, mientras que el bloqueo del nitrógeno 1 tiene efectos muy importantes, especialmente sobre la cooperatividad.

Como la fosforilasa es una enzima alostérica, hemos estudiado el efecto de diferentes concentraciones de fosfato en el proceso de activación según el modelo de Monod (45). Buc (46) suponiendo que la unión del AMP a la enzima se produce únicamente en un estado conformacional obtuvo la ecuación

$$\left[\frac{V}{V_{\max} - V} \right]^{1/2} = \left[\frac{1}{L_0} \right]^{1/2} \left(1 + \frac{[P]}{K_p} \right) \left(1 + \frac{[A]}{K_A} \right)$$

donde V es la velocidad inicial de la reacción catalítica a concentración de nucleótido $[A]$ y de fosfato $[P]$, V_{\max} es la velocidad inicial máxima de la reacción a concentración de fosfato constante, L_0 la constante de equilibrio transformacional para las dos formas de enzima R y T en ausencia de ligando y K_p y K_A son respectivamente las constantes de disociación de los complejos enzima-fosfato y enzima nucleótido. En la figura 5 se da un ejemplo para observar que la unión de análogos a la enzima se produce según el modelo Monod. Los parámetros alostéricos calculados para los cuatro nucleótidos se dan en la Tabla VIII.

TABLA VIII

Constantes alostéricas de los complejos fosforilasa b nucleótidos a 25°C

Nucleótido	Lo	$10^2 K_p$	$10^4 K_A$
AMP	600	0,4	0,3
N-6-MeAMP	60	2,4	0,22
N-1-MeAMP	40	2,4	1,75
ClAMP	240	1,7	0,22

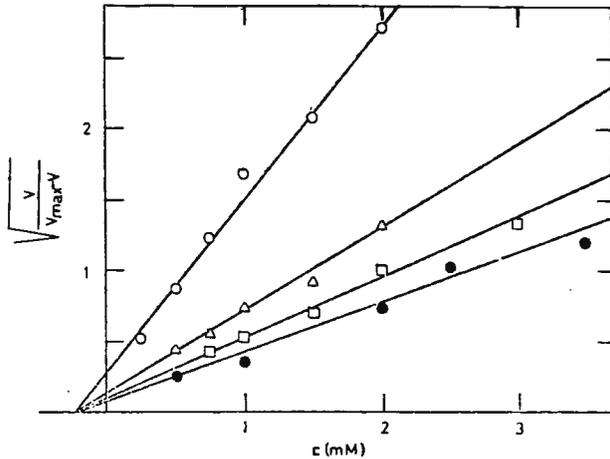


Fig. 5 Efecto de la concentración de ClAMP sobre la velocidad inicial catalítica. Concentraciones de fosfato: ● 3mM; □ 9mM; △ 18mM; ○ 54mM.

3.2.1.3 Efecto de la temperatura

El estudio más sistemático sobre la enzima se ha realizado a 4°C por Buc y col. (47). No obstante hasta el presente momento los resultados obtenidos se utilizan, considerándose válida su extrapolación.

ción, a 25°C. Por esta razón, hemos estudiado la variación de la actividad en función de la temperatura. Las medidas se han realizado para cada nucleótido a 4, 10, 16, 18, 25 y 30°C. Los resultados se dan en la figura 6, donde puede observarse que una representación de $-\log 1/K_{1/2}$ frente a $1/T$ no da una línea recta, sino que se produce una variación abrupta en las pendientes en el rango de temperatura de 16-18°C, independientemente del análogo estudiado, y que coincide con la previamente descrita para el AMP (48).

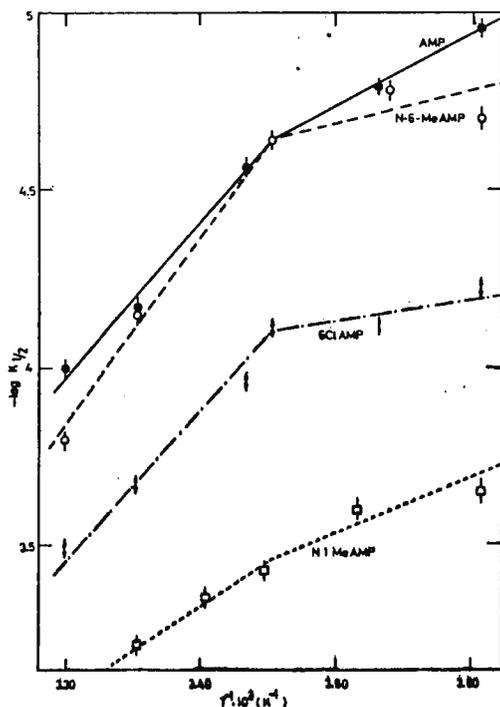


Fig. 6 Variación de la $K_{1/2}$ cinética de varios nucleótidos con el inverso de la temperatura.

3.2.1.4 Valoración de cisteínas

Los resultados obtenidos a 25°C con enzima sola muestran que es posible titular con DTNB dos residuos cisteína por cada mol de monómero. Todos los nucleótidos estudiados protegen la titulación de los dos SH citados aunque los mecanismos no parecen ser idénticos. Así a baja concentración de nucleótido, se produce en algunos casos, un débil incremento en la constante de titulación o bien para el N-1-MeAMP un incremento de cooperatividad positiva.

Los valores de las constantes K_1 y K_2 de semiprotección (los valores de las concentraciones de nucleótido necesarias para alcanzar la mitad de protección de las dos cisteínas lentas SH_1 y SH_2), se dan en la tabla IX.

TABLA IX

Constantes de semiprotección de los grupos cisteína.

Nucleótido	$10^4 K_1^{1/2}$	$10^4 K_2^{1/2}$
AMP	4,7	3,3
N-6-MeAMP	0,75	0,45
N-1-MeAMP	2,5	2,0
ClAMP	0,70	0,15

3.2.2 MODIFICACIONES EN OTRA PARTE DE LA MOLECULA

3.2.2.1 Estudios cinéticos

Un resumen de los resultados se da en la tabla X

TABLA X
Datos cinéticos a 25°C

Nucleótido	$10^4 K_a$	$10^3 K_i$	% Act.o inh. máximo
AMP	0,65	--	100
IMP	9,0	--	13
dAMP	4,2	--	4,7
dIMP	6,4	--	0,8
AMP-2'	---	1,2	70
AMP-3'	---	1,6	70

Todas las experiencias se han realizado a una concentración 12mM de fosfato inorgánico y 2,5mM de residuos glucosa de glucógeno.

En la figura 7 puede verse cómo afecta el fosfato a la inhibición de la actividad residual de la fosforilasa b por AMP-3' a 25°C. El proceso no presenta características de cooperatividad positiva, siendo la inhibición máxima total aproximadamente independiente de la concentración de fosfato inorgánico, aunque a 9,6 mM la inhibición se produce después de un ligero aumento de la actividad residual.

La inhibición de la fosforilasa b por AMP-2' a diferentes concentraciones de fosfato, se muestra en la figura 8. El porcentaje máximo de inhibición es el mismo que el del AMP-3', pero sin embargo el proceso da lugar a una ligera cooperatividad positiva dependiente de la concentración de fosfato. Hasta concentraciones 12mM de fosfato, éste aumenta la cooperatividad

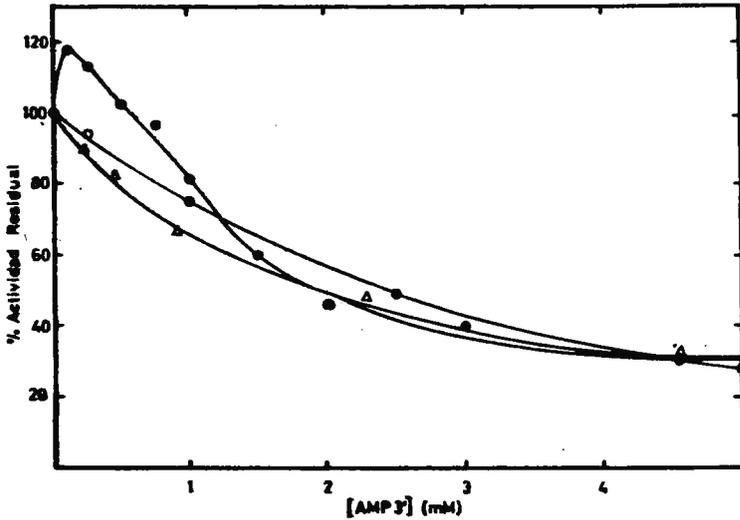


Fig. 7 Efecto del fosfato en la inhibición de la enzima producida por el AMP-3'. Concentraciones de fosfato: ○ 2.4mM; ● 9.6mM; △ 43mM.

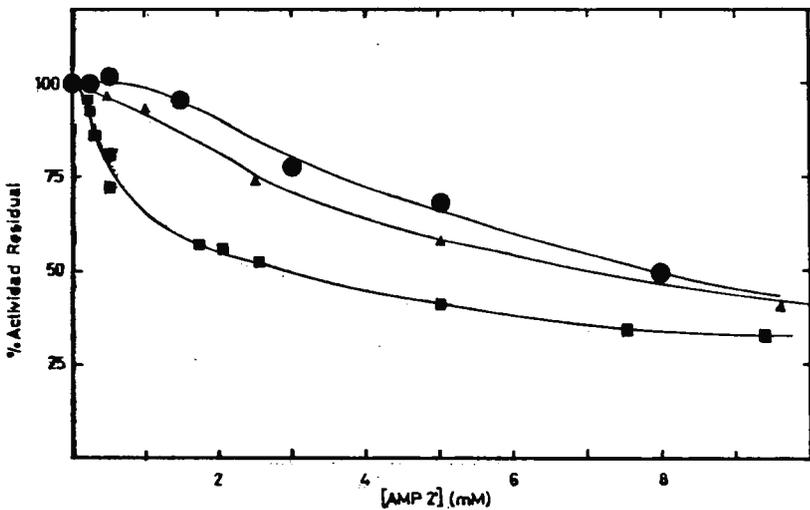


Fig. 8 Efecto del fosfato en la inhibición de la enzima producida por el AMP-2'. Concentraciones de fosfato: ▲ 2.4mM; ■ 9.6mM; ● 43mM.

del proceso de inhibición por AMP-2' y disminuye las K_i de AMP-2' y AMP-3'. Por encima de esta concentración el efecto se invierte en ambos casos.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos para el dAMP. En este caso, puede apreciarse una activación muy débil, así como una dependencia de ésta con la concentración de fosfato. A una concentración de fosfato 0,6mM el nivel de activación es mínimo alcanzando únicamente un valor del 160%, mientras que a otras concentraciones se llega a un 200% de la actividad residual. El proceso presenta cooperatividad positiva, como puede verse en una representación de inversos, aunque disminuye a altas concentraciones de fosfato.

Los resultados obtenidos con el dAMP a diversas concentraciones de fosfato se muestran en la figura 10. Puede apreciarse que a elevadas concentraciones de dAMP, se produce una disminución de la activación inducida en la enzima. La concentración de dAMP precisa para el comienzo de esta segunda región de la curva de activación es función de la concentración de fosfato, produciéndose en este caso las mismas anomalías descritas anteriormente.

Un análisis de la figura 10, muestra que la primera región de la curva sigue el tratamiento descrito para análogos en la base, lo que nos permite obtener valores de $K_A = 7 \cdot 10^{-5}$ y $L_0 = 150-200$.

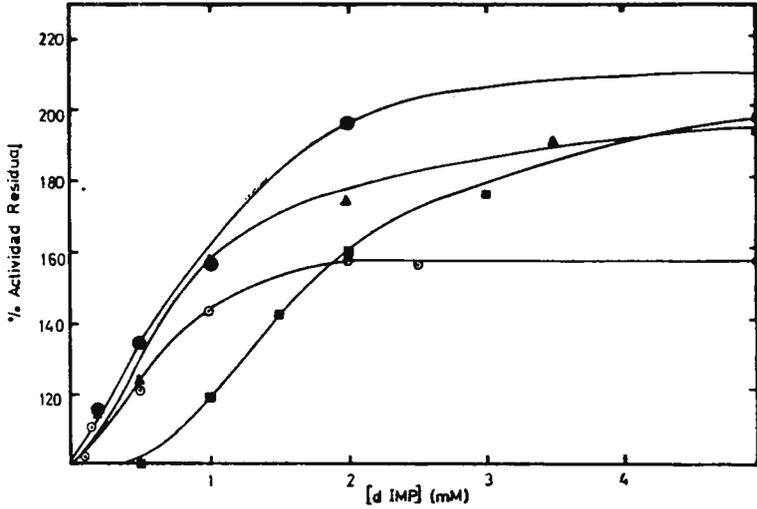


Fig. 9 Efecto del fosfato en la activación producida por el dIMP: ■ 2,4mM; ○ 9,6mM; ▲ 14mM; ● 43mM.

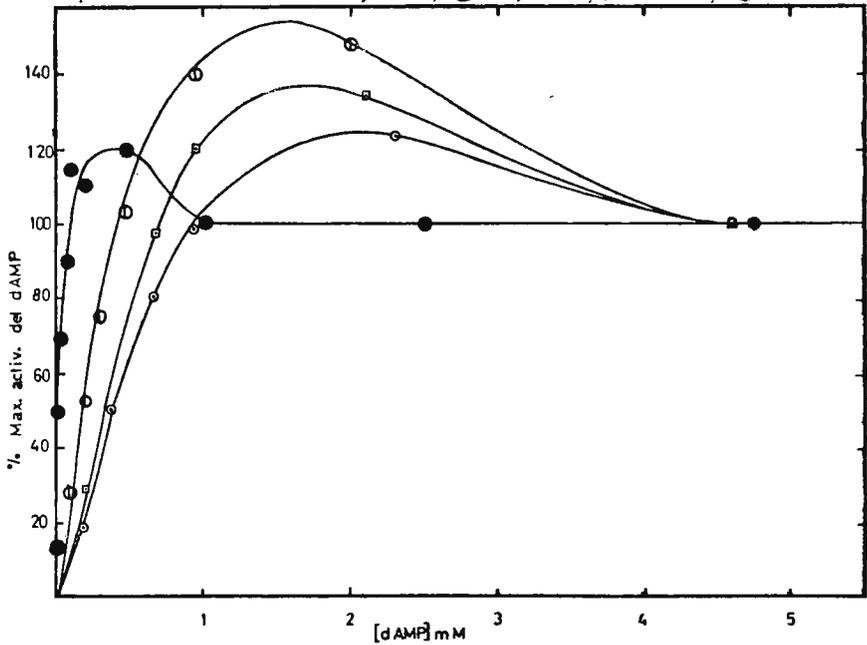


Fig. 10 Efecto del fosfato en la activación de la enzima producida por el dAMP: □ 1,4mM; ⊕ 2,4mM; ○ 9,6mM; ● 43mM

3.2.2.2 Efecto de la Temperatura

Los resultados obtenidos, se dan en la figura 11. Puede observarse de la misma manera que en el caso descrito de análogos en base, una discontinuidad aproximadamente a 16°C aunque en este caso existen diferencias muy netas entre el dAMP y dIMP y los demás -compuestos.

Los resultados indican que la temperatura de transición no se ve modificada apreciablemente por alteraciones en el entorno de los sitios de unión de -AMP en la enzima, aunque son capaces de producir grandes modificaciones en la activación, valoración de cis teínas lentas y agregación, a excepción del caso del -dAMP.

3.2.2.3 Estudios de diálisis

Los resultados indican que el dIMP desplaza muy mal el AMPC¹⁴ a 25°, lo que está en discrepancia con los valores obtenidos a 4° por Buc y col.(47), pero que quizá puede explicarse ante el comportamiento anormal de dicho compuesto, que no es capaz de reconocer la transición inducida por la temperatura.

Por otra parte el AMP-2' y AMP-3' desplazan completamente a 25°C al AMP radioactivo, mientras que el dAMP únicamente es capaz de desplazarle en un 50%, de acuerdo con los resultados obtenidos a 4°C(47)

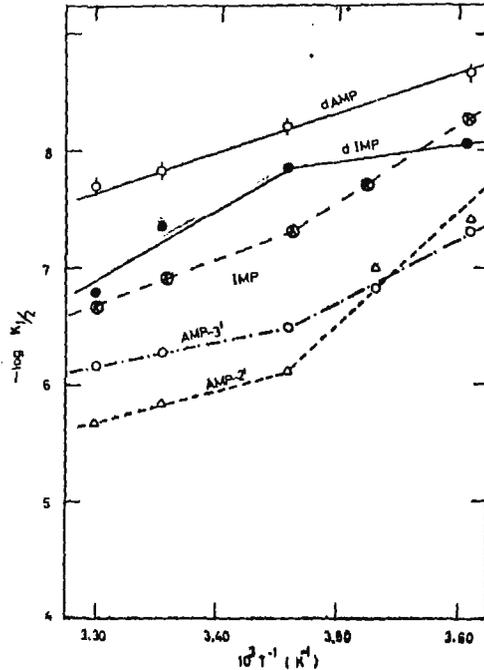


Fig. 11 Efecto de la temperatura sobre los valores de $K_{1/2}$ de activación o inhibición.

Las constantes de semidesplazamiento se dan en la tabla XI

TABLA XI

Valores de las constantes de semidesplazamiento de AMPC¹⁴

Nucleótido	$10^4 K_{1/2}$	$K_{1/2}$ relativa
AMP	1,2	1
AMP-2'	1,25	34
AMP-3'	1,55	37
dAMP	4	17
dIMP	10	36

El estudio del desplazamiento del inhibidor alostérico, como en el caso anterior, da lugar a -

competiciones, con constantes idénticas a las del AMP. Sin embargo existe en estos compuestos una profunda diferencia en su comportamiento con respecto al inhibidor alostérico, glucosa-6-fosfato. En todos los casos, son capaces de producir un desplazamiento de únicamente un 50%, lo cual es indicativo del importante papel de los grupos -OH de la ribosa y del fosfato, en esta competición específica.

3.2.2.4 Valoración de cisteínas

Las curvas de protección de las dos cisteínas lentas presentan un hábito diferente, sigmoideo o hiperbólico, para los diferentes nucleótidos. Así la valoración del grupo $-SH_2$ por el IMP y de los dos -SH lentos por el dIMP y dAMP siguen una variación hiperbólica.

En la tabla VII se han resumido las constantes de titulación de los grupos (SH_1) y (SH_2). Los valores del porcentaje de protección máxima, p , de cada SH por cada nucleótido, se han obtenido a partir de la relación entre el valor de la constante de velocidad a alta concentración de nucleótido y la constante de velocidad de valoración de ese SH por DTNB cuando se halla la enzima sola, sin nucleótido en disolución.

TABLA XII

Resultados de la protección de los SH lentos contra --
DTNB a 25°C

Nucleótido	$10^4 k_{1/2}(\text{SH}_1)$	p	$10^4 k_{1/2}(\text{SH}_2)$	p
AMP	4,7	75	3,3	75
IMP	6,5	52	2,8	50
dAMP	8,4	87	5,7	92
dIMP	7,5	35	2,8	50
AMP-2'	6,7	58	9,2	65
AMP-3'	5,7	52	2,5	50

3.3 MODIFICACION DE TIROSINAS

3.3.1 USO DE TNM

3.3.1.1 Inactivación

Con el fin de que el marcaje con TNM fuese lo más selectivo posible se utilizaron relaciones de TNM/F de 1 a 10 (figura 12). Si la relación era pequeña, no se conseguía una pérdida total de actividad, -- aún despues de cinco horas de reacción, alcanzándose -- una inactivación límite a las tres horas. Con el fin de revertir en lo posible la oxidación de grupos SH, -- en todos los casos la reacción se paraba con ME, incu-- hándose en este medio durante dos horas,

Como se puede apreciar en la figura 13, la enzima es protegida totalmente de la inactivación a re-- laciones molares de TNM/F suficientemente pequeñas, -- aunque al aumentar dicha relación decrece la efectivi-- dad de la protección. En las condiciones en que se con-- sigue una total pérdida de actividad, la presencia de AMP protege a la enzima de forma que únicamente se con-- sigue un 50% de la inactivación, aproximadamente.

3.3.1.2 Estudio de tirosinas y cisteínas

Despues de la reacción con TNM y previamen

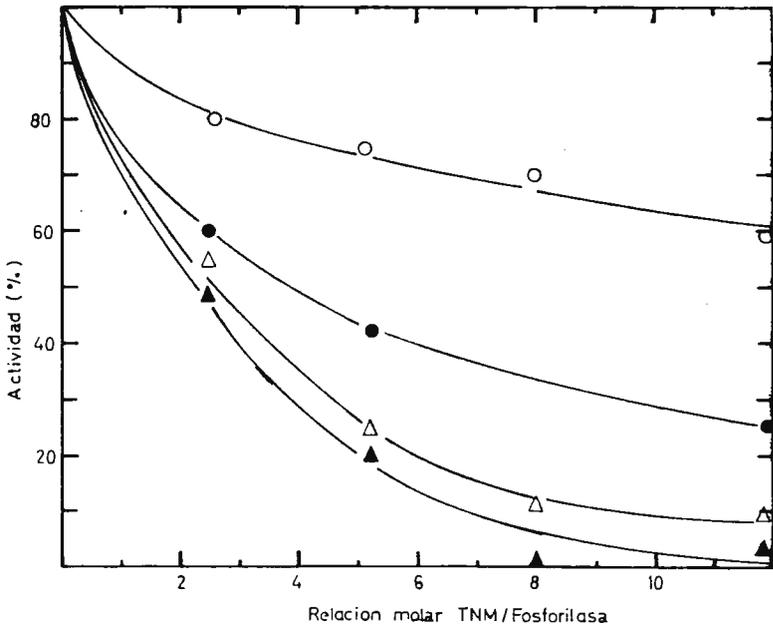


Fig. 12 Inactivación de fosforilasa por tratamiento -- con TNM a pH=8. Fosforilasa: $7.9\mu\text{M}$. Tiempo de -- reacción: ○ 20; ● 50; △ 135 y ▲ 270 min te a la determinación del número de ambos restos amino ácidos, el exceso de reactivo y productos que interferían en la medida se eliminaban mediante una columna de sephadex G-25.

Los resultados de la determinación del número de nitrotirosinas se han resumido en la figura 14. Puede observarse que para conseguir la modificación de un resto de tirosina, es necesario utilizar una relación TNM/F igual a 10 para los tiempos de incubación utilizados (2 horas).

En la misma figura se puede observar que la inactivación de la enzima se debe principalmente a

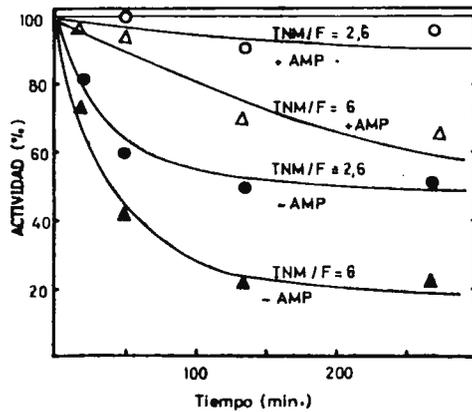


Fig. 13 Efecto del AMP sobre la inactivación de la fosforilasa tratada con TNM a pH 8. Fosforilasa : 8.0 μ M. Relaciones TNM/fosforilasa: (○) 2.6 con AMP 2mM; (●) 2.6 sin AMP; (△) 6.0 con AMP 2mM; y (▲) 6.0 sin AMP.

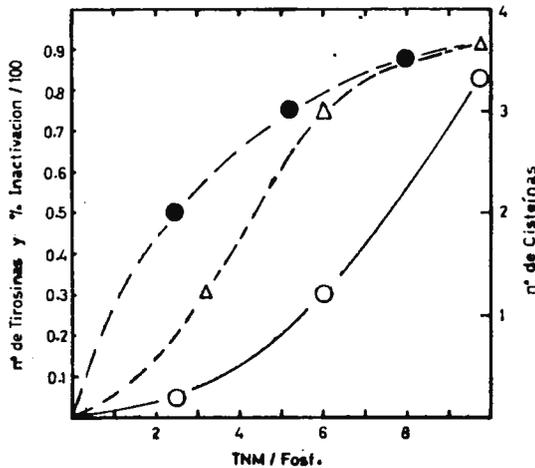


Fig. 14 Inactivación y modificación de tirosinas y cisteínas, por monómero de enzima, en función de la relación molar TNM/F. (●) inactivación; (○) nº de tirosinas; (△) nº de cisteínas modificadas.

la modificación de los grupos -SH de la fosforilasa, y únicamente cuando la pérdida de actividad es superior a un 70%, comienza a ser significativa la modificación de tirosinas.

El AMP protege, de su titulación, a un grupo SH y sólo parcialmente a una tirosina, lo cual hace suponer que en el sitio de unión del AMP a la enzima - se encuentran implicados ambos residuos, o bien que -- existe una cierta interrelación entre ellos.

Una estimación de la unión del AMP a la enzima que había reaccionado con TNM (t=2h. TNM/F=10) se realizó por cromatografía de gel, observando que sólo se fijaba un 42% del que se unía a la enzima nativa en las mismas condiciones.

3.3.2 USO DE LA SAL DE FREMY

Antes de efectuar el marcaje en la fosforilasa, se ha estudiado su posible reacción con tirosina, mercaptoetanol, cisteína y PLP. En todos los casos la reacción se ha efectuado de tal forma que la relación sal de Fremy/compuesto fuera igual a 10. Únicamente la reacción resultó positiva en el caso de la tirosina. - El producto obtenido presentaba dos bandas de absorción con máximo a 300 y 450 nm, correspondientes al 2-carboxi-5,6 dihidroxi indol, formado por ciclación intramolecular a través de una reacción de adición (22).

3.3.2.1 Inactivación

A concentración alta de reactivo, se produce una pérdida total de actividad, incluso con pequeños tiempos de reacción. No obstante, a relaciones molares SF/F no superiores a 10, la inactivación era completa únicamente a los 45 minutos (figura 15), pudiéndose estimar el periodo de semirreacción en unos cinco minutos. En repetidas ocasiones se verificó que la pérdida de actividad no era reversible por incubación de la enzima marcada con ME, durante 1 hora a 30°C.

El espectro de la enzima marcada posee un máximo a 500 nm, un hombro a 380 y una tercera banda a 310-320 nm, difícil de determinar dada la fuerte absorción que en esta región presenta el PLP de la enzima.

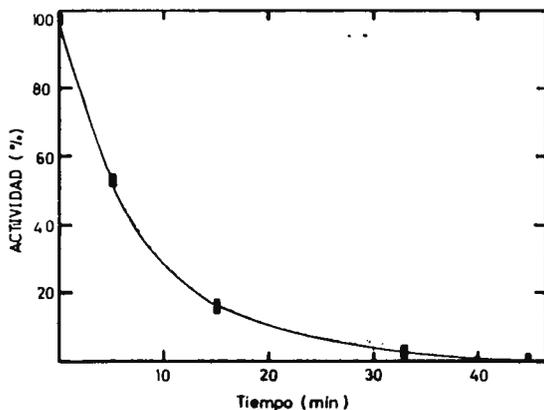


Fig. 15 Inactivación de fosforilasa ($c=11.8\mu\text{M}$) por tratamiento con sal de Fremy a $\text{pH}=7.5$. Relación molar sF/F = 9,3.

Dichas bandas permanecían despues de pasar la mezcla -- de reacción por Sephadex G-25. La banda a 380 nm (22) sería atribuible a la o-benzoquinona, siendo por ahora desconocido el origen de las bandas de 500 y 310-320 - nm.

3.3.2.2 Protección por AMP

Como puede observarse en la figura 16, el AMP a una concentración 1mM ejerce una protección sensible sobre la enzima, ya que aún a relaciones de sF/F del orden de 10, la enzima conserva una actividad del 75%.

Con objeto de aclarar si la protección --- ejercida por el AMP tiene alguna relación con las tiro^sinas oxidadas simultáneamente a la desactivación, se estudió paralelamente a este proceso el número de tiro^sinas modificadas por absorción ultravioleta. Los resultados se muestran en la tabla XIII.

TABLA XIII

Influencia del AMP sobre la inactivación y oxidación - de tirosinas, de la fosforilasa tratada con sal de Fre^my.

AMP (mM)	actividad (%)	n° tirosinas modificadas
0,0	0,0	1,8
1,0	75	0,4

fosforilasa, 11 μ M. Relación molar sF/F=10.

El comportamiento de la enzima, parece ser

diferente a bajas y altas concentraciones de enzima, - (49), razón por la cual hemos efectuado las mismas experiencias anteriores a una concentración de enzima de $30\mu\text{M}$. Los resultados pueden observarse en la tabla XIV

La protección ejercida ahora por el AMP -- frente a la inactivación es mucho menos efectiva.

TABLA XIV

Inactivación de la enzima por sal de Fremy.

AMP (mM)	actividad (%)	n°tirosinas modificadas
0,0	0	4
1,0	10	3

fosforilasa, $30\mu\text{M}$. Relación molar sF/F = 11.

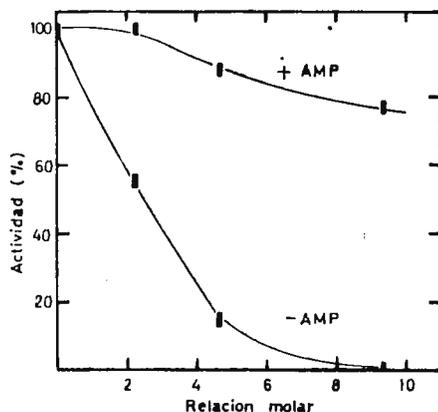


Fig. 16 Inactivación de fosforilasa ($c=11,8\mu\text{M}$) por tratamiento con sal de Fremy a pH 7,5, durante 45 minutos.

3.3.2.3 Cinética de reacción

Fuó seguida observando el aumento de absorbancia a 500 nm. El período de semirreacción coincide con el encontrado para la pérdida de actividad en función del tiempo. Los resultados pueden ajustarse a una cinética de pseudo primer orden con una constante de velocidad $k=970 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Esta cinética correspondería a la oxidación de las prácticamente dos tirosinas que son modificadas en estas condiciones.

La cinética de la reacción, seguida a 500 nm, a concentraciones altas de enzima, ofrece características diferentes.

Así, usando la misma relación molar sF/F igual a 10, cuando la concentración de fosforilasa es del orden de $13\mu\text{M}$, obtenemos una sola etapa en la cinética. No obstante cuando la concentración es del orden de $50\mu\text{M}$, se pueden distinguir dos etapas, una de ellas con una velocidad similar a la encontrada a baja concentración, $k=660 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y otra con una constante de velocidad un poco inferior $k=210 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Evidentemente estos resultados demuestran que el comportamiento de la enzima a alta concentración es diferente del que presenta a concentraciones inferiores a $15\mu\text{M}$.

4. D I S C U S I O N

4.1 SITIO DEL PLP

4.1.1 MODO DE UNION A LA ENZIMA

Los resultados obtenidos demuestran que el aducto formado por PLP y hexilamina en disolventes apolares es una base de Schiff y no una carbinolamina. Por ello los trabajos que demostraban que en la fosforilasa y en este aducto existían las mismas estructuras, conducen a la reafirmación del modelo propuesto para la unión del PLP a fosforilasa (8).

Además este modelo nos permite medir la polaridad del sitio de unión del PLP a fosforilasa que resulta ser de $Z=69,8$. La enzima reducida tiene la bolsa hidrofóbica algo más abierta $Z=81$. Este mismo modelo nos permite calcular la polaridad del sitio I del complejo PLP-albúmina como $Z=75$ y la del sitio II, mucho más abierto como $Z=87$.

En otras enzimas en las que el PLP está unido en forma de base de Schiff se puede calcular la polaridad de la bolsa de una manera simple con este modelo, midiendo la relación de absorbancias a 335 y 415 nm.

4.1.2 POLAROGRAFIA

SH lentos han de hallarse relacionados con los fenómenos asociados a la interacción de la adenina con la enzima. Esta conclusión se ve apoyada por el hecho de -- que "solo" la modificación en el N(1) del anillo de -- adenina, es la que provoca la más drástica disminución en el porcentaje de protección máxima de ambos grupos SH. En el caso de análogos en base, ambos SH lentos -- eran protegidos exhibiendo características de cooperatividad positiva en el proceso de protección en fun--- ción de la concentración de nucleótido. El IMP sin embargo aunque es un análogo en base del AMP presenta un comportamiento diferente del de los demás ya que el 2º grupo SH no es protegido cooperativamente en este caso lo cual permite concluir que las diferencias en el pro-- ceso de activación del AMP e IMP provienen de una dife-- rente acción estructural de éste sobre la enzima que -- conduce a un estado conformacional dimérico en el caso del IMP incapaz de tetramerizar. La cooperatividad en los procesos de protección de los SH lentos se pierde completamente en el dAMP y dIMP, aunque no en los inhi-- bidores AMP'2 y AMP'3; lo cual demuestra que la coope-- ratividad en las transiciones conformacionales no ha -- de corresponder necesariamente con la cooperatividad -- en los procesos catalíticos ni con la elevación o dis-- minución de la velocidad de la catálisis.

Al comparar las constantes cinéticas K_a o K_i relativas de los diferentes nucleótidos estudiados a 4°C y 25°C se observa que el estado conformacional -- estabilizado a baja temperatura (<16°C) presenta una -- mayor selectividad estructural hacia las tres partes -- de la molécula de AMP.

4.2 SITIO DEL AMP

4.2.1 ANALOGOS EN LA BASE

La activación de estos análogos puede estudiarse según el modelo de Monod (45).

Los resultados (tablas VII a IX) podrían interpretarse suponiendo que la enzima se une directamente al nucleótido por el nitrógeno 1 del anillo de adenina, o bien que la interacción fosforilasa b-análogo de AMP se debe principalmente al carácter aromático del anillo de adenina. Contra esta última hipótesis -- hay que objetar sin embargo la menor afinidad de los derivados N-6Me AMP y ClAMP.

Los nucleótidos poseen mayor afinidad para la enzima a temperaturas menores de 16-18°C, lo cual hace pensar en un cambio conformacional a estas temperaturas. Este cambio se observa con casi todos los análogos, por lo que nos inclinamos a pensar que debe ser una propiedad de la enzima más que del complejo nucleótido-enzima.

La valoración de las dos cisteínas lentas a 25°C es diferente de la obtenida a 4°C (47) en presencia de AMP 1mM. Bajo las últimas condiciones, la enzima está en forma tetramérica. Para dilucidar la razón de las discrepancias, hemos titulado las cisteínas con DTNB a 25°C bajo condiciones de tetramerización -- (10⁻²M AMP y 2,58 mg/ml de enzima), coincidiendo perfectamente. Es decir, en el estado tetramérico, única-

mente es posible titular un SH por monómero. Las dos formas más simples de explicar la no reactividad de este grupo SH podrían ser, que se hiciera inaccesible al DTNB o bien que se forme un puente disulfuro. En el proceso de tetramerización inducido por el AMP se ha encontrado un valor entálpico de -69 Kcal/mol (49) que coincide con el de formación de puentes disulfuro (-67 Kcal/mol). Por otro lado de los datos de Wang puede deducirse que el calor debido al proceso de tetramerización (en presencia de β -mercaptoetanol, y por lo tanto sin implicar los SH) es mucho menor (51). Por lo tanto aunque es difícil decidir entre ambas posibilidades, podemos decir razonablemente que posiblemente ocurra la segunda hipótesis.

Si se comparan los resultados obtenidos en la tabla VIII, está claro que pequeñas variaciones en la unión de la base dan lugar a un gran cambio en la afinidad de la enzima hacia el fosfato, lo cual únicamente puede entenderse si el sitio de unión del AMP y el fosfato, se encuentran próximos en la enzima.

4.2.2 ANALOGOS EN OTRA PARTE DE LA MOLECULA

En este caso puede observarse que la valoración de los grupos cisteína lentos de la fosforilasa b en presencia de los diferentes análogos de AMP muestran que los cambios conformacionales producidos son muy diferentes, siguiendo la protección mecanismos muy diferentes. La comparación de estos resultados con los de análogos en base, permiten concluir que los grupos

Los complejos PLP-cisteína, las bases de Schiff del PLP, y el mismo PLP, presentan, en disolución acuosa, ondas con potenciales de onda media menos negativos que $-1,0$ volts. Si en la enzima o en el complejo PLP-albúmina (sitio I) se encontrara presente alguna de las estructuras representadas por estos complejos en medio acuoso, deberíamos obtener una onda a esos potenciales. Puesto que no ocurre así, podemos concluir que dichas estructuras no se encuentran en la enzima uniendo al PLP. Esto significaría que el sitio del PLP en fosforilasa, así como el del PLP en albúmina (sitio I) no tiene carácter hidrofílico, confirmando los resultados de espectroscopía y fluorescencia.

El complejo PLP-albúmina (sitio II) presenta una onda a un potencial próximo a $-0,9$ volts. Esto sugiere que la fosforilasa en un medio "deformante" como el citrato de imidazol $0,4$ M debe dar una onda polarográfica a pH neutro. Efectivamente a pH neutro, y a baja temperatura, se obtiene una onda con un potencial de onda media próximo a $-0,95$ volts, mientras que, en las mismas condiciones, la apoenzima sigue dando la onda catalítica a potenciales de $-1,1$ volts.

Podemos, ahora, dar una explicación al hecho de que tanto la enzima como el complejo PLP-albúmina (sitio I) no puedan ser reducidos con NaBH_4 , a pH neutro: la especie activa del NaBH_4 en agua, BH_3 , (50), tiene un potencial anódico de onda media de $-0,64$ volt siendo por consiguiente imposible, por razones termodinámicas, la reducción a pH neutro del PLP tanto en el complejo PLP-albúmina (sitio I), como en fosforilasa.

4.3 MODIFICACION QUIMICA

4.3.1 USO DE TNM

Como consecuencia de los experimentos descritos en 3.3.1, se encontró que era necesaria una relación molar TNM/F al menos igual a 10 para conseguir la total inactivación, pues relaciones molares inferiores conducían a inactivaciones parciales (fig. 12). -- Usando aquella relación, el tiempo necesario encontrado era de dos a tres horas. Dicho tiempo coincide con el necesario para conseguir una estabilidad en el incremento de absorbancia a 380 nm.

Dicho tratamiento da lugar a la modificación de una tirosina y cuatro cisteínas, cuando la --- inactivación es total.

4.3.2 USO DE SAL DE FREMY

La inactivación de la enzima era prácticamente completa cuando se utilizaba una cantidad de sal de Fremy tal que la relación molar sF/F era aproximadamente igual a 10. Utilizando estas condiciones se realizó el espectro de la enzima tratada con sal de Fremy, apareciendo tres bandas, con máximos a 310-320 nm., 380 nm. y 500 nm. La banda que aparecía a 380 nm, lo hacía en todas las condiciones en que se realizaron los expe

rimentos, utilizando diversas concentraciones de enzima y de sal de Fremy, e incluso cuando la fosforilasa se "abría" con altas concentraciones de guanidina. Esta banda, además, resultaba ser proporcional al número de tirosinas que se modificaban con sal de Fremy, determinadas por análisis de aminoácidos y por el método de Edelhoch (52). Por estas razones, esta última banda fue la que se utilizó en el cálculo del número de tirosinas que se modificaban por el tratamiento con sal de Fremy, habiéndose obtenido un ϵ de 700 a 380 nm.

Con este reactivo se ha podido comprobar que existen 34 tirosinas por monómero. De ellas 16 están ocluidas en el interior de la proteína y son inaccesibles a este reactivo. De las otras diez y ocho sólo dos son muy reactivas y son decisivas en mantener la actividad catalítica de la enzima, pues su modificación es concomitante con la pérdida de la actividad catalítica. Por otra parte, la presencia de AMP protege a la enzima de la citada pérdida de actividad, y, simultáneamente, de la reacción de las dos tirosinas que se modifican en ausencia de AMP, en una extensión similar. Este resultado contrasta con el obtenido por Caccace et. al. (20), quienes por reacción a temperatura ordinaria con N-acetilimidazol, encuentran que el AMP no protege de la pérdida de actividad, aunque sí lo hace de la reacción de algunas tirosinas. Por el contrario, a 0°C el AMP protege de la inactivación y de la reacción de dos tirosinas con N-acetilimidazol.

Ambos hechos: inactivación y protección -- por AMP implican que 1-2 tirosinas se encuentran en el sitio catalítico, en el sitio del AMP, o bien en un si

tio con fuertes interacciones heterotrópicas sobre el activador alostérico. Teniendo en cuenta que una tirosina se ha encontrado en el péptido implicado en la unión del AMP a la fosforilasa (53), nos inclinamos por la posibilidad de que 1-2 tirosinas se encuentren en el sitio del efector. Ambas tirosinas no son cinéticamente distinguibles, pero cuando se utiliza un reactivo como el TNM, solamente puede ser modificada una tirosina como máximo, indicando esto que posiblemente, de las dos tirosinas modificadas con sal de Fremy, una de ellas es más reactiva que la otra y únicamente se pueden diferenciar cuando se utiliza un reactivo que presenta menos afinidad por tirosinas que la sal de Fremy, como es el TNM. No se puede desechar, nor consiguiendo, la posibilidad de que sea solamente una, la tirosina que está implicada en el sitio del AMP.

Cuando se utilizan concentraciones muy diferentes de enzima, los resultados no son comparables totalmente. Muy recientemente uno de los autores ha encontrado evidencia de que la enzima presenta un comportamiento distinto a lo largo del rango de 1-5 mg/ml a temperatura ambiente (49). Como se deduce de estos resultados, cuando la concentración de fosforilasa es superior a 3 mg/ml observamos que el efecto de protección que ejerce el AMP prácticamente desaparece y, además, los resultados de la determinación del número de tirosinas modificadas son diferentes en este rango de concentración. Evidentemente se hace necesario prolongar estos estudios utilizando otros parámetros adicionales que pudieran dar más luz a este hecho.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fischer, E.H., Pocker, A. y Saari, J.C. (1970). -- Essays Biochem. 6, 23.
- 2.- Graves, J.D. y Wang, J.H. (1972). The Enzymes (Ed. P.D. Boyer) 7, 435.
- 3.- Sygusch, J., Madsen, N.B., Kasvinsky, P.J. and Fletcher, R.J. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4757.
- 4.- Johnson, L.N., Weber, I.T., Wild, D.L., Wilson, K. S. and Yeates, D.G.R. (1978). J. Mol. Biol. 118, 579.
- 5.- Titani, K., Koide, A., Hermann, J., Ericsson, L.H., Kumar, S., Wade, R.D., Walsh, K.A., Neurath, H. and Fischer, E.H. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, - 74, 4762.
- 6.- Kent, A.B., Krebs, E.G. y Fischer, E.H. (1958). J. Biol. Chem., 232, 549.
- 7.- Cortijo, M., Steinberg, I.Z. y Shaltiel, S. (1971). J. Biol. Chem., 246, 933.
- 8.- Shaltiel, S. y Cortijo, M. (1970). Biochem. Biophys. Res. Comm., 41, 594.
- 9.- Honikel, K.O., y Madsen, N.B. (1972). J. Biol. Chem. 247, 1057.
- 10.- Green, A.A., Cori, G.T. y Cori C.F. (1942). J. Biol. Chem., 142, 447.
- 11.- Green, A.A. y Cori, G.T. (1943). J. Biol. Chem., 151, 21.
- 12.- Helmreich, E. y Cori, C.F. (1964). Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 51, 131.
- 13.- Buc, M.H. y Buc, H. (1967) Fed. Eur. Biochem. Soc. -- Meet., 4th, 109.
- 14.- Zarkadas, C.G., Smillie, L.B. (1970). Can. J. Biochem. 48, 763.

- 15.-Battell,M.L., Zarkadas,C.G., Smillie,L.B. y Madsen,N.B. (1968).J. Biol. Chem., 243, 6202.
- 16.-Huang,C.Y. y Madsen,N.B. (1966).Biochemistry,5, - 116.
- 17.-Philip,G., y Graves, D.J. (1968). Biochemistry,7, 2093.
- 18.-Fasold,H., Keller,F., Halbach,M. y Helmreich,E. - (1969). Federation Proc., 28, 847.
- 19.-Anderson, R.A. y Graves,D.J. (1972). Federation - Proc. 31, 833.
- 20.-Cacace,M.G., Diprisco,G. y Zito, R. (1976). Febs letters, 62, 338.
- 21.-Riordan,J.F., Sokolovsky,M. y Valle, B.L. (1967). Biochemistry, 6, 3609.
- 22.-Dukler,S., Wilchek,M. y Lavie,D. (1971). Tetrahe-
dron 27, 607.
- 23.-Sizer,I.W. (1953). Adv. in Enzymology, 14, 129.
- 24.-Fischer,E.H., Krebs,E.G. y Kent,A.B. (1958). Bio-
chem. Prep., 6, 68.
- 25.-Krebs,E.G., Love,D.S., Bratvold,G.E., Tryser,K. -
A., Meyer,W.L. y Fischer,E.H. (1964). Biochemis-
try, 3, 1022.
- 26.-Fischer,E.H., y Krebs,E.G. (1958). J. Biol.Chem.,
231, 65.
- 27.-Seery,V.L., Fischer,E.H. y Teller,D.C. (1967). --
Biochemistry, 6 , 3315.
- 28.-Shaltiel,S., Hedrick,J.L. y Fischer,E.H. (1967)..
Methods Enzymol., 11, 675.
- 29.-Dempsey,W.B. y Christensen,H.N. (1962).J. Biol. -
Chem., 237, 1113.
- 30.-Jonas,A. y Weber,G.(1971). Biochemistry,10, 1335.

- 31.-Chen,R.F. (1967).J. Biol. Chem., 242, 173.
- 32.-Sober,H.A. (Ed.). (1973)."Handbook of Biochemis--
try", Cleveland, CRC press.
- 33.-Peterson,E.A. y Sober,H.A. (1954) J.Am.Chem.Soc.
76, 169.
- 34.-Helmreich,E. y Cori,C.F. (1964). Proc.Natl.Acad..
Sci. 51, 131.
- 35.-Hedrick,J.L. y Fischer,E.H. (1965).Biochemistry,
4 , 1337.
- 36.-Palter,K. y Lukton,A. (1973).Anal. Biochemistry,
53 , 613.
- 37.-Ellman,G.L. (1958).Arch.Biochem.Biophys.,74,443.
- 38.-Kosower,E.M. (1968)."Physical Organic Chemistry",
Wiley, London.
- 39.-Llor,J. and Cortijo,M. (1977)J.C.S.Perkin II,1111.
- 40.-Turchin,K.F., Bystrev,V.F., Karpeisky,M.Ya., Ol--
khovoy,A.S., Florentiev,V.L. y Sheinker,Yu.N. ---
(1968) en "Proceedings of the IUB Symposium on Py
ridoxal Catalysis:Enzymes an Model Systems, Inter
science", N.York, p-67.
- 41.-Abbot,E.H. y Martell,A.E. (1970) J.Am.Chem.Soc. -
92 , 1754.
- 42.-Llor,J. (1973). Tesis Doctoral, Universidad Murcia
- 43.-Manousek,O. y Zuman,P. (1964). Collection Czech.
Chem. Comm., 29 , 1718. 93.
- 44.-Kolthoff,I.M. y Lingane, (1952)."Polarography". -
Interscience. N. Y. p. 291.
- 45.-Monod,J., Wyman,J. y Changeaux,J.P. (1965).J.Mol.
Biol., 12, 88.
- 46.-Buc,H.(1967) Biochem.Biophys.Research.Comm.28,59.
- 47.-Morange,M., Garcia Blanco,F., Vandebunder,B. y -
Buc,H.(1976).Eur.J.Biochem. 65, 553.

- 48.-Kastenschmidt,L.L., Kastenschmidt,J. y Helmreich E. (1968). Biochemistry, 7 , 4543.
- 49.-Merino,C.G., Garcia Blanco,F. y Laynez,J.(1976) Febbs Letters, 67, 9.
- 50.-Gardiner,J.A., Collat,J.W. (1965). J.Am.Chem.Soc 87 , 1692.
- 51.-Ho,H.C., y Wang,H. (1973) Biochemistry,12, 4750.
- 52.-Edelhoch,H. (1967).Biochemistry, 6 , 1948.
- 53.-Anderson,R.A., Parrish,R.F. y Graves,D.J.(1973). Biochemistry, 10 , 1901.



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

1. — *Semántica del lenguaje religioso.* / A. Fierro
(Teología. España, 1973)
2. — *Calculador en una operación de rectificación discontinua.* / A. Mulet
(Química. Extranjero, 1974)
3. — *Skarns en el batolito de Santa Olalla.* / F. Velasco
(Geología. España, 1974)
4. — *Combustión de compuestos oxigenados.* / J. M. Santiuste
(Química. España, 1974)
5. — *Películas ferromagnéticas a baja temperatura.* / José Luis Vicent López
(Física. España, 1974)
6. — *Flujo inestable de los polímeros fundidos.* / José Alemán Vega
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
7. — *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.* /
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
8. — *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.* / José Plá Carrera
(Matemáticas. España, 1974)
9. — *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.* /
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
10. — *El teatro español en Francia (1935—1973).* / F. Torres Monreal
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
11. — *Simulación electrónica del aparato vestibular.* / J. M. Drake Moyano
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
12. — *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.* /
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
13. — *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.* /
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
14. — *La obra gramatical de Abraham Ibn ^c Ezra.* / Carlos del Valle Rodríguez
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

- 15.— *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.* / Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
- 16.— *El significado teórico de los términos descriptivos.* / Carlos Solís Santos (Filosofía. España, 1973)
- 17.— *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica.* / Gumersindo Ruíz Bravo (Economía. España, 1971)
- 18.— *La imaginación natural (estudios sobre la literatura fantástica norteamericana).* / Pedro García Montalvo (Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
- 19.— *Estudios sobre la hormona Natriurética.* / Andrés Purroy Unanua (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
- 20.— *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.* / José Salvador Serrano Molina (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
- 21.— *El hombre y el diseño industrial.* / Miguel Durán-Lóriga (Artes Plásticas. España, 1974)
- 22.— *Algunos tópicos sobre teoría de la información.* / Antonio Pascual Acosta (Matemáticas. España, 1975)
- 23.— *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile.* / Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
- 24.— *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo. Teoría y realizaciones.* / Juan Manuel Martín Sánchez (Ingeniería. España, 1973)
- 25.— *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 26.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 27.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 28.— *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real.* / Vicente Zugasti Arbizu (Física. España, 1975)
- 29.— *Transferencia de carga en aleaciones binarias.* / Julio A. Alonso (Física. Extranjero, 1975)
- 30.— *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / José Luis Sebastián Franco (Física. Extranjero, 1974)

- 31.— *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.*/ Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
- 32.— *Estudios sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.*/ Eduardo Acosta Méndez. (Filosofía. España, 1973).
- 33.— *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.*/ Salvador Ordóñez Delgado. (Geología. España, 1975).
- 34.— *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obreros y empleados.*/Federico Durán López. (Derecho. España, 1975).
- 35.— *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.*/Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
- 36.— *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.*/ Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
- 37.— *Lenguaje en periodismo escrito.*/Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos. Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
- 38.— *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.*/José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
- 39.— *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.*/José Luis Blasco Olcina. (Matemáticas. España, 1975).
- 40.— *Estructuras de la épica latina.*/M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología. España, 1971).
- 41.— *Comunicación por fibras ópticas.*/Francisco Sandoval Hernández. (Ingeniería. España, 1975).
- 42.— *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.*/José Antonio Pero-Sanz Elorz. (Ingeniería. España, 1974).
- 43.— *Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus.*/Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
- 44.— *Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae alterados en la biosíntesis de proteínas.*/Lucas Sánchez Rodríguez. (Biología. España, 1976).

45. – *Sistema automático para la exploración del campo visual.* José Ignacio Acha Catalina. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1975).
46. – *Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica.* Margarita Ruiz Altisent. (Ciencias Agrarias. España 1975).
47. – *El uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular en las células de Ehrlich y en escherichia coli.* Francisco Javier García-Sancho Martín. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1974).
48. – *Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina en la neurona adrenérgica periférica.* Antonio García García. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1975).
49. – *Introducción a los espacios métricos generalizados.* Enrique Trillas y Claudi Alsina. (Matemáticas. España, 1974).
50. – *Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.* Enrique Pando Ramos. (Química. España, 1975).
51. – *Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.* Fernando Orozco y Carlos López-Fanjul. (Biología Genética. España, 1973).
52. – *Mecanismos neurales de adaptación visual a nivel de la capa plexiforme externa de la retina.* Antonio Gallego Fernández. (Biología Neurobiología. España, 1975).
53. – *Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham.* M^a. Teresa Herrera Hernández. (Literatura y Filología. España, 1976).
54. – *Breve introducción a la historia del Señorío de Buitrago.* Rafael Flaquer Montequi. (Historia. España, 1975).
55. – *Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.* Manuel Castellet Solanas. (Matemáticas. Extranjero, 1974).
56. – *Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.* Pedro Sánchez Lazo. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).
57. – *Estudios sobre la expresión genética de virus animales.* Luis Carrasco Llamas. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).
58. – *Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros.* Juan M. Serradilla Manrique. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1974).

59. — *Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.* / Carmen Nieves Afonso Rodríguez. (Física. España, 1975).
60. — *El sistema de Servet.* / Angel Alcalá Galve. (Filosofía. España, 1974).
61. — *Dos estudios sobre literatura portuguesa contemporánea.* / David Mourão-Ferreira y Vergilio Ferreira. (Literatura y Filología, 1977).
62. — *Sistemas intermedios.* / María Manzano Arjona. (Filosofía. España, 1975).
63. — *A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el ^4He líquido.* / Félix Vidal Costa. (Física. Extranjero, 1974).
64. — *Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido.* José Ramón Farré Muntaner. (Ingeniería. España, 1976).
65. — *Desnaturalización de una proteína asociada a membrana y caracterización molecular de sus subunidades.* / José Manuel Andreu Morales. (Biología. España, 1976).
66. — *Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.* / Enrique Blázquez Fernández. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1976).
67. — *La teoría de los juegos semánticos. Una presentación.* / Juan José Acero Fernández. (Filosofía. Extranjero, 1974).
68. — *El problema de la tierra en el expediente de Ley Agraria.* / Margarita Ortega López. (Historia. España, 1976).
69. — *Razas vacunas autóctonas en vías de extinción. (Aportaciones al estudio genético).* / Miguel Vallejo Vicente. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1976).
70. — *Desviaciones del sistema y de la norma de la lengua en las construcciones pronominales españolas.* / María Antonia Martín Zorraquino. (Literatura y Filología. España, 1974).
71. — *Sociología del ejército español en el siglo XIX.* / Fernando Fernández Bastarreche. (Historia. España, 1977).
72. — *La filosofía hegeliana en la España del siglo XIX.* / Juan Francisco García Casanova. (Filosofía. España, 1976).

- 73.— *Procesamiento de datos lingüísticos. Modelo de traducción automática del español al alemán.* / Montserrat Meya Llopart. (Literatura y Filología. Extranjero, 1976).
- 74.— *La Constitución de 1931 y la autonomía regional.* / Adolfo Hernández Lafuente. (Ciencias Sociales. España, 1976).
- 75.— *El modelo constitucional español del siglo XIX.* / Miguel Artola Gallego. (Historia, 1979).
- 76.— *Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr₂O₃ policristalino, por el método de la constante dieléctrica.* / Rafael C. Martín Pérez. (Ciencias Físicas. España, 1970).
- 77.— *C-14 y Prehistoria de la Península Ibérica.* / M. Almagro-Gorbea, F. Bernaldo de Quirós, G. A. Clark, R. de Balbín-Behrmann, G. Delibes, J. J. Eiroa, U. Espinosa, M. Fernández-Miranda, M. D. Garralda, A. González, M. González, F. Gusi, P. López, B. Martí, C. Martín de Guzmán, A. Morales, A. Moure, C. Olaria, M. Sierra y L. G. Strauss. (Reunión celebrada en la Fundación Juan March el día 14 de abril de 1978).
- 78.— *Cultura en periodismo.* / Manuel Martín Serrano, Juan Ramón Masoliver, Rafael Conte Oroz, Carlos Luis Alvarez, Amando de Miguel, Manuel Seco, José Luis Abellán, André Fontaine. (Seminario de "Cultura en periodismo", celebrado en la Fundación Juan March, los días 26 y 27 de junio de 1978).
- 79.— *Las Giberelinas. Aportaciones al estudio de su ruta biosintética.* / Braulio M. Fraga González. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
- 80.— *Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.* / María Dolores Guerra Suárez. (Química. España, 1976).
- 81.— *Sobre Arquitectura Solar.* / Guillermo Yáñez Parareda. (Arquitectura y Urbanismo. España, 1974).
- 82.— *Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.* / Luis Lamas de León. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1977).
- 83.— *La Economía y la Geomatemática en prospección geoquímica.* / Carlos Díez Viejobueno. (Geología. España, 1976).
- 84.— *Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.* / José Repollés Moliner. (Química. Extranjero, 1975).

- 85.— *Las enseñanzas secundarias en el País Valenciano.* / María José Sirera Oliag. (Ciencias Sociales. España, 1977).
- 86.— *Flora y fauna acuáticas.* / José Manuel Viéitez Martín, Ricardo Anadón Álvarez, Jesús Angel Ortea Rato, Isabel Moreno Castillo, Manuel Rubió Lois, José Carlos Pena Álvarez, María Rosa Miracle Solé. (II Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1979).
- 87.— *Botánica.* / Salvador Rivas Martínez, Arnoldo Santos Guerra, César Gómez Campo, Miguel Carravedo Fantova, Nicolás Jouve de la Barreda, Fernando Pérez Camacho. (II Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1979).
- 88.— *Zoología.* / Miguel Cordero del Campillo, Antonio Palanca Soler, Alfredo Salvador Milla, José M. Génis Gálvez, María Teresa Alberdi Alonso. (II Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1979).
- 89.— *Zoología.* / Juan Mayol Serra, Francisco Bernis Madrazo, Miguel Delibes de Castro, Isaías Zarazaga Burillo. (II Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1979).
- 90.— *Master en Planificación y Diseño de Servicios Sanitarios.* / Francisco Pernas Gali. (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1977).
- 91.— *Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.* / José M. Viéitez Martín. (Biología. España, 1976).

