

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 132-Rod
Aplicación de la espectroscopía
Rodríguez de Bodas, Angel.
1031690



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Angel Rodríguez de Bodas

Aplicación de la
espectroscopía de RPE al
estudio conformacional del
ribosoma y el tRNA.

FJM
Uni
132
Rod
132

132 Aplicación de la espectroscopía de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA / Angel Rodríguez de Bodas.

Fundación Juan March

Serie Universitaria

132



Angel Rodríguez de Bodas

Aplicación de la
espectroscopía de RPE al
estudio conformacional del
ribosoma y el tRNA.



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 Extranjero, 1977, individual.
Departamento de QUIMICA.*

*Centro de trabajo: Département de Chimie. Faculté des
Arts et des Sciences. Université de
Montreal, Canadá.*

Depósito Legal: M - 29696 - 1980

I.S.B.N. : 84 - 7075 - 176 - X

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

Deseo expresar mi agradecimiento al profesor Hermann Dugas y al Departamento de Química de la Universidad de Montreal, que han hecho posible la realización de este trabajo.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	7
2. MARCAJE DE SPIN Y ESPECTROSCOPIA DE RPE	8
3. METODOS Y RESULTADOS	14
3.1. Preparación de ribosomas, enzimas y factores	14
3.2. Marcaje de spin del ribosoma 70S	15
A. Grado de incorporación del marcador	16
B. Identificación de las proteínas marcadas	19
C. Integridad y actividad de los ribosomas marcados	23
3.3. Espectro RPE del Ribosoma 70S	24
A. Características del espectro	25
B. Efecto de las condiciones de marcaje	27
C. Efecto del grado de marcaje	28
D. Efecto de la longitud del marcador	29
E. Análisis por simulación	32
3.4. Aplicaciones de la RPE al estudio conformacional del ribosoma ..	34
A. Efecto de la temperatura	34
B. Efecto del ión Mg^{++}	37
C. Efecto del tRNA	40
3.5. Aplicación de la RPE al estudio conformacional del tRNA	45
A. Marcaje de spin del tRNA	45
B. Interacción $SL-CBz^{-}fe^{-}tRNA^{fe^{-}}$ -ribosoma	47
4. CONCLUSIONES	52
5. BIBLIOGRAFIA	53

INTRODUCCION

El ribosoma, complejo sistema de 54 proteínas y 3 ácidos ribonucleicos, con peso de $2,8 \times 10^6$ uam (para el E. coli), constituye un orgánulo celular fundamental en el proceso de la biosíntesis de proteínas. Es uno de los sistemas más estudiados en bioquímica, biofísica y biología molecular; su interés radica en su función biológica.

En las sucesivas etapas de su acción, el ribosoma presenta una gran pluralidad de funciones, lo que requiere diferentes sitios activos con estructuras altamente específicas, así como cambios conformacionales también altamente específicos (1 y 2). Evidentemente, la complejidad de estructura del ribosoma se corresponde con la complejidad de su función. Numerosos trabajos actuales tratan de establecer la correlación estructura-función de este sistema, teniendo en cuenta que la diversidad de funciones debe ser el resultado de múltiples interacciones entre sus macromoléculas componentes, y no una mera adición de sus propiedades (3 y 4). La técnica espectroscópica de resonancia paramagnética electrónica es muy adecuada para este tipo de estudios (5-8), pero sólo muy recientemente se ha comenzado a aplicar al estudio del ribosoma (9-11).

Como se verá más adelante, la aplicación de esta técnica requiere la introducción de un marcador de spin en el ribosoma. Para que la interpretación de resultados pueda ser clara y con significación biológica, se ha de cumplir que el marcaje sea lo más específico posible, y que el marcador no altere la estructura del sistema hasta el punto de hacerlo inactivo.

En este trabajo hemos tratado de encontrar unas condiciones de marcaje que cumplan los requisitos anteriores. Seguidamente hemos analizado la información que nos suministra el marcador sobre la estructura estática del ribosoma, y sobre los cambios que esta estructura experimenta bajo el efecto de diferentes agentes. De manera complementaria, hemos empleado la misma técnica para estudiar el efecto del ribosoma sobre la estructura del tRNA.

2. MARCAJE DE SPIN Y ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNETICA ELECTRONICA

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (RPE) , también llamada de resonancia de spin electrónico (RSE), sólo es aplicable al estudio de sustancias que poseen uno o varios electrones no apareados. No obstante, Onishi y Mc Connel (12) han desarrollado el método llamado de marcaje de spin, que permite extender la técnica a moléculas no paramagnéticas. El método consiste en fijar, de manera covalente o no, un marcador de spin, molécula con un electrón no apareado.

El espectro de RPE de la molécula marcada depende estrechamente del entorno geométrico, magnético y eléctrico del marcador, dando así una información muy sensible y específica de la estructura molecular en una región bien localizada ; pequeñas variaciones conformacionales en esta región se traducirán, normalmente, en apreciables variaciones del espectro.

La técnica de marcaje de spin ha encontrado numerosas aplicaciones en biología molecular (5,6,13 y 14). La mayoría de los marcadores de spin utilizados son derivados de ciclos nitroxídicos con cuatro sustituyentes metilo que hacen más estable el radical nitroxídico (fig. 1). La parte denominada R define la especificidad del marcador de spin. En nuestro caso, R será el radical maleimida, para el marcaje de las proteínas ribosómicas, y bromoacetamida y carbodiimida, para el marcaje del tRNA.

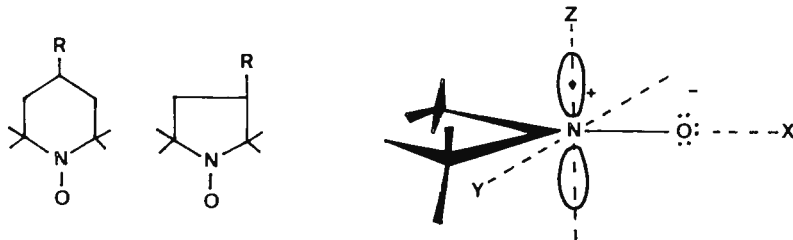


Fig.1.-Estructura general de los marcadores de spin.

En la técnica de RPE se provoca el desdoblamiento del nivel energético, degenerado, del electrón libre en dos subniveles, mediante la aplicación de un intenso campo magnético externo (15 y 16). Se trata del efecto Zeeman de una partícula con spin igual a 1/2.

Se puede observar la transición entre esos niveles comunicando energía mediante una microonda de frecuencia adecuada (con su campo magnético perpendicular al campo externo), con lo que se observará una banda de absorción. En la práctica, la frecuencia de radiación se mantiene constante y se varía la intensidad del campo externo para dar con las condiciones de resonancia (fig. 2).

Por razones técnicas de detección, los aparatos de RPE no dan directamente la banda de absorción sino su primera derivada (fig. 2). Se puede considerar que la anchura media de la banda de absorción es igual a la distancia en abscisas entre el máximo y el mínimo de la primera derivada.

En el caso de derivados nitroxídicos se puede considerar que el electrón no apareado se encuentra localizado, predominantemente, en el orbital p del átomo de nitrógeno (fig. 1). El acoplamiento entre los momentos de spin del electrón desapareado y el núcleo de N (I=1) origina el desdoblamiento de cada subnivel energético del electrón en tres igualmente espaciados (fig. 2). Existen solamente tres transiciones entre estos seis niveles que cumplen las reglas de selección: $m_S = \pm 1$, $m_I = 0$. Como consecuencia, el espectro resultante tiene tres bandas igualmente espaciadas (fig. 2).

El hamiltoniano de spin del radical NO puede expresarse en la forma:

$$\mathcal{H} = \beta \vec{H} g \vec{S} + h \vec{S} \underline{A} \vec{I}$$

donde h es la cte. de Planck, β el magnetón de Bohr para el electrón libre, \underline{H} el campo externo, y \underline{g} y \underline{A} son los dos tensores correspondientes al efecto Zeeman y a la estructura hiperfina resultante del acoplamiento spin-spin, respectivamente. El espectro queda fijado por los componentes de \underline{g} y \underline{A} que son característicos del grupo marcador. El parámetro g indica, para una frecuencia de irradiación dada, el valor de H al que se produce la absor-

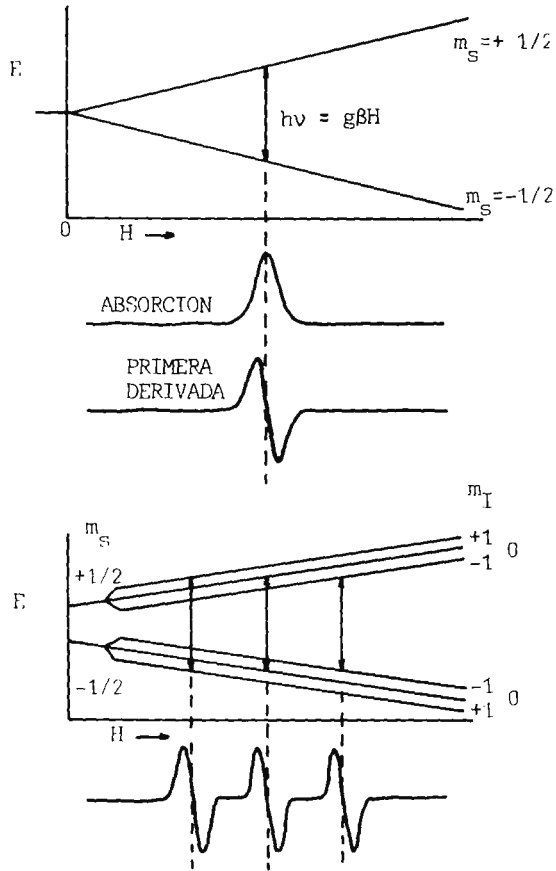


Fig. 2.- Origen del espectro de PRE.

ción; A indica la separación entre las bandas. Ambos factores g y A dependen ligeramente de los grupos R y R', y de la polaridad del medio.

En razón de la asimetría del grupo NO, los tensores g y A son anisotrópicos y, por ello, el desdoblamiento de niveles es función de la orientación del grupo NO respecto del campo externo.

Eligiendo adecuadamente los ejes, el hamiltoniano puede descomponerse del siguiente modo:

$$\mathcal{H} = \beta (\vec{H}_x g_{xx} \vec{S}_x + \vec{H}_y g_{yy} \vec{S}_y + \vec{H}_z g_{zz} \vec{S}_z) + \\ + h (\vec{S}_x A_{xx} \vec{I}_x + \vec{S}_y A_{yy} \vec{I}_y + \vec{S}_z A_{zz} \vec{I}_z)$$

En dicha descomposición los componentes en \underline{x} nos darían el espectro que se obtiene cuando H tiene la dirección \underline{x} , y análogamente con \underline{z} e \underline{y} . Consecuentemente el espectro RPE de un marcador nitroxídico es anisotrópico; es decir, la posición de las tres bandas es función de la orientación del marcador (fig. 3 a-c).

Por otra parte, la resonancia de spin electrónico tiene un tiempo de relajación del orden de 10^{-7} s; por lo tanto, si la molécula rota muy rápidamente (tiempo de correlación de rotación por difusión browniana del orden de 10^{-11} s), las orientaciones moleculares particulares no serán resueltas y el espectro responderá a un intermedio de las propiedades magnéticas (fig. 3d) caracterizadas por los parámetros isotrópicos

$$A_0 = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$$

$$g_0 = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$$

Sin embargo, si el movimiento molecular es suficientemente lento ($\tau > 10^{-7}$ s para difusión browniana), el espectrómetro puede resolver cada orientación y el espectro resultante es idéntico al de una colección de marcadores -- orientados al azar, pero fijos (espectro de polvo) (fig. 3e).

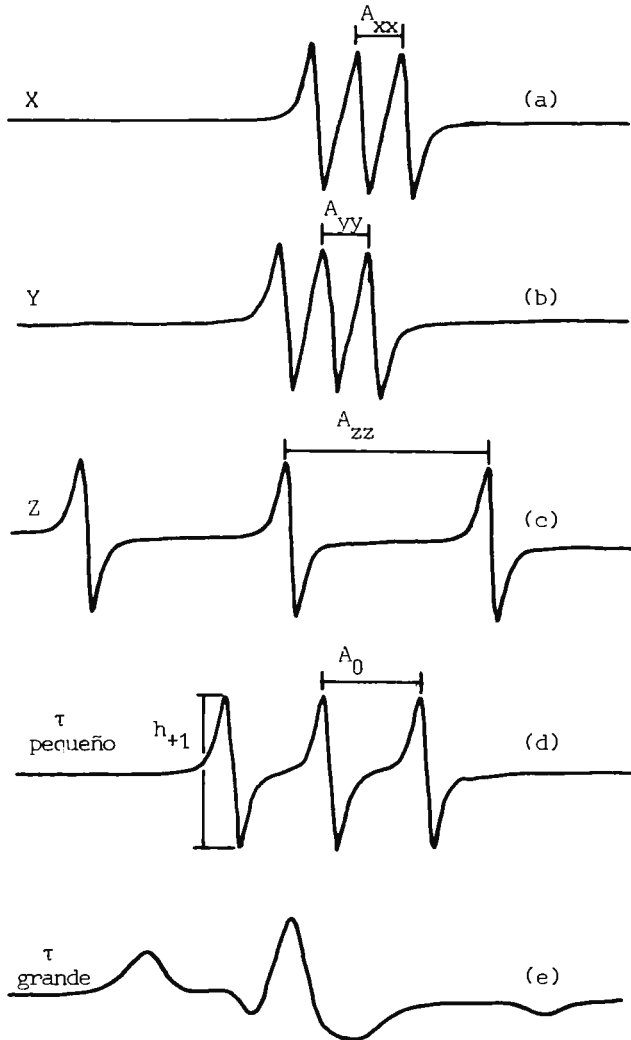


Fig. 3.- Espectros RPE de un marcador nitroxídico en función de la orientación (a - c) y la movilidad (d y e).

En el rango $10^{-11} < \tau < 10^{-7}$ s, el espectro cambia gradualmente de un modo al otro y la forma de las bandas puede relacionarse exactamente con las velocidades de rotación. Para radicales nitroxídicos con movilidad alta ($\tau < 10^{-9}$ s) el tiempo de correlación τ puede obtenerse -- fácilmente mediante la expresión

$$\tau = 0,57 \Delta H_0 \left[\sqrt{h_0/h_1} + \sqrt{h_0/h_{-1}} - 2 \right] \text{ns} \quad (17 \text{ y } 18)$$

siendo ΔH_0 la anchura media en gaus de la banda central, y h_1 , h_0 y h_{-1} , las alturas de las tres bandas en unidades arbitrarias (fig. 3d). Para movilidad baja ($\tau > 5 \times 10^{-9}$ s) esta expresión no es aplicable, y para -- obtener el valor de τ se debe recurrir a la simulación teórica del espectro o a cálculos empíricos aproximados (19 y 20).

Evidentemente los parámetros físicos como la temperatura y la viscosidad, que afectan al movimiento molecular, afectarán también a la -- forma del espectro y al valor de τ .

La utilidad de los marcadores de tipo nitroxídico, en el estudio de macromoléculas, radica en que el parámetro τ es muy sensible a las varia ciones conformacionales en las proximidades del marcador.

3. MÉTODOS Y RESULTADOS

3.1. PREPARACION DE RIBOSOMAS, ENZIMAS Y FACTORES

Utilizamos la cepa Escherichia coli MRE600, deficiente en RNasa I. Las bacterias han sido recogidas a los 3/4 de la fase logarítmica de crecimiento y provienen de la compañía Grain Processing - Corp. (Muscatine, Iowa, USA).

El aislamiento de los ribosomas 70S se efectúa por centrifugación diferencial, según un método adaptado de Iwasaki et al. (21).

La tabla 1 recoge las cantidades obtenidas en una de las preparaciones realizadas.

Tabla 1

Preparación a partir de 75g de bacterias E. coli MRE600

- Ribosomas antes de la purificación	1,10g
- Ribosomas purificados	0,40g
- Proteínas del sobrenadante S-150 (factores T, G y aminoacil-sintetasas)	1,70g
- Proteínas de la fracción de los factores de iniciación	0,20g

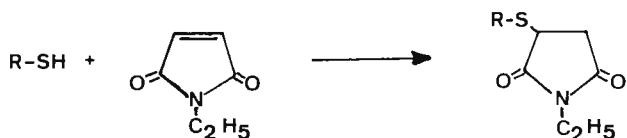
Se comprueba la pureza de las preparaciones de ribosomas - mediante ultracentrifugación con óptica Schlieren. Una preparación se considera suficientemente pura cuando la superficie del pico 50S no - representa más del 10% del area total de todos los picos.

La integridad de los ribosomas 70S se comprueba determinando su constante de sedimentación, mediante ultra-centrifugación analítica con sistema de detección en la modalidad de absorción

Un tercer control de las preparaciones de ribosomas 70S - es el de su actividad biológica, que pueda caracterizarse mediante la síntesis in vitro de polifenilalanina dirigida por un mRNA artificial, el poliU (22).

3.2. MARCAJE DE SPIN DEL RIBOSOMA 70S

La N-etilmaleimida, o N-etil-2,5-pirrolidiona, es una imida sustituida que reacciona con los grupos sulfidrilo (SH) de los residuos de cisteína de las proteínas (23). La reacción consiste en la formación de un enlace tioeter estable según el esquema siguiente:



La reacción de la NEM con las proteínas es específica de los residuos de cisteína. Ciertos autores señalan la eventualidad de reacción con el núcleo de imidazol de los residuos de histidina o con el grupo amino de los residuos de lisina. Sin embargo, parece que estas reacciones no se observan sino para concentraciones muy elevadas de N-etilmaleimida y que, generalmente, la reacción con los grupos sulfidrilo es predominante. La NEM no reacciona con el RNA (24).

Utilizando diversas técnicas, ha sido estimado por diferentes autores (25-27) que el ribosoma 70S contiene de 41 a 44 grupos SH, de los cuales 15 a 17 se encuentran situados sobre la subunidad 30S (25) y de -26 a 27 sobre la subunidad 50S (27). Entre estos grupos SH solamente un pequeño número, variable con las condiciones experimentales, es accesible a los reactivos en el ribosoma nativo: 7 u 8 en la subunidad 30S y 6 ó 7 en la 50S.

En este trabajo se han marcado los grupos SH del ribosoma 70S usando una serie de derivados nitroxídicos de la N-etilmaleimida (fig.4) que designaremos con el término general NONEM.

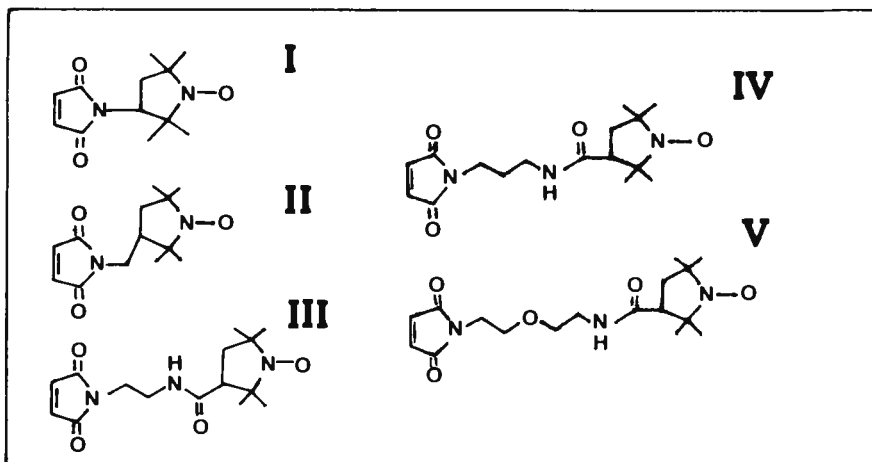


Fig. 4.- Marcadores NONEM

La reacción de marcaje se realizó a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, generalmente en los tampones C (20 mM en tris-HCl pH 7,4, 100 mM en NH_4Cl y 10 mM en $\text{Mg}(\text{AcO})_2$) o D (50m M en tris-HCl pH 7,4, 140 mM en NH_4Cl y 20 mM en $\text{Mg}(\text{AcO})_2$).

Para detener la reacción de marcaje y separar el exceso de marcador, la mezcla de reacción se pasa, a temperatura ambiente, por una columna (20x0,7cm) de Sephadex G-25 fino (28). Las fracciones conteniendo los ribosomas eran concentradas hasta un volumen de -- 0,1-0,2ml por ultrafiltración en una célula Amicon (modelo 3) usando membranas Diaflo PM10; la concentración final de ribosomas era del orden de 10^{-5}M .

A. Grado de incorporación del marcador

La tabla 2 presenta el grado de incorporación del marcador NOMEN I (fig.4) al ribosoma, en diferentes condiciones. La estimación ha sido hecha por dos técnicas diferentes: RPE y marcaje radioactivo.

Tabla 2

Marcaje de ribosomas 70S de E. coli con NONEM I en tampón C, pH 7,4, a 22°C

$\frac{[\text{NONEM}]}{[\text{RIBOS}]} \text{ (a)}$	(min.) Tiempo de reacción	$\frac{\text{NONEM incorp./ribos.}}{\text{RPE (b)}} \quad \frac{^{14}\text{C-NEM (c)}}{}$	
40	1	0,5	
40	2	0,6	0,6
40	4	1,0	
40	5	1,1	1,2
40	8	1,2	
40	16	1,6	1,5
40	32	1,9	1,8
40	60	2,2	2,0
240	2	1,5	1,7
500	185	13,0	>9

(a) $[\text{ribosomas}] = (12 \pm 1) \times 10^{-6} \text{M}$

(b) Error inferior al 20%

(c) Promedio de cuatro experimentos. Error < 20%

En el primer caso el número de marcadores por ribosoma se obtiene como cociente de la concentración de marcadores de spin presentes en la muestra de ribosomas (determinada por doble integración del espectro RPE) y la concentración de ribosomas, obtenida a partir de la absorción UV a 260nm.

En el segundo caso, el promedio de moléculas de marcador incorporadas por ribosoma, se obtiene como diferencia entre el número de moléculas de $^{14}\text{C-NEM}$ incorporadas a ribosomas intactos y a ribosomas premarcados con NONEM I. Se obtiene una buena concordancia entre los dos métodos.

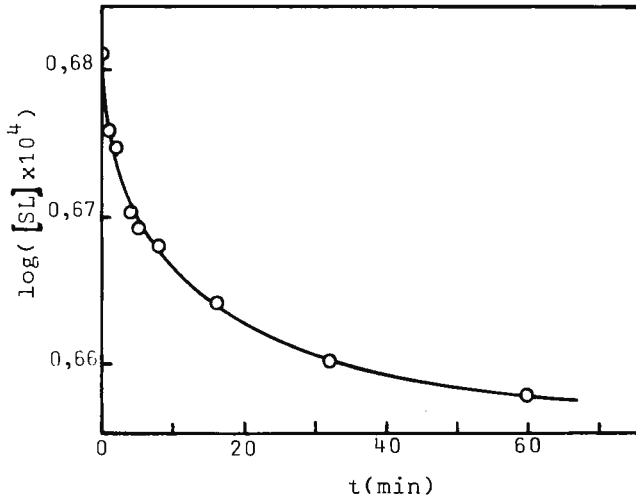


Fig. 5.- Cinética de incorporación del marcador de spin NONEM I al ribosoma 70S.

El valor obtenido para marcaje de 3h concuerda con los resultados de Bakardjieva y Crichton (27).

En la figura 5 se han representado los valores de la tabla 2 correspondientes a un exceso de marcador de 40 veces, en función del -- tiempo, para mostrar la complejidad de la cinética de marcaje del ribosoma con NONEM I.

B. Identificación de las proteínas marcadas

Se aislaron las proteínas ribosómicas (29) a partir de ribosomas intactos, ribosomas débilmente marcados (1,6 NONEM/ribosoma) y - ribosomas fuertemente marcados (13 NONEM/rib.) con el marcador NONEM I (fig. 4). A partir de 300UA₂₆₀ (20mg) de ribosomas se obtienen unos 4mg de proteínas.

Las proteínas ribosómicas fueron marcadas con ¹⁴C-NEM bajo condiciones desnaturalizantes (6M en urea), con lo que se espera que todos los grupos SH reactivos serán alquilados, y a continuación fueron sometidos a electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida, según el método de Wittmann (30 y 31).

La comparación, para cada proteína, entre la radioactividad encontrada en ribosomas con marcador de spin y ribosomas intactos, - permite calcular el grado de incorporación de NONEM a esa proteína. La tabla 3 recoge los valores medios de las dos electroforesis.

Tabla 3

Grado de incorporación del marcador de spin NONEM I a las diferentes protefnas del ribosoma de E. coli según los resultados de electroforesis.

grupos SH (a)	protefna	radioactividad (cpm) (b)			razón de marcaje (c)		NONEM/Protefna (d)	
		p0	p1	p2	p1/p0	p2/p0	p1	p2
1	S1	528	682	18	1,30	0,03		1,0
1	S4	1513	1820	844	1,20	0,56		0,4
1	S8	756	890	953	1,18	1,26		
2	S11	1832	1442	1000	0,79	0,55		0,5
3-4	S12	2397	1785	458	0,74	0,19	0,5	1,6
1	S13	1350	1146	1360	0,85	1,01		
2	S17	1660	1139	236	0,69	0,14	0,3	0,9
1	S18	828	431	251	0,52	0,30	0,5	0,7
1	S21	980	633	84	0,65	0,09	0,35	0,9
3	L2	2933	3324	3804	1,13	1,30		
1	L5	1020	1223	1102	1,20	1,08		
1+1	L6+L11	4093	3676	2231	0,90	0,55		1,3
1	L10	1393	1276	322	0,92	0,23		0,8
2	L14	2572	2185	1300	0,85	0,51		1,0
0	L15	1455	1154	1260	0,79	0,87		
1	L17	2302	2210	1766	0,96	0,77		0,5
1	L27	1039	665	173	0,64	0,17	0,35	0,8

(a) Número de grupos SH según la bibliografía. Debe hacerse notar que algunas proteínas tienen grupos reactivos frente a la NEM distintos de SH.

(b) Los valores están referidos a 1mg de mezcla de protefnas depositadas sobre el gel y han sido corregidos por la retención de material en el gel. Sólomente se presentan las proteínas con más de 400cpm.

p0: protefnas de ribosomas sin tratar con NONEM I.

p1: protefnas de ribosomas con 1,6 NONEM I.

p2: protefnas de ribosomas con 13 NONEM I.

(c) Fracción de grupos SH todavía accesibles a la ^{14}C -NEM en los ribosomas marcados con NONEM I. Sólomente consideramos significativos los valores inferiores a 0,75.

(d) En las protefnas S12, L14 y L17, se ha considerado que el marcador de spin puede estar distribuido entre 2 grupos de la protefna, y en las proteínas L6+L11 se ha supuesto que tres grupos independientes son modificados por el marcador.

La radioactividad específica de las proteínas preparadas a partir de ribosomas intactos era de $3,0 \times 10^5$ dpm/mg lo que corresponde a unos 23 grupos SH por ribosoma marcados con ^{14}C -NEM. Así pues, la radioactividad de las proteínas separadas del gel, en valor medio, es de 1450 cpm por grupo SH marcado con ^{14}C -NEM. Este valor justifica el que en algunos casos se haya de considerar que hay más de un grupo SH -- marcado; y las desviaciones respecto de este valor las interpretamos -- como debidas al hecho de que no todas las proteínas se recuperan en el líquido de centelleo al 100%.

Los resultados de la tabla 3 demuestran que, para marcaje -- poco intenso, más del 80% del marcador de spin se encuentra en la subunidad 30S sobre las proteínas S18, S12, S21 y S17; lo que confirma una vez más que la subunidad 50S es más compacta y sus SH son menos reactivos (32).

Los grupos SH reactivos de las proteínas citadas se encuentran, muy probablemente, en un entorno semejante, y es interesante notar que la mayoría de estas proteínas están localizadas en la cabeza de la subunidad 30S (33 y 34), como se ve en la figura 6. Además, en el -- ribosoma 70S, la cabeza de la subunidad 30S se encuentra en contacto con la región de la subunidad 50S donde se encuentra la proteína L27, que es otra de las proteínas intensamente marcadas. Parece ser, por tanto, que los SH más sensibles a la alquilación se encuentran en la misma región del ribosoma.

En las dos condiciones de marcaje analizadas hemos encontrado, como era de esperar, numerosas coincidencias con los datos de la -- bibliografía para marcaje con NEM, y también algunas diferencias, que deben ser atribuidas al hecho de que la analogía entre NEM y NONEM no es completa. De hecho la presencia del núcleo de tetrametil-pirrolidil añade a la molécula un grupo voluminoso, bastante hidrofóbico.

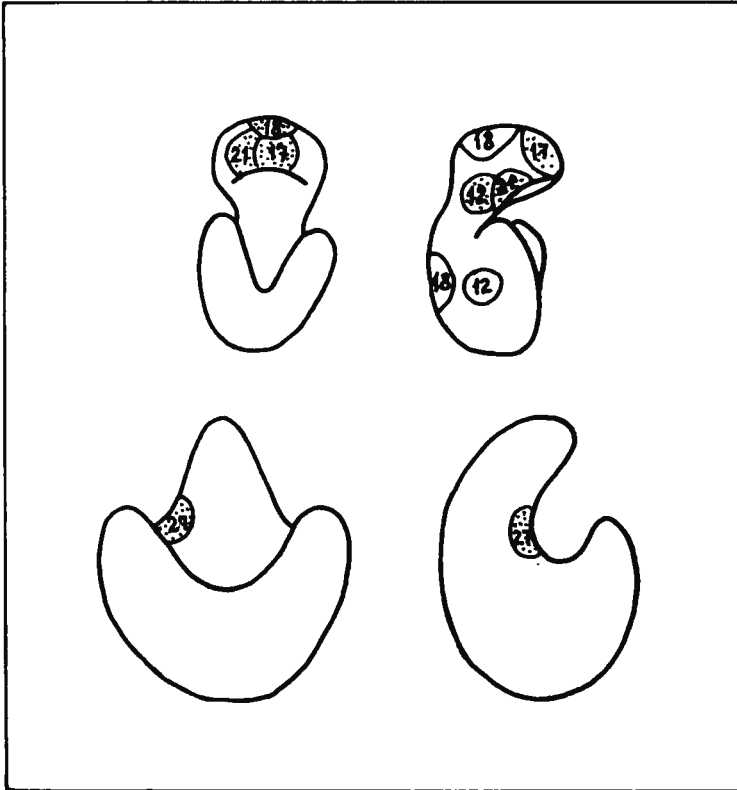


Fig. 6.- Topografía de las proteínas del ribosoma 70S marcadas con NONEM I, para una intensidad de marcaje de 1,6 moléculas de marcador por ribosoma.

C. Integridad y actividad de los ribosomas marcados

Para analizar el efecto que el tratamiento de marcaje de spin tiene sobre la integridad y la actividad biológica del ribosoma, se han comparado las propiedades de sedimentación de ribosomas marcados y sin marcar, así como su capacidad de síntesis de polifenilalanina - in vitro (tabla 4).

Tabla 4

Integridad y actividad de ribosomas 70S marcados

NONEM I por ribosoma (a)	proporción de 70S (%) (b)	actividad relativa en la síntesis de polifenilalanina
0	92	100
0(c)	91	100
0,6		95
1,2	91,5	90
1,6	92	88
2,1		74
13	91	31

(a) Valores obtenidos a partir de la tabla 2.

(b) El resto corresponde a las subunidades libres.

(c) Ribosomas sometidos al tratamiento de marcaje.

Es de destacar que para marcajes poco intensos con NONEM I el ribosoma 70S conserva en gran parte su capacidad de síntesis de polipéptidos. Esto nos hace pensar que los SH de las proteínas S18, S12, S21, S17 y L27 no deben tener un papel preponderadamente en la actividad del ribosoma.

Para marcaje intenso, la actividad se ve reducida apreciablemente; pero los resultados de Schlieren muestran que la estructura -- global del ribosoma 70S no es alterada hasta el punto de producirse la disociación de las subunidades. Asimismo, se han encontrado variacio-

nes en el valor de la constante de sedimentación que no consideramos significativas. Estas observaciones coinciden con los resultados de Tritton (11).

Los resultados de la tabla 4, en combinación con los de la tabla 3, muestran también que las moléculas del marcador de spin no están localizadas tan sólo sobre las partículas 70S inactivas. Así, ribosomas con un promedio de 1,6 marcadores conservan un 88% de la actividad máxima, y en esta preparación hay al menos una proteína (S18) que está marcada en un 48% de los ribosomas. Puede, por tanto, suponerse que una fracción -- apreciable de NONEM-ribosomas es todavía activa.

3.3 ESPECTRO DE RPE DEL RIBOSOMA 70S

Los espectros RPE han sido registrados mediante un espectrometro Bruker 414S, acoplado a un miniordenador Nicolet 1180, de 16K de memoria, provisto de un sistema de almacén de datos sobre disco. El ordenador permite el control de operación del aparato, pudiendo realizarse -- acumulación de espectros a fin de aumentar la razón señal-ruido. Así mismo el ordenador permite ciertas operaciones con los espectros como el cambio de escalas, obtención de espectros de diferencia, integración del área de las bandas, etc. Este mismo ordenador, junto con el programa EPRCAL -- suministrado por la firma Nicolet, ha sido utilizado para realizar la simulación del espectro del ribosoma.

Teniendo en cuenta que la separación máxima de picos en un -- marcador nitroxídico es del orden de 70gaus, se ha tomado para el barrido del espectro un intervalo de 100G. Como la frecuencia de la microonda es de 9,7GHz (banda X), el espectro aparece hacia los 3400G ($g= 2,0023$).

Las restantes variables experimentales se ajustaron de modo que se obtuviera la mejor relación señal-ruido, pero sin deformar las bandas del espectro; es decir:

- potencia de la microonda: lo mayor posible sin llegar a la saturación (generalmente se usó 20mW),

- amplitud de modulación del campo magnético; lo mayor posible, pero inferior a 1/3 de la anchura de banda. (Generalmente 1G)
- constante de tiempo: lo mayor posible, pero inferior a 1/10 del tiempo de barrido de la anchura media de banda. (Normalmente 1/500 del tiempo de barrido total).

Generalmente se registró el espectro a 21°C. Para otras temperaturas se utilizó la unidad de control de temperatura del aparato, -- calibrada con un termopar.

Se usaron células de cuarzo, planas, para disoluciones acuosas de 80 y 200 μ l.

A. Características del espectro

La figura 7 muestra el espectro de RPE del marcador nitroxídico NONEM I en tampón C y el espectro del ribosoma marcado con ese mismo marcador (1,6 marcadores por ribosoma), registrados en las mismas condiciones. Como es lógico, el marcador libre, a 21°C en disolución, presenta una gran movilidad. El tiempo de correlación, τ , obtenido a partir del espectro según se indicó en 2, es de 0,07ns. Por otra parte, este valor es prácticamente constante para todos los marcadores nitroxídicos aquí utilizados.

Por el contrario, el espectro del ribosoma marcado indica que el marcador de spin está muy inmovilizado y que, al menos, hay dos entornos distintos. Así, el espectro presenta una superposición de dos subespectros que reflejan, o bien dos clases diferentes de grupos SH, o bien una clase con dos conformaciones posibles para el marcador y con velocidad de intercambio entre esas conformaciones inferior a -- 10^{-7} s.

Uno de los dos subespectros consiste en tres bandas bien resueltas: h_0 (banda central), h_{+1} (banda a bajo campo) y h_{-1} (banda a alto campo), correspondientes a marcadores de spin en un entorno --

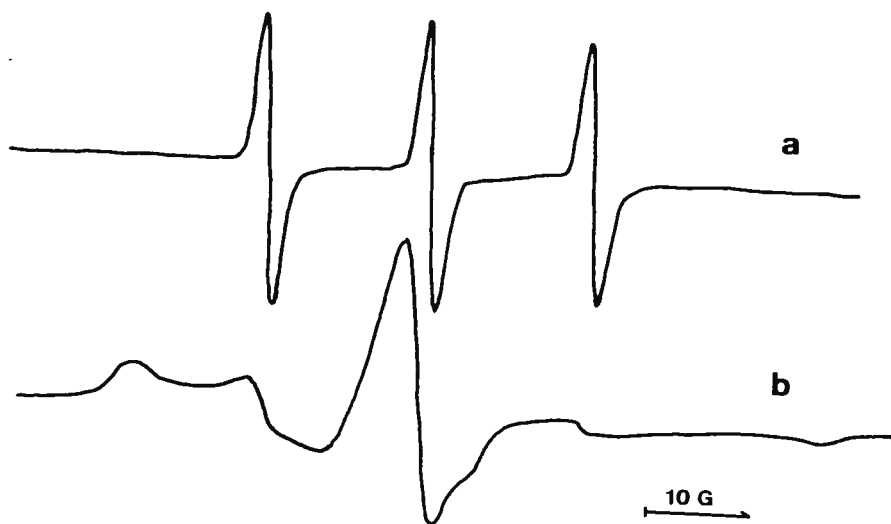


Fig. 7.- Espectro de PRE del marcador de spin NONEM I, a) libre en disolución, b) sobre el ribosoma 70S (1,6 moléculas de marcador por ribosoma).

débilmente inmovilizado. La constante de acoplamiento, A_0 , tiene un valor de 15,9G. El segundo tipo de espectro es similar al espectro de polvo, y la distancia entre las bandas extremas, A_{max} , es 67,6G indicando que el marcador se encuentra prácticamente inmovilizado.

En un espectro compuesto, como el de la figura 7b, no puede determinarse el tiempo de correlación rotacional, τ , mediante la expresión presentada en 2. Sin embargo, podemos utilizar el parámetro h como una medida de la inmovilidad del marcador en el ribosoma.

$$h = \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 2$$

B. Efecto de las condiciones de marcaje

Aunque los resultados de la tabla 4 muestran que el tratamiento de marcaje, incluida la separación sobre sephadex G25, no altera la actividad de síntesis del ribosoma 70S, resulta conveniente controlar el efecto de las condiciones de marcaje sobre el espectro de RPE.

Se hicieron dos marcajes en presencia de 2 y 14% en etanol, con el mismo grado de incorporación de marcador, y no se observó variación en el espectro. Asimismo se registraron espectros consecutivos de una misma preparación de ribosomas marcados; en un espacio de 8h, a 21°C, no se encontró modificación apreciable en el espectro.

Se realizaron también marcajes a 21 y 37°C, registrándose los espectros a 21°C. Para marcaje poco intenso, menos de 2 marcadores por ribosoma, no hay apenas variación en el espectro; pero, para

marcaje intenso, unos 13 marcadores por ribosoma, el espectro de la muestra marcada a 37°C es apreciable más móvil. Se decidió por ello realizar todas las experiencias a 21°C.

C. Efecto del grado de marcaje

Dada la heterogeneidad de posiciones ocupadas por el marcador de spin sobre el ribosoma (tabla 3) es de esperar que la forma del espectro variará con el grado de incorporación del marcador. La variación que - experimenta el espectro es bastante pequeña, incluso para diferencias en la intensidad de marcaje muy grandes, y siempre hay dos componentes. Este resultado sugiere que el entorno de los grupos SH en las distintas proteínas marcadas no es muy diferente, incluso si los marcadores no están homogéneamente distribuidos.

También resulta sorprendente que la componente fuertemente inmóvilizada del espectro esté ya presente para cortos periodos de marcaje, indicando que los sitios más reactivos son de naturaleza bastante hidrofóbica. El bajo valor de A_0 (15,9G) concuerda con un entorno, del marcador de spin, no polar.

Si caracterizamos los espectros por el parámetro h , obtenemos los valores de la tabla 5. Estos valores indican que, cuando el grado de marcaje no es elevado, el marcador no modifica la estructura del ribosoma, al menos de modo que pueda ser detectado por una variación en el espectro.

Tabla 5

Efecto del grado de marcaje
sobre el espectro de RPE

NONEM I por ribosoma	h
0,5	4,7
1,2	4,8
2,2	4,3
13	2,3

Para marcajes intensos se observa un aumento en la movilidad media de los marcadores de spin que admite, al menos, dos interpretaciones:

a) La introducción del marcador produce una modificación en la estructura del ribosoma que se hace más relajada, con lo que la movilidad del marcador aumenta; b) las posiciones menos reactivas corresponden a grupos SH más expuestos. Aunque la segunda interpretación es muy poco probable, realizamos experiencias de pre y postmarcaje con NEM, para resolver toda ambigüedad. Tanto si el marcaje intenso con NEM se hace antes de un marcaje débil con NONEN I, como si se hace después, se observó que la movilidad del marcador de spin aumentaba ligeramente: h disminuye.

Así pues, el marcaje intenso del ribosoma ocasiona una abertura de su estructura, que puede estar relacionada con la apreciable pérdida de actividad reflejada en la tabla 4. Esta modificación estructural es suficientemente intensa como para afectar ligeramente el espectro de RPE, pero no lo es como para reflejarse en un cambio de las propiedades de sedimentación del ribosoma (tabla 4).

D. Efecto de la longitud del marcador

Puesto que el marcador NONEM nos da información sobre el entorno de los grupos SH, hemos empleado una serie de marcadores de spin de longitud diferente para analizar la geometría de las posiciones marcadas. La figura 8 recoge los espectros, correspondientes a un marcaje de 1,5 moléculas de marcador por ribosoma, para los distintos -- marcadores empleados. Como era de esperar, los marcadores más cortos, I y II, están más inmovilizados y exhiben un espectro muy asimétrico, de bandas anchas. Al aumentar la distancia entre el grupo NO y el ribosoma el espectro de RPE se hace más simétrico.

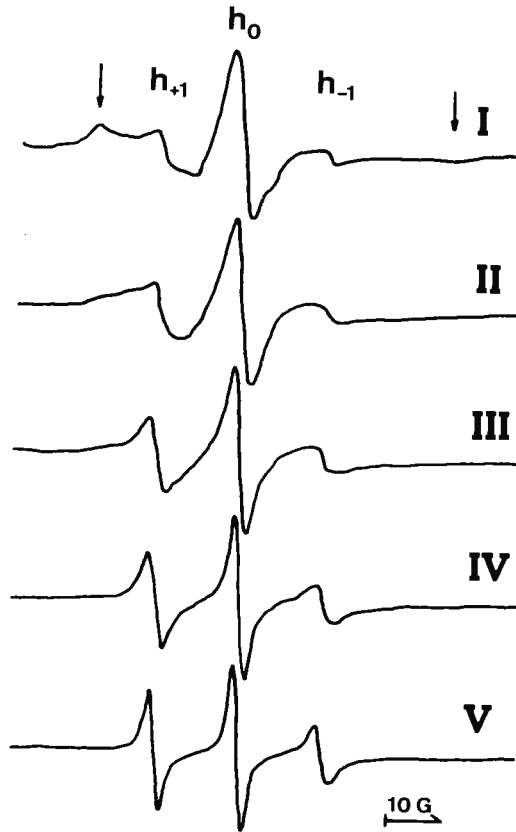


Fig. 8.- Espectros RPE de ribosomas 70S, $6 \times 10^{-6} M$ en tampón C, marcados con 1,5 moléculas de diferentes NONEM.

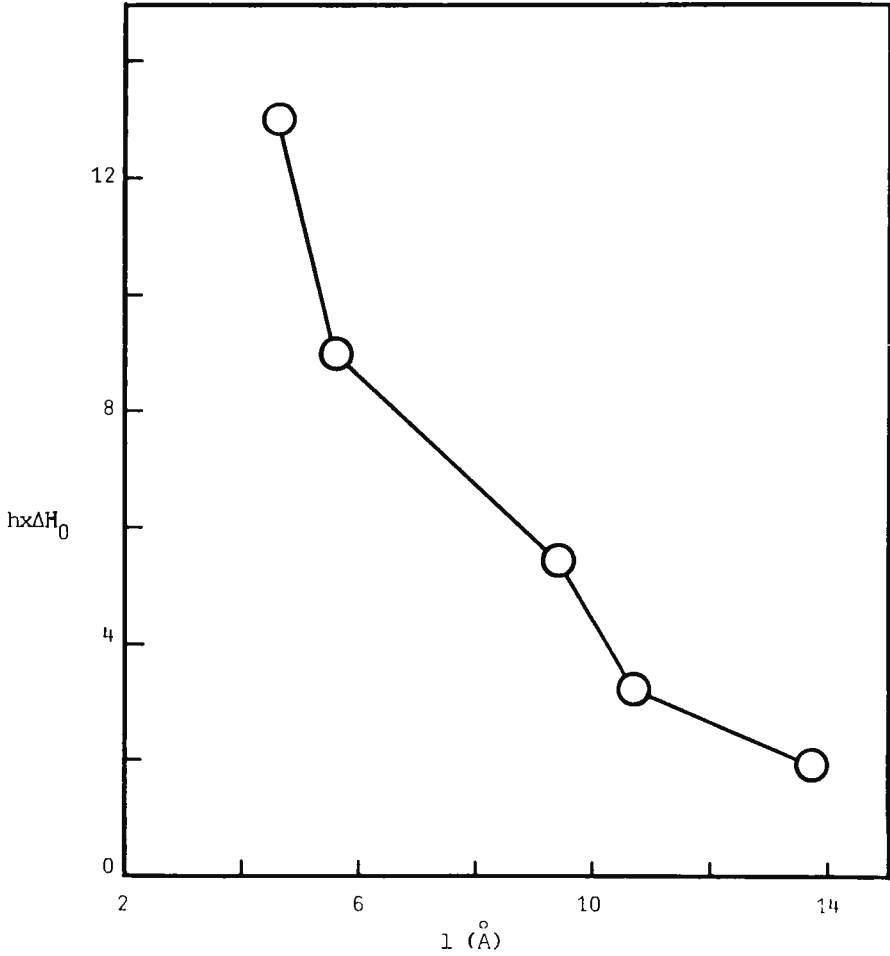


Fig. 9.- Variación de la movilidad de los marcadores de spin NONEM, fijados al ribosoma 70S, en función de la longitud del marcador.

La distancia entre los centros de los dos anillos en los cinco marcadores I a V es, respectivamente, 4,4 , 5,7 , 9,3 , 10,5 y 12,9Å (35). Ya que sólomente los dos primeros espectros de la figura 8 tienen una componente fuertemente inmovilizada, puede deducirse que, cuando el marcador tiene una longitud de alrededor de 6Å, el grupo NO pasa de un entorno impedido a un entorno de rotación relativamente libre. Desde -- luego, el marcador nunca se aproximará a la libertad de movimiento característica de un marcador de spin libre en disolución (fig. 7.a), ya que está covalentemente unido a un sistema muy grande que rota lentamente. La reactividad de los diferentes marcadores usados puede no ser igual, pero ello no puede explicar la gran variación encontrada en el espectro.

En la figura 9 se ha representado el tiempo de correlación rotacional en función de la longitud del marcador, y no se encuentra un salto brusco en la gráfica. Esto sugiere que los grupos SH no se encuentran en un pozo estrecho, sobre el ribosoma, sino más bien en una cavidad ancha con una profundidad máxima de 6Å.

E. Análisis por simulación

Se ha utilizado el programa Nicolet RPECAL, basado en los algoritmos de Coffey et al. (36 y 37), para la simulación del espectro del ribosoma marcado con 1,6 moléculas del marcador NONEM I (fig. 7.b).

El programa es válido para movimiento isotrópico con tiempo de correlación comprendido en el intervalo 10^{-11} - 5×10^{-7} s. El modelo en el que se basa supone simetría axial del grupo NO y, por tanto, de los tensores A y g.

Entre los datos espectrales para el cálculo se requiere, además de $A_{||}$, $g_{||}$, A_{\perp} y g_{\perp} , el valor de T_2 : tiempo de relajación --- spin-spin del electrón. En nuestro caso, $g_{||}$ y g_{\perp} se tomaron de la bibliografía (de marcadores semejantes, pues el parámetro g depende poco del resto de la molécula y apenas influye en la forma del espectro); $A_{||}$ y A_{\perp} se obtuvieron experimentalmente.

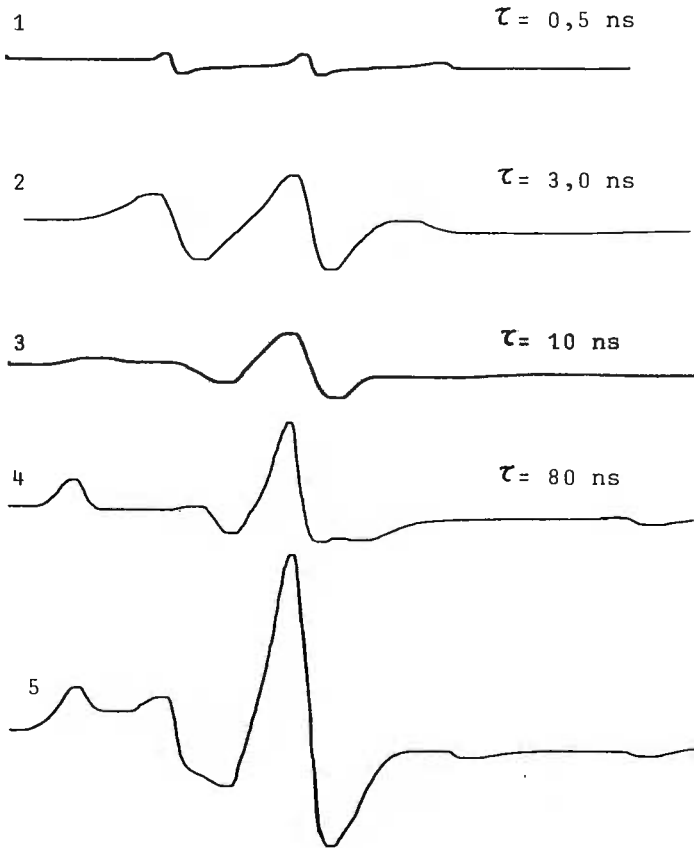


Fig. 10.- Simulación del espectro RPE del ribosoma 70S marcado con 1,6 moléculas de NONEM I. La intensidad relativa de cada espectro es la indicada en la tabla 6. El espectro 5 es la suma de los cuatro primeros.

T_2 está relacionado con la anchura media de banda ΔH mediante la expresión:

$$\Delta H = 2h / \sqrt{3g\beta T_2}$$

El valor de τ se tantea hasta que el espectro RPE simulado coincide con el espectro experimental.

Hemos encontrado una satisfactoria reproducción del espectro experimental mediante una combinación de cuatro componentes (fig. 10). En la tabla 6 presentamos los tiempos de correlación y la contribución de cada componente a la intensidad total del espectro.

Tabla 6

Simulación del espectro RPE del ribosoma 70S marcado con 1,6 moléculas de NONEM I.

componentes	τ (ns)	T_2 (ns)	% intensidad	
móviles	0,5	65	1,4	29,4
	3,0	45	28	
poco móviles	10	45	24,4	70,4
	80	45	46	

Los datos de la tabla 6 indican que al menos 46% del espectro corresponde a la señal del marcador casi completamente inmobilizado sobre el ribosoma. Las distintas componentes del espectro corresponden a diferentes modos de rotación del marcador, independientes entre sí o en equilibrio dinámico pero con velocidad de intercambio pequeña.

3.4. APLICACIONES DE LA RPE AL ESTUDIO CONFORMACIONAL DEL RIBOSOMA

A. Efecto de la temperatura

Se ha seguido la variación de la señal RPE de ribosomas 70S marcados con el marcador nitroxídico NONEM I en función de la temperatura. El grupo NO rota más rápidamente a medida que la temperatura aumenta, de acuerdo con la expresión :

$$\tau = \tau_0 e^{-E/RT}$$

donde E es la energía de activación para la movilidad del marcador.

La figura 11 representa el comportamiento del espectro en la forma de una gráfica de Arrhenius. Entre 24 y 30°C se observa una discontinuidad en la recta. Hemos verificado que esa discontinuidad es significativa, aplicando el test de Chow (38) a las tres regresiones lineales posibles. Efectivamente la suma de los cuadrados de las desviaciones respecto de las tres rectas ajustadas por mínimos cuadrados es:

$$\begin{aligned}
 \text{I} & : 6,5 - 23^{\circ}\text{C} \quad ; \quad \sum_{i=1}^m d_i^2 = 45,4 \times 10^{-5} \quad , \quad m = 4 \\
 \text{II} & : 30 - 63,5^{\circ}\text{C} \quad ; \quad \sum_{i=1}^n d_i^2 = 80,2 \times 10^{-5} \quad , \quad n = 7 \\
 \text{III} & : 6,5 - 63,5^{\circ}\text{C} \quad ; \quad \sum_{i=1}^{m+n} d_i^2 = 422,3 \times 10^{-5} \quad , \quad m + n = 11 \\
 F_{(p, m+n-2p)} & = \frac{(\sum d_i^2(\text{III}) - \sum d_i^2(\text{I}) + \sum d_i^2(\text{II}))/p}{(\sum d_i^2(\text{I}) + \sum d_i^2(\text{II}))/ (m+n-2p)}
 \end{aligned}$$

siendo $p = 2$ para una recta. Sustituyendo en la expresión anterior, se obtiene $F(2,7) = 8,263$; y la probabilidad de que $F > 8,263 = 0,014$; - luego deben considerarse dos rectas distintas en lugar de una sola.

La discontinuidad a $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$ manifiesta un cambio de estructura del ribosoma en el entorno de los marcadores de spin. Cada segmento corresponde a un particular modo de rotación del marcador, con una entalpía específica de rotación, obtenida a partir de las dos regresiones lineales, de $-5,8\text{Kcal/mol}$ y $-4,8\text{Kcal/mol}$, antes y después de la -- transición, respectivamente.

Esta transición está bien por debajo del desdoblamiento global de la estructura del ribosoma hacia los 70°C (39). En nuestra experiencia no hemos encontrado esta transición global porque, a la concentración empleada, a 70°C los ribosomas precipitaron.

La estructura del ribosoma experimenta, por tanto, importantes perturbaciones locales por encima de 30°C , que probablemente corresponden a una reorganización en las proximidades de las proteínas marcadas.

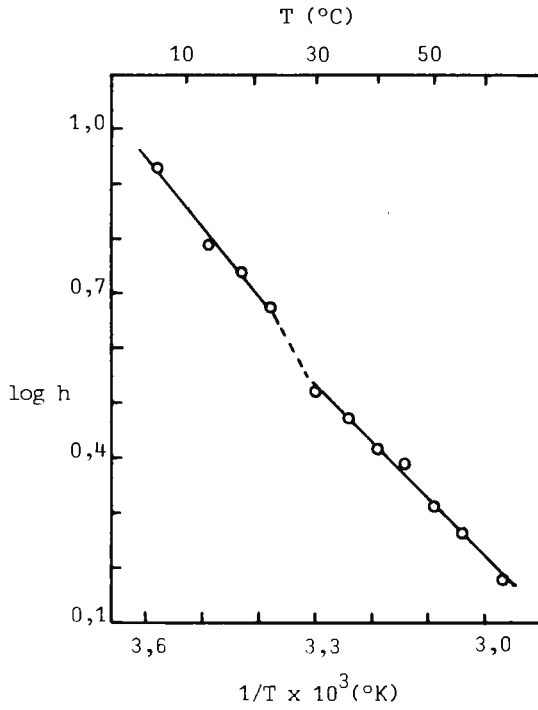


Fig. 11.- Variación con la temperatura de la movilidad del marcador de spin NONEM I en el ribosoma 70S. Representación de Arrhenius.

Por otra parte está bien establecido que la activación de las subunidades 30S provoca la reorganización de las proteínas, en particular en la región donde se encuentran S18 y S21 (40 - 42).

Es de destacar que, para un sistema macromolecular tan grande, solamente se haya encontrado una transición de fusión. Esto constituye otra indicación de la pequeña diferencia que existe entre los entornos estructurales de los distintos grupos marcados.

B. Efecto del ion Mg^{++}

Como es bien sabido, para que el ribosoma mantenga su estructura activa se requiere una cierta concentración de Mg^{++} (43), y el cambio en el valor de esta concentración parece causar modificaciones en la estructura del ribosoma (40). Hemos tratado de ver si esos cambios estructurales pueden ser seguidos por la técnica de RPE. Para ello se han realizado tres marcajes poco intensos (unos 1,5 marcadores por ribosoma) con el marcador de spin NONEM I a concentraciones de Mg^{++} de 20, 10 y 0,5mM (figura 12).

Aunque en la literatura (40) se afirma que el ribosoma 70S -- experimenta un cambio conformacional al pasar de 10 a 20mM en Mg^{++} , nosotros no hemos encontrado diferencias apreciables entre los espectros correspondientes a marcajes a 10 y 20mM. Puede ser que el cambio de estructura exista y que no se refleje en el espectro de RPE. No obstante, conviene hacer notar que Ghosh y More (44) no han observado -- tampoco el cambio conformacional sugerido por Ginzburg y Zamir.

A 0,5mM en Mg^{++} los ribosomas están completamente disociados en sus subunidades (45), como hemos podido comprobar mediante el -- Schlieren, y el marcaje en estas condiciones da lugar a un mayor porcentaje de la componente móvil (fig. 12). Por otra parte, cuando los ribosomas marcados a 10mM son llevados a 0,5mM (mediante diálisis prolongada) no se observa variación apreciable (fig. 13a). Sin embargo,

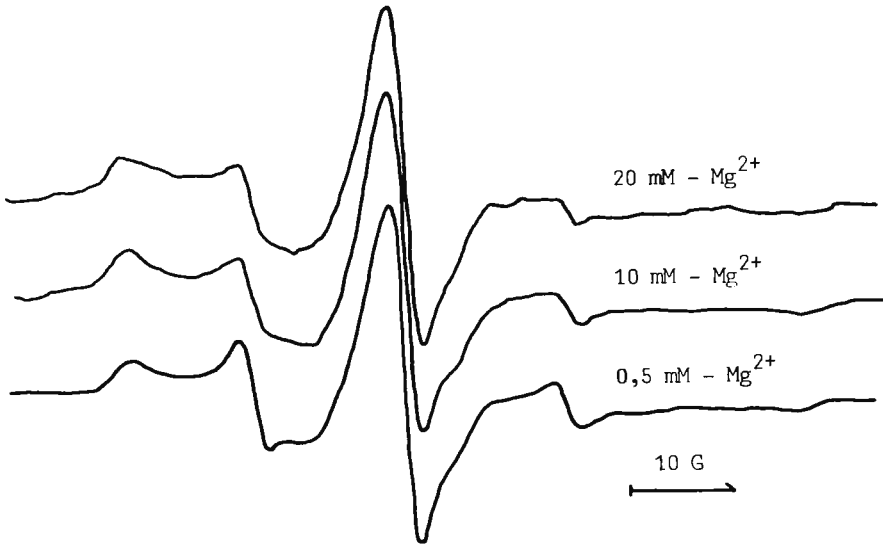


Fig. 12.- Espectros RPE de ribosomas 70S marcados con NONEM I a diferentes concentraciones de Mg²⁺.

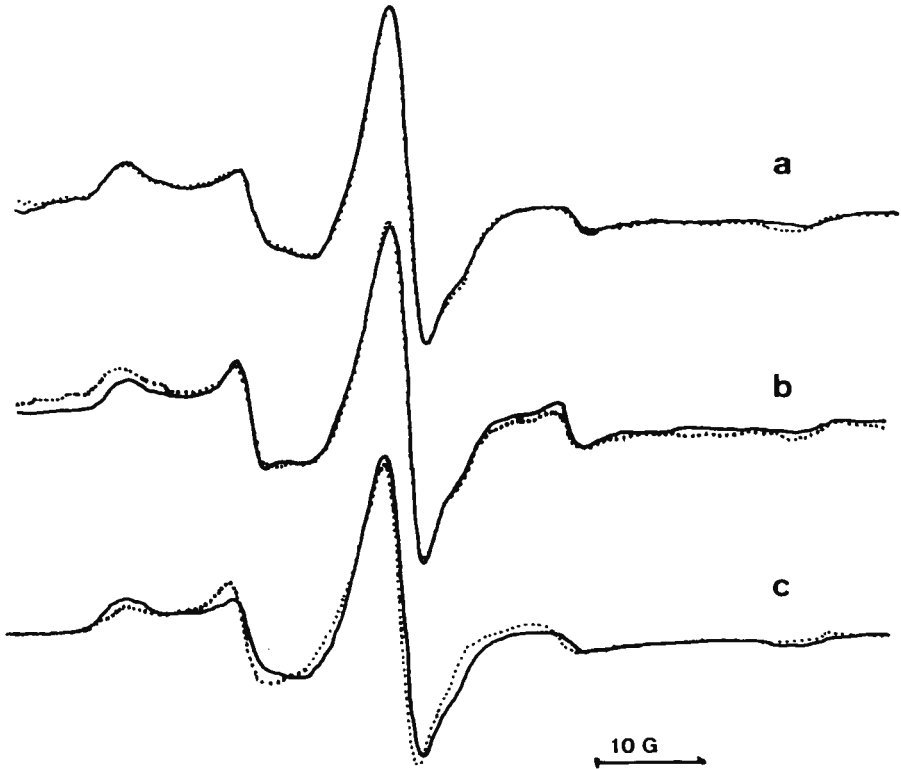


Fig. 13.- a) Ribosomas marcados a 10 mM en Mg^{++} (—) y llevados a 0,5 mM Mg^{++} (....). b) Ribosomas marcados a 0,5 mM en Mg^{++} (—) y llevados a 10 mM en Mg^{++} (....). c) Ribosomas marcados a 10 mM en Mg^{++} (—) y dializados contra EDTA 6 mM (....).

cuando los ribosomas marcados a 0,5mM son llevados a 10mM, se observa una disminución en la intensidad relativa de la componente móvil -- (fig. 13.b).

Interpretamos estas observaciones en el sentido de que, en la disociación del ribosoma, aparecen nuevas posiciones accesibles al marcador, probablemente en la región de contacto entre las dos subunidades; en estas posiciones el marcador tiene gran movilidad, pero esta disminuye, por impedimentos estéricos, cuando se provoca la reasociación de las subunidades. Esta interpretación coincide con otros resultados de la literatura (46 y 47) que muestran un aumento en el número de grupos accesibles a la NEM cuando se produce la disociación del ribosoma en subunidades.

Ha sido estimado (45) que, de 1 a 10mM en Mg^{++} , hay aproximadamente 2000 iones Mg^{++} unidos al ribosoma, y, entre 0 y 1mM en Mg^{++} , hasta 1200 iones quedan aún unidos al ribosoma. Por ello no resulta sorprendente que el espectro RPE a 10mM en Mg^{++} permanezca constante, tras diálisis contra 0,5 mM en Mg^{++} ; los iones unidos al ribosoma mantienen la estructura compacta de las subunidades; sólo se hace patente el efecto primario de los iones Mg^{++} cuya presencia disminuye las repulsiones electrostáticas entre las subpartículas 30S y 50S (48). Sin embargo, si por diálisis prolongada contra EDTA se eliminan los iones Mg^{++} unidos al ribosoma, un notable cambio aparece en el espectro de RPE (fig.13c) reflejando un relajamiento en la estructura de la partícula.

C. Efecto del tRNA

Aunque se ha sugerido con frecuencia que las diferentes etapas de la función del ribosoma deben ir acompañadas de cambios conformacionales (49), no se ha encontrado hasta ahora mucha evidencia directa de estos cambios. Empleando la técnica de RPE hemos puesto de manifiesto la existencia de un cambio conformacional del ribosoma cuando éste incorpora el tRNA.

En una primera serie de experiencias hemos seguido la variación que el espectro RPE del ribosoma, marcado con 1,5 moléculas de NONEM I, experimenta durante la interacción con tRNA, en presencia de un exceso de poliU, en tampón D a 21°C.

La adición de poliU o tRNA^{fe} no afecta apenas la señal RPE del ribosoma. Sin embargo, si ambos están presentes, con independencia del orden en que se haga la adición al ribosoma, se detecta un aumento en la movilidad de los marcadores de spin; lo que debe interpretarse como un cambio estructural, localizado en la región del ribosoma donde se -- encuentran los SH marcados (fig. 6), debido a la formación del complejo ternario. La figura 14a recoge este resultado. El mismo efecto es observado si el tRNA^{fe} es sustituido por tRNA no fraccionado. La sustitución de poliU por U₄ causa la misma perturbación, pero el efecto es más débil.

Las experiencias fueron realizadas a concentraciones de tRNA^{fe} de 1,5 y 15 veces la concentración de ribosomas, que deben corresponder a la incorporación de 1 molécula de tRNA^{fe} (sitio P del ribosoma) y 2 -- moléculas de tRNA^{fe} (sitios P y A del ribosoma) según Phillips (50). En ambos casos se encontró la misma perturbación, pero en el segundo era más intensa.

Por otra parte, si se forma primero el complejo ribosoma-poliU-tRNA^{fe}, y después se marca en condiciones idénticas a las empleadas anteriormente, el espectro RPE indica que los marcadores de spin son ahora -- menos móviles (fig. 14b.) Por consiguiente, la adición del tRNA^{fe} y el -- poliU al ribosoma debe bloquear la accesibilidad de algún grupo SH que antes se marcaba.

Hay que hacer notar que, al marcar el ribosoma en presencia de tRNA^{fe}, también se marca una de las bases del tRNA que tiene un grupo tiol, pero la señal resultante del tRNA marcado es tan débil que no interfiere con la señal del ribosoma.



Fig. 14.- a) Espectros RPE de ribosomas 70S marcados con 1,5 moléculas de NONEM I en tampón D (—), y en presencia de un exceso de poliU y tRNA^{fe} (....).

b) Espectros RPE de ribosomas 70S en tampón D en presencia de un exceso de poliU y tRNA^{fe}. El marcaje se realizó antes (....) y después de la adición del poliU y el tRNA^{fe} (—).

Es sabido que la adición de poliU y tRNA^{fe} disminuye la reactividad de los SH de las proteínas S18 y S1 (40), y que tanto S18 (51) como S1, S11 y S2 (52 y 53) están implicadas en la fijación del tRNA sobre el ribosoma. De estas proteínas, S18 y S21 se encuentran entre las más intensamente marcadas cuando se realiza el marcaje del ribosoma aislado (tabla 4) y pueden ser las responsables del efecto encontrado.

En otra serie de experiencias hemos adoptado el método de -- McConnell (54) de reducción del radical NO del marcador de spin con ácido ascórbico, para comprobar el cambio conformacional observado sobre el ribosoma en la incorporación del tRNA.

A ribosomas, marcados con 1,5 moléculas de NONEM I, en presencia y ausencia de poliU y tRNA sin fraccionar, y al marcador NONEM I, libre, se añadió ácido ascórbico y se siguió la desaparición de la banda central del espectro de RPE. En la figura 15 se da la representación semilogarítmica de la altura de la banda en función del tiempo.

Ninguna de las tres cinéticas es de primer orden, probablemente a causa de que nuestro marcador (con un carbono asimétrico) es una mezcla de dos enantiómeros cuya cinética de reducción con el ácido L-ascórbico es diferente.

Puesto que la concentración de ascórbico se mantiene prácticamente constante, podemos analizar las curvas de la figura 15 considerando dos cinéticas de primer orden. La descomposición de las curvas en dos líneas rectas, ajustadas por mínimos cuadrados, es bastante satisfactoria. La tabla 7 recoge las correspondientes constantes cinéticas así como el porcentaje de señal RPE que corresponde a los grupos NO que se reducen más rápidamente. Como puede verse, en la presencia de poliU y tRNA, K_2 aumenta así como el porcentaje de señal que se reduce rápidamente. Ambas observaciones confirman la hipótesis de que la estructura del ribosoma se hace más relajada cuando éste incorpora el tRNA.

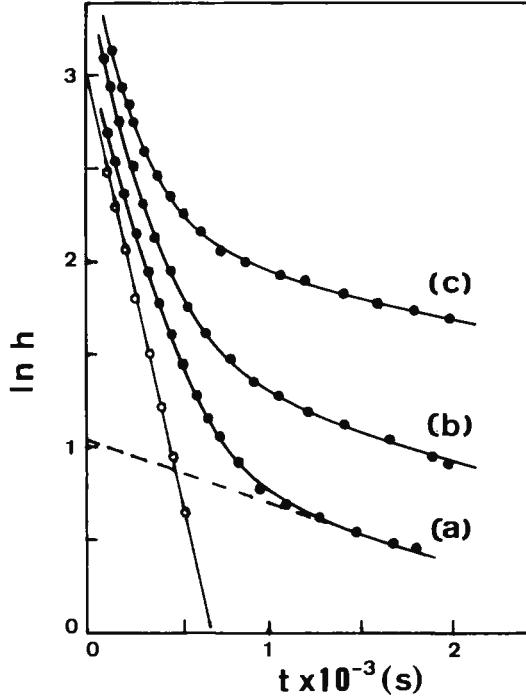


Fig. 15.- Variación de la señal RPE por reducción con ácido ascórbico 10 mM a 22°C. Marcador libre (a); ribosomas marcados con 1,5 moléculas de NONEM I, (b) y ribosomas en presencia de poliU y tRNA^{fe} , (c).

Tabla 7

Cinética de la reducción del grupo NO con ácido L-ascórbico a 21° en tampón D pH 7,4.

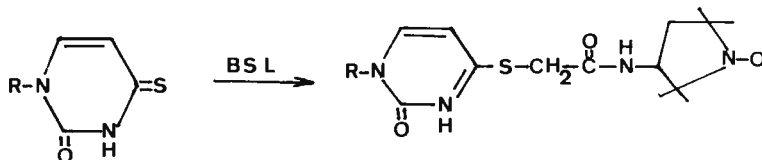
Sistema	K_1 ($S^{-1}M^{-1}$)	K_2 ($S^{-1}M^{-1}$)	% de señal RPE que se reduce rápidamente
NONEM I libre	$0,50 \pm 0,01$	$0,038 \pm 0,004$	88 ± 2
NONEM - ribosoma	$0,55 \pm 0,01$	$0,026 \pm 0,001$	77 ± 1
NONEM - poli(U)-tRNA	$0,53 \pm 0,01$	$0,038 \pm 0,002$	84 ± 2

3.5. APLICACION DE LA RPE AL ESTUDIO CONFORMACIONAL DEL tRNA.

A. Marcaje de spin del tRNA

Hemos utilizado dos marcadores de spin:BSL y CSL, para marcar, respectivamente, la región próxima al brazo del aminoácido y el bucle anticodon (fig. 16). El marcaje se efectuó sobre tRNA^{fe} y sobre Cbz-phe-tRNA^{fe} preparado por el método de Tritton y Mohr (55), siendo Cbz el radical carbobenciloxi que bloquea el NH₂ en α del aminoácido.

El marcador BSL, (bromo-2 acetamido)-3 tetrametil-2,2,5,5 pirrolidinoxil-1, marca específicamente la tiouridina S⁴-U8 del tRNA^{fe} (56) según la reacción:



La base S⁴-U8 se encuentra sobre un de los dos segmentos lineales que unen las dos hélices continuas del tRNA, y ha sido demostrado por Hara *et al.* (57) que los tRNA marcados por BSL en dicha base conservan su actividad biológica.

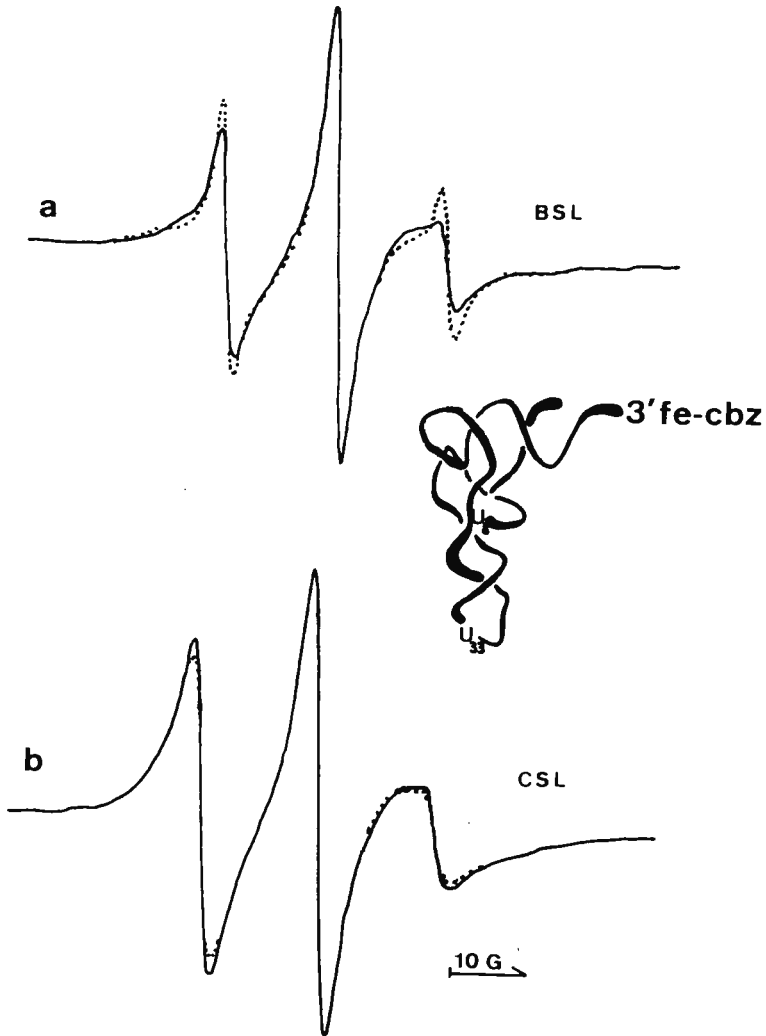
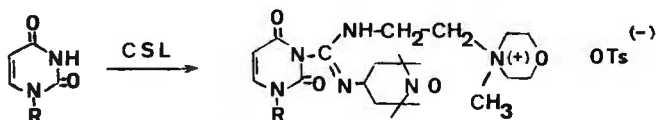


Fig. 16.- Espectros RPE de $\text{Cbz.fe-tRNA}^{\text{fe}}$ (—) y del complejo ternario $\text{Cbz.fe-tRNA}^{\text{fe}}$ -poliU-ribosoma (.....).

El marcador CSL: p-toluensulfonato de (N-metil morfolino-2 etil)-1 (tetrametil-2,2,6,6 piperidionoxil-1)-3 carbodiimida, marca específicamente la uridina U33 del anticodon del tRNA^{fe} (56) según la reacción:



Se obtuvo una intensidad de marcaje de 1,0 moléculas de marcador por tRNA con CSL y de 0,4 moléculas de marcador con BSL. La cromatografía sobre BD-celulosa, después del marcaje, indicaba que menos del 10% del Cbzfe-tRNA era desacilado durante el proceso de marcaje.

Hemos observado que, a pH neutro, el marcador CSL se hidroliza con cierta facilidad. En las medidas llevadas a cabo con este marcador se ha realizado una corrección para eliminar la interferencia del marcador libre resultante de la hidrólisis.

En la figura 16, en trazo continuo, se representan los espectros RPE de BSL-Cbzfe-tRNA^{fe} y CSL-Cbzfe-tRNA^{fe}, en tampón D a 21°C. El tiempo de correlación rotacional del marcador, obtenido a partir de esos espectros, fue de $2,4 \pm 0,2$ ns para BSL y $1,75 \pm 0,05$ ns para CSL. Lógicamente el marcador en la región del anticodon está más expuesto y por ello presenta mayor movilidad.

El marcaje de tRNA^{fe} dio la misma cantidad de incorporación de marcador, y los correspondientes espectros eran idénticos a los de la figura 16 para Cbzfe-tRNA^{fe}.

B. Interacción SL-Cbzfe-tRNA^{fe} — ribosoma

Hemos estudiado la interacción de SL-Cbzfe-tRNA^{fe}, o SL-tRNA^{fe} (donde SL es el marcador BSL o CSL), con el ribosoma 70S. La figura 16 muestra cómo la fijación del aminoacil-tRNA sobre el ribosoma va acompañada de una inmovilización del marcador CSL, y un aumento de movilidad en

el marcador BSL. Los tiempos de correlación, τ , obtenidos en presencia de poliU y ribosomas, fueron 2,1ns para CSL y 1,5ns para BSL. El efecto era algo más pronunciado en presencia de factores de iniciación y GTP (incorporación enzimática), obteniéndose para el tiempo de correlación los valores de 1,2ns para BSL y 2,3ns para CSL.

El aumento en el tiempo de correlación, τ , para CSL debe corresponder a una inmovilización del marcador por la proximidad del poliU y del ribosoma, y la disminución en τ para BSL manifiesta una apertura de la estructura del tRNA. La figura 17 presenta la variación de este efecto en función de la concentración relativa de ribosomas y aa-tRNA.

En el caso de tRNA^{fe} no aminoacilado, marcado con BSL, no se observó variación en el espectro de RPE al realizarse la interacción con el ribosoma y poliU. Ello nos sugiere que la modificación estructural del tRNA está condicionada a la interacción del aminoácido con el ribosoma. También es posible que el aa-tRNA y el tRNA posean una conformación diferente, diferencia que no se manifiesta en el espectro de RPE de los marcadores empleados.

Las curvas de la fig. 17 nos permiten obtener las correspondientes representaciones de Scatchard (58 y 59) para los dos marcadores -- (fig. 18.)

Ambas series de puntos no pueden ser ajustadas a líneas rectas, lo que sugiere la existencia de, al menos, dos constantes de asociación diferentes. Hemos realizado el ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales a la ecuación de la interacción, supuestos dos sitios de interacción diferentes sobre el ribosoma.

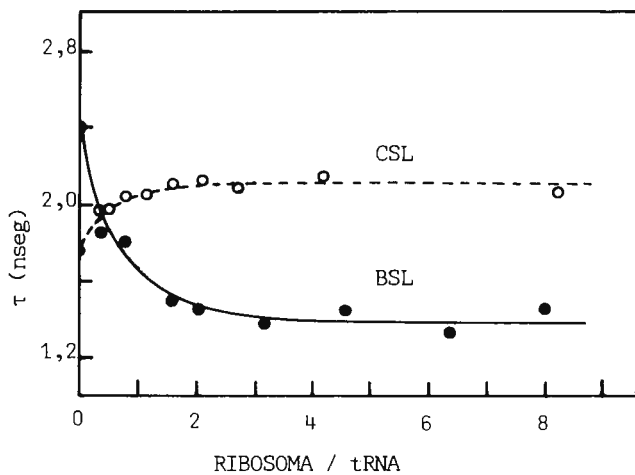


Fig. 17.- Interacción Cbzfe-tRNA^{fe} — ribosoma,
en presencia de poliU.

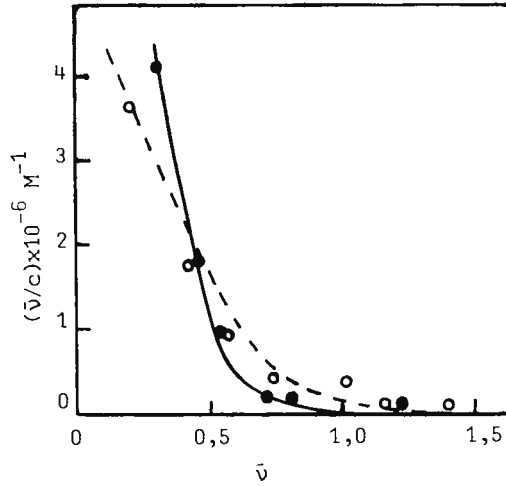


Fig. 18.- Representación de Scatchard de la interacción Cbzfe-tRNA-poliU-ribosoma. BSL (—●—) y CSL (-○-)

La intersección de las curvas con el eje $\bar{\nu}$ nos da la proporción de ribosomas activos (α). Las curvas obtenidas se presentan en la figura 18 y los correspondientes parámetros del ajuste se recogen en la tabla 8.

tabla 8
Asociación de cbz-fe-tRNA y ribosoma en presencia de poliU .

	K_1 (M^{-1})	K_2 (M^{-1})	α
BSL - cbz-fe-tRNA	$1,6 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	0,55
CSL - cbz-fe-tRNA	$7,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	0,70

Ambas constantes deberán corresponder a los sitios A y P del ribosoma, y como es sabido el sitio P tiene una mayor afinidad por el aa-tRNA con el grupo amino bloqueado, como es nuestro caso.

Los valores obtenidos para las dos constantes son inferiores a las encontradas en la bibliografía (60) para N-acetil-fe-tRNA, debido a la presencia del grupo Cbz.

4. CONCLUSIONES

1. Se pueden introducir hasta 1,5 moléculas del marcador de spin NONEM I sin apenas modificar la estructura ni la actividad biológica del ribosoma 70S.
2. El marcador se distribuye entre los grupos SH de las proteínas S18, S12, S21, S17 y L27.
3. El correspondiente espectro RPE puede interpretarse en función de los dos tipos de movimiento del marcador paramagnético : un modo de rotación rápido, con 3 ns al que corresponde un 30% de la intensidad del espectro y otro lento, 10 ns , que da cuenta del 70% de la intensidad total.
4. Las posiciones marcadas son bastante similares y pueden describirse como una ancha cavidad de menos de 6 \AA de profundidad, formada por grupos no polares.
5. En el intervalo de temperaturas $27 \pm 3^\circ\text{C}$ el ribosoma experimenta un cambio de conformación que afecta las posiciones marcadas.
6. Los entornos de los SH marcados no parecen ser afectados por la disociación del ribosoma en subunidades.
7. En la formación del complejo ternario con poliU y $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$, el ribosoma 70S experimenta una relajación de su estructura en la región ocupada por el marcador de spin.
8. En el complejo ternario uno de los SH, inicialmente accesibles, resulta protegido por el poliU o el tRNA.
9. La fijación del aminoacil-tRNA sobre el ribosoma va acompañada de una modificación estructural del tRNA que afecta a la base $\text{S}^4\text{-UG}$

5. BIBLIOGRAFIA.

1. SPIRIN, A. y GAVRILOVA, L.: "The Ribosome. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics", 4, Spring-Ver. (1969).
2. CHUANG, D. y SIMPSON, M.V.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 1474 (1971).
3. KURLAND, C.G.; Ann. Rev. Biochem., 46, 173 (1977).
4. WITTMANN, H.G.; Fed. Proc., 36, 8, 2075 (1977).
5. BERLINER, L.J.; "Spin Labeling. Theory and Applications" I y II, A.P. New York (1976 y 1979).
6. SWARTZ, H.M., BOLTON, J.R. y BORG, D.C.; "Biological Applications of Electron Spin Resonance", Wiley-Int., N.Y. (1972).
7. DUGAS, H.; Can. J. Spectr., 18, 110 (1973).
8. DUGAS, H.; Ac. Chem. Res. 10, 47 (1977).
9. BRAKIER-GINGRAS, L., PROVOST, L. y DUGAS, H.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1238 (1974).
10. BRAKIER-GINGRAS, L., BOILEAU, G., GLORIEUX, S. y BRISSON, N.: Biochim. Biophys. Acta 521, 413 (1978).
11. TRITTON, T. R.; Biochemistry 17, 3959 (1978).
12. ONISHI, S.I. y McCONNELL, H.; J. Am. Chem. Soc. 87, 2293 (1965)
13. SMITH, I.C.P., SCHREIER-MUCCILLO, S. y MARSH, D.; "Free Radicals in Biology" A.P., Vol. I, p 149 (1976).
14. BERLINER, L.J. y REUBEN, J. (eds.), "Biological Magnetic Resonance", Plenum Press, NY (1978).
15. CARRINGTON, A. y McLACHLAN, A.D.; "Introduction to Magnetic Resonance", Harper-Row, NY. (1967).
16. POOLE Jr, C.P.; "Electron Spin Resonance", Ed. J. Wiley-Sons, IP (1967).
17. KIVELSON, D.; J. Chem. Phys. 33, 1094 (1960).
18. WAGGONER, A.S., GRIFFITH, O.H. y CHRISTIESEN, C.R; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57 1198 (1967).
19. McCALLEY, R.C., SHIMSHICH, E.J. y McCONNELL, H.; Chem. Phys. Let. 13, 115 (1972).
20. GOLDMAN, S.A. et al.; J. Chem. Phys. 56, 716 (1972).
21. IWASAKI, K. et al.; Arch. Biochem. Biophys. 125, 542 (1968).
22. GESTELAND, R.F.; J. Mol. Biol. 18, 356 (1966).
23. WEBB, J.L.; "Enzyme and metabolic inhibitors". Vol. III, A.P. NY, 337 (1966)

24. MOORE, P.B.; J. Mol. Biol. 60, 169 (1971).
25. MOORE, P.B.; J. Mol. Biol. 98, 439 (1975).
26. ACHARYA, A.S. y MOORE, P.B.; J. Mol. Biol. 76, 207 (1973).
27. BAKARDJIEVA, A. y CRICHTON, R.R.; Biochem. J. 143, 599 (1974).
28. TRAUT, R.R. y HAENNI, A.L.; Eur. J. Biochem. 2, 64 (1967).
29. HARDY, S.J.S., KURLAND C.G., VOYNOW, P. y MORO, G.; Biochemistry 8, 2897 (1969).
30. KALTSCHMIDT, E. y WITTMANN, H.G.; Anal. Biochem. 36, 401 (1970).
31. WITTMANN, H.G.; "Methods in Enzymology XXX", p 497 (1974).
32. SLOBIN, L.I.; J. Mol. Biol. 61, 281 (1971).
33. LAKE, J.A.; J. Mol Biol. 105, 131 (1976).
34. TISCHENDORF, G.W., ZEICHHARDT, H. y STOFFLER, G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4820 (1975).
35. HULL, H.H., CHANG, R. y KAPLAN, L.J.; Biochim. Biophys. Acta 400, 132 (1975).
36. COFFEY, P., ROBINSON, B.H. y DALTON, L.R.; Chem. Phys. Lett. 35, 360 (1975).
37. COFFEY, P., ROBINSON B.H. y DALTON, L.R.; Mol. Phys. 31, 1703 (1976).
38. CHOW, G.C.; Econometrica 28, 3, 591 (1960).
39. ONIRI, G. et al.; Studia Biophysica 65, 155 (1977).
40. GINZBURG, I. y ZAMIR, A.; J. Mol. Biol. 93, 465 (1975).
41. THAMMANA, P. y HELD, W.A.; Nature 251, 682 (1974).
42. THAMMANA, P. y CANTOR, C.R.; Nucl. Acids Res. 5, 805 (1978).
43. CHAO, F.C. y SCHACHMAN, H.K.; Arch. Biochem. Biophys. 61, 220 (1956).
44. CHOSH, N y MOORE, P.B.; Eur. J. Biochem. 93, 147 (1979).
45. WISHNIA, A. y BOUSSERT, A.S.; J. Mol. Biol. 116, 577 (1977).
46. MODOLELL, J. y VAZQUEZ, D.; "Ribosomas and RNA metabolism (eds.: Zelinka y Balar) Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, 259 (1976).
47. GLICK, B.R. y BRUBACHER, L.J.; J. Mol Biol 93, 319 (1975).
48. WISHNIA, A. et al, J. Mol. Biol. 93, 499 (1975).
49. COX, R.A.; Prog. Biophys, Mol. Biol. 32, 3, 193 (1977).
50. PHILLIPS, G.R.; J. Biol. Chem. 245, 859 (1970).

51. USTAV, M. et al; FEBS Lett. 87, 315 (1978).
52. MARGARITELLA, P. Y KUECHLERM E. ; FEBS Lett. 88, 131 (1978).
53. FANNING, T.G. et al; Nucleic Acids Res. 5, 933 (1978).
54. KORNBERG, R.D. y McCONNELL, H. M.; Biochemistry 10, 1111 (1971)
55. TRITTON, T.R. y MOHR, S.C.; Biochem. 12, 905 (1973).
56. CARON, M. y DUGAS, H.; Nucl, Acid Res. 3, 19 (1976).
57. HARA, H. et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 305 (1970),
58. SCATCHARD, G; Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51, 660 (1949).
59. HALFMAN, C.J. y NISHIDA, T.; Biochem. 11, 3493 (1972).
60. ODINZOV, V.B. y KIRILOV, S.V.; Nucleic Acids Res. 5. 3871 (1978)



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.º:
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.º 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 Alvarez, M.º 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.º 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 Buitrago. | 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, N.:
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-Tolosa, 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.:
La mujer española en el mundo del trabajo. 1900-1930.
- 119 Pere Julià:
El formalismo en psicolingüística: Reflexiones metodológicas.
- 126 Mir Curcó, C.:
Elecciones Legislativas en Lérida durante la Restauración y la II República: Geografía del voto.
- 130 Reyes Cano, R.:
Medievalismo y renacentismo en la obra poética de Cristóbal de Castillejo.

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Calculador en una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, 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 Natrlurética.
- 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 Zugasti 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 4_{He} líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica 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 Moliner, 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 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.
- 101 Fernández de Heredia, C.:
Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.
- 103 Guix Pericas, M.:
Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmunocitos 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 Galián Jiménez, R.:
Teoría de la dimensión.
- 111 Obregón Perea, J. M.:
Detección precoz del hipotiroidismo congénito.
- 115 Cacicedo Egües, L.:
Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótrópica.
- 121 Rodríguez García, R.:
Caracterización de lisozimas de diferentes especies.
- 122 Carravedo Fantova, M.:
Introducción a las Orquídeas Españolas.
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:
Contribución al estudio de la Mano-
- metría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.**
- 127 Marro, J.:
Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.
- 129 Gracia García, M.:
Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.
- 131 García Sevilla, J. A.:
Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.

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.* P.:
Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.
- 15 Ruiz López, F.:
Proyecto de inversión en una empresa de energía eléctrica.
- 23 Bastarache 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 Alvarez, 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 bloensayo 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.:
Estudio 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 Mesme.
- 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 Fitalexinas 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.
- 123 Pulido Bosch, A.:
Datos hidrogeológicos sobre el borde occidental de Sierra Nevada.

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.
- 124 Roldán Barber, H.:
La naturaleza jurídica del estado de necesidad en el Código Penal Español: crítica a la teoría de la exigibilidad de la conducta adecuada a la norma.
- 128 De Esteban Alonso, J.:
Los condicionamientos e intensidad de la participación política.

