

INTERACCIONES MOLECULARES  
PROYECCION BIOLOGICA

A. M. MUNICIO

FJM  
Com2  
Int



A. M. MUNICIO

# INTERACCIONES MOLECULARES

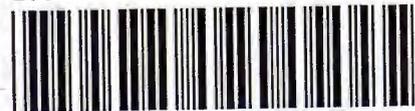
## PROYECCION BIOLOGICA



publicaciones de la  
**FUNDACION JUAN MARCH**  
*Colección COMPENDIOS*  
**RIODUERO**

FJM-Com 2-Int  
Interacciones moleculares : proyecci

1032522



Biblioteca FJM

# **INTERACCIONES MOLECULARES**

## **PROYECCION BIOLOGICA**

- La **BIOLOGIA MOLECULAR** enfocada desde uno de los ángulos que permite mayor diversidad de tratamientos.
- Las **INTERACCIONES MOLECULARES** en la constitución de ingredientes celulares, en la regulación del metabolismo y en la biosíntesis de proteínas.
- Una de las **BASES MOLECULARES** más importantes de la **BIOLOGIA**, desde sus aspectos físicos, químico-físicos, bioquímicos e instrumentales.
- Los tratamientos teóricos fundamentales de las **INTERACCIONES MOLECULARES** y las técnicas experimentales para su estudio.





INTERACCIONES MOLECULARES  
*PROYECCION BIOLOGICA*



FJM - Com 2 - Int

# INTERACCIONES MOLECULARES

## *PROYECCION BIOLOGICA*

POR

A. M. MUNICIO

CON LA PARTICIPACIÓN DE

**F. Agulló, J. Bertrán, L. Franco,  
E. Gallego, F. García-Blanco,  
J. Modolell, F. Montero, M. Salas  
y D. Vázquez**



Publicaciones de la FUNDACION JUAN MARCH  
**Colección Compendios**

RIODUERO  
MADRID 1974

La FUNDACIÓN JUAN MARCH no se solidariza necesariamente con la opinión de los autores cuyas obras publica.

Trescientos ejemplares de esta obra han sido donados por la FUNDACIÓN JUAN MARCH a centros culturales y docentes.

© Fundación Juan March, Madrid, 1974

Depósito legal: M. 7.132-1974

ISBN 84-400-7177-9

Impreso en España. Printed in Spain

Hijos de E. Minuesa, S. L. Ronda de Toledo, 24. Madrid-5 (1974)

Fotocompuesto por Imposa. Juan de Oñas, 12. Madrid-20

## INDICE GENERAL

	<u>Págs.</u>
CAPITULO I.—Fuerzas de interacción entre sistemas moleculares (F. Agulló).	3
CAPITULO II.—Evaluación mecánico-cuántica de interacciones moleculares. Conformación de polipéptidos y ácidos nucleicos (J. Bertrán) . . . . .	41
CAPITULO III.—Interacciones moleculares en el DNA (C. Valdemoro). . . . .	67
CAPITULO IV.—Cálculo del porcentaje de helicidad en polipéptidos y proteínas (F. García-Blanco) . . . . .	105
CAPITULO V.—Equilibrios de asociación en macromoléculas. Técnicas de estudio (L. Franco y F. Montero). . . . .	131
CAPITULO VI.—Espectrometría de relajación química (E. Gallego). . . . .	229
CAPITULO VII.—Interacciones moleculares y regulación del metabolismo (A. M. Municio). . . . .	267
CAPITULO VIII.—Transcripción y traducción del mensaje genético (M. Salas). . . . .	497
CAPITULO IX.—Interacciones histonas-DNA (F. Montero). . . . .	541
CAPITULO X.—Interacciones moleculares entre constituyentes de cromosomas (L. Franco). . . . .	559
CAPITULO XI.—Ribosomas. Interacciones, disgregación y reconstitución (J. Modolell). . . . .	579
CAPITULO XII.—Mecanismos de acción de antibióticos y otros compuestos que interaccionan con DNA (D. Vázquez). . . . .	593



## PRÓLOGO

*La FUNDACION JUAN MARCH presenta, como continuación a la marcha iniciada en el año 1973 con la colección «Compendios», el titulado «INTERACCIONES MOLECULARES», que abre, dentro de la serie, la temática sobre Biología. Para la elección de esta temática, entraron en juego, principalmente, dos criterios: el primero, quizás, residía en la contemplación de los distintos niveles en que la organización biológica puede ser analizada; el segundo, basado en la mejor conveniencia de ofrecer aspectos y tratamientos que, al lado de una aportación bibliográfica en nuestra lengua, supusieran una actitud, un estilo y una proyección lo más intensamente eficaces en la promoción científica; una actitud acorde al tiempo rápido que nos viene marcando la investigación biológica actual; un estilo que, al incorporar como su más importante característica un sesgo multidisciplinario, muestre motivos de indiscutible eficacia; y una proyección que signifique y señale nuevos caminos, que ofrezca utensilios mentales con los que poder abordar más abundantemente originales problemas biológicos.*

*Es conocido cómo el enfrentamiento con la organización del ser vivo ha supuesto muy marcadas y definidas épocas de la Biología. En el siglo XIX, al lado de lo que puede conocerse como macro-organización, nace la contemplación de la estructura íntima de los cuerpos organizados. Ante esta visión, desaparecen muchas diferencias macroscópicas; el tejido, el último término en que el ser vivo puede ser resuelto por el anatomista, significa un nivel intermediario entre órgano y molécula; la teoría celular ofrece tremendas simplificaciones a interpretaciones y a supuestas diferencias del organismo en su conjunto, constituye el punto de partida para el conocimiento de las propiedades de todo ser vivo y es también el punto de partida para el estudio de su composición y función. Se ha dicho que, con la célula, la Biología encontró su átomo; por encima de lo original que la frase pueda tener, quizá la originalidad misma ra-*

dica en lo que significa de cambio en la práctica de la Biología, que corre parangón con lo que supuso el advenimiento de la Física atómica.

Todas estas concepciones, según expresa François Jacob, iban a acarrear «la división de la Biología en dos ramas, cada una de ellas con sus propias técnicas y materiales. De un lado, una de ellas continúa ocupándose del organismo en su totalidad, considerado ya como una unidad intangible, ya como elemento de una población o de una especie. Esta Biología, que no tiene contacto con las otras Ciencias de la Naturaleza, funciona con los conceptos de la Historia Natural, sin referencia alguna a la Física o a la Química. De otro lado, se pretende, por el contrario, reducir el organismo a sus constituyentes. Para hacer esta Biología, no es suficiente observar los seres vivos; es necesario analizar las reacciones químicas, profundizar el estudio de las células, esclarecer sus fenómenos. Si el organismo debe, aún, concebirse como un todo, ha de ser porque la regulación de las reacciones, la coordinación de las células y la integración de los fenómenos, aporten la posibilidad de una síntesis».

Ello sitúa, inequívocamente, las dos grandes concepciones de la Biología frente a la organización del mundo viviente. La interpretación molecular de la Biología reconoce la unidad de los procesos químico-físicos para el tratamiento de la variada fenomenología que ocurre en el ser vivo. Más aún, este enfoque molecular ha ofrecido en los últimos años desplazamientos que, de un lado, van desde las propiedades químicas globales de las macromoléculas a la caracterización de los detalles de su estructura molecular fina, y, de otro, pasan de las moléculas y los procesos individuales a sistemas organizados.

Así, pues, el enfoque molecular se está haciendo hoy, y simultáneamente, más físico y más biológico. Más físico, con la aplicación de cada vez más refinados conceptos y metodología físicos; más biológico, con un mayor énfasis en el estudio de sistemas organizados. Y es, precisamente, la introducción de esta refinada metodología física y química la que hace posible el progresivo enfrentamiento con una cada vez más compleja organización biológica.

La utilización de estos criterios ha conducido, pues, al enfoque dado a este Compendio al considerar las INTERACCIONES MOLECULARES como fenómeno esencial a la interpretación molecular de la Biología, en el que se fundamentan importantes actividades del ser vivo, que ofrece la posibilidad de servir de base a tratamientos de diferentes niveles de organización estructural y en el que, a no dudarlo, han de basarse futuras versiones moleculares de codificaciones asociativas.

*Al lado de la fenomenología biológica que se nos ofrece en esta obra, será conveniente considerar, en sus principios, la base física que a ella subyace, los tratamientos teóricos que pueden originarse y la metodología capaz de enfrentarse con su estudio experimental. Estos tipos de consideraciones nos van a presentar, sin duda, una imagen multidisciplinaria de las INTERACCIONES MOLECULARES, que intenta con sus ejemplos, a la vez, conformar la variación de sus enfoques.*

A. M. MUNICIO



**INTERACCIONES MOLECULARES**  
**PROYECCION BIOLOGICA**



# CAPÍTULO I

## *FUERZAS DE INTERACCION ENTRE SISTEMAS MOLECULARES*

F. AGULLÓ

Departamento de Física. Universidad Autónoma de Madrid

I.	RESPUESTA DIELECTRICA DE SISTEMAS MOLECULARES . . . . .	4
1.	Introducción. Constante dieléctrica . . . . .	4
2.	Diélectricos no polares y diélectricos polares . . . . .	4
3.	Campo eléctrico local . . . . .	5
4.	Diélectricos no polares. Fórmula de Clausius-Mossotti . . . . .	7
5.	Diélectricos polares. Fórmula de Langevin . . . . .	9
6.	Polarizabilidad molecular. Modelo de Lorentz . . . . .	10
7.	Dispersión y disipación . . . . .	13
II.	FUERZAS DE INTERACCIÓN ENTRE SISTEMAS MOLECULARES. LARGAS DISTANCIAS	14
1.	Introducción . . . . .	14
2.	Interacción a largas distancias. Tratamiento clásico . . . . .	15
3.	Multipolos . . . . .	16
4.	Potencial de una distribución arbitraria de carga . . . . .	20
5.	Interacción de una distribución de carga con un potencial exterior . . . . .	22
6.	Interacción entre sistemas moleculares . . . . .	23
7.	Tratamiento cuántico de la interacción a larga distancia . . . . .	24
8.	Fuerzas de dispersión o de London . . . . .	27
III.	FUERZAS DE INTERACCIÓN ENTRE SISTEMAS MOLECULARES. CORTAS DISTANCIAS	29
1.	Introducción . . . . .	29
2.	Método de Heitler-London . . . . .	31
3.	Enlace covalente. Resonancia . . . . .	33
4.	Método de Hund-Mulliken . . . . .	35
5.	Distancias intermedias. Fórmulas empíricas . . . . .	38

## I. Respuesta dieléctrica de sistemas moleculares

### 1. INTRODUCCIÓN. CONSTANTE DIELECTRICA

La materia responde a la aplicación de un campo eléctrico  $\vec{E}$  mediante la aparición de un momento dipolar  $\vec{P}$  por unidad de volumen. Para campos eléctricos no muy elevados, tales como los que se usan en el laboratorio, la «respuesta»  $\vec{P}$  es proporcional al «estímulo»  $\vec{E}$ ,

$$\vec{P} = \chi \vec{E} \quad [I-1]$$

siendo  $\chi$  la susceptibilidad dieléctrica del material. Es claro que la polarización  $\vec{P}$  es la suma de los momentos dipolares elementales a que ha dado lugar el campo  $\vec{E}$  sobre cada átomo o molécula.

Si utilizamos el vector inducción eléctrica  $\vec{D}$ , se verifica

$$\vec{D} = \vec{E} + 4\pi\vec{P} = (1 + 4\pi\chi)\vec{E} = \epsilon \vec{E} \quad [I-2]$$

El factor de proporcionalidad  $\epsilon$  entre el vector inducción y el vector campo es la constante dieléctrica del material. Aunque es, en principio, preferible trabajar con  $\chi$ , que tiene un sentido físico más inmediato, en la mayoría de los cálculos y fórmulas se maneja la constante dieléctrica.

Conviene hacer notar que, aunque por comodidad hemos supuesto que  $\chi$  y  $\epsilon$  son magnitudes escalares, para muchos materiales (sólidos) se trata de tensores de segundo orden, ya que su comportamiento no es isótropo.

### 2. DIELECTRICOS NO POLARES Y DIELECTRICOS POLARES

Es preciso distinguir dos tipos fundamentalmente diferentes de sustancias dieléctricas. En unas, las moléculas poseen un momento dipolar permanente (sustancias polares), mientras que en otras no lo presentan (sustancias no polares). En las sustancias polares, el efecto fundamental de un campo eléctrico es orientar cada dipolo

molecular en la dirección del campo, dando lugar a un momento dipolar neto o resultante. En las sustancias no polares, el efecto del campo es crear en la molécula un dipolo inducido en el sentido del campo.

Aunque los átomos no presentan momento dipolar, hay, en cambio, bastantes moléculas que lo poseen en su estado fundamental y dan lugar a sustancias polares. Un ejemplo típico de molécula polar es una molécula diatómica de átomos diferentes, como HCl. Al constituirse la molécula, el electrón del átomo de hidrógeno se desplaza algo hacia el cloro, dejando el núcleo de hidrógeno parcialmente desnudo. Así aparece un momento  $|\vec{p}| = 1.03 \times 10^{-18}$  uee  $\times$  cm.

Otro ejemplo sencillo de molécula polar es el H<sub>2</sub>O, debido a no ser lineal. Esto ilustra la importancia que tiene la estructura molecular en determinar su comportamiento dieléctrico.

Los momentos dipolares permanentes son muy superiores a los que pueden inducirse con los campos eléctricos disponibles ordinariamente, ya que, por ejemplo, el átomo de hidrógeno adquiere un momento dipolar  $|\vec{p}| \simeq 10^{-22}$  uee  $\times$  cm para un campo  $E = 30$  kV cm<sup>-1</sup>.

Como las moléculas son menos simétricas que los átomos, la respuesta de una molécula a un campo  $\vec{E}$ , o sea su polarización inducida  $\vec{p}$ , depende, en general, de la dirección de aplicación del campo. Esto quiere decir que la polarizabilidad molecular  $\alpha$ , definida a través de  $\vec{p} = \alpha \vec{E}$ , es un tensor de segundo orden. Consideremos como ejemplo la molécula de CO<sub>2</sub>, que es lineal (Fig. 1). Se encuentra experimentalmente que su polarizabilidad en la dirección de su eje ( $x$ ) es más del doble de la correspondiente a un campo aplicado en dirección transversal (eje  $z$ ). En lo sucesivo y por evitar complicaciones matemáticas en la exposición, supondremos que  $\alpha$  (al igual que  $\chi$  y  $\epsilon$ ) es una magnitud escalar.

### 3. CAMPO ELÉCTRICO LOCAL

Para describir en detalle el comportamiento dieléctrico-microscópico de un sistema, hay que tener en cuenta que el campo que actúa sobre cada molécula no es el aplicado, sino el que resulta de añadir a éste el campo creado por la propia polarización de la sustancia. El campo efectivo o local  $\vec{E}_L$  puede calcularse en medios homogéneos e isótropos uniformemente polarizados por la fórmula de Lorentz. Consideremos un punto  $Q$  en el interior de un dieléctrico cuya polarización constante es  $\vec{P}$  (Fig. 2). En  $Q$  puede suponerse situada una

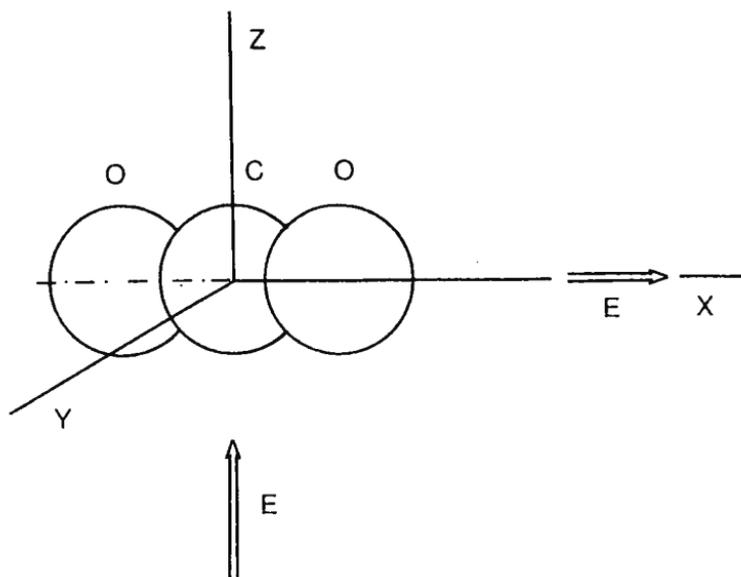


Figura 1

molécula de referencia. Construyamos una cavidad esférica de radio  $a$  en torno a  $Q$ , tal que no contenga en su interior ninguna otra molécula, y evaluemos el campo que produce en  $Q$  el medio polarizado. Se sabe que un medio continuo polarizado es equivalente a una distribución ficticia de carga volúmica con densidad  $\rho = -\text{div } \vec{P}$ , más una distribución de carga superficial con densidad  $\sigma = P_n$ , distribuida sobre la superficie del medio.  $P_n$  representa la proyección de  $\vec{P}$  sobre la superficie.

Como en el caso de polarización uniforme,  $\text{div } \vec{P} = 0$ , basta con calcular el campo creado en  $Q$  por las cargas aparentes distribuidas sobre la superficie exterior del dieléctrico y sobre la pared interna de la cavidad esférica: El campo debido a la superficie exterior se llama campo de despolarización, y normalmente va incluido en lo que se considera campo  $\vec{E}$  en el interior del dieléctrico. En cuanto a la corrección  $\vec{E}'$  debida a la pared de la cavidad, se obtiene inmediatamente de acuerdo con la figura 3

$$E' = \int_0^\pi \frac{2\pi a \sin \theta}{a^2} a d\theta P_n \cos \theta = \frac{4\pi P}{3}$$

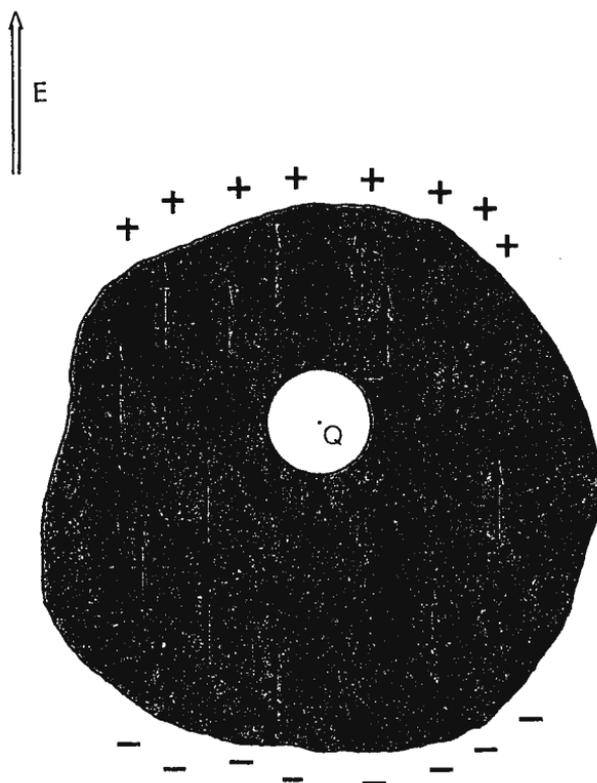


Figura 2

Así que el campo local  $\vec{E}_L$  viene dado por

$$\vec{E}_L = \vec{E} + \frac{4\pi\vec{P}}{3} \quad [I-3]$$

que es la fórmula de Lorentz. Como acabamos de indicar,  $\vec{E}$  incluye el campo exterior y el campo de despolarización.

#### 4. DIELECTRICOS NO POLARES. FÓRMULA DE CLAUSIUS-MOSSOTTI

Para estas sustancias, el comportamiento dieléctrico viene determinado por su polarizabilidad molecular  $\alpha$ . Se trata, pues, de encontrar una fórmula que ligue el comportamiento macroscópico ( $\epsilon$ ) con

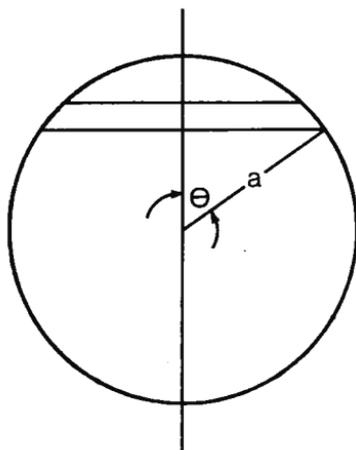


Figura 3

la respuesta microscópica ( $\alpha$ ). Si  $N$  es el número de moléculas por unidad de volumen, se verifica

$$\begin{aligned}\vec{P} &= N \vec{p} = N \alpha \vec{E}_L = N \alpha \left( \vec{E} + \frac{4\pi \vec{P}}{3} \right) = \\ &= N \alpha \vec{E} \left( 1 + \frac{\varepsilon - 1}{3} \right) = N \alpha \vec{E} \frac{\varepsilon + 2}{3}.\end{aligned}$$

Por otra parte, según [1] y [2]

$$\vec{P} = \chi \vec{E} = \frac{\varepsilon - 1}{4\pi} \vec{E}.$$

Igualando ambos resultados se obtiene la fórmula de Clausius-Mossotti

$$\frac{4\pi}{3} N \alpha = \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} \quad [I-4]$$

Esta fórmula suele escribirse en la forma

$$\frac{4\pi}{3} A \alpha = \frac{M}{\rho} \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} \quad [I-5]$$

donde  $A$  es el número de Avogadro,  $M$  la masa molecular, y  $\rho$  la densidad de la sustancia: Usando [5], puede calcularse  $\alpha$  a partir de los parámetros  $M$ ,  $\rho$  y  $\varepsilon$ , que son medibles macroscópicamente.

En todo el razonamiento anterior no aparece la temperatura, por lo que puede afirmarse que la respuesta dieléctrica de un medio no polar es independiente de la temperatura.

## 5. DIELECTRICOS POLARES. FÓRMULA DE LANGEVIN

En estas sustancias, los momentos dipolares permanentes se orientan en el sentido del campo. Esto hace que este tipo de comportamiento sea aplicable a líquidos y gases, donde la orientación molecular es fácil, y raramente a sólidos.

La orientación molecular inducida por el campo eléctrico está contrapesada por la desorientación debida a la interacción con las moléculas vecinas, que es función de la temperatura. El cálculo de la polarización  $\vec{P}$  resultante en función de la temperatura se hace recurriendo a los métodos estadísticos convencionales.

La energía potencial de un dipolo  $\vec{p}$  en el campo  $\vec{E}$  es,

$$w = -\vec{p} \cdot \vec{E} = -pE \cos \theta. \quad [1-6]$$

De acuerdo con la distribución de Boltzmann, la probabilidad de encontrar un dipolo apuntando según una dirección comprendida dentro del ángulo sólido  $d\Omega$  en torno a  $\vec{\Omega}$ , es  $e^{-w/kT} d\Omega$ , siendo  $w$  el valor que se obtiene de [6] para  $\vec{p}$  apuntando según  $\vec{\Omega}$ . La polarización resultante en la dirección de  $\vec{E}$  viene dada por

$$\begin{aligned} P &= \frac{Np \int e^{-w/kT} \cos \theta d\Omega}{\int e^{-w/kT} d\Omega} = \\ &= \frac{\int_0^{2\pi} 2\pi \sin \theta \cos \theta e^{pE \cos \theta/kT} d\theta}{\int_0^{2\pi} 2\pi \sin \theta e^{pE \cos \theta/kT} d\theta} = \coth \left( \frac{pE}{kT} \right) - \frac{kT}{pE}. \end{aligned} \quad [1-7]$$

Esta es la fórmula de Langevin. La expresión funcional del segundo miembro de [7] recibe también el nombre de función de Langevin.

Para  $pE/kT \gg 1$ , es decir, campos eléctricos suficientemente altos o temperaturas extremadamente bajas, la función de Langevin se satura tal como corresponde a una orientación completa de todos los dipolos. Sin embargo, la situación alcanzable en la práctica corres-

ponde a  $pE/kT \ll 1$ , para la que es válida una aproximación lineal de la forma

$$P = \frac{Np^2E}{3kT} \quad [I-8]$$

que conduce a

$$\varepsilon = \frac{Np^2}{3kT} \quad [I-9]$$

Como se ve, la constante dieléctrica depende ahora fuertemente de la temperatura.

## 6. POLARIZACIÓN MOLECULAR. MODELO DE LORENTZ

La fórmula [4] permite describir el comportamiento dieléctrico macroscópico de una substancia no polar en términos del comportamiento dieléctrico de sus moléculas constituyentes. El paso siguiente consistiría en desarrollar un modelo molecular que permitiese obtener la polarizabilidad  $\alpha$  en función de la estructura molecular. Por lo pronto puede afirmarse que la polarizabilidad de una molécula es la suma de dos contribuciones, la electrónica y la iónica. La contribución electrónica tiene su origen en la deformación de la nube electrónica de la molécula al aplicar el campo, y la iónica resulta de la modificación en las separaciones interiónicas.

La respuesta tanto iónica como electrónica al campo aplicado no es nunca instantánea, sino diferida. Por razón de la mayor movilidad de los electrones, la respuesta electrónica es muy rápida,  $\sim 10^{-15}$  segundos, mientras que la iónica es más lenta,  $10^{-12}$  segundos. Este retraso en la polarización molecular respecto a la aplicación del campo hace que el valor de la polarizabilidad sea función de la frecuencia cuando la substancia se somete a un campo eléctrico alterno. Por ejemplo, a frecuencias correspondientes a la luz visible los iones no pueden seguir las rápidas oscilaciones del campo, y  $\alpha_{ionica} = 0$ . Sólo existe en este caso la polarizabilidad electrónica.

El cálculo detallado de la polarizabilidad exige manejar un modelo muy elaborado de la estructura iónica y electrónica de la molécula. Sin embargo, es posible situarse en un modelo mucho más sencillo, pero que conserva los rasgos fundamentales de la dependencia de  $\alpha$  con la frecuencia del campo eléctrico: En esencia, el modelo en cuestión consiste en asimilar los iones o electrones moleculares a osciladores

armónicos. Esa es, por ejemplo, la idea básica del modelo de Lorentz para la polarizabilidad electrónica, que vamos a analizar en algún detalle para facilitar la discusión. Se admite, con Lorentz, que los átomos y moléculas en una substancia aislante contienen electrones ligados a posiciones de equilibrio mediante fuerzas elásticas. Se acepta también que estas fuerzas son isotrópicas y, además, que existe una fuerza de amortiguamiento proporcional a la velocidad. El problema se plantea inmediatamente en términos clásicos: La ecuación de movimiento de un electrón sometido a un campo eléctrico oscilante (frecuencia angular  $\omega$ ) en la dirección del eje  $y$  se escribe:

$$m\ddot{y} + m\gamma\dot{y} + ky = -eE_0e^{i\omega t},$$

donde se ha utilizado la notación compleja, para describir el término de oscilación sinusoidal.  $m$  es la masa del electrón, y  $\gamma$  un coeficiente de amortiguamiento.

La solución de la ecuación es

$$y = -\frac{e}{m} \frac{E_0 e^{i\omega t} e^{-i\varphi}}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}}, \quad [\text{I-10}]$$

donde

$$\omega_0 = \sqrt{k/m}$$

es la frecuencia natural de oscilación del electrón y

$$\varphi = \text{arc tg } \frac{\gamma\omega}{\omega_0^2 - \omega^2}$$

representa la diferencia de fase que aparece entre la elongación y del electrón y el campo  $E$ . La polarización  $P$ , o momento dipolar por unidad de volumen, es simplemente

$$P = eNf_0y, \quad [\text{I-11}]$$

donde  $N$  es el número de moléculas por unidad de volumen, y  $f_0$  el número de electrones de cada molécula que dan origen a la oscilación de frecuencia  $\omega_0$ .

Ahora podemos obtener la polarizabilidad  $\alpha = P/E$ . Como  $P$  y  $E$  vienen definidas por magnitudes complejas,  $\alpha$  será también una magnitud compleja. Normalmente se trabaja con la parte real de  $\alpha$ , es decir,

la relación entre las amplitudes de  $P$  y  $E$  que están en fase. Se encuentra entonces

$$\alpha = \frac{Nf_0e^2}{m} \frac{\omega_0^2 - \omega^2}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2\omega^2} \quad [\text{I-12}]$$

La dependencia de  $\alpha$  con  $\omega$  viene ilustrada en la figura 4. Para bajas frecuencias,  $\omega \ll \omega_0$ ,  $\varphi \simeq 0$ , y la polarizabilidad  $\alpha$  adopta el valor real

$$\alpha_0 = \frac{Nf_0e^2}{m\omega_0^2}.$$

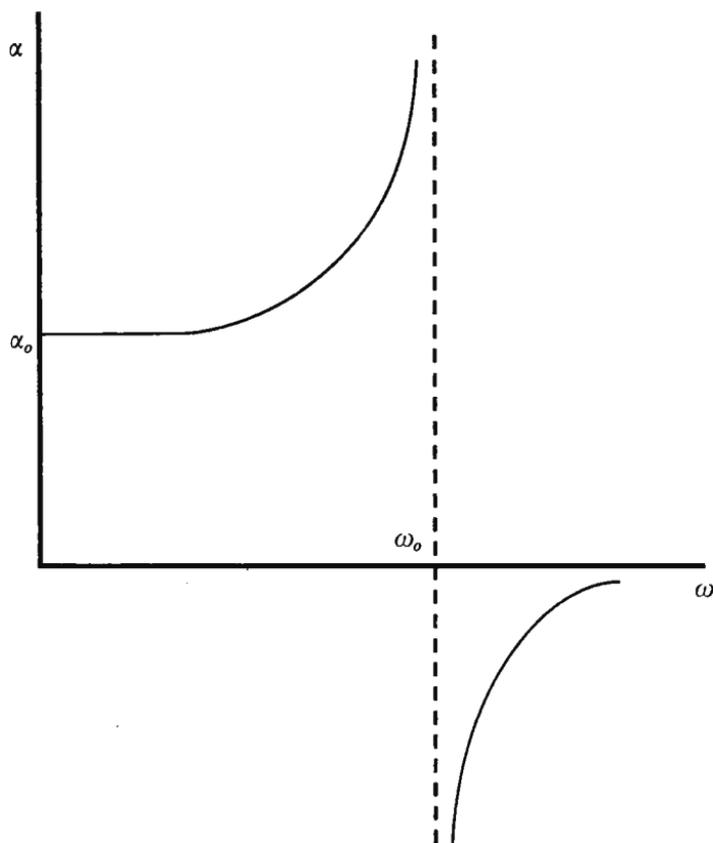


Figura 4

En este caso el campo y la polarización oscilan en fase. Para altas frecuencias,  $\omega \gg \omega_0$ ,  $\varphi \simeq \pi/2$ , de modo que la polarización oscila en cuadratura con el campo, y entonces la parte real de  $\alpha$ , obtenida de [12], se hace cero. Este resultado está de acuerdo con la discusión cualitativa presentada en la sección anterior, en el sentido de que, a frecuencias elevadas en relación a la respuesta natural del sistema ( $\omega_0$ ), la sustancia no puede responder y no se polariza.

En este momento podrían presentarse escrúpulos por haber tratado clásicamente la interacción del electrón con el campo eléctrico. Afortunadamente, el cálculo de la polarizabilidad puede rehacerse utilizando una formulación cuántica y teoría de perturbaciones, obteniéndose (ref. 2) una expresión totalmente análoga a la clásica

$$\alpha = \frac{Ne^2}{m} \sum_{ab} \frac{f_{ab}(\omega_{ab}^2 - \omega^2)}{(\omega_{ab}^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}$$

donde el sumatorio se extiende sobre todas las transiciones posibles entre estados electrónicos moleculares  $a$  y  $b$ . El coeficiente que sustituye ahora al clásico  $f_0$  es la intensidad del oscilador correspondiente a la transición  $ab$

$$f_{ab} = \frac{2}{3} \frac{\pi}{h} \omega_{ab} |\langle a | \bar{r} | b \rangle|^2,$$

que se utiliza en el análisis de las fuerzas de dispersión.

La única diferencia que merece la pena hacer notar con el caso clásico es la posibilidad de obtener valores negativos para  $f_{ab}$  y  $\alpha$  si el sistema contiene átomos o moléculas en estados excitados.

## 7. DISPERSIÓN Y DISIPACIÓN

Hemos señalado anteriormente que la respuesta dieléctrica de una sustancia no polar no es instantánea, sino que requiere un tiempo finito. Este retraso da lugar a la aparición de una dependencia de la polarizabilidad y, en último término, de la constante dieléctrica con la frecuencia. Este comportamiento dieléctrico dispersivo es el que da origen a los bien conocidos fenómenos de dispersión cromática de la luz cuando la sustancia es atravesada por un haz de luz visible. La relación entre el comportamiento óptico y dieléctrico de una sustancia está contenida en la relación de Maxwell  $n = \sqrt{\epsilon}$  que liga el índice de refracción con la constante dieléctrica.

El comportamiento dispersivo no es exclusivo de los dieléctricos no polares. En los dieléctricos polares existe también un retraso entre la aplicación del campo y la polarización, y, por tanto, una dependencia de la constante dieléctrica con la frecuencia. En este caso, sin embargo, la respuesta dieléctrica depende fuertemente de la temperatura, y lo mismo le ocurre a la función  $\varepsilon(\omega)$ \*

## II. Fuerzas de interacción entre sistemas moleculares. Largas distancias

### 1. INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de la naturaleza eléctrica de los constituyentes elementales de la materia (núcleo atómico y electrones), las fuerzas intermoleculares son de origen electrodinámico, ya que las fuerzas propiamente nucleares son de muy corto alcance en comparación con el tamaño atómico ( $10^{-13}$  cm. frente a  $10^{-8}$  cm.). Si prescindimos además, en una primera aproximación, de las interacciones spin-órbita y spin-spin, que hay que tener en cuenta en un estudio detallado de átomos y moléculas, resulta que las interacciones son de naturaleza puramente *electrostática*.

La fuerza de interacción electrostática entre dos cargas  $q$  y  $q'$ , separadas una distancia  $R$ , viene dada por la fórmula de Coulomb

$$f = \frac{qq'}{\varepsilon R^2}$$

y está dirigida en la dirección que une ambas cargas. Esta interacción puede interpretarse suponiendo que cada carga  $q$  crea en el espacio que la rodea un potencial  $V = q/\varepsilon R$  que actúa sobre cualquier otra carga colocada en el espacio.  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica del medio en el que ambas cargas se encuentran inmersas.

Las fuerzas de Coulomb presentan algunas propiedades interesantes, algunas de las cuales pueden parecer obvias:

- el potencial es isótropo respecto de la carga que lo origina;
- las fuerzas son de relativamente largo alcance, como se verá más adelante;
- satisfacen el principio de aditividad, es decir, la fuerza resultante de un sistema de cargas es la suma de las debidas a cada una de las cargas por separado.

En esta situación parece que el problema de las interacciones entre sistemas moleculares que, al fin y al cabo, pueden equipararse a distribuciones de carga, estará resuelto automáticamente en cuanto se conozca la distribución de carga molecular. Efectivamente, aun dentro del marco de la mecánica cuántica, el teorema de Hellmann-Feynman (ref. 3) garantiza que las fuerzas sobre cada molécula pueden obtenerse por las leyes clásicas si se conoce la distribución de carga molecular. Este es, sin embargo, el nudo del problema, puesto que es enormemente difícil en la práctica determinar la estructura molecular aun en los casos más simples. Además, el recurso a la mecánica cuántica es imprescindible.

No vamos en absoluto a entrar en los detalles de los cálculos, sino a discutir someramente las ideas de base de los métodos generales que se usan para tratar el problema. Estos métodos generales son substancialmente distintos según que la distancia que separa las moléculas sea mucho mayor o comparable con el tamaño molecular, y, por tanto, serán analizadas en capítulos separados. En esta parte vamos a limitarnos al primer caso, es decir, largas distancias de separación intermolecular. Como veremos ahora, los métodos clásicos de electrostática y los de perturbaciones en mecánica cuántica son particularmente apropiados para este problema. Vamos a empezar discutiendo los métodos clásicos, analizando con bastante detalle las distribuciones multipolares por su interés en toda la teoría de las interacciones electrostáticas. Utilizaremos la notación vectorial y tensorial tal como se describe, por ejemplo, en la referencia 4.

## 2. INTERACCIÓN A LARGAS DISTANCIAS. TRATAMIENTO CLÁSICO

El problema de la energía de interacción electrostática  $W(R)$  entre dos sistemas moleculares separados una distancia  $R$  mucho mayor que su tamaño es muy fácil de plantear clásicamente, pero el cálculo es, en la práctica, muy difícil o muy farragoso. Vamos a ver que es posible introducir unas distribuciones especialmente sencillas de carga llamadas multipolos que permiten plantear el problema en términos mucho más accesibles a una discusión cualitativa e incluso cuantitativa. Se va a demostrar que cualquier distribución de carga puede sustituirse por una suma de distribuciones multipolares o multipolos, entre las cuales la energía de interacción  $W(R)$  puede escribirse mucho más simplemente. Esto tiene la ventaja de que la dependencia funcional  $W(R)$

para la interacción entre dos sistemas moleculares viene automáticamente definida por la que corresponde a sus multipolos de orden más bajo. A su vez, el orden multipolar más bajo de una distribución de carga puede en muchos casos obtenerse de consideraciones sencillas de simetría.

Empezaremos por estudiar las distribuciones multipolares de carga o multipolos y los potenciales que crean. A continuación demostraremos que cualquier distribución de carga es equivalente, desde el punto de vista del potencial que crea y desde el de su energía de interacción con el potencial creado por cualquier otra distribución, a una suma de multipolos. Estos multipolos vienen unívocamente determinados por la distribución.

### 3. MULTIPOLOS

La distribución más sencilla es una carga puntual  $q$  o *monopolo*. Su potencial es, como indicamos anteriormente

$$V_0(R) = \frac{q}{\epsilon R} \quad [\text{II-1}]$$

Si colocamos dos cargas iguales, pero de signo opuesto, separadas una distancia  $\vec{l}_1$ , tenemos un *dipolo*. Su potencial a grandes distancias comparadas con su tamaño  $l_1$ , se obtiene inmediatamente del correspondiente al monopolo mediante la fórmula

$$V_1(R) = \vec{l}_1 \cdot \nabla V_0 = \frac{q\vec{l}_1}{\epsilon} \cdot \nabla \frac{1}{R} = \frac{\vec{p}}{\epsilon} \cdot \nabla \frac{1}{R} \quad [\text{II-2}]$$

donde  $R$  es ahora la distancia al dipolo (o a cualquiera de las cargas, dado su tamaño infinitesimal). Como se ve, el potencial del dipolo está esencialmente ligado al gradiente del potencial del monopolo.

Una distribución siguiente en complejidad es el *cuadripolo* que se construye colocando dos dipolos  $q\vec{l}_1$ , iguales y opuestos, separados una distancia muy pequeña (respecto a  $R$ )  $\vec{l}_2$ . En este caso se obtiene análogamente

$$V_2(R) = \vec{l}_2 \cdot \nabla V_1 = \frac{q}{\epsilon} \vec{l}_2 \cdot \nabla \nabla \frac{1}{R} \cdot \vec{l}_1 \quad [\text{II-3}]$$

Iterando el procedimiento anterior se obtiene el  $2^l$  - polo, cuyo potencial viene dado por la fórmula de recurrencia

$$V_l(R) = l_l \cdot \nabla V_{l-1} \quad [\text{II-4}]$$

Los potenciales multipolares tiene las siguientes interesantes propiedades:

a) La dependencia de  $V$  con  $R$  es progresivamente más abrupta o de más corto alcance a medida que aumenta el orden multipolar, ya que de las fórmulas anteriores se obtiene en general que

$$V_l(R) \sim \frac{1}{R^{l+1}}.$$

En la figura 5 se visualiza esta propiedad para los multipolos de orden más bajo.

b) Excepto para el monopolo, los potenciales multipolares son fuertemente anisótrpos. Como caso particular es fácil obtener las líneas equipotenciales correspondientes al dipolo, ya que para este caso

$$V_1 = \frac{\vec{p}}{\epsilon} \cdot \nabla \frac{1}{R} = \frac{p}{\epsilon R^2} \cos \theta \quad [\text{II-5}]$$

En general puede demostrarse (ref. 5) que el potencial  $V_l(R)$  puede escribirse en términos de los armónicos esféricos mediante la fórmula

$$V_l(R) = \sum_{m=-l}^{+l} \frac{b_l^m \Upsilon_l^m(\theta, \phi)}{R^{l+1}} \quad [\text{II-6}]$$

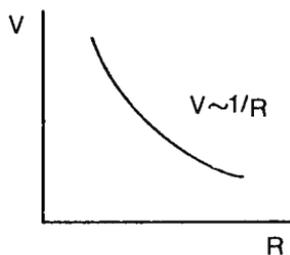
que relaciona la distribución angular del potencial multipolar con la correspondiente a los armónicos esféricos, que son ya bien conocidos de la física atómica.

De la fórmula [6] se deduce que un  $2^l$  - polo arbitrario puede especificarse por  $2l + 1$  parámetros independientes (\*), que son los coeficientes  $b_l^m$  de los armónicos esféricos componentes. Esto quiere decir que un  $2^l$  - polo arbitrario es equivalente a una superposición de  $2l + 1$ ,  $2^l$  - polos básicos, cada uno de los cuales tiene una configuración bien definida y una distribución angular del potencial dada por uno de los armónicos esféricos de orden  $l$ . En la figura 6 se han dibujado esquemáticamente las distribuciones angulares (superficies equipotenciales) correspondientes a las componentes básicas del dipolo y cuadrípulo. Para el dipolo, las tres componentes son tres dipolos orientados según tres ejes coordenados ortogonales.

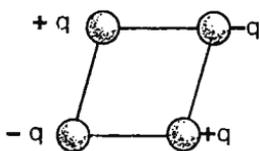
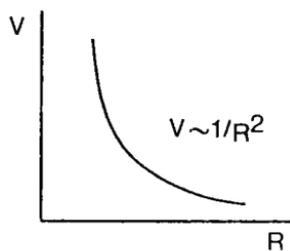
(\*) Estos parámetros independientes podrían ser también los desplazamientos sucesivos utilizados para la construcción del multipolo a partir del monopolo.



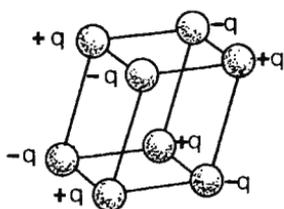
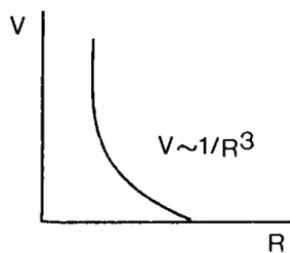
Monopolo



Dipolo



Cuadripolo



Octopolo

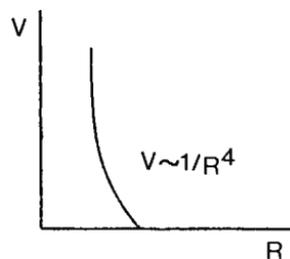
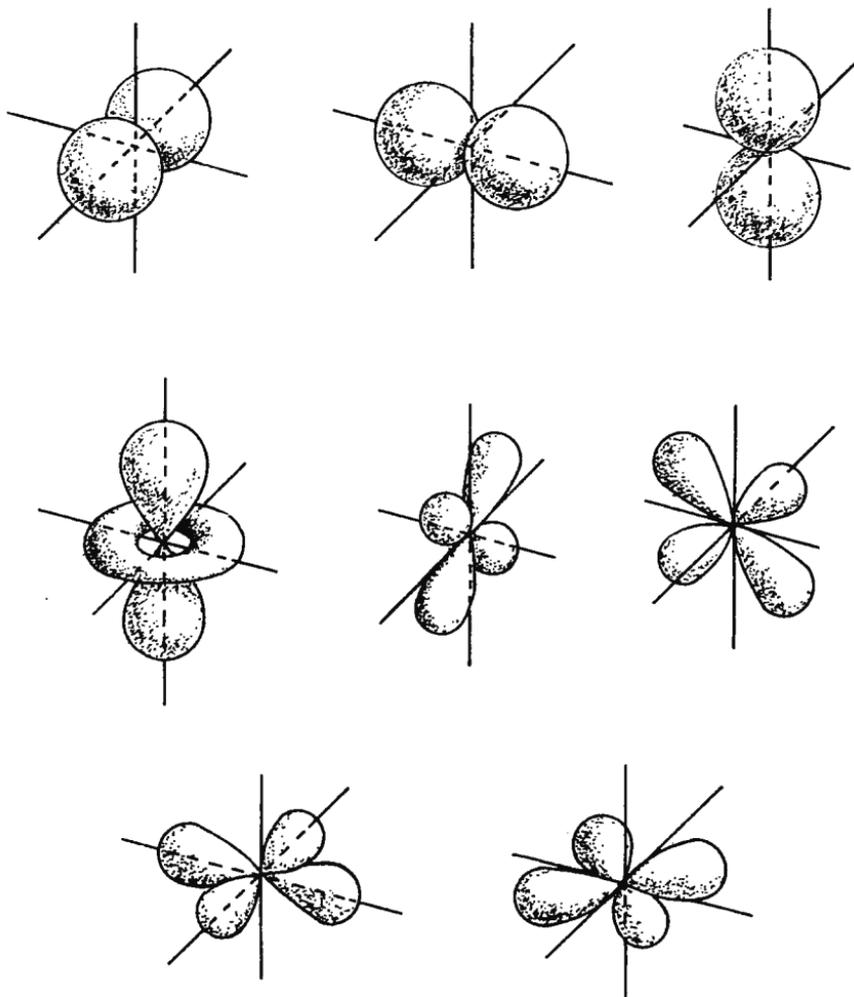


Figura 5

Dipolo



Cuadripolo

Figura 6

## 4. POTENCIAL DE UNA DISTRIBUCIÓN ARBITRARIA DE CARGA

Consideremos una distribución arbitraria de densidad de carga  $\rho(r)$  confinada al entorno del origen  $O$  (Fig. 7). El potencial en un punto  $P$  cualquiera cuyo vector de posición es  $R$ , viene dado por

$$V(\vec{R}) = \int \frac{\rho(\vec{r}) dv}{|\vec{R} - \vec{r}|} \quad [\text{II-7}]$$

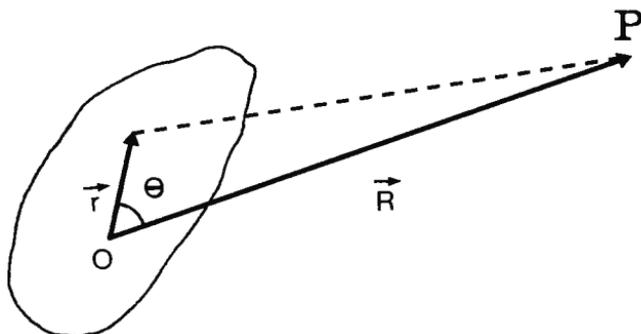


Figura 7

donde la integral se extiende al volumen ocupado por la distribución.

Si  $|\vec{R}| \gg |\vec{r}|_{\max}$  se puede desarrollar el factor  $1/|\vec{R} - \vec{r}|$  en serie de potencias de  $1/R$ .

Se sabe que

$$\frac{1}{|\vec{R} - \vec{r}|} = \frac{1}{R} \sum_{l=0}^{\infty} \left(\frac{r}{R}\right)^l P_l(\cos \theta) \quad [\text{II-8}]$$

donde  $\theta$  es el ángulo entre  $\vec{r}$  y  $\vec{R}$  y  $P_l(\cos \theta)$  es el polinomio de Legendre de orden  $l$ . Resulta, pues, para el potencial

$$V(\vec{R}) = \sum_{l=0}^{\infty} V_l(\vec{R}) \quad [\text{II-9}]$$

siendo

$$V_l(\vec{R}) = \frac{1}{R^{l+1}} \int \rho r^l P_l(\cos \theta) dv \quad [\text{II-10}]$$

es decir, el potencial puede expresarse como superposición de potenciales que varíen con  $R$  de igual modo que los potenciales multipolares.

Es fácil convencerse de que, efectivamente, los  $V_l(\vec{R})$  corresponden a multipolos de orden  $l$ . Para ello refirmamos los vectores  $\vec{r}$  y  $\vec{R}$  a un cierto eje de referencia  $\vec{e}$ , respecto al cual los ángulos de acimut y altura sean  $\theta_r, \phi_r$  y  $\theta_R, \phi_R$ , respectivamente. Haciendo uso del teorema de adición de los armónicos esféricos (cf., p.e., ref. 6)

$$P_l(\cos \theta) = \frac{4\pi}{2l+1} \sum_{m=-l}^{+l} Y_l^m(\theta_r, \phi_r) Y_l^m(\theta_R, \phi_R) \quad [\text{II-11}]$$

resulta

$$V_l(\vec{R}) = \frac{1}{R^{l+1}} \sum_{m=-l}^{+l} b_l^m Y_l^m(\theta_R, \phi_R) \quad [\text{II-12}]$$

con

$$b_l^m = \frac{4\pi}{2l+1} \int \rho(\vec{r}) r^l Y_l^m(\theta_r, \phi_r) dv \quad [\text{II-13}]$$

La expresión [12] coincide exactamente con la fórmula [6] para el potencial de un  $2^l$  - polo. Las componentes  $b_l^m$  de las diferentes componentes angulares del multipolo se obtienen a partir de la distribución  $\rho(\vec{r})$  mediante [13].

En particular la componente monopolar resulta

$$b_0^0 = \sqrt{4\pi} \int \rho(\vec{r}) dv \quad [\text{II-14}]$$

es decir, coincide salvo un factor de escala con la carga total de la distribución.

Para el dipolo y cuadrípulo de la distribución es usual caracterizarlos, no por los coeficientes  $b_1^m$  y  $b_2^m$  del desarrollo en armónicos esféricos, sino por un vector y un tensor de segundo orden respectivamente. Para el dipolo tenemos:

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{1}{R^2} \int \rho r P_1(\cos \theta) dv = \frac{1}{R^2} \int \rho r \cos \theta dv = \\ &= \frac{1}{R^2} \int \rho \frac{\vec{r} \cdot \vec{R}}{R} dv = \frac{1}{R^3} \left[ \int \rho \vec{r} dv \right] \cdot \vec{R} = \frac{\vec{p} \cdot \vec{R}}{R^3} \end{aligned} \quad [\text{II-15}]$$

que es la expresión clásica en función del vector momento dipolar  $\vec{p} = \int \rho \vec{r} dv$ .

Análogamente, para el cuadrípulo tenemos:

$$\begin{aligned} V_2 &= \frac{1}{R^3} \int \rho r^2 P_2(\cos \theta) dv = \frac{1}{R^3} \int \rho r^2 \left( \frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right) dv = \\ &= \frac{1}{2R^3} \left\{ 3 \int \rho \left( \frac{\vec{r} \cdot \vec{R}}{R} \right)^2 dv - \int \rho r^2 dv \right\} = \frac{1}{2R^3} \vec{R} \cdot Q \cdot \vec{R} \end{aligned} \quad [\text{II-16}]$$

siendo  $Q$  el tensor momento cuadrípolar

$$Q = 3 \int \rho(\vec{r}) \vec{r} \vec{r} dv - I \int \rho(\vec{r}) r^2 dv \quad [\text{II-17}]$$

con  $I$  el tensor unidad.

Aunque en principio cabría pensar que este tensor  $Q$  exigiría una caracterización a base de 9 parámetros independientes (en lugar de los 5 necesarios para un cuadrípulo) debe tenerse en cuenta que es un tensor simétrico y que los elementos de su diagonal principal suman cero.

Si la distribución de carga tiene un eje de simetría (eje  $z$ ), el tensor  $Q$  se reduce a

$$Q \equiv \begin{pmatrix} -q/2 & 0 & 0 \\ 0 & -q/2 & 0 \\ 0 & 0 & q \end{pmatrix}$$

con

$$q = \int \rho(\vec{r}) (3z^2 - r^2) dv,$$

que es en este caso el único parámetro escalar necesario para caracterizar el cuadrípulo. Este caso es muy importante en la práctica.

Como apuntábamos en la introducción, argumentos de simetría bastan muchas veces para anular ciertos multipolos. El caso más sencillo es el de una distribución de carga esféricamente simétrica. Es fácil convencerse, teniendo en cuenta las relaciones de ortonormalidad de los armónicos esféricos, que todos los multipolos son nulos excepto el monopolo, ya que

$$\int Y_0^0 Y_l^m d\Omega = 0$$

para  $l \neq 0$ .

## 5. INTERACCIÓN DE UNA DISTRIBUCIÓN DE CARGA CON UN POTENCIAL EXTERIOR

Consideremos ahora el caso de una distribución de carga  $\rho(\vec{r})$  en el entorno del origen  $0$  y sometida a un potencial creado por otras

fuentes. Vamos a ver que también en este caso la energía potencial de la distribución puede escribirse como suma de las energías correspondientes a cada uno de los multipolos que componen la distribución. En efecto, la energía potencial se escribe simplemente

$$W = \int \rho(\vec{r}) V(\vec{r}) dv \quad \text{[II-18]}$$

Ahora bien  $V(r)$  puede desarrollarse en serie de Taylor en torno a 0,

$$V(\vec{r}) = V(0) + \vec{r} \cdot (\nabla V)_0 + \frac{1}{2} \vec{r} \vec{r} \cdot (\nabla \nabla V)_0 + \dots$$

y, por tanto,

$$W = \{ \int \rho(\vec{r}) dv \} V(0) + \{ \int \rho(\vec{r}) \vec{r} dv \} \cdot (\nabla V)_0 + \quad \text{[II-19]} \\ + \frac{1}{2} \{ \int \rho(\vec{r}) \vec{r} \vec{r} dv \} \cdot (\nabla \nabla V)_0 + \dots$$

El primer término representa el potencial del monopolo de la distribución colocado en 0. Análogamente, el segundo representa la energía potencial del dipolo, y así sucesivamente. Es interesante notar, de acuerdo con la expresión [19], que el multipolo de orden  $l$  es sensible a la derivada de orden  $l$  del potencial. Por ejemplo, en un potencial constante, sólo el monopolo da una contribución a la energía potencial, y en un campo eléctrico constante sólo son significativos el monopolo y el dipolo.

## 6. INTERACCIÓN ENTRE SISTEMAS MOLECULARES

La descomposición multipolar de una distribución de carga permite ahora abordar con mayor simplicidad el problema de la interacción entre dos sistemas moleculares en términos clásicos. De acuerdo con las consideraciones expuestas anteriormente, la energía de interacción entre un multipolo de orden  $l$  y otro de orden  $l'$ , sigue en función de su separación  $R$ , la siguiente ley

$$W_{ll'} \sim \frac{\partial^{l'} V_l}{\partial R^{l'}} \sim \frac{\partial^{l'} (1/R^{l+1})}{\partial R^{l'}} \sim \frac{1}{R^{l+l'+1}},$$

donde  $V_l$  indica el potencial creado por el  $2^l$  - polo en la posición del  $2^{l'}$  - polo. Esta fórmula indica que, al aumentar el orden multipolar de los sistemas en interacción, la dependencia con la distancia se hace más abrupta, es decir, la interacción es de menor alcance. En

estas condiciones, a distancias suficientemente largas de separación, en la descomposición

$$W = \sum_{ll'} W_{ll'}$$

para la energía de interacción total predomina el término  $W_{ll'}$  correspondiente a los órdenes  $l$  y  $l'$  más bajos. En los sistemas moleculares con carga neta, es decir, monopolos no nulos, los órdenes más bajos son  $l = l' = 0$ , y la energía sigue la ley de Coulomb  $W \sim W_{00} \sim 1/R$ .

En sistemas globalmente neutros, pero con momentos dipolares permanentes,  $W \sim W_{11} \sim 1/R^3$ .

De esta forma es fácil hacer una predicción de la dependencia  $W(R)$  en base a los desarrollos multipolares de los sistemas en interacción.

## 7. TRATAMIENTO CUÁNTICO DE LA INTERACCIÓN A LARGA DISTANCIA

Ateniéndonos a un punto de vista estrictamente clásico, no deberían existir fuerzas de interacción entre átomos en el estado fundamental, ya que todos sus multipolos serían nulos. Sin embargo, esto es estrictamente aplicable a distribuciones rígidas de carga. En los sistemas atómicos o moleculares, los electrones ejecutan movimientos rápidos en torno a los núcleos (seguimos pensando clásicamente) y presentan instantáneamente momentos multipolares no nulos. Cabe pensar que estos multipolos instantáneos produzcan desviaciones orbitales en el otro sistema, creando multipolos inducidos y dando lugar a interacciones del tipo multipolo - multipolo. Desde luego, no cabe duda de que deben de existir interacciones entre sistemas con simetría esférica, dada la aparición de una fase líquida en los gases nobles. Esta interacción fue postulada por Van der Waals al construir su ecuación de estado para los gases reales y lleva su nombre.

Ahora bien, para estudiar cuantitativamente esta interacción, hace falta conocer muy bien la estructura orbital de los electrones moleculares, y esto sólo puede hacerse utilizando la mecánica cuántica.

Los razonamientos que conducen a predecir la existencia de la interacción Van der Waals se hacen más cómodamente, pero sin ninguna restricción esencial, para el caso de dos átomos de hidrógeno separados una distancia  $R$ . Sean  $A$  y  $B$  las posiciones de los núcleos sobre el eje  $z$ ,  $\vec{r}_1(x_1, y_1, z_1)$ , el vector de posición del electrón del átomo  $A$  respecto de  $A$  y  $\vec{r}_2(x_2, y_2, z_2)$  el del electrón de  $B$  respecto de  $B$  (Fig. 8).

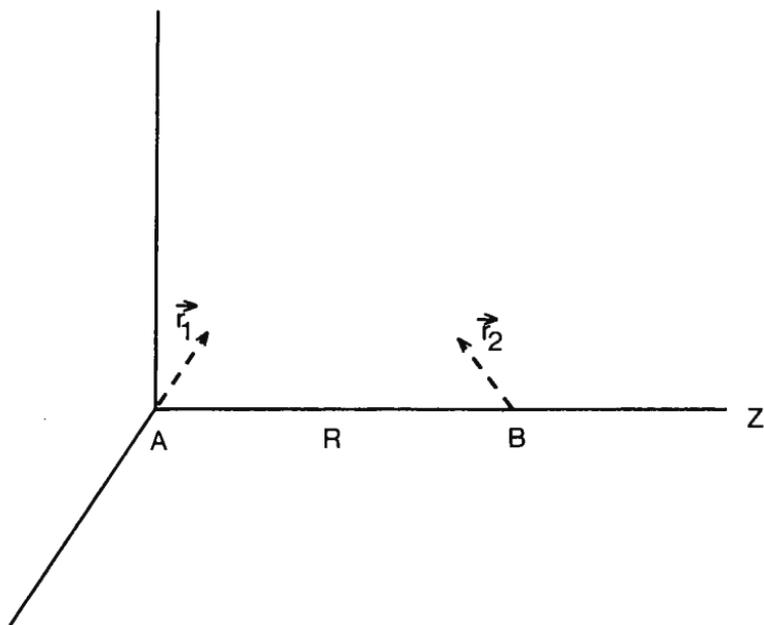


Figura 8

El operador hamiltoniano del sistema total se escribe

$$H = H_0 + H'$$

donde

$$H_0 = -\frac{\hbar^2}{2m}(\Delta_1 + \Delta_2) - \frac{e^2}{r_1} - \frac{e^2}{r_2} \quad [\text{II-20}]$$

y

$$H' = \frac{e^2}{R} + \frac{e^2}{r_{12}} - \frac{e^2}{r_{1B}} - \frac{e^2}{r_{2A}} \quad [\text{II-21}]$$

y siendo  $\Delta_1$  y  $\Delta_2$  los operadores laplacianos para las coordenadas  $\vec{r}_1$  y  $\vec{r}_2$ , respectivamente.  $H'$  es el término que corresponde a la interacción o acoplamiento entre los dos átomos. Si no fuese por  $H'$ , la energía total del sistema sería simplemente

$$W = W_1 + W_2,$$

donde  $W_1$  es la energía del átomo A en su estado electrónico correspondiente, y lo mismo  $W_2$  para el átomo B. La energía total  $W$  no de-

pende, por tanto, de la separación  $R$  y no hay, por ende, interacción entre los dos átomos. Sin embargo, la presencia de  $H'$  hace que  $W = W_1 + W_2 + W_{12}(R)$ , donde  $W_{12}$  es un término de interacción dependiente de la distancia. Se puede demostrar para átomos en el estado fundamental que  $W_{12}$  es negativo y aumenta con  $R$ , de modo que los átomos se atraen. La fuerza de atracción es simplemente

$$f = \frac{\partial W_{12}}{\partial R}$$

¿Cómo calcular  $W_{12}(R)$ ? Bastaría resolver la ecuación de Schrödinger  $(H_0 + H')\psi = W\psi$  para el sistema total. Sin embargo, la solución exacta del problema no es viable por dificultad práctica (no conceptual), como ocurre en la inmensa mayoría de los sistemas atómicos o moleculares. En el presente caso y suponiendo que la separación  $R$  es muy superior a la extensión espacial de la función de onda del electrón en cada átomo, se verifica  $H' \ll H_0$  y puede recurrirse al método de perturbaciones.

Designemos por  $\phi_0$  a la función de onda no perturbada de cada átomo y que corresponderá a un átomo de hidrógeno en su estado fundamental. La función de onda no perturbada del sistema total es

$$\psi_0(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = \phi_0(\vec{r}_1)\phi_0(\vec{r}_2)$$

Se sabe (ref. 6) que la corrección  $W'_{12}$  a la energía es al primer orden

$$W'_{12} = H'_{00} = \langle \psi_0 | H' | \psi_0 \rangle \quad [\text{II-22}]$$

y al segundo orden

$$W''_{12} = \sum'_n \frac{|H'_{0n}|^2}{W_0 - W_n} \quad [\text{II-23}]$$

donde con el subíndice  $n$  se representan todos los estados posibles del sistema de ambos átomos, incluyendo los estados del continuo de ionización. La prima que afecta al símbolo sumatorio indica que se ha de excluir en la suma el término  $n = 0$ .

Existen fórmulas progresivamente más complicadas para órdenes superiores del cálculo de la perturbación, pero en la mayoría de los casos basta con el primero o, a lo más, el segundo orden.

Para el cálculo de  $W_{12}^1 = H'_{00}$  se desarrolla la perturbación  $H'$  en potencias de  $1/R$  teniendo en cuenta que

$$r_{12} = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2 + (z_1 - z_2 - R)^2}$$

$$r_{2A} = \sqrt{x_2^2 + y_2^2 + (R + z_2)^2}$$

$$r_{1B} = \sqrt{x_1^2 + y_1^2 + (z_1 - R)^2}$$

En esencia, el desarrollo en cuestión corresponde a la descomposición clásica de la energía de interacción en los diferentes términos multipolo - multipolo. En este caso se trata de los multipolos asociados a las distribuciones instantáneas de carga correspondientes a las posiciones  $\vec{r}_1$  y  $\vec{r}_2$  de los electrones atómicos. Limitando el desarrollo a la interacción dipolo - dipolo resulta tras un cálculo sencillo, pero farragoso,

$$H' = \frac{e^2}{R^3} \{x_1 x_1 + y_1 y_2 - 2z_1 z_2\} \quad [\text{II-24}]$$

Sustituyendo en la expresión para  $W_{12}^1$ , se obtiene  $W_{12}^1 = 0$ , ya que la integral correspondiente es suma de tres integrales que se anulan, por ser el integrando función impar.

No hay, pues, energía de interacción al primer orden. Hay que proseguir el cálculo hasta segundo orden. Los cálculos son bastante elaborados, pero se demuestra (cf., más adelante) que  $W_{12}^2$  es distinta de cero y negativa. Teniendo en cuenta la fórmula [23] y la expresión [24] para  $H'$ , no cabe duda de que

$$W_{12}^1 \sim 1/R^6 \quad [\text{II-25}]$$

con lo que quedan caracterizadas las fuerzas Van der Waals como atractivas y dependientes de  $1/R^7$ .

## 8. FUERZAS DE DISPERSIÓN O DE LONDON

El método anterior de perturbaciones conduce a la siguiente expresión general para la energía de interacción  $W_{12}^2$  para el caso de dos

sistemas moleculares cualesquiera que se encuentran en los estados electrónicos  $n_1$  y  $n_2$  (que supondremos no degenerados):

$$W_{12}^2 = \frac{e^4}{R^6} \sum_{m_1, m_2} \frac{|\langle n_1 | X | m_1 \rangle \langle n_2 | X | m_2 \rangle + \langle n_1 | Y | m_1 \rangle \langle n_2 | Y | m_2 \rangle - 2 \langle n_1 | Z | m_1 \rangle \langle n_2 | Z | m_2 \rangle|^2}{w(n_1) + w(n_2) - w(m_1) - w(m_2)} \quad [\text{II-26}]$$

donde  $X = \Sigma x_i$ ;  $Y = \Sigma y_i$ ;  $Z = \Sigma z_i$ , siendo  $x_i, y_i, z_i$  las coordenadas de los electrones moleculares.

El inconveniente de esta fórmula radica en que no aparece clara en ella ninguna conexión con el comportamiento físico de las moléculas en interacción y, por tanto, no parece expresable en términos de parámetros moleculares medibles o directamente accesibles a observación. Fue London quien estableció esa conexión y relacionó estrechamente la energía de interacción Van der Waals con el comportamiento óptico de la molécula, y en particular con sus propiedades de dispersión. De ahí el nombre con el que se conocen usualmente esas fuerzas.

Para desentrañar la relación existente entre la energía de interacción Van der Waals y el comportamiento dispersivo de las moléculas, empecemos por recordar que a una transición óptica entre los estados moleculares  $n$  y  $m$  le corresponde una intensidad del oscilador  $f_{nm}$  que se define mediante

$$f_{nm} = \frac{2}{3} \frac{m}{h^2} |\langle n | \Sigma \vec{r}_i | m \rangle|^2 (w_m - w_n) \quad [\text{II-27}]$$

y que, esencialmente, mide la intensidad de la transición dipolar eléctrica entre los estados  $n$  y  $m$ . En términos de este parámetro  $f$ , la energía de interacción  $W_{12}$  se escribe

$$W_{12}^2 = \frac{3}{2} \frac{e^4}{R^6} \frac{h^4}{m^2} \sum_{m_1, m_2} \frac{f_{n_1, m_1} \cdot f_{n_2, m_2}}{[w(n_1) - w(m_1)] [w(n_2) - w(m_2)] [w(n_1) + w(n_2) - w(m_1) - w(m_2)]} \quad [\text{II-28}]$$

Teniendo en cuenta la fórmula de suma para las  $f$ , y aceptando que una de las transiciones es predominante en cada molécula,

$$f_{n_1 m_1} = N_1, \quad f_{n_2 m_2} = N_2$$

$$W_{12}^2 = -\frac{3}{2} N_1 N_2 \frac{a_0^2 e^8}{R^6 \hbar^3} [v_1 v_2 (v_1 + v_2)]^{-1} \quad [\text{II-29}]$$

donde  $N_1$  y  $N_2$  son los números de electrones activos;  $v_1$  y  $v_2$ , las frecuencias de las transiciones activas, y  $a_0 = \hbar^2/m_e^2$ , el radio de la primera órbita de Bohr del átomo de hidrógeno.

Las fórmulas [28] y [29] expresan el potencial de interacción  $W_{12}^2$  en términos de las frecuencias e intensidades de oscilador de las transiciones dipolares eléctricas que puede experimentar cada una de las moléculas. En lugar de las intensidades  $f$  de oscilador, que tienen una definición más bien abstracta, puede emplearse la polarizabilidad estática molecular  $\alpha$ , que es inmediatamente accesible a medición. Se demuestra, en efecto (cf. Capítulo sobre respuesta dieléctrica molecular), que existe una estrecha conexión entre las  $f$  y  $\alpha$ . En particular para una transición predominante

$$f = \frac{2\pi m \alpha v}{e^2 \hbar}$$

y, por tanto, en las mismas condiciones de validez de [29], puede escribirse

$$W_{12}^2 = -\frac{3}{2} \frac{\hbar}{R^6} \frac{v_1 v_2 \alpha_1 \alpha_2}{v_1 + v_2} \quad [\text{II-30}]$$

donde  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son las polarizabilidades estáticas de las dos moléculas en interacción.

### III. Fuerzas de interacción entre sistemas moleculares. Cortas distancias.

#### 1. INTRODUCCIÓN

Cuando los átomos o moléculas en interacción se encuentran tan próximos que sus funciones de onda se solapan, el problema se complica considerablemente y, desde luego, no son válidos los métodos descritos en el capítulo anterior. En este caso hay que intentar un cálculo deta-

llado de la función de onda del sistema utilizando métodos cuánticos, y de ahí inferir la energía de interacción. Por esta razón, aun cuando las fuerzas entre electrones y núcleos siguen siendo electrostáticos, el resultado es una interacción global que no puede expresarse en términos electrostáticos convencionales, y por ello se habla con frecuencia de fuerzas de tipo «químico» entre las moléculas. Con ello se quiere expresar esencialmente que las fuerzas intermoleculares dependen drásticamente de la configuración electrónica detallada y, por tanto, de la estructura «química» del sistema constituido por las moléculas en interacción.

El problema de la estructura molecular es muy complejo, y por ello hay que acudir a importantes simplificaciones si se quieren alcanzar resultados útiles. La aproximación fundamental que se hace de entrada es la aproximación adiabática, o de Born-Oppenheimer (ref. 7). La función de onda molecular completa es una función  $\psi(\vec{r}_i, \vec{R}_j)$  definida sobre las coordenadas  $\vec{r}_i$  de todos sus electrones y  $\vec{R}_j$  de todos sus núcleos, que satisface la ecuación de Schrödinger  $H\psi = E\psi$ , donde  $H$  es la hamiltoniana de la molécula. La aproximación de Born-Oppenheimer establece que  $\psi$  puede descomponerse en el producto de un factor  $\phi(\vec{r}_i, \vec{R}_j)$  que corresponde a la solución del problema electrónico de la molécula, suponiendo los núcleos en posiciones fijas  $\vec{R}_j$  (que actúan como parámetros), y una función  $\chi(\vec{R}_j)$  que corresponde al movimiento de los núcleos sometidos a un potencial que incluye sus interacciones mutuas y el efecto medio de la nube electrónica. La posibilidad de desacoplar el movimiento de los electrones y núcleos de la molécula es consecuencia de la gran diferencia de masa entre ambas especies. Se comprende intuitivamente que los electrones adopten muy rápidamente una configuración acorde con las posiciones instantáneas de los núcleos y que vayan sucesivamente ajustando dicha configuración a la evolución mucho más lenta de los núcleos.

A pesar de haber desacoplado el movimiento nuclear, el cálculo de la función de onda electrónica, que es el factor más importante desde el punto de vista químico, es muy complicado. Hace falta recurrir a nuevas simplificaciones. En este capítulo vamos a exponer los métodos de Heitler-London y Hund-Mulliken para el cálculo de orbitales moleculares, aplicados a sistemas suficientemente sencillos para permitir comprender su fundamento sin excesivas complicaciones matemáticas. Ambos métodos tienen una base común, consistente en aceptar para la función de onda electrónica una cierta forma en la que inter-

vienen varios parámetros indeterminados que se calculan haciendo que sea mínima la energía del sistema. Se trata, pues, de métodos variacionales. El éxito de estos métodos está ligado a una elección juiciosa de la forma aceptada para la función de onda  $\psi$ , y, por tanto, requieren poseer, *a priori*, una buena idea de su estructura.

## 2. MÉTODO DE HEITLER-LONDON

Por sencillez vamos a describir este método para el caso de la interacción entre dos átomos de hidrógeno (molécula  $H_2$ ), pero los argumentos pueden extenderse fácilmente a moléculas más complicadas.

En este método se acepta que la función de onda electrónica es una combinación lineal de productos de orbitales atómicos. Es decir, se supone que los electrones se comportan en torno a cada molécula como electrones atómicos, aunque se toma en cuenta la posibilidad de que cada electrón «pertenezca» simultáneamente a los dos átomos en interacción.

Consideremos de nuevo los átomos de hidrógeno situados en posiciones  $A$  y  $B$ . La hamiltoniana del sistema que ya hemos utilizado en el capítulo anterior puede ahora escribirse

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m}(\Delta_1 + \Delta_2) - \frac{e^2}{r_{1A}} - \frac{e^2}{r_{2A}} - \frac{e^2}{r_{1B}} - \frac{e^2}{r_{2B}} + \frac{e^2}{R} + \frac{e^2}{r_{12}} \quad [\text{III-1}]$$

donde los subíndices 1 y 2 se refieren a los dos electrones en juego.

Cuando los átomos de hidrógeno están muy alejados, la función de ondas total puede tomarse con muy buena aproximación como  $\phi_A(1)\phi_B(2)$  o bien  $\phi_A(2)\phi_B(1)$ . Suponiendo que tanto  $\phi_A$  como  $\phi_B$  se refieren al estado fundamental, la energía total del sistema sería simplemente  $W = 2W_0$ , siendo  $W_0$  la energía del estado fundamental. Es decir, despreciando las fuerzas de dispersión de las que ya nos hemos ocupado, no hay interacción cuando los átomos están suficientemente alejados.

Supongamos ahora, de acuerdo con Heitler y London, que los productos anteriores constituyen una buena base para describir la función de onda cuando los átomos se encuentran próximos. Tomamos, pues,

$$\psi = a\phi_A(1)\phi_B(2) + b\phi_B(1)\phi_A(2) \quad [\text{III-2}]$$

donde  $\phi_A$  y  $\phi_B$  se suponen normalizadas.

Hagamos para simplificar

$$\phi_1 = \phi_A(1)\phi_B(2), \quad \phi_2 = \phi_B(1)\phi_A(2)$$

y utilicemos la notación

$$H_{mn} = \langle \phi_m | H | \phi_n \rangle$$

$$S_{mn} = \langle \phi_m | \phi_n \rangle, \quad S_{12} = S$$

La energía del estado (2) es

$$W = \frac{\langle \phi | H | \phi \rangle}{\langle \phi | \phi \rangle} = \frac{(a^2 + b^2)H_{11} + 2abH_{12}}{a^2 + b^2 + 2abS} \quad \text{[III-3]}$$

Los valores de los parámetros  $a$  y  $b$  que relacionan el mejor estado dentro del espacio [2] de funciones posibles, se determinan haciendo mínima la expresión [3] para la energía.

Anulando las derivadas primeras  $\partial W/\partial a$  y  $\partial W/\partial b$  se obtiene

$$[H_{12} - H_{11}S] b(a^2 - b^2) = 0$$

$$[H_{12} - H_{11}S] a(b^2 - a^2) = 0$$

que conducen a las condiciones de extremo  $a = b$  y  $a = -b$ . Para el primer caso,  $a = b$ , se obtiene una función de onda simétrica

$$\phi_S = a[\phi_1 + \phi_2] \quad \text{[III-4]}$$

y para  $a = -b$ , una función de onda antisimétrica:

$$\phi_A = a[\phi_1 - \phi_2] \quad \text{[III-5]}$$

Si ahora se calcula la energía  $W$  para ambos estados, se obtiene

$$W_S = \frac{H_{11} + H_{12}}{1 + S^2}, \quad W_A = \frac{H_{11} - H_{12}}{1 - S^2} \quad \text{[III-6]}$$

Mediante un sencillo cálculo resulta

$$H_{11} = 2W_0 + \langle \phi_1 | H_i | \phi_1 \rangle$$

$$H_{12} = 2S^2W_0 + \langle \phi_1 | H_i | \phi_2 \rangle$$

donde  $H_i$  es la componente de interacción de la hamiltoniana [1], es decir,

$$H_i = -\frac{e^2}{r_{1B}} - \frac{e^2}{r_{2A}} + \frac{e^2}{R} + \frac{e^2}{r_{12}}$$

Volviendo a [6] se obtiene, finalmente,

$$\begin{aligned} W_S &= 2W_0 + \frac{J + K}{1 + S^2} \\ W_A &= 2W_0 + \frac{J - K}{1 - S^2} \end{aligned} \quad \text{[III-7]}$$

llamando

$$J = \langle \phi_1 | H_i | \phi_1 \rangle \quad \text{y} \quad K = \langle \phi_1 | H_i | \phi_2 \rangle.$$

$J$  recibe el nombre de energía o integral de Coulomb, y representa el valor medio de la energía de interacción coulombiana  $H_i$  en el estado  $\phi_1$ .  $K$  recibe el nombre de integral o energía de intercambio, y no tiene una interpretación clásica. Tanto  $J$  como  $K$  son, evidentemente, funciones de la separación  $R$  entre los átomos de hidrógeno.

La energía de interacción correspondiente a los estados  $\phi_S$  y  $\phi_A$  es, respectivamente,

$$\frac{J + K}{1 + S^2} \quad \text{y} \quad \frac{J - K}{1 - S^2}.$$

Para discutir la variación de estas energías con la distancia y de ahí obtener la fuerza de interacción, hace falta evaluar las integrales  $J$  y  $K$ . No vamos a presentar aquí el cálculo de  $J$  y  $K$ , que puede verse, por ejemplo, en referencia [8]. La figura 9 ilustra cualitativamente los resultados obtenidos para las energías de interacción  $W_S^i(R)$  y  $W_A^i(R)$ .  $W_S^i$  es negativa, pasa por un mínimo que corresponde a la configuración establecida de la molécula  $H_2$ , y después se hace positiva y presenta una subida muy abrupta. Esto quiere decir que los átomos de hidrógeno se atraen hasta la distancia interatómica de la molécula de  $H_2$ , pero a distancias inferiores existe una fuerte repulsión. Para el caso antisimétrico,  $W$  es siempre positivo y aumenta monótonamente al disminuir  $R$ , lo que indica que la interacción es permanentemente repulsiva. Los datos experimentales sobre la interacción  $H - H$  se ajustan cualitativamente bien al esquema anterior. Es posible introducir modificaciones en el método anterior para mejorar la concordancia (cf. ref. 9), pero no tienen gran interés desde el punto de vista fundamental.

### 3. ENLACE COVALENTE. RESONANCIA

Quizás la mayor importancia del método anterior es que permite una interpretación física definida de los conceptos de covalencia y

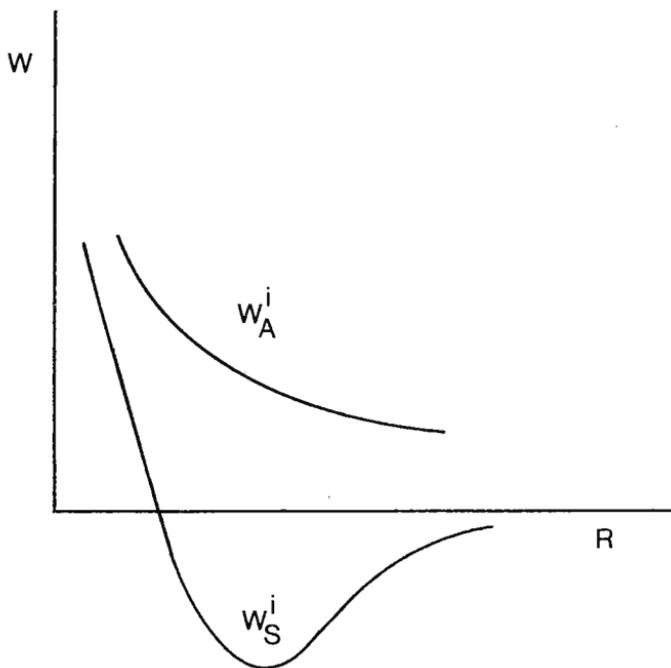


Figura 9

resonancia, usados con gran éxito en el campo de la química. Aunque estos conceptos parecen, ciertamente, alejados del tema específico de las interacciones moleculares, merece la pena dedicarles de pasada unas líneas, que además ayudarán a enriquecer físicamente la fría matemática del método Heitler-London. Recordemos que el orbital molecular  $\phi_S$  que conduce a una configuración estable de la molécula  $H_2$  es una superposición de los estados, uno  $\phi_1$ , en el que el electrón 1 pertenece al átomo A, y el 2 al B; y otro  $\phi_2$ , en el que sus papeles están intercambiados. En el lenguaje de la química decimos que el sistema *resuena* o salta entre los estados componentes  $\phi_1$  y  $\phi_2$ . Lo interesante de este fenómeno de resonancia es que la energía correspondiente a esa superposición es inferior a la que corresponde a cada estado por separado. La resonancia rebaja, pues, la energía del sistema y da estabilidad a la molécula.

Por otra parte, el orbital estable  $\phi_S$ , que es simétrico, debe tener una función de spin antisimétrica para que la función total sea anti-

simétrica, de acuerdo con el principio de Pauli. Ello significa que los electrones 1 y 2 deben tener spines opuestos, con lo que  $\phi_S$  resulta ser un orbital molecular que contiene dos electrones de spines opuestos compartidos simultáneamente por ambos átomos. Se dice, entonces, que estos electrones constituyen un *enlace covalente*, cuya estabilidad viene asegurada por la condición de resonancia.

#### 4. MÉTODO DE HUND-MULLIKEN

Este método difiere del anterior en el espacio de funciones de partida, al cual se va a aplicar el método variacional para seleccionar la «mejor» función de onda. Consiste en adoptar para la función de onda molecular  $\phi(\vec{r}_1, \vec{r}_2)$  un producto de orbitales moleculares, uno para cada electrón, es decir:

$$\phi(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = \phi_1(\vec{r}_1)\phi_2(\vec{r}_2)$$

donde  $\phi_1$  y  $\phi_2$  son, ambos, orbitales moleculares. ¿Cómo construir los orbitales moleculares? Un primer procedimiento sería utilizar el método autoconsistente de Hartree-Fock. Otro método posible es el tomar como orbital molecular una combinación lineal de orbitales atómicos (método LCAO). Este último método tiene interés desde el punto de vista químico, y por ello vamos a estudiarlo en lo que sigue. Por sencillez, y también con el fin de poder comparar con los resultados del método de Heitler-London, vamos a aplicarlo de nuevo al caso de la interacción entre dos átomos de hidrógeno. El problema que hay que resolver es encontrar una combinación adecuada de orbitales de hidrógeno, de modo que la energía del sistema (ión molecular de hidrógeno) sea mínima. La hamiltoniana para un solo electrón es ahora

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m}\Delta - \frac{e^2}{r_A} - \frac{e^2}{r_B} \quad \text{[III-8]}$$

Como orbital molecular se toma

$$\phi = a\phi_A + b\phi_B \quad \text{[III-9]}$$

donde  $\phi_A$  y  $\phi_B$  son orbitales atómicos de hidrógeno correspondientes al estado fundamental. Se trata ahora de aplicar el método variacional para determinar los coeficientes  $a$  y  $b$ .

Tomando como hasta ahora

$$\begin{aligned} H_{AA} &= \langle \phi_A | H | \phi_A \rangle \\ H_{BB} &= \langle \phi_B | H | \phi_B \rangle = H_{AA} \\ H_{AB} &= \langle \phi_A | H | \phi_B \rangle = H_{BA} \\ S &= \langle \phi_A | \phi_B \rangle \end{aligned} \quad \text{[III-10]}$$

puede demostrarse que el problema variacional es equivalente a resolver la ecuación secular

$$\begin{vmatrix} H_{AA} - W & H_{AB} - SW \\ H_{AB} - SW & H_{BB} - W \end{vmatrix} = 0 \quad \text{[III-11]}$$

de forma que las raíces  $W$  son precisamente los valores que hacen «extremum» la integral  $\langle \phi | H | \phi \rangle$ .

Las raíces de la ecuación son:

$$W_+ = \frac{H_{AA} + H_{AB}}{1 + S}, \quad W_- = \frac{H_{AA} - H_{AB}}{1 - S} \quad \text{[III-12]}$$

La raíz  $W_+$  corresponde a

$$a = b = \frac{1}{\sqrt{2 + 2S}}$$

es decir:

$$\phi_+ = \frac{\phi_A + \phi_B}{\sqrt{2 + 2S}} \quad \text{[III-13]}$$

La raíz  $W_-$  corresponde a

$$a = -b = \frac{1}{\sqrt{2 - 2S}}$$

es decir:

$$\phi_- = \frac{\phi_A - \phi_B}{\sqrt{2 - 2S}} \quad \text{[III-14]}$$

El cálculo detallado de las integrales que aparecen en las expresiones [12], para la energía y [13] y [14] para las funciones de onda es complicado y puede verse en referencia 10. Los resultados son:

$$\begin{aligned} W_+ &= W_0 + \frac{1}{R} - \frac{\epsilon_{AA} + \epsilon_{AB}}{1 + S} \\ W_- &= W_0 + \frac{1}{R} - \frac{\epsilon_{AA} - \epsilon_{AB}}{1 - S} \end{aligned} \quad \text{[III-15]}$$

donde  $W_0$  representa la energía del estado fundamental del átomo de hidrógeno, y  $S$ ,  $\varepsilon_{AA}$  y  $\varepsilon_{AB}$  tienen las siguientes expresiones

$$S = e^{-R}(1 + R + R^2/3)$$

$$\varepsilon_{AA} = \frac{1}{R} \{1 - e^{-2R}(1 + R)\} \quad [\text{III-16}]$$

$$\varepsilon_{AB} = e^{-R}(1 + R)$$

Representando la energía de los orbitales (descontado  $W_0$ ) en función de  $R$ , se obtiene una marcha cualitativa totalmente análoga a la de la figura 5. El orbital simétrico  $\phi_+$  es el que conduce ahora a un ión molecular estable. Las distribuciones de carga correspondientes a  $\phi_+$  y  $\phi_-$  aparecen dibujadas esquemáticamente en la figura 6. La característica fundamental del orbital  $\phi_+$  es que da una distribución apreciable de carga en la zona intermedia entre los átomos. En cambio, la densidad de carga en esa zona es nula para el orbital  $\phi_-$ .

El orbital  $\phi_+$ , que tiende a enlazar ambos átomos, puede contener dos electrones con spines opuestos y recibe el nombre de orbital de enlace («bonding»). Se trata de la versión LCAO del enlace covalente ya examinado con el método de Heitler-London. El orbital  $\phi_-$  recibe el nombre de antienlace («antibonding»).

Desde el punto de vista de la interacción  $H - H$ , la energía de interacción correspondiente al orbital de enlace  $\phi_+$  se obtiene inmediatamente de las fórmulas [15], ya que, por tratarse de dos electrones en el mismo estado,  $\phi_+$  se verifica.

$$W_+^i = 2 [W_+ - W_0] = 2 \left\{ \frac{1}{R} - \frac{\varepsilon_{AA} + \varepsilon_{AB}}{1 + S} \right\} \quad [\text{III-17}]$$

cuya dependencia con  $R$  es cualitativamente la dibujada en la figura 5 para  $W_+^i$ . El resultado es, pues, totalmente similar al obtenido con el método de Heitler-London.

Una de las ventajas del método LCAO de orbitales moleculares es que puede muy fácilmente extenderse a utilizar combinaciones de orbitales atómicos híbridos. La utilización de estos orbitales híbridos conduce a una interpretación energética sencilla de la estructura espacial de muchas moléculas y, por tanto, es de inestimable valor en estereoquímica.

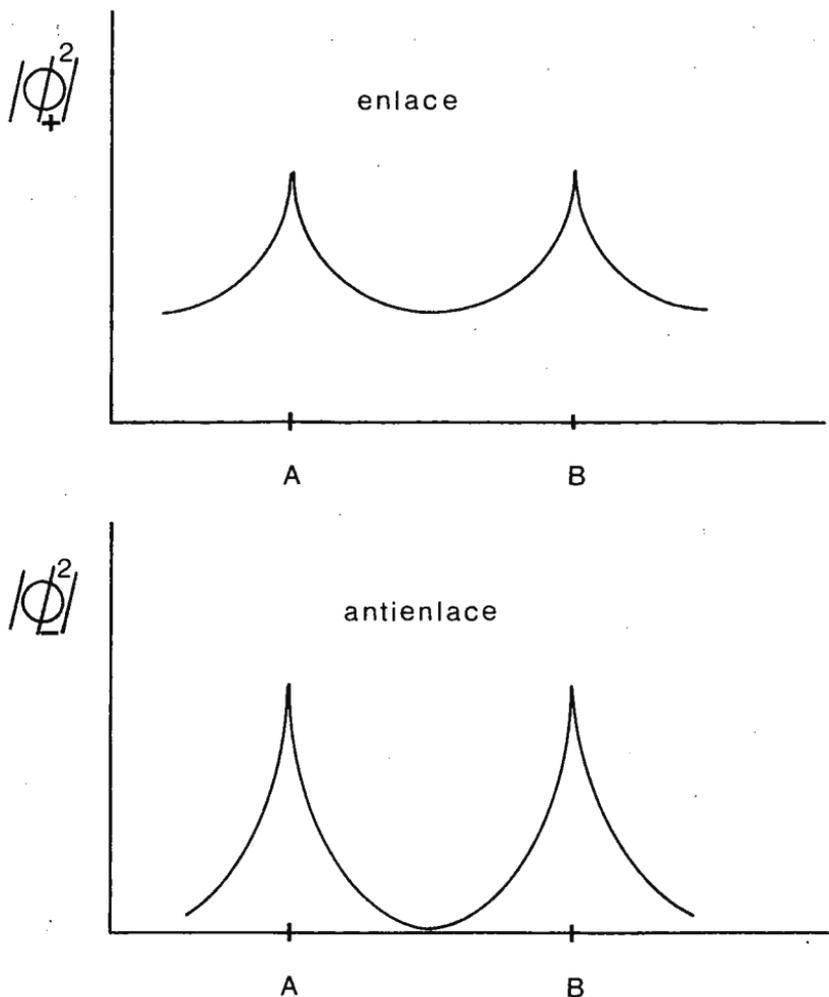


Figura 10

### 5. DISTANCIAS INTERMEDIAS. FÓRMULAS EMPÍRICAS

Anteriormente se ha visto que, a grandes separaciones intermoleculares, la energía de interacción es pequeña frente a las energías internas de cada molécula y es adecuado un tratamiento perturbativo. Esto condujo a las funciones de London. A cortas distancias no es

posible ese método y es preciso un cálculo relativamente detallado de la estructura electrónica («química») de las moléculas. Utilizando métodos aproximados adecuados, se ha podido obtener una dependencia, al menos en forma numérica, entre la energía de interacción y la distancia de separación. A distancias intermedias, el problema es todavía mucho más complejo. Como, además, en la zona de fuerte solapamiento, las interacciones químicas no son usualmente expresables en forma analítica, en la práctica hay que recurrir a expresiones semiempíricas que se ajusten convenientemente a aquellas con fundamento teórico en sus respectivos rangos de validez.

Existen una gran variedad de potenciales empíricos más o menos afortunados. Citaremos a título de ejemplo los potenciales del tipo Lennard-Jones

$$W(R) = \frac{\lambda}{R^n} - \frac{\mu}{R^m} \quad (n > m) \quad \text{[III-18]}$$

el más famoso de los cuales es el potencial 6 - 12

$$W(R) = \varepsilon_0 \left[ \left( \frac{R_0}{R} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \right] \quad \text{[III-19]}$$

que a largas distancias se ajusta a un potencial de dispersión. Los parámetros desconocidos se determinan experimentalmente en cada caso comparando las predicciones teóricas con las propiedades experimentales de los gases reales, tales como ecuación de estado, viscosidad, etc.

Para moléculas diatómicas en particular, la experiencia ha demostrado que el potencial de interacción para el estado fundamental puede representarse bastante exactamente por una función analítica sencilla que contiene tres parámetros ajustables (potencial de Morse)

$$W(R) = W_0 \left[ e^{-\frac{2(R-R_0)}{a}} - 2e^{-\frac{(R-R_0)}{a}} \right] \quad \text{[III-20]}$$

Con este potencial se pueden ajustar razonablemente bien la dependencia teórica obtenida por el método Heitler-London para la interacción  $H - H$ , así como la de otras parejas de átomos ligeros idénticos.

## BIBLIOGRAFIA

1. J. A. STRATTON, *Electromagnetic Theory* (McGraw Hill, 1941).
2. J. H. VAN VLECK, *The Theory of Electric and Magnetic Susceptibilities* (Oxford, 1932).
3. J. O. HIRSCHFELDER, CH. F. CURTISS y R. B. BIRD, *Molecular Theory of Gases and Liquids*, (Wiley 1954).
4. H. MARGENAU y G. M. MURPHY, *Las Matemáticas de la Física y de la Química* (Madrid 1952) (traducción).
5. J. A. STRATTON, *Electromagnetic Theory* (McGraw-Hill 1941).
6. A. MESSIAH, *Mecanique Quantique* (Dunod 1959).
7. MOTT-SNEDDON, *Quantum Mechanics and Applications*.
8. KOTANI, AMEMIYA, ISHIGURO y KIMURA, *Table of Molecular Integrals* (Tokyo, Maruzen-co 1955).
9. KOTANI, OHNO y KAYAMO, *Handbook der Physik XXXVII/2* (1961), *Quantum Mechanics of Electronic Structure of Simple Molecules*.
10. EYRING, WALTER y KIMBALL, *Quantum Chemistry* p. 196-197.

## CAPÍTULO II

### *EVALUACION MECANICO-CUANTICA DE INTERACCIONES MOLECULARES. CONFORMACION DE POLIPEPTIDOS Y ACIDOS NUCLEICOS*

**J. BERTRÁN**

Departamento de Química, Universidad Autónoma de Madrid

I.	EVALUACIÓN DE LAS INTERACCIONES MOLECULARES . . . . .	42
1.	Fuerzas a corta distancia. Fuerzas de repulsión de Pauli . . . . .	42
2.	Fuerzas a gran distancia. Fuerzas de atracción de Van der Waals . . . . .	43
3.	Fuerzas a media distancia. Puentes de hidrógeno y complejos de transferencia de carga . . . . .	46
II.	CONFORMACIONES DE POLIPÉPTIDOS . . . . .	49
III.	CONFORMACIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS . . . . .	57

## INTRODUCCION

Antes de discutir la aplicación de los métodos mecánico-cuánticos a la determinación de las conformaciones más estables en las proteínas y en los ácidos nucleicos, es conveniente dar una visión de conjunto de las diferentes aproximaciones utilizadas para evaluar las interacciones moleculares.

Varios factores intervienen en las fuerzas intermoleculares. Al tratarse de moléculas en su estado electrónico fundamental, lo más adecuado es clasificar las distintas interacciones según la distancia intermolecular. De acuerdo a este criterio pueden enumerarse:

a) Fuerzas a corta distancia (del orden de  $1 \text{ \AA}$ ). Fuerzas de repulsión de Pauli.

b) Fuerzas a gran distancia (del orden de  $5 \text{ \AA}$ ). Fuerzas de atracción de Van der Waals.

c) Fuerzas a media distancia (del orden de  $3 \text{ \AA}$ ). Puentes de hidrógeno y complejos de transferencia de carga.

Lo más lógico sería considerar las fuerzas a corta, a media y a larga distancia según este orden, pero pedagógicamente es mejor estudiar en primer lugar los casos extremos y, finalmente, el caso intermedio.

Una observación final. Si una de las dos moléculas se encuentra en un estado electrónico excitado, aparecen nuevas fuerzas atractivas, llamadas de transferencia de excitón o de transferencia de resonancia. De este tipo de interacciones no se tratará en la presente charla.

### I. Evaluación de las interacciones moleculares

#### 1. FUERZAS A CORTA DISTANCIA (DEL ORDEN DE $1 \text{ \AA}$ ). FUERZAS DE REPULSIÓN DE PAULI

Dos átomos de helio, o dos moléculas de hidrógeno, a corta distancia se rechazan violentamente. La energía de repulsión es de la misma magnitud que la energía de un enlace químico. Estas fuerzas

repulsivas no son específicas y se manifiestan entre todo tipo de moléculas.

Al acercarse dos moléculas, la densidad electrónica aumenta hasta valores superiores a los permitidos por el principio de exclusión de Pauli. Consiguientemente, el origen de estas fuerzas es mecánico-cuántico. Los electrones del mismo espín tienden a distanciarse lo más posible distribuyéndose en los extremos del sistema. Ello crea un vacío electrónico entre los núcleos que se rechazarán violentamente. Puede comprenderse el fenómeno aludido al comparar las energías del estado singlete  $^1\Sigma$  y del estado triplete  $^3\Sigma$  de dos átomos de hidrógeno en función de la distancia interatómica. A corta distancia, mientras que el estado singlete es fuertemente atractivo, el estado triplete es repulsivo. Para el estado singlete hay un aumento de densidad electrónica entre los núcleos, mientras que, para el estado triplete, hay una disminución. En el primer caso, los dos electrones son de diferente espín, mientras que en el segundo ambos electrones son del mismo espín.

Al estar las dos moléculas a corta distancia, una separación de sus respectivos sistemas electrónicos es completamente arbitraria. Para evaluar la energía de interacción, lo adecuado es estudiar el sistema total como una supermolécula.

Los resultados obtenidos por este método pueden representarse correctamente por fórmulas empíricas del tipo  $U(R) = A e^{-KR}$  (utilizada en la expresión de la energía potencial por Buckingham) o del tipo  $U(R) = B/R^n$  ( $n = 12$  en la expresión de la energía potencial propuesta por Lennard-Jones). Puede observarse que estas fuerzas de repulsión decrecen rápidamente con la distancia y son despreciables a grandes distancias.

## 2. FUERZAS A GRAN DISTANCIA (DEL ORDEN DE 5 Å). FUERZAS DE ATRACCIÓN DE VAN DER WAALS

Se manifestaron al estudiar Van der Waals la ecuación de estado de los gases reales. Son fuerzas atractivas débiles, del orden de 1 Kcal/mol, y no específicas.

Para moléculas neutras, su origen radica en la interacción de los dipolos permanentes de ambas moléculas. Si una de las dos moléculas carece de momento dipolar permanente, el campo eléctrico creado por el momento dipolar de la otra molécula la polariza y hace aparecer en ella un momento dipolar inducido, interaccionando ambos momentos

dipolares. Estas interacciones fueron ya estudiadas por la física clásica. En 1931, London estudió un nuevo tipo de interacción entre moléculas carentes de momento dipolar permanente. Las fuerzas de dispersión de London no pueden comprenderse mediante la física clásica y son sólo adecuadamente descritas por la mecánica cuántica. Su origen estriba en que, al desplazarse aleatoriamente los electrones, aparecen en las moléculas momentos dipolares transitorios que interaccionan. Por correlación electrónica, un momento instantáneo en una de ellas induce un momento instantáneo en la otra favorable para una situación atractiva. Pueden describirse como interacciones entre dos momentos dipolares inducidos.

Diferentes expresiones empíricas describen adecuadamente estas fuerzas. Generalmente, la energía potencial se pone como función de  $R^{-6}$ . Por ejemplo, en el potencial de Lennard-Jones, la energía total de interacción tiene la forma:

$$U(R) = 4\epsilon \left( - \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 + \left( \frac{R_0}{R} \right)^{12} \right)$$

$R_0$  corresponde a la distancia de potencial nulo. El primer término se refiere a las fuerzas de atracción de Van der Waals, y el segundo a las fuerzas de repulsión de Pauli, anteriormente descritas.

Dos factores determinarán el método teórico más adecuado para una recta evaluación de estas interacciones. Por tratarse de interacciones débiles, la energía total diferirá poco de la energía de ambas moléculas separadas, y, por estar ambas moléculas a gran distancia, sus correspondientes sistemas electrónicos están claramente diferenciados sin intercambio alguno de partículas. En estas condiciones el método más adecuado es la teoría de perturbaciones. La función de onda total se expresará como producto de las funciones electrónicas de cada molécula, ya que ambos sistemas electrónicos pueden separarse perfectamente. En expresión abreviada notaremos este producto por  $AB$ . Cuando la molécula  $A$  o la molécula  $B$  se encuentre en un estado electrónico excitado, lo notaremos por un apóstrofe.

La variación de energía dada por la teoría de perturbaciones tiene la forma:

$$\Delta E = \langle 0 | \hat{V} | 0 \rangle + \sum_i \frac{|\langle 0 | \hat{V} | i \rangle|^2}{E_0 - E_i} + \dots \quad [1]$$

$\hat{V}$  es el operador de perturbación,  $|0\rangle$  el estado fundamental y  $|i\rangle$  los

estados excitados del operador sin perturbar. Al expresar estado fundamental y estados excitados del sistema como productos de las funciones electrónicas de cada molécula, se tiene:

$$\Delta E = \langle AB | \hat{V} | AB \rangle + \sum_{A'} \frac{|\langle AB | \hat{V} | A'B \rangle|^2}{E_A - E_{A'}} + \sum_{B'} \frac{|\langle AB | \hat{V} | AB' \rangle|^2}{E_B - E_{B'}} + \sum_{A' B'} \frac{|\langle AB | \hat{V} | A'B' \rangle|^2}{E_A - E_{A'} + E_B - E_{B'}} \quad [2]$$

El primer término corresponde en una interpretación semiclassical a la interacción dipolo permanente-dipolo permanente. El segundo y tercero, a la interacción entre el dipolo permanente de una molécula y el dipolo inducido en la otra. Finalmente, el último a las fuerzas de dispersión de London. Se ha de notar que se ha truncado el desarrollo de la energía de perturbación en los términos de segundo orden.

Para mostrar la equivalencia de los diferentes términos de la teoría de perturbación con los de una física clásica puede desarrollarse el operador de perturbación,  $\hat{V}$ , en serie de multipolos. En este desarrollo sólo el primer término, correspondiente a la interacción dipolo-dipolo, es apreciable, y toma la forma:

$$\hat{V} = \frac{1}{R^3} (-2\hat{M}_z^A \hat{M}_z^B + \hat{M}_x^A \hat{M}_x^B + \hat{M}_y^A \hat{M}_y^B) + \dots$$

Con este operador de perturbación calculemos el término correspondiente a la perturbación de primer orden.

$$\begin{aligned} \langle AB | \hat{V} | AB \rangle &= \frac{1}{R^3} \langle AB | -2\hat{M}_z^A \hat{M}_z^B + \hat{M}_x^A \hat{M}_x^B + \hat{M}_y^A \hat{M}_y^B | AB \rangle = \\ &= \frac{1}{R^3} (-2\bar{M}_z^A \bar{M}_z^B + \bar{M}_x^A \bar{M}_x^B + \bar{M}_y^A \bar{M}_y^B) \end{aligned}$$

Siendo  $\bar{M}_z^A = \langle A | \hat{M}_z^A | A \rangle$ , es decir, el valor medio de dicha magnitud. La perturbación de primer orden nos da el mismo resultado que la física clásica en la interacción dipolo permanente-dipolo permanente. Sólo con la variante de que ahora se trata de valores dipolares medios.

Análogamente puede mostrarse que segundo y tercer término [2] corresponden a la interacción dipolo permanente-dipolo inducido.

Originan términos en  $R^{-6}$ . Finalmente, el último término, con ambas moléculas excitadas, origina un término de la forma:

$$-\frac{3\alpha_A\alpha_B}{2R^6} \frac{I_A I_B}{I_A + I_B}$$

$\alpha_A$  es la polarizabilidad de la molécula  $A$ ;  $I_A$  es el potencial de ionización de la molécula  $A$ , que reemplaza una energía de excitación media. Esta es la expresión de la energía de dispersión, que puede interpretarse como una interacción dipolo inducido-dipolo inducido, ya que contiene el producto de polarizabilidades de ambas moléculas.

Ya en 1942, London indicó que el desarrollo multipolar es sólo adecuado cuando el tamaño de las moléculas es pequeño comparado con la distancia intermolecular. Normalmente, en los sistemas biológicos no se cumplió esta condición y no es lícito utilizar esta expresión aproximada del operador de perturbación. En estas circunstancias debe utilizarse el operador exacto:

$$\hat{V} = \sum_{\alpha} \sum_{\beta'} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta'}}{R_{\alpha\beta'}} - \sum_{\alpha} \sum_{j'} \frac{Z_{\alpha}}{R_{\alpha j'}} - \sum_{\beta'} \sum_i \frac{Z_{\beta'}}{R_{\beta' i}} + \sum_i \sum_{j'} \frac{1}{r_{ij'}} \quad [3]$$

en donde los índices sin apóstrofe,  $\alpha$  y  $i$ , se refieren a los centros atómicos y electrones de la molécula  $A$ ; y los índices con apóstrofe,  $\beta'$  y  $j'$ , a los centros atómicos y electrones de la molécula  $B$ . Primer y último término expresan la repulsión entre núcleos y electrones de ambas moléculas, mientras que segundo y tercer término expresan la atracción de los electrones de una molécula por los núcleos de la otra. Al estudiar en otra conferencia la interacción entre las bases de los ácidos nucleicos desarrollaré las fórmulas originadas por tal operador de perturbación.

### 3. FUERZAS A MEDIA DISTANCIA (DEL ORDEN DE 3 Å). PUENTES DE HIDRÓGENO Y COMPLEJOS DE TRANSFERENCIA DE CARGA

A la distancia de 3 Å, tanto las fuerzas de repulsión de Pauli como las de atracción de Van der Waals son apreciables, pero en los puentes de hidrógeno y en los complejos de transferencia de carga interviene además un nuevo tipo de fuerzas. Estas fuerzas son específicas y anisotrópicas, del orden de 10 Kcal/mol.

En los puentes de hidrógeno este átomo está ligado a un átomo fuertemente electronegativo,  $F$ ,  $O$  o  $N$ . El átomo de hidrógeno cargado

positivamente es atraído por el heteroátomo negativo de otra molécula. Hay una transferencia parcial del protón entre las dos moléculas. La estabilización peculiar de esta situación es fundamentalmente electrostática. En los complejos de transferencia de carga hay una transferencia electrónica entre ambas moléculas. La estabilización procede fundamentalmente de la deslocalización electrónica. Transferencia parcial de un protón o de un electrón son fenómenos equivalentes. El parentesco entre los puentes de hidrógeno y los complejos de transferencia de carga se evidencia por la existencia de casos intermedios. Así, entre un benceno y una molécula con un grupo  $-\text{OH}$  hay una transferencia parcial de un electrón del benceno al grupo hidroxilo, y una transferencia parcial del protón del grupo hidroxilo al benceno.

Dos métodos son posibles para describir las fuerzas a media distancia. Puede considerarse que una distancia media es una distancia pequeña y estudiar el sistema como una supermolécula, o puede considerarse que es una distancia grande y utilizar la teoría de perturbaciones. Al utilizar la teoría de perturbaciones se ha de tener en cuenta que, a la distancia de 3 Å, habrá un solapamiento entre los orbitales moleculares de ambas moléculas, lo cual introducirá un intercambio electrónico. Ya no es posible tratar el sistema electrónico total como dos sistemas separados. Es necesario antisimetrizar el producto de funciones electrónicas de ambas moléculas para introducir la indiscernibilidad de los electrones de una y otra molécula. En los últimos años, la aplicación de la teoría de perturbaciones a distancias medias es objeto de constante investigación.

El estudio de los complejos de transferencia de carga y de los puentes de hidrógeno propuesto por Mulliken es ya clásico. Si expresamos por  $D$  la molécula dadora de electrones (aceptora del protón), y por  $A$  la molécula aceptora de electrones (dadora del protón), la función de onda total se expresa como combinación lineal de la función  $\psi_{DA}$  del sistema en ausencia de transferencia y  $\psi_{D+A}$  función de onda del sistema si un electrón es totalmente transferido de  $D$  a  $A$ .

$$\Phi = a\psi_{DA} + b\psi_{D+A}$$

En el estado fundamental,  $a$  es grande, y  $b$  pequeño. Habrá un estado excitado en el que sucede lo contrario. La transición electrónica del estado fundamental a este estado excitado implica una transferencia de carga del dador al aceptor. En el espectro aparece una nueva banda, llamada de transferencia de carga, correspondiente a esta transición.

El determinante secular nos suministra la ecuación que dará las energías de los dos estados descritos.

$$\begin{vmatrix} H_{11} - E & H_{12} - ES_{12} \\ H_{21} - ES_{21} & H_{22} - E \end{vmatrix} = 0 \quad \begin{aligned} H_{11} &= \langle \psi_{DA} | H | \psi_{DA} \rangle \\ H_{12} &= \langle \psi_{DA} | H | \psi_{D^+A^-} \rangle \\ H_{22} &= \langle \psi_{D^+A^-} | H | \psi_{D^+A^-} \rangle \end{aligned}$$

Esta ecuación puede resolverse exactamente, pero por ser el valor de la energía del estado fundamental muy cercana a  $H_{11}$ , se acostumbra a utilizar la teoría de perturbaciones para determinar la energía del estado fundamental.

$$E = H_{11} - \frac{(H_{12} - H_{11}S_{12})^2}{H_{22} - H_{11}} \quad [4]$$

$H_{11}$  y  $H_{22}$  se determinan semiempíricamente.  $H_{12} = \beta$  se trata como parámetro empírico y se desprecia  $H_{11}S_{12}$  frente a  $H_{12}$ .

$H_{11}$  se aproxima en los puentes de hidrógeno como suma de la energía de las dos moléculas a infinita distancia,  $E_F$ , de la energía electrostática dada por la fórmula de Coulomb con las cargas efectivas del hidrógeno,  $Q_H$ , del heteroátomo unido al hidrógeno,  $Q_X$ , y del heteroátomo de la otra molécula,  $Q_{X'}$ , y, finalmente, de la energía de repulsión de Pauli dada por la fórmula empírica apuntada anteriormente. La diferencia de energía entre  $H_{11}$  y  $H_{22}$  es la energía necesaria para arrancar un electrón del dador menos la energía devuelta al captar el electrón el aceptor y la estabilización electrostática después de haberse transferido el electrón y aparecer ambas moléculas cargadas. Así [4] se transforma en:

$$E = E_F + \frac{Q_X Q_{X'}}{R_{XX'}} - \frac{Q_H Q_{X'}}{R_{X'H}} + ke^{-bR_{X'H}} - \frac{\beta^2}{I_D - A_A - C_{D^+A^-}} \quad [5]$$

La estabilización del puente de hidrógeno,  $E - E_F$ , es fundamentalmente electrostática. Los dos últimos términos [5], correspondientes a la repulsión de Pauli y a la estabilización por transferencia de carga, se compensan mutuamente.

En los complejos de transferencia de carga se obtiene una fórmula análoga con la ausencia de segundo y tercer término [5] referentes a la energía electrostática de la configuración sin transferencia de carga. La estabilización procede del último término proveniente de la trans-

ferencia de carga. El denominador será pequeño cuando lo sea el potencial de ionización del dador y sea elevada la electroafinidad del aceptor.

## II. Conformaciones de polipéptidos

Un polipéptido tiene numerosos grados de libertad. Es necesario operar una reducción en las conformaciones posibles, fijando algunos de los grados de libertad, para poder realizar los cálculos teóricos. Un enlace deslocalizado se extiende sobre los átomos de carbono, de oxígeno y de nitrógeno del enlace peptídico. Es lógico tomar el

grupo  $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{—C—N—} \\ | \\ \text{H} \end{array}$  como plano y en conformación *trans* como la situa-

ción energéticamente más favorable. Se fijan además las distancias de los enlaces y los ángulos formados por enlaces contiguos. Quedan sólo como grados de libertad los ángulos de rotación consignados en la figura 1. Normalmente sólo se retienen las rotaciones alrededor del enlace N—C $^{\alpha}$ ,  $\Phi$ , y alrededor del enlace C—C $^{\alpha}$ ,  $\psi$ . Se prescinde de las rotaciones que afectan al grupo unido al carbono  $^{\alpha}$ .

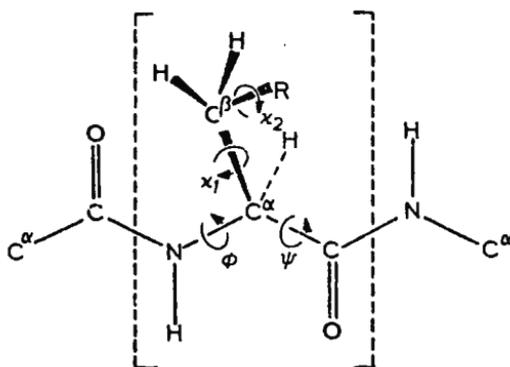


Figura 1.—Parámetros de un dipéptido en el estudio conformacional de polipéptidos. [ ], límites de un residuo.

Los resultados se presentan en mapas conformacionales, circunscribiendo las regiones de conformaciones más estables con líneas continuas. En abscisas se toma el ángulo  $\Phi$ , y en ordenadas el ángulo  $\psi$ . Los resultados se refieren normalmente a dipéptidos internos en una cadena de polipéptidos. Ello implica prescindir de varias interacciones decisivas en la determinación de la hélice  $\alpha$  de muchos polipéptidos. Se prescinde en primer lugar de las interacciones con el disolvente; en segundo lugar, de interacciones con otros polipéptidos, y, finalmente, de interacciones entre aminoácidos no contiguos en la estructura primaria del polipéptido, que pueden estar espacialmente a corta distancia. Sobre todo será decisivo el prescindir de puentes de hidrógeno entre residuos lejanos en la estructura primaria.

Tres etapas pueden señalarse en los cálculos teóricos. En la primera, los mapas conformacionales se construyeron a partir del modelo de las esferas rígidas (1). Quedaban prohibidas las zonas en que se superponían distintos átomos. Tamaño y forma de estas zonas dependen de los radios de Van der Waals asignados a cada átomo.

En una segunda etapa se refina el método introduciendo otros factores expresados por fórmulas empíricas calibradas en moléculas de pequeña talla (2). Se introduce un potencial de torsión que da las barreras de rotación. Se introducen además las interacciones entre átomos no enlazados, no consideradas en el factor precedente, mediante un potencial empírico del tipo Lennard-Jones. Se introduce también la interacción electrostática entre dipolos del grupo amida del enlace peptídico. Finalmente se introducen los puentes de hidrógeno aproximados por fórmulas empíricas. Las figuras 2 y 3 presentan los mapas conformacionales obtenidos para residuos dipéptidos de glicina y alanina, respectivamente. Las dextro y levo  $\alpha$  hélices se encuentran en zonas favorables, pero no en los mínimos absolutos de energía.

Las aproximaciones empíricas adoptadas permiten, dentro de límites razonables de cálculo, evaluar energías de estructuras helicoidales regulares de nueve unidades con dos residuos en los extremos. En estas condiciones, todos los ángulos  $\Phi$  y  $\psi$  son idénticos. La figura 4 presenta el mapa conformacional de una poliglicina. Es interesante comparar las figuras 2 y 4. En la poliglicina, las dextro y levo  $\alpha$  hélices se encuentran ya en el mínimo absoluto de energía. Este efecto debe atribuirse a que, al tener ya algunas vueltas, se consideran ya interacciones, especialmente los puentes de hidrógeno, entre residuos no contiguos en la estructura primaria.

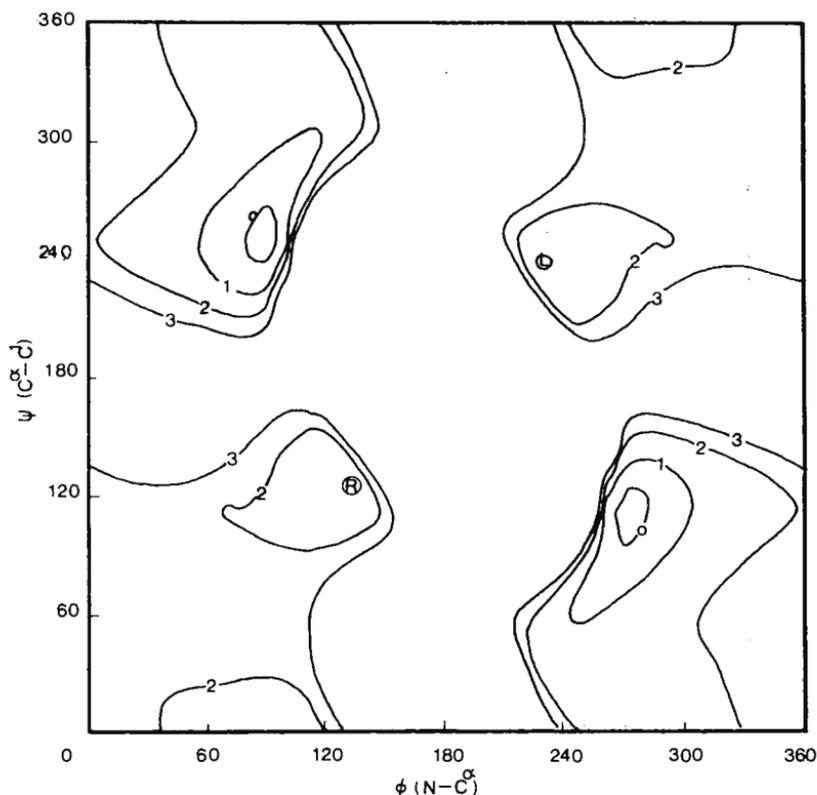
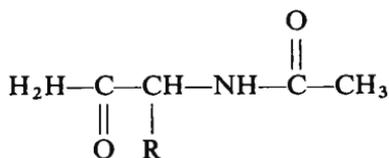


Figura 2.—Mapa conformacional para un residuo de glicina. Las energías vienen dadas en kcal/mol. Las letras R y L indican las posiciones de las hélices enrolladas a derecha e izquierda respectivamente.

En una última etapa, los cálculos para las diferentes conformaciones de un dipéptido no se han hecho mediante la teoría de perturbaciones, sino considerándolo como una única molécula. En concreto, los cálculos han versado sobre una N-acetil-amida del aminoácido considerado:



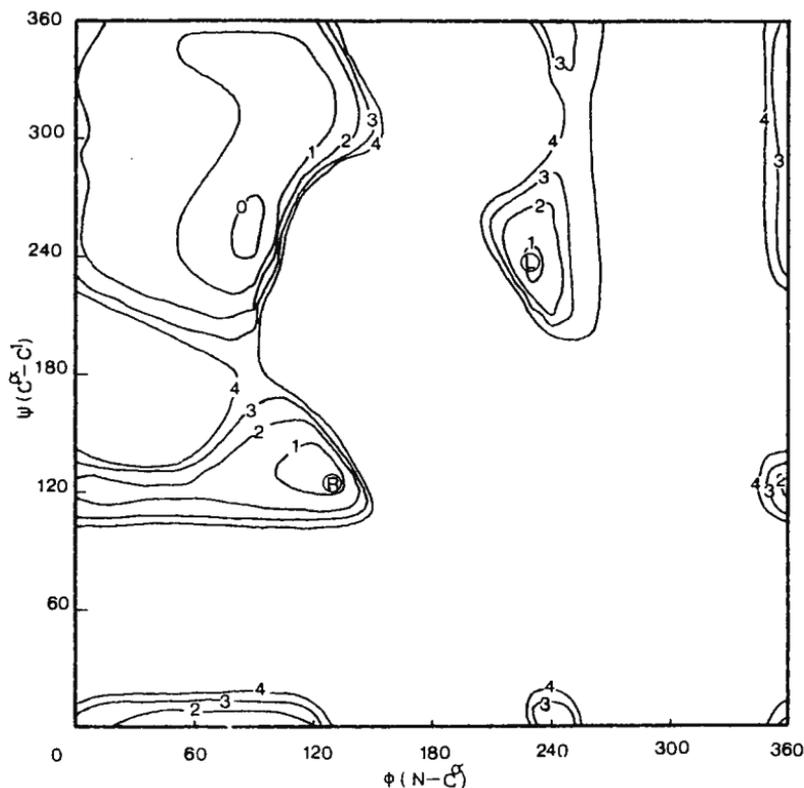


Figura 3.—Mapa conformacional para un residuo de alanina.

Esta molécula es análoga a un dipéptido en el interior de una cadena péptica. Se modifican solamente los ángulos  $\Phi(N-C^\alpha)$  y  $\psi(C-C^\alpha)$ .

El método EHMO ha sido utilizado en primer lugar para efectuar los cálculos (3). Rossi y David (4) han estudiado supermoléculas de poliglicina con cuatro y cinco unidades. Se observa en las  $\alpha$  hélices un incremento de estabilización por péptido al pasar de cuatro a cinco unidades, lo cual refleja la formación de un primer puente de hidrógeno adicional estabilizador. Kier y George se atreven a predecir la geometría más estable de la bradiquinina,



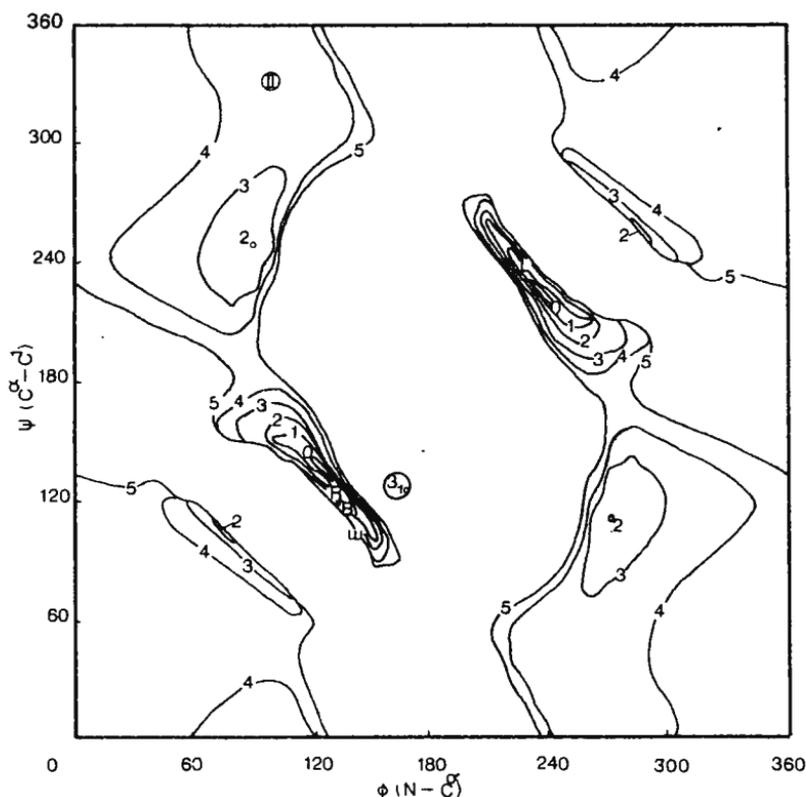


Figura 4.—Mapa conformacional para hélices de poliglicina. Las letras R y L indican las posiciones de las hélices  $\alpha$  enrolladas a derecha e izquierda respectivamente, B de la hélice B de la mioglobina,  $\omega$  de la hélice  $\omega$ ,  $3_{10}$  de la hélice  $3_{10}$  y II de la estructura II de la poliglicina.

polipéptido lineal de pequeña talla. Esta previsión se hace a partir de las conformaciones más estables encontradas teóricamente para cada aminoácido. Sería interesante poder comparar estas previsiones con resultados experimentales.

El método PCILO, más elaborado que el EHMO, ha sido utilizado por Pullman (5) para determinar los mapas conformacionales. Las figuras 6 y 7 presentan los resultados para los derivados N-acetil-amida de la glicina y de la alanina. Al comparar valores experimentales, re-

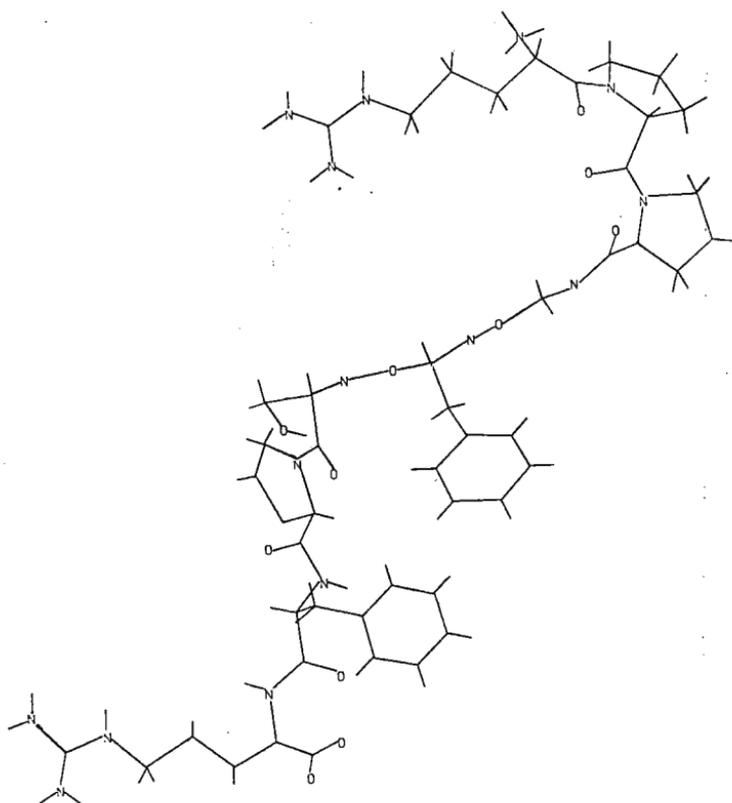


Figura 5.—Conformación de la bradiquinina a partir de las conformaciones calculadas para cada residuo que interviene en la secuencia de aminoácidos.

sultados obtenidos por los métodos empíricos y resultados obtenidos por el método PCILO, puede observarse una mejor correspondencia entre valores experimentales y calculados en este último método. No puede esperarse una correspondencia perfecta con los valores experimentales por prescindirse de interacciones con el disolvente, con otros polipéptidos y entre residuos no contiguos de la misma cadena. Con todo, la correspondencia existente parece indicar que los factores determinantes de la conformación más estable en cada aminoácido

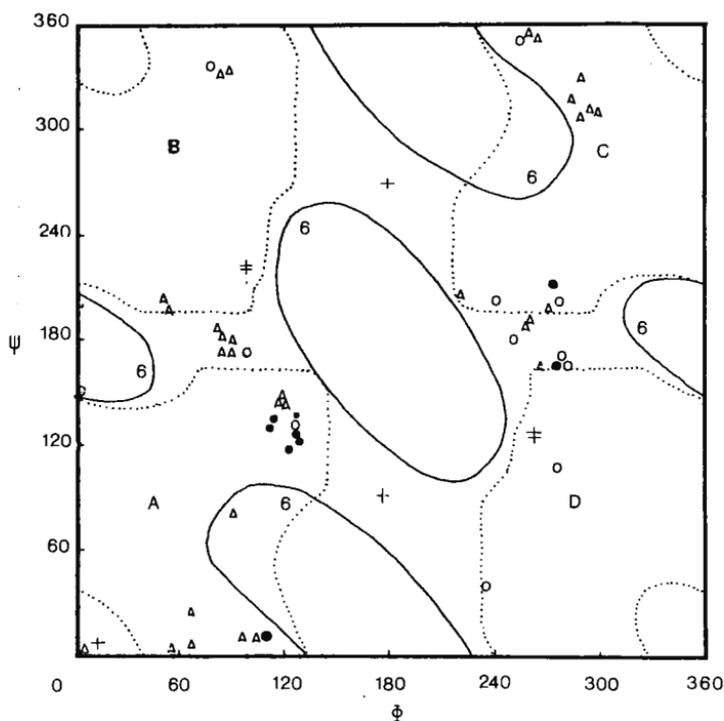


Figura 6. Mapa conformacional para un residuo de glicina.  
 (.....) Límites de las zonas permitidas en la aproximación de esferas duras. (—) Límites de 6 kcal/mol por encima del mínimo más profundo según un cálculo mecánico-cuántico. (+) Mínimos locales en el cálculo mecánico-cuántico. (○) Valores experimentales de la lisozima.  
 ● Valores de la mioglobina. Δ Valores de compuestos pequeños.

son importantes para determinar la estructura en hélice  $\alpha$  de las proteínas.

Al enjuiciar los resultados obtenidos, en favor de los métodos empíricos milita la ventaja de su simplicidad, que permite considerar cadenas ya suficientemente largas. Las restricciones de tamaño al considerar una supermolécula son las limitaciones más fuertes para este tipo de cálculos. Se ha de señalar además que hay notables diferencias cuantitativas entre los resultados obtenidos por el método EHMO y por el método PCILO. El método EHMO, con drásticas aproxima-

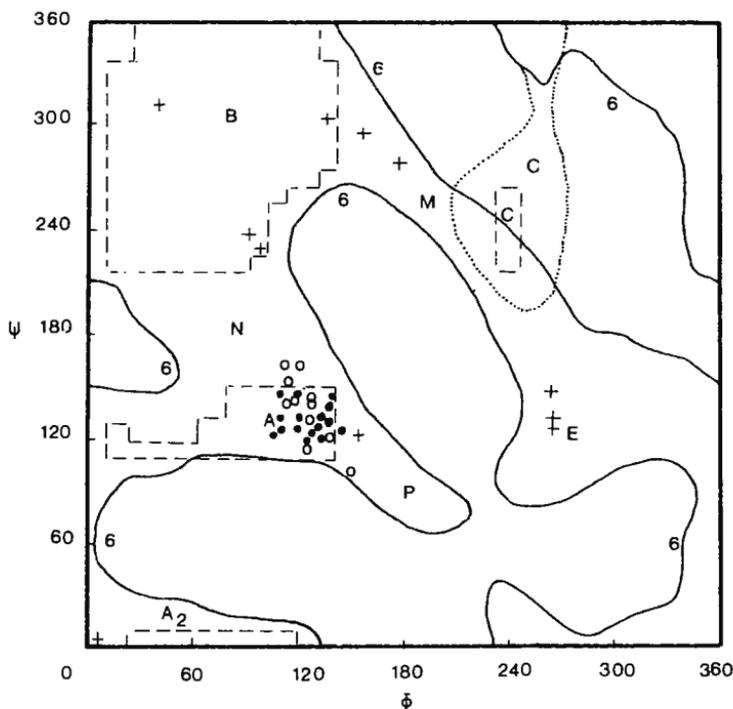


Fig. 7.—Mapa conformacional para un residuo de alanina.  
 (----) Límites de las zonas permitidas en la aproximación de esferas duras. (· · · ·) Extensión de la zona C al adoptarse funciones empíricas del potencial. (—) Límites de 6 kcal/mol por encima del mínimo más profundo ( $\neq$ ) según un cálculo mecánico-cuántico. (+) Mínimos locales en un cálculo mecánico-cuántico. (O) Valores experimentales de la lisozima.  
 ● Valores de la mioglobina.

ciones, aparece escasamente adaptado a la determinación conformacional. Como indicaba al final de la conferencia anterior, dado que las barreras son muy pequeñas, es necesario utilizar métodos muy precisos. Desde este punto de vista, las ventajas del método PCILO son evidentes. Ya que las barreras encontradas por este método son de unas 6 Kcal/mol, parece muy conveniente poder hacer cálculos para cadenas más largas e introducir otros grados de libertad, como son las rotaciones alrededor de los ángulos  $\chi_1$  y  $\chi_2$ , para poder tener resultados realmente significativos comparables con los valores experimentales.



### III. Conformaciones de ácidos nucleicos

Se han utilizado diferentes aproximaciones para evaluar las interacciones entre las bases de los ácidos nucleicos. En los trabajos iniciales (6) se empleó la aproximación dipolo para evaluar los tres términos clásicos, electrostático, de polarización y de dispersión. Ya señalé que esta aproximación es inadecuada para moléculas de gran tamaño. De una forma progresiva se ha ido introduciendo la aproximación monopolo para desarrollar el operador de perturbación (ecuación [3]). Generalmente, las funciones de onda de cada molécula han sido determinadas por el método MO-LCAO. Las fórmulas que se obtienen se desarrollan más adelante.

Primero se introdujo la aproximación monopolo para calcular el término electrostático, despreciando los otros dos términos (7). En problemas en los que la interacción electrostática es la principal, como acaece en los puentes de hidrógeno, esta aproximación proporciona resultados significativos. Así, al cambiar la posición relativa de un par de bases, aparecen profundos mínimos energéticos en las posiciones de equilibrio de los puentes de hidrógeno, mientras que tales mínimos no aparecen en la aproximación dipolo. En algunos trabajos (8) se evalúan los términos de polarización y de dispersión en la aproximación dipolo. Se trata de un procedimiento híbrido, adoptando la aproximación monopolo para evaluar el término electrostático y la aproximación dipolo para evaluar los términos de polarización y de dispersión.

Finalmente, la aproximación monopolo se ha adoptado para evaluar los tres términos de una interacción a larga distancia, electrostático, de polarización y de dispersión. En un principio se aplicó sólo al sistema de electrones  $\pi$  (9). Los electrones  $\sigma$  no se han introducido por carecer de buenas funciones de onda y de buenos valores de los niveles energéticos. De nuevo un procedimiento híbrido se ha adoptado para introducir los electrones  $\sigma$ , la aproximación monopolo para obtener la distribución de carga y la aproximación dipolo aplicado a cada enlace localizado para evaluar los términos de polarización y de dispersión (10). Los dipolos considerados se refieren sólo a los enlaces localizados, cuyo tamaño es pequeño comparado con la distancia intermolecular.

Mediante el método CNDO/2 modificado (11) se han obtenido buenos valores propios y buenas funciones de onda, incluyendo todos

los electrones de valencia para las bases y los pares de bases del DNA (12). Ello permite aplicar la aproximación monopolo para evaluar los tres términos, electrostáticos, de polarización y de dispersión, en el sistema de todos los electrones de valencia. Al introducir en la ecuación [2] el operador de perturbación dado por la ecuación [3], el primer término da la energía electrostática; el segundo y tercero, la de polarización, y el último, la de dispersión. Se obtienen las siguientes expresiones para cada uno:

$$E_{el} = \sum_{\alpha=1}^M \sum_{\beta'=1}^{M'} \frac{Q_{\alpha} Q_{\beta'}}{R_{\alpha\beta'}}$$

$$E_{pol} = 2 \sum_{s=1}^n \sum_{l=n+1}^{\infty} \frac{\left( \sum_{\beta'=1}^{M'} \sum_{\mu=1}^m C_{s\mu} C_{l\mu} \frac{Q_{\beta'}}{R_{\beta'\mu}} \right)^2}{E_0^A - E_{s \rightarrow l}^A} +$$

$$+ 2 \sum_{k=1}^{n'} \sum_{p=n'+1}^{\infty} \frac{\left( \sum_{\alpha=1}^M \sum_{\mu'=1}^{m'} C_{k\mu'} C_{p\mu'} \frac{Q_{\alpha}}{R_{\alpha\mu'}} \right)^2}{E_0^B - E_{k \rightarrow p}^B}$$

$$E_{dis} = 4 \sum_{s=1}^n \sum_{l=n+1}^{\infty} \sum_{k=1}^{n'} \sum_{p=n'+1}^{\infty} \frac{\left( \sum_{\mu=1}^m \sum_{\mu'=1}^{m'} \frac{C_{s\mu} C_{l\mu} C_{k\mu'} C_{p\mu'}}{R_{\mu\mu'}} \right)^2}{E_0^A - E_{s \rightarrow l}^A + E_0^B - E_{k \rightarrow p}^B}$$

$Q_{\alpha}$  es la carga neta sobre el centro atómico  $\alpha$ ;  $C_{s\mu}$ , el coeficiente del orbital atómico  $\mu$  en el orbital molecular  $s$ ;  $m$  es el número de orbitales atómicos;  $E_{s \rightarrow l}^A$  es la energía de un estado excitado de la molécula  $A$  correspondiente a una transición electrónica del orbital  $s$  al orbital  $l$ ;  $E_0^A$ , la energía del estado fundamental, y  $n$ , el número de orbitales moleculares doblemente ocupados. Los valores análogos con apóstrofe se refieren a la molécula  $B$ .

Al encontrarse las bases a una distancia vertical de 3,36 Å se recubren los orbitales  $2p_z$  de ambas moléculas, originándose una deslocalización de los sistemas  $\pi$ . Mediante un operador efectivo monoeléctrico,

al aplicar la teoría de perturbaciones se obtiene para esta energía de deslocalización:

$$\Delta E = -2 \sum_{i=1}^n \sum_{j'=n'+1}^{\infty} \frac{\left( \sum_{\mu=1}^m \sum_{\mu'=1}^{m'} C_{i\mu} C_{j'\mu'} \beta_{\mu\mu'} \right)^2}{\varepsilon_{j'}^B - \varepsilon_i^A} -$$

$$-2 \sum_{j'=1}^{n'} \sum_{i=n+1}^{\infty} \frac{\left( \sum_{\mu=1}^m \sum_{\mu'=1}^{m'} C_{i\mu} C_{j'\mu'} \beta_{\mu\mu'} \right)^2}{\varepsilon_i^A - \varepsilon_{j'}^B}$$

$n$ ,  $m$  y  $C_{i\mu}$  significan lo mismo que antes, pero ahora se refieren sólo al sistema de electrones  $\pi$ ;  $\varepsilon_i$  es la energía del orbital molecular  $i$ , y  $\beta_{\mu\mu'}$  es la integral de resonancia entre los orbitales atómicos  $\mu$  y  $\mu'$ .

En el cuadro I se dan los valores obtenidos para los pares adenina-timina y guanina-citosina en su interacción horizontal. Los valores (a) corresponden al método aquí descrito, y los valores (b) al método híbrido con la aproximación monopolo para evaluar el término electrostático, y la aproximación dipolo para evaluar los de polarización y de dispersión [8]. Interesa introducir este contraste para una correcta interpretación de los resultados. Con todos los métodos se obtienen resultados parecidos dentro del mismo orden. Puede concluirse que la interacción horizontal entre las bases es fundamentalmente electrostática. En segundo lugar, mucho mayor en el par guanina-citosina. Ello parece interpretar la mayor estabilidad térmica de DNA rico en G—C y ha sido confirmado experimentalmente (13). Los valores del cuadro I dan una idea de la tendencia a parearse de las bases púricas y pirimidínicas.

CUADRO I

Interacción horizontal	Electrostática	Polarización	Dispersión	Total
Adenina-timina	-3,07	-0,17	-0,45	-3,69 (a)
	-4,61	-0,27	-0,77	-5,65 (b)
Guanina-citosina	-11,18	-1,22	-0,32	-12,72 (a)
	-15,91	-2,02	-1,25	-19,18 (b)

Todos los valores están dados en Kcal/mol.

Las figuras 8, 9, 10 y 11 presentan las energías electrostática, de polarización y de dispersión entre dos pares de bases a la distancia vertical de 3,36 Å y girando libremente el par de bases superior. Con ello se pretende averiguar si a esta distancia de equilibrio hay algún ángulo más favorable. La energía electrostática presenta cuatro mínimos hacia ángulos de 45°, partiendo de una posición paralela o antiparalela de las bases y girando en los dos sentidos. En ciertos casos, alguno de estos mínimos se reduce a una inflexión. La energía de dispersión presenta sus mínimos a 0° y 180°. Al calcular este término se ha truncado la suma sobre los estados excitados en las treinta primeras configuraciones monoexcitadas. Este término está infravaluado y no nos permite obtener una energía total exacta. Sin embargo, se puede asegurar que, al introducir la energía de dispersión, los cuatro mínimos se acercarán a giros de 36°. Lo mismo puede decirse de la energía de polarización, que parece jugar un papel más secundario.

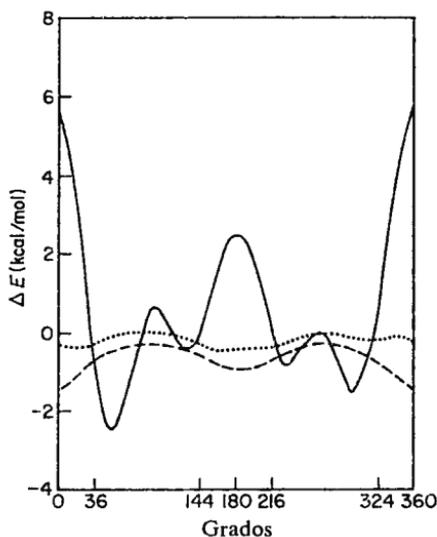


Figura 8.—Energía de interacción entre un par *A-T* inmóvil y un par *A-T* girando a la distancia de 3,36 Å. (—) Energía electrostática. (----) Energía de dispersión. (.....) Energía de polarización.

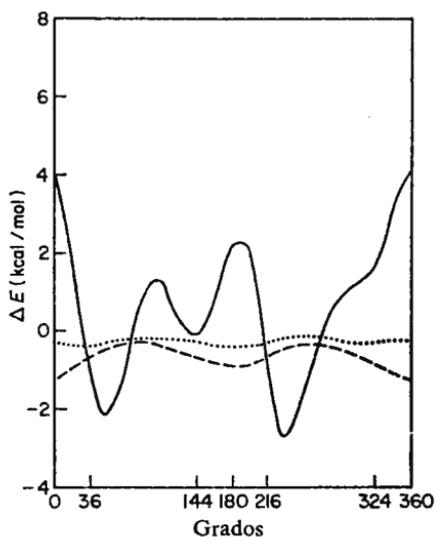


Figura 9.—Energía de interacción entre un par G-C inmóvil y un par A-T girando a la distancia de 3,36 Å.

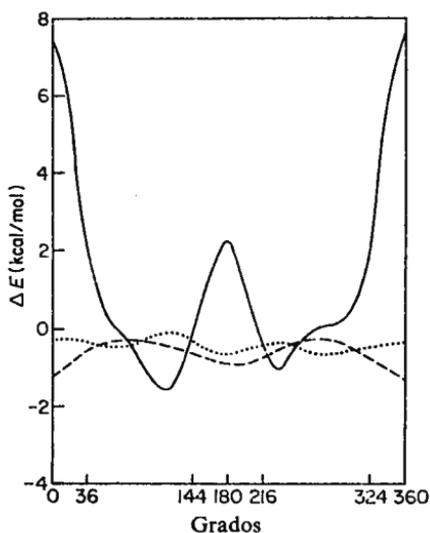


Figura 10.—Energía de interacción entre un par G-C inmóvil y un par G-C girando a la distancia de 3,36 Å.

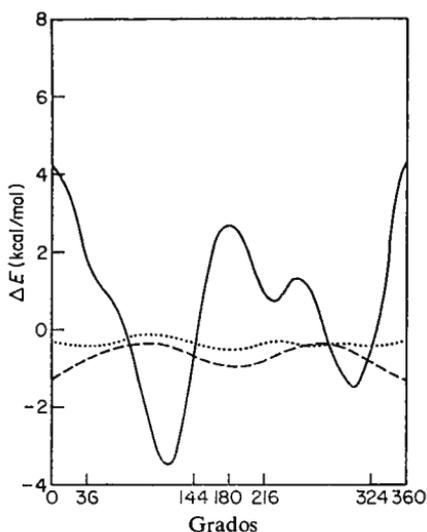


Figura 11.—Energía de interacción entre un par A-T inmóvil y un par G-C girando a la distancia de 3,36 Å.

Las figuras 12, 13, 14 y 15 presentan la energía de deslocalización entre dos pares de bases a la distancia de 3,36 Å, girando el par superior. Los mínimos de energía se encuentran para giros de 18°, partiendo de la posición paralela y antiparalela. Los resultados vienen dados en unidades  $\beta$ , y por desconocerse su exacta equivalencia en Kcal/mol no puede obtenerse el valor exacto de la energía total, pero de nuevo el mínimo de la energía total se desplazará hacia ángulos de menor cuantía.

En conclusión, al estudiar la conformación más estable de dos pares de bases consecutivos, la energía electrostática presenta mínimos energéticos hacia los 45°. Los mínimos de la energía de dispersión y de deslocalización están a los 0° y 18°. El mínimo de la energía total estará no lejos de los 36°. Para discutir la estructura secundaria del DNA sería necesario introducir las cadenas laterales y el disolvente. Es sabido que la doble hélice del DNA es estable en agua, pero no en otros disolventes. Sin embargo, la interacción entre dos pares de bases consecutivos en ausencia de la cadena lateral y del disolvente conduce ya a conformaciones no lejanas de la estructura B del DNA. El defecto de

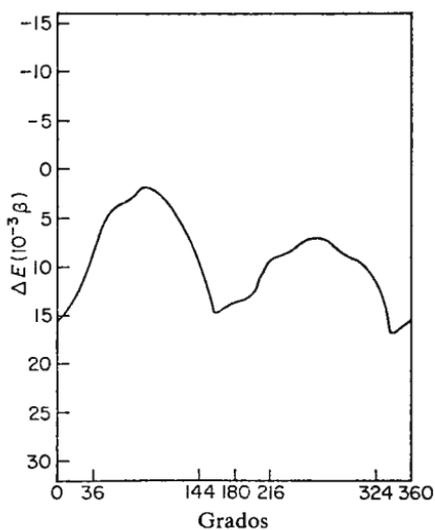


Figura 14.—Energía de deslocalización entre un par G-C inmóvil y un par G-C girando a la distancia de 3,36 Å.

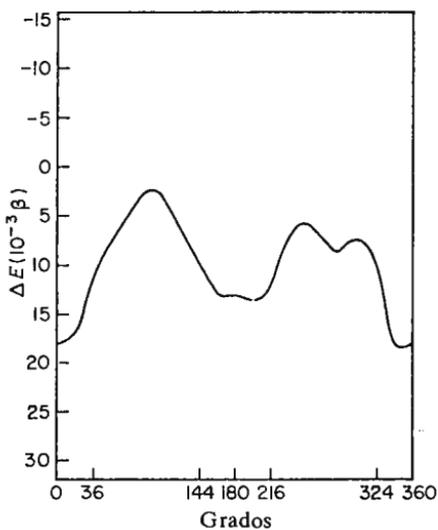


Figura 15.—Energía de deslocalización entre un par A-T inmóvil y un par G-C girando a la distancia de 3,36 Å.

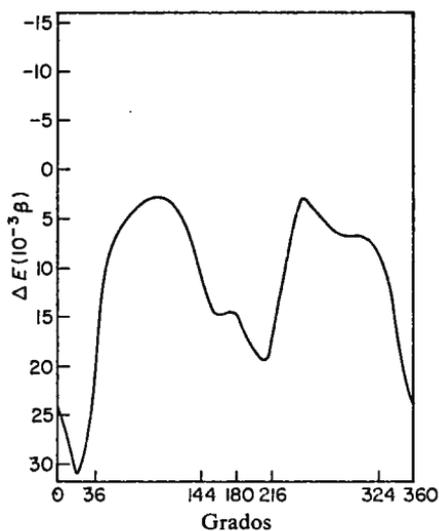


Figura 12.—Energía de deslocalización entre un par  $A-T$  inmóvil y un par  $A-T$  girando a la distancia de  $3,36 \text{ \AA}$ .

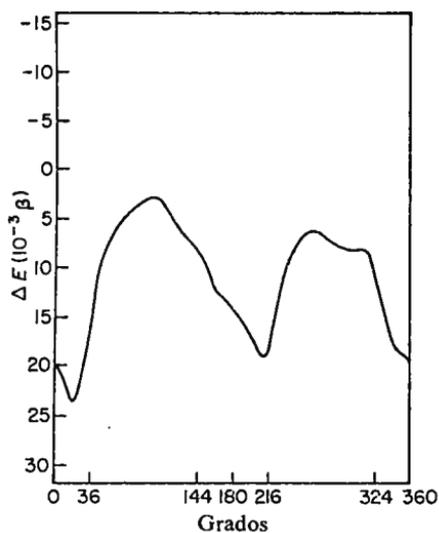


Figura 13.—Energía de deslocalización entre un par  $G-C$  inmóvil y un par  $A-T$  girando a la distancia de  $3,36 \text{ \AA}$ .

los cálculos teóricos estriba en las simplificaciones operadas, pero en ello mismo estriba su ventaja. Teóricamente puede aislarse un factor, cosa imposible en la práctica, y estudiar su influencia. En estrecha colaboración con los experimentadores, los cálculos teóricos pueden ser de gran ayuda para una correcta interpretación de los resultados experimentales.

## BIBLIOGRAFIA

1. G. N. RAMACHANDRAN, C. RAMAKRISHNAM y V. SASISEKHARAN: *J. Mol. Biol.* 7,95 (1963).
2. R. A. SCOTT y H. SCHERAGA: *J. Chem. Phys.* 42,2209 (1965).
3. R. HOFFMANN y A. IMAMURA: *Biopolymers* 7,207 (1969);  
L. B. KIER y J. M. GEORGE: *Theoret. Chim. Acta* 14,258 (1969);  
L. B. KIER y J. M. GEORGE, en *Molecular Orbital Studies in Chemical Pharmacology* p. 82 (Springer-Verlag, N. Y. 1970).
4. A. ROSSI y C. W. DAVID: *Theoret. Chim. Acta* 14,429 (1969).
5. B. PULLMAN, B. MAIGRET y D. PERAHIA: *Theoret. Chim. Acta* 18,44 (1970).
6. H. DE VOE y I. TINOCO: *J. Mol. Biol.* 4,500 (1962);  
N. F. GERSH y D. JORDAN: *J. Mol. Biol.* 13,138 (1965).
7. D. BRADLEY, S. LIFSON y B. HONIG, en *Electronic Aspects of Biochemistry* (B. Pullman, ed.), p. 77 (New York, Academic Press, 1964);  
A. NASH y D. BRADLEY: *Biopolymers* 3,261 (1965).
8. B. PULLMAN, P. CLAVERIE y J. CAILLET: *J. Mol. Biol.* 22,373 (1966);  
B. PULLMAN y J. CAILLET: *Theoret. Chim. Acta* 8,223 (1967).
9. M. POLLAK y R. REIN: *J. Theoret. Biol.* 11,490 (1966);  
M. POLLAK y R. REIN: *J. Chem. Phys.* 47,2045 (1967);  
M. POLLAK y R. REIN: *J. Theoret. Biol.* 19,241,333 (1968);  
R. REIN y M. POLLAK: *J. Chem. Phys.* 47,2039 (1967).
10. P. CLAVERIE: *J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.* 65,57 (1968);  
R. REIN, P. CLAVERIE y M. POLLAK: *Int. J. Quantum Chemistry* 2,129 (1968);  
P. CLAVERIE y R. REIN: *Int. J. Quantum Chemistry* 3,537 (1969).
11. J. DEL BENE y H. H. JAFFÉ: *J. Chem. Phys.* 48,1807,4050 (1968).
12. J. BERTRÁN, O. CHALVET y R. DAUDEL: *Anales de Física* 66,247 (1970).
13. Z. KATZ y S. PENMAN: *J. Mol. Biol.* 15,220 (1966);  
J. PITHA, N. JONES y P. PITHOVA: *Canad. J. Chem.* 44,1045 (1966);  
R. R. SHOUP, H. T. MILES y E. D. BECKER: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23,194 (1966).



# CAPÍTULO III

## INTERACCIONES MOLECULARES EN EL DNA

C. VALDEMORO

Departamento de Física. Universidad Autónoma de Madrid.

INTRODUCCIÓN .....	68
I. TEORÍA MICROSCÓPICA DE LA INTERACCIÓN MOLECULAR.....	69
1. Preliminares .....	69
2. Teoría mecano-cuántica de estas interacciones.....	71
1) Expansión del potencial con respecto a dos centros.....	72
2) Aproximación adiabática.....	74
3) Casos sin solape de nubes electrónicas.....	74
4) El solape entre las nubes electrónicas de las moléculas I y II no es despreciable.....	76
5) Aditividad de las polarizabilidades.....	77
3. Cálculos mecano-cuánticos en polímeros.....	78
1) Esquema de cálculo de polímeros saturados.....	79
2) Cadenas conjugadas.....	80
II. TEORÍA MACROSCÓPICA.....	81
1. Preliminares.....	81
2. Funciones de densidad y correlación.....	83
3. Funciones «cluster» de Ursell y Mayer.....	85
III. FENÓMENOS COOPERATIVOS.....	87
1. Concepto de orden y desorden.....	87
2. Modelo de Ising.....	90
3. Métodos aproximados de obtención de la función de partición.....	92
IV. INTERACCIONES EN EL DNA.....	95
1. Datos sobre la estructura.....	95
2. Interacciones entre vecinos próximos capaces de propagar el orden.....	98
3. Posibles cálculos y experimentos.....	102

## INTRODUCCION

El concepto de fuerzas intermoleculares y superficies de potencial fue magistralmente expuesto ya en 1930 por London (1) y en 1931 por Margenau (2), Slater y Kirkwood (3). Después de un lapso de tiempo largo en que, debido a la dificultad de obtener datos experimentales, se hizo muy poco en este campo, empieza en los años 50 a resurgir el interés, gracias sobre todo a los avances efectuados en las técnicas experimentales de difracción de rayos X y experimentos con haces moleculares.

Si en el campo de la química, la física de líquidos y cristales moleculares, las fuerzas intermoleculares juegan un papel importantísimo, en el estudio del comportamiento de los sistemas biológicos donde asociaciones de macromoléculas o moléculas «sencillas» se encuentran inmersas en un medio acuoso es donde este estudio se hace más difícil y complejo, aunque sin duda también el más fascinante.

La complejidad del estudio de estos sistemas proviene del hecho de que un análisis completo no se puede limitar al examen de un solo ángulo de la situación, sino que debe considerar a la vez muchos aspectos del problema, ya que todos ellos se hallan interrelacionados.

Así, la teoría de la interacción microscópica de las moléculas debe obtener resultados capaces de ser integrados como datos para la obtención de resultados macroscópicos cuantitativos o, al menos, cualitativos que puedan ser comparados con los obtenidos experimentalmente. O bien, una teoría macroscópica paramétrica debe corresponder a un modelo microscópico y los parámetros deben tener un contenido físico relacionado con la estructura microscópica.

A primera vista esto no parece presentar diferencias con la situación que se encuentra en el estudio de líquidos sencillos, por ejemplo, el argón. Es decir, se podría creer que la misma sistemática teórica, unida a métodos más laboriosos, podría dar resultados satisfactorios; sin embargo, no es así; los sistemas biológicos son no sólo complejos, debido a la complejidad microscópica o molecular de sus componentes —lo que ya de por sí impide despreciar fuerzas y aplicar modelos de

éxito en otros sistemas—, sino que esta complejidad da origen a fenómenos macroscópicos de asociaciones moleculares que impiden aplicar la regla de aditividad, dando lugar a transiciones de fase. Esto implica, evidëntemente, complicaciones de tipo termodinámico, ya que las hipótesis de «procesos reversibles» y «sistemas en equilibrio» pierden gran parte de su aplicabilidad y validez.

En este trabajo se pretende analizar algunos de los distintos aspectos de la interacción molecular en los ácidos nucleicos, intentando en la discusión elucidar hipótesis que puedan ser planteadas como base de estudios posteriores.

Con la intención de dar claridad a la exposición se inicia este estudio, por una parte, muy elemental, pero básica, de la teoría de fuerzas intermoleculares, a fin de que el contenido físico de las teorías elaboradas aparezca claramente.

El segundo capítulo es una exposición de las relaciones a que llega la mecánica estadística general, que son de interés en los sistemas con interacciones de tipo Van der Waals-London.

En el tercer capítulo se describen los conceptos de orden y de transiciones de fase, así como los métodos más utilizados en el análisis de fenómenos cooperativos.

Finalmente, en el capítulo 4, apoyándose en los anteriores, se analizan los tipos de interacciones que existen en los cristales de ácidos nucleicos.

En el último capítulo se discuten algunos modelos y experimentos posibles.

## I. TEORIA MICROSCOPICA DE LA INTERACCION MOLECULAR

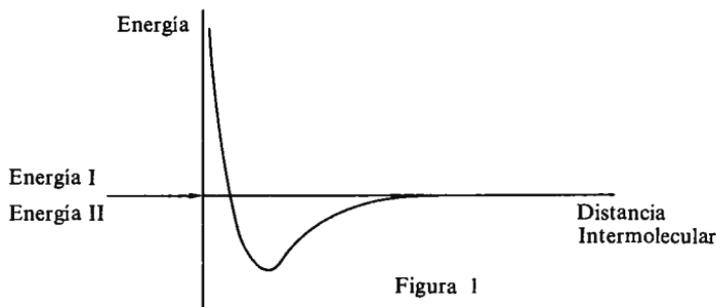
### I.1. Preliminares

Se puede ver lo que sucede cualitativamente considerando un modelo esquemático:

- Sistema: dos átomos —o dos moléculas— que llamaremos, respectivamente, *I* y *II*.
- Características del sistema: *I* es una molécula con un coeficiente de polarizabilidad  $\alpha$ . *II* es una molécula con un momento dipolar permanente  $\mu$ .

— Variable: distancia a la que se encuentran los subsistemas *I* y *II*.

La curva que, como se sabe, describe el comportamiento de este sistema, considerando el subsistema *I* en el origen de coordenadas, es la de la figura 1.



Como se puede observar:

- i) A distancia infinita, las fuerzas de interacción son nulas.
- ii) A distancias del orden de *algunos* Ångstroms, las fuerzas atractivas de interacción dominan.
- iii) A distancias del orden del Ångstrom dominan las repulsiones.

Evidentemente, es la parte de la curva donde las fuerzas de interacción son atractivas la que nos interesa, ya que corresponde a sistemas donde las interacciones son fuertes (sistemas condensados) conservando, sin embargo, cada molécula su identidad molecular.

Veamos, pues, la naturaleza de estas fuerzas atractivas responsables de la condensación y, por lo tanto, que contrarrestan el efecto de los momentos cinéticos de *I* y *II*.

El dipolo  $\mu$  del subsistema *II* ocasiona en el subsistema *I* la aparición de un campo

$$\varepsilon_I = \frac{\mu}{4\pi\epsilon r^3} A_I, \quad [1-1]$$

donde  $A_I$  es una constante de proporcionalidad, así como los símbolos  $B_I$ ,  $A_{II}$ ,  $C_{II}$  y  $D$  que se emplean a continuación.

Este campo provoca la aparición en *I* de un dipolo inducido

$$\mu_I = \frac{\mu\alpha}{4\pi\epsilon r^3} B_I. \quad [1-2]$$

Ahora bien, este dipolo  $\mu_I$  crea a su vez un campo en  $II$

$$\varepsilon_{II} = \frac{\mu_I}{4\pi\epsilon r^3} \quad A_{II} = \frac{\mu\alpha}{(4\pi e)^2 r^6}. \quad [1-3]$$

La fuerza de interacción es proporcional al dipolo permanente y al gradiente del campo en ese punto; luego se tendrá:

$$F = \frac{\mu\alpha}{(4\pi e)^2 r^7} \cdot \mu D = \frac{\mu^2\alpha}{(4\pi e)^2 r^7} D \quad [1-4]$$

y, por lo tanto, la energía de interacción será

$$E = - \frac{\mu^2\alpha}{(4\pi e)^2 r^6} D. \quad [1-5]$$

Cabe preguntarse qué pasa cuando la molécula  $II$  no tiene un momento dipolar permanente capaz de crear un campo en  $I$ . Este caso se puede razonar en forma análoga, ya que la molécula siempre tendrá un dipolo instantáneo *distinto de cero*, aunque considerando un tiempo  $t$  largo el promedio sea cero. La razón por la cual las moléculas apolares (e incluso átomos) están sujetas a fuerzas de interacción (es decir, el momento dipolar instantáneo es  $\neq 0$ ) viene dada por la mecánica cuántica. En efecto, debido al principio de incertidumbre, las cargas están en movimiento al azar, produciendo campos fluctuantes que, a su vez, inducen multipolos en las moléculas próximas. Al tomar el promedio en el tiempo de  $\mu^2$ , que es el término que aparece en las expresiones [1-4] y [1-5], éste es distinto de cero. (Para un sistema compuesto por dos átomos de H, London y Eisenschitz (4) encontraron en 1930 que la constante  $D$  valía 6,47.)

Estas ideas son suficientes desde un punto de vista conceptual; sin embargo, si se quiere entender en profundidad las interacciones moleculares, debe analizarse con algo más de rigor la situación desde un punto de vista mecano-cuántico.

## 1.2. Teoría mecano-cuántica de estas interacciones

La energía de interacción aparece como la diferencia de energía entre la molécula  $I$  y la molécula  $II$  a distancia infinita, es decir, cuando

no hay interacción, y la energía del sistema a la distancia  $R$  que se considera.

a) Energía del sistema a  $R = \infty$ :

En este caso, las energías de las moléculas  $I$  y  $II$  vienen dadas, respectivamente, por las dos ecuaciones de Schrödinger correspondientes

$$H_I \Psi_I = E_I \Psi_I \quad [2-1]$$

$$H_{II} \Psi_{II} = E_{II} \Psi_{II}, \quad [2-2]$$

donde  $H_I$  y  $H_{II}$  son los operadores hamiltonianos, y  $\Psi_I$  y  $\Psi_{II}$  son las funciones de onda de las moléculas  $I$  y  $II$ , respectivamente.

$$E_\infty = E_I + E_{II}. \quad [2-3]$$

b) Energía del sistema a  $R \neq \infty$ :

También aquí se halla la energía por resolución de la ecuación de Schrödinger

$$H\Psi = E\Psi,$$

donde

$$H = H_I + H_{II} + V,$$

siendo  $V$  el potencial de interacción entre las partículas de la molécula  $I$  y de la molécula  $II$ .

### I.2.1. EXPANSIÓN DEL POTENCIAL CON RESPECTO A DOS CENTROS

El potencial  $V$  viene dado en unidades atómicas por

$$V = \pm \sum_{i>j=1}^N \frac{1}{r_{ij}}. \quad [2-1-1]$$

El signo  $(-)$  corresponde a atracciones electrón-núcleo, y el signo  $(+)$  a repulsiones electrón-electrón y núcleo-núcleo.

$r_{ij}$  = Distancia entre las partículas  $i$  y  $j$  (se supone que son electrones en la figura).

$N$  = Número de partículas.

$\Sigma'$  Representa que la operación no se efectúa cuando ambas partículas corresponden a la misma molécula, ya que estos términos están incluidos en  $H_I$  y  $H_{II}$ .

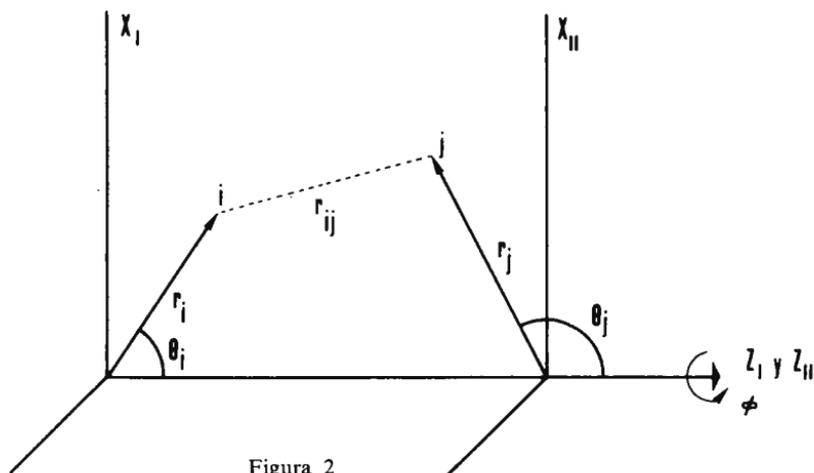


Figura 2

Ahora bien,  $\frac{1}{r_{ij}}$  se puede expandir de la siguiente forma (5):

$$\frac{1}{r_{ij}} = \sum_{n_I, n_{II}=0}^{\infty} \sum_{m=-n}^{+n} B_{n_I, n_{II}}^{|m|} (r_i, r_j, r_{I II}) P_{n_I}^m(\cos \theta_i) P_{n_{II}}^m(\cos \theta_j); \quad [2-1-2]$$

las funciones  $P_n^m(\cos \theta)$  son los polinomios asociados de Legendre de primera clase.

Las dos formas más importantes que toma la función  $B$  son:

a)  $r_{I II} > (r_i + r_j)$

$$B_{n_I, n_{II}}^m (r_i, r_j, r_{I II}) = \frac{(-1)^{n_I + n_{II}} (n_I + n_{II})!}{(n_I + |m|)! (n_{II} + |m|)!} \cdot \frac{r_i^{n_I} r_j^{n_{II}}}{r_{I II}^{n_I + n_{II} + 1}} \quad [2-1-3]$$

b)  $r_{I II} + r_i < r_j$

(si  $r_{I II} + r_j < r_i$ , se cambia  $I$  por  $II$ ,  $i$  por  $j$ , así como  $(-1)^{n_I + n_{II}}$  por  $+1$  en la fórmula [2-1-4].)

$$B_{n_I, n_{II}}^m (r_i, r_j, r_{I II}) = \frac{(-1)^{n_I + n_{II}} (n_{II} - |m|)!}{(n_{II} - n_I)! (n_I + |m|)!} \cdot \frac{r_i^{n_I} r_j^{-n_{II} - 1}}{r_{I II}^{n_I + n_{II}}} \quad [2-1-4]$$

Tanto en a) como en b) se ven aparecer potencias negativas de la distancia intermolecular  $r_{I II}$ , correspondiendo a la interacción de los distintos multipolos.

### I.2.2. APROXIMACIÓN ADIABÁTICA

Como se ha visto, en el hamiltoniano de un sistema de dos moléculas en interacción figuran en principio los potenciales debidos a todas las partículas. No obstante, la aproximación adiabática (o de Born Oppenheimer) consiste en separar el movimiento de los núcleos del de los electrones. Dado que la velocidad de los electrones es altísima comparada con la de los núcleos, esta aproximación es satisfactoria.

Matemáticamente consiste en considerar que la función de onda total  $\Omega$  es un producto de la función de onda nuclear y de la función de onda electrónica. Esto permite la descomposición de la ecuación de Schrödinger

$$H_{total} \Omega = E \Omega \quad [2-2-1]$$

en dos ecuaciones

$$H_e \phi_e = E_e \phi_e \quad [2-2-2]$$

y

$$H_N \chi_N = E_N \chi_N, \quad [2-2-3]$$

donde  $E_N$  viene expresada en función de  $E_e$ . Esto equivale a suponer que, durante la interacción, el sistema de las dos moléculas está caracterizado por un conjunto de números cuánticos que no cambian mientras dura la interacción. Es decir, el movimiento de los núcleos mientras las moléculas están suficientemente próximas para interactuar no afecta al estado electrónico. Esta independencia entre los dos tipos de movimiento no existe, evidentemente, si el movimiento nuclear es muy rápido. Tampoco se puede emplear esta aproximación cuando las curvas de potencial correspondientes a dos estados electrónicos degenerados se cruzan. Este cruce prohibido no aparece si se tiene en cuenta el acoplamiento del movimiento nuclear y electrónico.

Existen otras limitaciones, pero éstas no aparecen en el estudio de las cadenas de nucleótidos, por lo que no merece la pena mencionarlas aquí.

En lo que sigue se considera implícitamente que es válida esta aproximación.

### I.2.3. CASOS SIN SOLAPE DE NUBES ELECTRÓNICAS

Como se vio, la energía de interacción aparece como la diferencia de energía entre la molécula *I* y la molécula *II* a distancia infinita,

es decir, cuando no hay interacción, y la energía del sistema a la distancia  $R$  que se considera.

a) Energía del sistema a  $R = \infty$ :

En este caso, las energías de las moléculas  $I$  y  $II$  vienen dadas, respectivamente, por las dos ecuaciones de Schrödinger correspondientes, como se vio anteriormente:

$$y \quad \begin{aligned} H_I \Psi_I &= E_I \Psi_I \\ H_{II} \Psi_{II} &= E_{II} \Psi_{II}, \end{aligned} \quad [2-3-1]$$

donde  $H_I$  y  $H_{II}$  son los operadores hamiltonianos, y  $\Psi_I$  y  $\Psi_{II}$  son las funciones de onda de las moléculas  $I$  y  $II$ , respectivamente.

La función de onda total es simplemente

$$\Phi = \Psi_I \cdot \Psi_{II}, \quad [2-3-2]$$

ya que el efecto de canje es nulo a  $R = \infty$ . Tendremos:

$$E = E_I + E_{II}.$$

b) Energía del sistema a  $R \neq 0$ :

Ya que las nubes electrónicas no solapan, se puede tomar como función de onda cero

$$\Phi_0 = \Psi_I \cdot \Psi_{II}.$$

El hamiltoniano del sistema será:

$$H = H_I + H_{II} + V, \quad [2-3-3]$$

pudiendo considerarse  $V$  como una perturbación. Según se desee mayor o menor exactitud, se puede aplicar el método de perturbación de primer orden o de segundo orden: Esto se hace truncando la expansión de  $1/r_{ij}$  después de los términos dipolares, cuadrupolares, etc.

Hay que hacer notar que las funciones de onda deben incluir la correlación entre las partículas, ya que el error que se introduce ignorándola es de orden comparable con la energía de interacción. Sinanoglu (6) ha desarrollado una teoría completa de las fuerzas de interacción en forma aditiva en que incluye la energía de correlación.

#### I.2.4. EL SOLAPE ENTRE LAS NUBES ELECTRÓNICAS DE LAS MOLÉCULAS I Y II NO ES DESPRECIABLE

Este caso, que es sin duda el más complejo, refleja, sin embargo, la situación real, sea entre los monómeros contiguos de un polímero, sea simplemente entre las moléculas íntimamente asociadas en una célula viva. Intentar rigurosidad en el estudio de sistemas biológicos es una utopía; con todo, el conocimiento de los distintos factores físicos es tan necesario cuando se intenta despreciarlos o se desea sustituir por parámetros como cuando se efectúa un cálculo riguroso. Por este motivo se da a continuación una exposición somera de los distintos pasos de un cálculo de este tipo.

El hamiltoniano es de la misma forma que en [2-3-3], pero la función de onda debe estar antisimetrizada totalmente, dando lugar a un número muy elevado de integrales complicadas que describen lo que se llama el efecto de canje (o intercambio). Así, una posible forma de  $\Phi$  será:

$$\Phi = A \Psi_I' \Psi_{II}', \quad [2-4-1]$$

donde  $\Psi_I'$  y  $\Psi_{II}'$  representan funciones a evaluar mediante un método variacional, siendo  $A$  un operador encargado de antisimetrizar el producto, o bien, alternativamente, si se prefiere emplear el método de perturbaciones, se puede partir de una función de orden cero

$$\Phi_0 = A \Psi_I \Psi_{II}, \quad [2-4-2]$$

procediendo análogamente a cuando las nubes no solapan. La diferencia fundamental es que, debido al efecto del antisimetrizador  $A$ , tenemos ahora, a poco complejas que sean las moléculas  $I$  y  $II$ , un número astronómico de integrales.

Existe una serie de procedimientos basados en la ortogonalización previa de  $\Psi_I$  y  $\Psi_{II}$  que pueden ser aplicados a este tipo de cálculos y que simplifican mucho las operaciones (7-8) durante los pasos iterativos y diagonalizaciones; sin embargo, como se parte generalmente de orbitales atómicos que solapan, el número inicial de integrales es siempre el mismo: Por otro lado, el trabajar con funciones ortogonales simplifica la interpretación química del formalismo y permite la substitución de grupos de integrales por parámetros que guardan relación con conceptos familiares en química, como polarizabilidades de enlaces. También se puede trabajar con los orbitales equivalentes de Lennard Jones (9).

Debido a que, en este tipo de distancias internucleares, la energía de interacción es grande, mientras que el error introducido con un modelo de partículas independientes, es decir, «no correladas», es comparativamente mucho más pequeño, se pueden despreciar los efectos de correlación en la función de onda. Esto no es cierto a distancias grandes, donde esta aproximación puede conducir a errores relativos altos.

Cuando se utiliza el método variacional, los efectos debidos a las llamadas fuerzas electrostáticas químicas, dispersión e inducción, se mezclan, por lo que ésta resulta una clasificación artificial a menos que se utilice el método de perturbaciones con la función de potencial en su forma de expansión en serie de potencias negativas de la distancia intermolecular.

Los métodos considerados anteriormente calculan la energía de interacción molecular; otra alternativa consiste en calcular las fuerzas de interacción que a distancias infinitas son cero, mientras que con la energía siempre tenemos que obtenerla por diferencia entre dos cantidades grandes. Este método se basa en la aplicación del teorema de Hellman y Feynman y, a pesar de que no da resultados tan exactos como los que se basan en cálculos energéticos, parece prometedor cuando se piensa en sistemas muy complejos.

En muchos casos las polarizabilidades presentan propiedades aditivas, esta circunstancia permite una gran simplificación.

### I.2.5. ADITIVIDAD DE LAS POLARIZABILIDADES

Hylleraas (10) y Hassé (11) obtuvieron la expresión de la polarizabilidad para moléculas en un campo eléctrico en forma variacional. Estos autores suponen que la molécula, al estar perturbada por el campo eléctrico, está descrita por la función de onda

$$\Psi = (1 + AH_1)\Psi_0,$$

donde  $\Psi_0$  es la función de onda molecular en ausencia del campo;  $A$  es un parámetro que determinan variacionalmente;

$$H_1 = -e\varepsilon_x \left| - \sum_{i=1}^n x_i + \sum_{\alpha=1}^v z_{\alpha} x_{\alpha} \right| = \text{Hamiltoniano de la perturbacion.}$$

Los símbolos en esta última expresión indican:  $e$  = carga de un electrón;

$\varepsilon_x$  = campo eléctrico, que se supone dirigido en la dirección de las  $x$ ;  
 $z_\alpha$  = carga del núcleo  $\alpha$ ;  $x_i, x_\alpha$  = coordenada sobre el eje  $x$  del electrón  $i$   
 y del núcleo  $\alpha$ , respectivamente.

Simplifican mucho el cálculo del corrimiento del nivel de energía debido a la perturbación, teniendo en cuenta que:

1) La polarizabilidad está directamente relacionada con  $\varepsilon_x^2$ .

2)  $x = \bar{\alpha} \cdot E$  ( $\bar{\alpha}$  aquí es la polarizabilidad).

3)  $\mu = \int \Psi_0 | -e \left\{ \sum_i x_i - \sum_\alpha z_\alpha x_\alpha \right\} | \Psi_0 dt = -e \left| \sum_{i=1}^v \bar{x}_i - \sum_{\alpha=1}^v z_\alpha x_\alpha \right|$

(se considera para esto que la molécula no se mueve y que  $\bar{x}_i$  es la componente  $x$  media del electrón  $i$ , que es indiscernible de los demás electrones).

4)  $E - E_0 = -(\mu \cdot \varepsilon) - \frac{1}{2} (\varepsilon \cdot \bar{\alpha} \cdot \varepsilon)$  (esta expresión sólo vale para campos eléctricos débiles).

Llegan así a la componente de la polarizabilidad según el eje  $x$

$$\bar{\alpha}_{xx} = \frac{4n}{a_0} \left| \overline{(x_1 - \bar{x})^2} + (n-1) \overline{(x_1 - \bar{x})(x_2 - \bar{x})} \right|^2$$

En esta expresión  $a_0$  es el radio de la primera órbita del átomo de Bohr,  $n$  es el número de electrones,  $(x_1 - \bar{x})$  es la fluctuación de la coordenada de un electrón, y  $(x_1 - \bar{x})(x_2 - \bar{x})$  es la medida de las fluctuaciones simultáneas de dos electrones.

Cuando se trata de moléculas grandes, se pueden obtener las polarizabilidades parciales de cada enlace y adicionarlas. Para que esto sea válido debe existir una cierta independencia entre los enlaces. Es decir, las funciones que los describen no deben tener solape. Se ve claramente que, si la molécula es de tipo aromático, esto no sería una aproximación aceptable más que para los enlaces  $\sigma$ . Esta idea es la que aplica Salem y que se describe más adelante en la sección I.3.1.

### I.3. Cálculos mecano-cuánticos de polímeros

En el estudio de moléculas más complejas deben ser tenidas en cuenta otras consideraciones.

- 1) La pérdida de la aditividad de las fuerzas que hacen necesario llevar el método perturbativo más lejos si se desea no perder exactitud.
- 2) La asimetría y forma de las moléculas.

Sin embargo, el tener en cuenta estos factores utilizando métodos puramente mecano-cuánticos es muy problemático en el caso de moléculas poliatómicas, y no digamos si, como en este caso, deseamos fijarnos en las interacciones en macromoléculas.

Por otro lado, el número alto de partículas, así como regularidades en las formas de los polímeros hacen posible un ataque del problema en forma mucho más sencilla que en el caso de moléculas de tipo medio.

### I.3.1. ESQUEMA DE CÁLCULO DE POLÍMEROS SATURADOS

Aunque se han hecho muchos cálculos de este tipo de sistemas, prácticamente todos se basan en la expansión del potencial en serie asintótica y aplicación de la teoría de perturbación; a continuación se da un ejemplo (12):

*Hipótesis:* Cada monómero interacciona mediante un potencial proporcional a  $r^{-6}$ .

*Descripción del modelo:* Dos cadenas de  $N$  monómeros cada una, con una separación  $D$  entre ellas y con la distancia  $l$  entre dos monómeros. La separación de dos monómeros dentro de cada cadena será, pues,  $L = l(N)$ , siendo  $N = n - n''$  donde  $n$  y  $n''$  son las posiciones de ambos monómeros. La distancia  $d$  entre dos monómeros  $n$  y  $n'$  pertenecientes a cadenas distintas será  $d = (D^2 + (n - n')^2 l^2)^{1/2}$ . Se supone que todos los monómeros son iguales.

De esto se deduce que la energía de interacción entre las dos cadenas será proporcional a

$$E_{\text{int}} = - \sum_{n < n'}^N |D^2 + (n - n')^2 l^2|^{-3}. \quad [3-1-1]$$

De esta expresión, por consideraciones de periodicidad, se obtiene, para una distancia grande entre las cadenas, que la energía de interacción es proporcional a

$$E_{\text{int}} = \frac{N^2}{D^6}. \quad [3-1-2]$$

Para distancias más pequeñas, pero muy grandes comparadas con la distancia entre monómeros contiguos, se encuentra

$$E_{\text{int}} = -\frac{3\pi}{8} \frac{N}{D^5}, \quad [3-1-3]$$

es decir, en este último caso, la energía de interacción es proporcional a  $D^{-5}$  en vez de  $D^{-6}$ .

El problema verdadero está aquí en encontrar la constante de proporcionalidad que viene determinada por la naturaleza del monómero.

En el caso de una parafina, Salem encuentra, despreciando la no aditividad y los efectos anisotrópicos, y considerando las polarizabilidades de los enlaces  $-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-$

$$E_{\text{int}} = -1240 \frac{N}{D^5} \text{ Kcal/mol},$$

siendo  $D$  expresado en Å (12).

### I.3.2. CADENAS CONJUGADAS

El modelo anterior implicaba la posibilidad de expresar las interacciones como resultado de la existencia de dipolos inducidos, localizados en los enlaces químicos. Por el contrario, la deslocalización existente en cadenas aromáticas no permite un tratamiento análogo más que en el caso de los esqueletos  $\sigma$ . Coulson y Davies (13) hicieron un cálculo en que las integrales de interacción de los electrones eran explícitamente evaluadas. Ahora bien, empleando la expresión del potencial en potencias negativas de la distancia intermolecular y aplicando el método de perturbaciones, el término importante será:

$$\Delta E = -\sum_{l,k} \frac{|\langle \Psi_0^{(1)} \Psi_0^{(2)} | V | \Psi_l^{(1)} \Psi_k^{(2)} \rangle|^2}{E_l^{(1)} + E_k^{(2)} - E_0^{(1)} - E_0^{(2)}} \quad [3-2-1]$$

donde  $\Psi_0^{(1)}$  y  $\Psi_0^{(2)}$  son las funciones de onda del estado fundamental de las moléculas 1 y 2, respectivamente, siendo  $E_0^{(1)}$  y  $E_0^{(2)}$  sus energías;  $\Psi_l^{(1)}$  y  $\Psi_k^{(2)}$  son las funciones de onda que describen cada una de las dos moléculas en sus estados excitados simbolizados por los índices  $l$  y  $k$ . A estos dos estados corresponden las energías  $E_l^{(1)}$  y  $E_k^{(2)}$ .

Empleando funciones antisimétricas y normalizadas se llega a

$$E = -4 \sum_{i=1}^{n^{(1)}/2} \sum_{j=n^{(1)}/2+1}^{\infty} \sum_{i'=1}^{n^{(2)}/2} \sum_{j'=n^{(2)}/2+1}^{\infty} \left( \frac{v_{ii',jj'}^2}{\varepsilon_j^{(1)} - \varepsilon_i^{(1)} + \varepsilon_{j'}^{(2)} - \varepsilon_{i'}^{(2)}} \right). \quad [3-2-2]$$

La razón por la que los límites de las sumas son diferentes se debe a que los orbitales virtuales son un número en principio infinito. Las  $\varepsilon_i^{(1)}$  representan la energía del nivel electrónico  $i$  en la molécula 1 y análogamente para las otras  $\varepsilon$ . Haugh y Hirschfelder (14), a quienes se debe este método, emplearon funciones electrónicas del tipo «electrón en caja», que vienen sencillamente dadas por:

$$\varphi_m = \left( \frac{2}{l} \right)^{1/2} \text{sen} \frac{4\pi x}{l},$$

y cuyas energías son:

$$\varepsilon_m = \frac{n^2 h^2}{8ml^2}$$

En su artículo, Haugh y Hirschfelder dan los resultados para distintas distancias y ángulos entre las cadenas conjugadas. La energía total de interacción será, evidentemente, la suma de las contribuciones debidas a las interacciones  $\sigma\sigma$ ,  $\sigma\pi$  y  $\pi\pi$ .

## II. TEORIA MACROSCOPICA

### II.1. Preliminares

En la sección anterior se ha visto en qué consiste y cómo se pueden tratar interacciones entre un número pequeño de átomos o moléculas, pero todos los sistemas con los que se experimentan están formados por muchos cuerpos en interacción simultánea, y lo que se mide son respuestas medias de estas interacciones; de ahí la necesidad de aplicar los recursos de la mecánica estadística.

Antes de considerar los modelos y métodos empleados para el estudio específico de interacciones en sistemas condensados, se ha creído necesario incluir en forma muy esquemática las relaciones básicas de mecánica estadística. El lector ya familiarizado con la mecánica estadística general puede saltar al párrafo II.3.

*Funciones de partición y funciones de estado termodinámicas:*

Se define como función de partición  $Z$  para un sistema energéticamente aislado y cerrado, es decir, con un número fijo de partículas y energía total aproximadamente constante:

$$Z = \sum_{\substack{j=\text{estados} \\ \text{diferentes}}} e^{-\beta E_j} \equiv \sum_{\substack{j=\text{niveles} \\ \text{de energía}}} g_j e^{-\beta E_j} \quad [1-1]$$

donde  $\beta = \frac{1}{KT}$ , siendo  $K$  la constante de Boltzmann.

$E_j$  = energía del estado (o nivel en la segunda parte de I-1).

$g_j$  = número de estados degenerados con energía  $E_j$ .

Esta función  $Z$  en el límite clásico se escribe:

$$Z = \frac{h^{3N}}{N!} \iint e^{-\beta H(q^N, p^N)} dq^N dp^N, \quad [1-2]$$

siendo  $p^N$  y  $q^N$  los momentos y coordenadas generalizados en el espacio de fases.  $h$  es la constante de Plank y  $h^{3H}$  es el volumen de la celdilla unidad en este espacio.

Cuando los sistemas son abiertos, pudiendo intercambiar energía y materia con el exterior, y además existen  $m$  clases de componentes, la función de partición toma la forma:

$$Z = \sum_{n_1=0}^{\infty} \sum_{n_2=0}^{\infty} \cdots \sum_{n_m=0}^{\infty} \sum_{j=1}^m e^{\beta \left( -E_j + \sum_{i=1}^m \mu_i n_j \right)} \quad [1-3]$$

siendo  $n_1, n_2, \dots, n_m$  el número variable de moléculas de cada clase;

$E_j$  = energía del estado  $j$  (de todo el sistema);

$\mu_i$  = potencial químico del componente  $i = \left( \frac{\partial E_i}{\partial n_i} \right)_{s,T}$

$m$  = número de componentes distintos.

Las funciones de estado termodinámicas se expresan en función de la  $Z$ , obteniéndose:

1) La energía interna  $U$  de un sistema de  $N$  partículas es:

$$U = \left( \frac{\partial \ln Z_N}{\partial \beta} \right) \theta, \quad [1-4]$$

donde  $\theta$  = volumen.

2) La entropía  $S$ :

$$S = (K \ln Z_N) + \frac{U}{T}. \quad [1-5]$$

3) La energía libre  $A$  a volumen constante:

$$A = - \frac{\ln Z_N}{\beta}. \quad [1-6]$$

4) La energía libre  $G$  a presión constante:

$$G = - \frac{\ln Z_N}{\beta} - \left( \frac{\partial \ln Z_N}{\partial \theta} \right)_T \theta. \quad [1-7]$$

Se ve claramente que cualquier otra variable se puede obtener fácilmente conociendo  $Z_N$  ( $\theta$  es aquí el volumen).

## II.2. Funciones de densidad y correlación

Debido a la importancia de la función de partición, es evidente que el interés teórico se centrará alrededor del problema de cómo obtener estas funciones para el sistema en estudio.

En los gases perfectos, sin interacciones,  $Z_N$  es inmediata; la dificultad surge cuando las interacciones no son despreciables. Pueden distinguirse varias causas de estas dificultades:

1) Aunque prácticamente se supone siempre que las funciones de potencial gozan de propiedad aditiva dos a dos, esto no es rigurosamente cierto, ya que, si tres partículas se hallan muy próximas, la tercera influencia el potencial con el que se atraen las otras dos. No obstante, en principio se admite que

$$V(q) = \sum_{i < j} v_{ij}. \quad [2-1]$$

2) La función de partición es esencialmente una suma de probabilidades de estados. Ahora bien, para obtener la probabilidad de un estado de un sistema de  $N$  partículas, suponiendo que se conozcan las probabilidades de existencia de cada partícula en un estado determinado, nos encontramos ante la siguiente situación estadística: La probabilidad de que simultáneamente ocurran dos sucesos independientes

viene dada por el producto de las probabilidades individuales de cada suceso. Por otro lado, si la probabilidad de que ocurra un suceso viene condicionada por la ocurrencia del otro, la probabilidad de simultaneidad no viene ya dada por el producto.

3) Dificultad de computación de sumas múltiples con índices que correspondan a configuraciones determinadas.

A continuación, admitiendo que [2-1] es válida, se analiza el segundo punto.

En la expresión (I.1.2) aparece el hamiltoniano del sistema. En el caso de gases perfectos, este hamiltoniano se descompone simplemente en energía cinética y potencial. Integrando sobre los momentos se obtiene:

$$Z = \frac{(2\pi mKT)^{3n}}{n! h^{3n}} \int e^{-V(q^N)} dq^N. \quad [2-2]$$

Si no se trata de gases perfectos siempre se puede separar  $H$  en forma perturbativa, como se vio en la primera parte, apareciendo  $Z$  como el producto

$$Z = \sum_{j=0}^{\infty} g_j e^{-\beta \sum_{i=1}^m E_{ij}} \int e^{-\beta V(q)} dq, \quad [2-3]$$

donde  $E_{ij}$  = energía de la molécula  $i$  en el nivel  $j$  del sistema. La primera parte de esta expresión es, en principio, fácil de obtener; luego el problema se centra de nuevo en la obtención de

$$\int e^{-V(q)} dq. \quad [2-4]$$

Para resolver este problema se recurre a las funciones de densidad. En lo que sigue se considerará un medio homogéneo, por lo que se toma un origen arbitrario de coordenadas, cambiando así de las coordenadas  $q$  a distancias radiales  $r$ .

Se define como función de densidad reducida a la probabilidad de encontrar en un punto del espacio una partícula:

$$\rho_1^{(\vec{r}_1)} = \frac{n \int e^{-V(q)} dq / d\vec{r}_1}{Z} = \frac{n}{\Omega}, \quad [2-5]$$

donde  $\Omega$  = volumen total. Si las partículas son independientes

$$\rho_2(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = \frac{n(n-1)}{\Omega^2} \cdot \frac{(n-1)}{n} \cdot \rho_1(\vec{r}_1) \cdot \rho_1(\vec{r}_2),$$

y para  $n \rightarrow \infty$

$$\rho_2(\vec{r}_1, \vec{r}_2) \rightarrow \rho_1(\vec{r}_1)\rho_1(\vec{r}_2). \quad [2-6]$$

Se llama función de correlación aquella función  $g(\vec{r}_1, \vec{r}_2)$  que nos describe la desviación de la independencia existente entre las partículas:

$$g(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = \frac{\rho_2(\vec{r}_1, \vec{r}_2)}{\frac{n-1}{n} \rho_1(\vec{r}_1) \cdot \rho_1(\vec{r}_2)} \quad [2-7]$$

Si se conoce  $g$  siempre se puede obtener el valor medio de cualquier función  $f(\vec{r}_1, \vec{r}_2)$ . Así, pues, expresando  $g$  y  $V$  radialmente se tiene

$$\bar{V} = \frac{2\pi(n-1)n}{\Omega} \int V(r)g(r)r^2 dr. \quad [2-8]$$

Existen varias formas alternativas de definir la función de correlación. Aquí se ha seguido el enfoque dado a esta cuestión por W. Kutzelnigg y otros (15), ya que esta definición permite la aplicación tanto a sistemas cuánticos como a clásicos, teniendo además un factor de normalización correcto, lo cual no es siempre respetado en estas definiciones.

### II.3. Funciones «cluster» de Ursell y Mayer

En II.2 se mencionó que la dificultad de computación de  $e^{-\sum_{i<j} v_{ij}/KT}$  en sí misma constituía un cuello de botella en la obtención de  $Z$ . Ursell y Mayer (16) dan un método que ha sido muy utilizado y cuyas líneas generales se dan a continuación.

$$e^{-\beta \sum_{i<j} v_{ij}} = \prod_{i<j} e^{-\frac{v_{ij}}{KT}} = \prod_{i<j} \left( 1 - 1 + e^{-\frac{v_{ij}}{KT}} \right), \quad [3-1]$$

llamando  $f_{ij} = e^{-\frac{V_{ij}}{kT}} - 1$  se tiene:

$$e^{-\beta \sum_{i < j} V_{ij}} = \prod_{i < j} (1 + f_{ij}) = 1 + \sum_{i,j} f_{ij} + \sum_{i,j,k,l} f_{ij} f_{kl} + \dots \quad [3-2]$$

Para ayudar a visualizar esto se emplean frecuentemente los diagramas. Por ejemplo, en el caso de cuatro moléculas se pueden tener las siguientes interacciones, que se representan por líneas

$$\begin{aligned} & \text{a } \{ \cdot \quad \cdot \} \\ & \text{b } \{ \text{---} \cdot \quad \cdot \text{---} \} \quad \text{b}^I \{ | \quad \cdot \quad \cdot \quad | \} \quad \text{b}^{II} \{ \text{---} \cdot \quad \cdot \text{---} \} \quad \text{b}^{III} \{ \cdot \quad | \quad \cdot \quad | \} \quad \text{b}^{IV} \{ \cdot \quad \diagdown \quad \cdot \quad \diagup \} \quad \text{b}^V \{ \cdot \quad \diagup \quad \cdot \quad \diagdown \} \\ & \text{c } \{ \text{---} \cdot \quad \cdot \text{---} \} \quad \text{c}^I \{ \text{---} \cdot \quad \cdot \text{---} \} \quad \text{c}^{II} \{ \text{---} \cdot \quad \cdot \text{---} \} \quad \text{c}^{III} \{ \cdot \quad \text{---} \quad \cdot \quad \text{---} \} \quad \text{c}^{IV} \{ \cdot \quad \diagdown \quad \cdot \quad \diagup \} \quad \text{etc.} \\ & \text{d } \{ \triangle \cdot \quad \cdot \quad \triangle \} \quad \dots \end{aligned} \quad [3-3]$$

A cada uno de los diagramas se hace corresponder un producto; así:

- al diagrama «a» corresponde el término 1 en la expansión, es decir, es el caso de los gases perfectos;
- a los diagramas «b» corresponden los términos  $f_{12}, f_{13}, f_{14}, \text{etc.}$ , pero topológicamente todos estos diagramas son análogos;
- a los diagramas «c» corresponderían  $f_{12}, f_{23}, \text{etc.}$

La parte de la función de partición que depende sólo del potencial de interacción toma la forma, entonces, de

$$Z(N) = \iiint \dots \int \prod_{i < j} (1 + f_{ij}) dr_1 dr_2 \dots dr_N; \quad [3-4]$$

por ejemplo, para cuatro moléculas se tiene

$$\begin{aligned} Z(4) &= \iint \dots \int \prod_{i < j}^4 (1 + f_{ij}) dr_1 dr_2 dr_3 dr_4 = \\ &= \cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot + 6 | + 12 \text{---} + 3 \square + 4 \triangle + \\ &+ 12 \text{---} + 4 \diagdown + 6 \otimes + 12 \diagup + \otimes + 3 = \end{aligned} \quad [3-5]$$

Diagramas que topológicamente son iguales dan la misma integral, por lo que aparecen los factores multiplicativos frente a cada uno de

los diagramas. Esta es la expansión de Ursell y Mayer, que, como se ve, recuerda la expansión del potencial en interacciones multipolares.

Cuando aparecen diagramas sin conexión, la integral correspondiente es un producto de las integrales correspondientes a cada uno de los «clusters» conexos que lo componen.

*Teorema de Mayer.* Sea  $G(N)$  un diagrama con  $N$  vértices y  $G_1(N)$  cualquier diagrama en el que los  $N$  puntos forman parte de un solo «cluster». Sea  $W(G)$  un factor de peso asociado con  $G$ , en todo arbitrario excepto en que: 1) debe depender de la topología de  $G$ , y 2)  $W(G) = \text{producto de los } \omega(g_i)$  donde  $g_i$  representa los diagramas conectados que componen  $G$ .

Se tiene entonces:

$$1 + \sum_{N=1}^{\infty} \frac{x^N}{N!} \sum_{G(N)} W|G(N)| = \exp \left\{ \sum_{M=1}^{\infty} \frac{x^M}{M!} \sum_{G_1(M)} W|G_1(M)| \right\}, \quad [3-5]$$

donde  $\sum_{G(N)}$  es la suma de todos los diagramas sumados bajo  $G$ .

Aplicando esta manera de sumar interacciones se han logrado muy buenos resultados para gases imperfectos y líquidos sencillos sin dificultad. Este teorema simplifica mucho la aplicación, teniendo además gran sentido físico, ya que, debido a que todos los «clusters» no conexos son eliminados, cada suma parcial (para un número determinado de moléculas unidas) es, pues, proporcional al volumen.

Si las integrales convergen, y siempre que  $V = \sum_{i < j} v_{ij}$  constituya una buena aproximación, este desarrollo es válido.

### III. FENOMENOS COOPERATIVOS

#### III.1. Concepto de orden y desorden

Un sistema de partículas ligadas por fuertes interacciones, en ciertas condiciones de temperatura y presión presentará discontinuidades en una o varias propiedades macroscópicas. El estudio de este tipo de fenómenos ha demostrado que estas discontinuidades en las fun-

ciones termodinámicas corresponden a una transición de un estado  $A$  a un estado  $B$  del sistema, tal que:

$$\begin{array}{ccc}
 A & \rightleftharpoons & B & [1-1] \\
 \text{Estado con orden} & & \text{Estado donde el orden} & \\
 \text{a gran distancia} & & \text{es sólo de corto alcance} &
 \end{array}$$

Este tipo de transición parece acompañar todos los procesos cooperativos donde la simetría de los dos distintos estados es diferente. Para visualizar lo que se entiende por estas dos clases de orden se da a continuación un ejemplo:

Supóngase una red de puntos en una dimensión. A cada punto se le asocia una configuración (o estado) que puede tomar dos valores, « $a$ » o « $b$ ». Supóngase también que la energía de dos puntos contiguos, si ambos se encuentran en el mismo estado, es,  $E_{aa} = E_{bb}$ , donde  $E_{aa} \leq E_{ab}$ , siendo  $E_{ab}$  la energía de interacción de dos partículas en lugares contiguos, donde una se encuentra en el estado « $a$ » y la otra en el « $b$ ».

El estado fundamental o de mínima energía de esta asociación corresponderá a:

$$\dots a \ a \ a^{-j-} \ a^{-h-} \ a \ a \ \dots$$

o lo que es equivalente a [1-2]

$$\dots b \ b \ b^{-j-} \ b^{-h-} \ b \ b \ \dots$$

Si se conoce el estado en que se encuentra la partícula localizada en el punto  $j$  de la red, automáticamente se puede predecir en qué estado se encontrará la partícula que se encuentra en cualquier punto  $h$  de la red. Pero este estado fundamental sólo tiene existencia a  $0^\circ\text{T}$ ; a cualquier otra temperatura este estado es solamente uno de los  $2^N$  posibles.

Supongamos ahora el primer estado excitado

$$\dots a \ a \ a \ b \ a \ a \ a \ \dots (A_I); \quad [1-3]$$

este estado tendrá energía superior a

$$\dots a \ a \ a \ a \ b \ b \ b \ b \ \dots (A_{II}), \quad [1-4]$$

ya que si se llama

$$\Delta E = E_{ab} - E_{aa}, \quad [1-5]$$

la configuración  $A_I$  tendrá una energía (considerando solamente vecinos próximos)

$$E_{A_I} = E_{\text{fundamental}} + 2\Delta E, \quad [1-6]$$

mientras que la configuración  $A_{II}$  tendrá

$$E_{A_{II}} = E_{\text{fundamental}} + \Delta E, \quad [1-7]$$

es decir, en una red monodimensional no se puede conocer el estado de una partícula a distancia, a no ser que el sistema se encuentre en el cero absoluto.

Si, en vez de una red monodimensional, se considera el mismo ejemplo en dos dimensiones, se encuentra:

$$\text{estado fundamental} \rightarrow \begin{array}{cccccc} a & a & a & a & a & \\ a & a & a & a & a & \\ a & a & a & a & a & \\ a & a & a & a & a & \end{array} \quad [1-8]$$

Excitemos ahora una partícula; tendremos:

$$A_I \rightarrow \begin{array}{cccccc} a & a & a & a & a & \\ a & a & a & a & a & \\ & & \vdots & & & \\ a & a & \dots b \dots & a & a & \\ & & \vdots & & & \\ a & a & a & a & a & \\ a & a & a & a & a & \end{array} \quad [1-9]$$

Si se produjera lo mismo que en la red monodimensional, se tendría el estado  $A_{II}$

$$A_{II} \rightarrow \begin{array}{cccccc} a & a & b & b & b & \\ a & a & b & b & b & \\ a & a & b & b & b & \\ a & a & b & b & b & \\ a & a & b & b & b & \end{array} \quad [1-10]$$

y tendríamos las energías correspondientes.

$$E_{A_I} = E_{\text{fundamental}} + 4\Delta E \quad [1-11]$$

$$E_{A_{II}} = E_{\text{fundamental}} + \sqrt{N} \Delta E. \quad [1-12]$$

Se ve, pues, que el estado  $A_I$  tiene energía muy inferior. Cuando aparece

desorden en esta red, éste está localizado, es decir, subsiste una gran probabilidad de acertar el estado en que se encuentra una partícula lejana a otra de la que conocemos su estado.

Al aumentar la temperatura, las desviaciones locales se hacen más y más frecuentes, acelerándose la aproximación a un estado desordenado, hasta que, al llegar a una temperatura crítica, todo el orden de largo alcance desaparece, subsistiendo únicamente correlación a cortas distancias.

Este tipo de fenomenología está muy extendido, pero donde se manifiesta más dramáticamente es en los materiales ferromagnéticos. La mayor parte de los estudios teóricos se ha llevado a cabo en los estudios de magnetismo; no obstante, todas las teorías pueden ser aplicadas a otro tipo de compuestos e interacciones. A continuación se expone el modelo de Ising de ferromagneto acoplado a la teoría de Dirac del spin del electrón, ya que es un ejemplo en el que aparecen claramente las etapas y dificultades que se encuentran en el estudio de los fenómenos cooperativos, aunque sean debidos a otro tipo de interacción.

### III.2. Modelo de Ising

Supóngase una red que, por simplicidad, es monodimensional; en cada posición existe una partícula con spin que puede existir en dos estados posibles ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Se supone también que no existen más interacciones que las de entre vecinos próximos. Para eliminar efectos terminales se supone la red circular.

Este es el modelo de ferromagneto en una dimensión de Ising. Acoplando las ideas de Heisenberg (17) y las de Dirac (18) se llega a una energía de interacción entre spines vecinos

$$E_{\text{int}} = -\frac{1}{2}JS_1S_2 - \mu_B H(S_1 + S_2), \quad [2-1]$$

siendo  $J$  una integral que describe la interacción de canje en el sentido de Heitler London,  $S_1$  y  $S_2$  las proyecciones en el eje  $z$  de los spines de las partículas 1 y 2, respectivamente,  $H$  el campo magnético y  $\mu$  el magnetón de Bohr. Superponiendo estos resultados al modelo de Ising,

se tiene que, para una configuración determinada de la red, la energía es:

$$E = \text{Constante} - \frac{1}{2} J \sum_{\substack{i \\ \text{pares de vecinos}}} S_i S_j - \vec{H} \mu \sum_{i=1} S_i; \quad [2-2]$$

ahora bien, la función de partición  $Z$  viene dada, como se sabe, por:

$$Z = \sum_k e^{-\frac{E_k}{kT}} \quad [2-2-3]$$

todas las con-  
figuraciones

luego

$$Z = \sum_k e^{-\beta[\text{constante} - \frac{1}{2} J \sum_i S_i S_j - \vec{H} \mu \sum_i S_i]} \quad [2-2-4]$$

Como la constante aparece tanto en una fase como en otra, puede no considerarse explícitamente.

Debido a que las proyecciones del spin pueden solamente tomar los valores  $\pm 1$ , tendremos los cuatro posibles valores de la exponencial correspondiente a dos vecinos próximos:

$S_1$	$S_2$				
+	+	→			$e^{\beta(\frac{1}{2}J + H)}$
+	-	→			$e^{\beta(-\frac{1}{2}J)}$
-	+	→			$e^{\beta(-\frac{1}{2}J)}$
-	-	→			$e^{\beta(\frac{1}{2}J - H)}$

[2-2-5]

Ordenando estos valores en forma matricial tendremos la matriz  $T$  siguiente:

$$T \begin{vmatrix} e^{(J' + H)} & e^{(-J')} \\ e^{(-J')} & e^{(\frac{1}{2}J - H)} \end{vmatrix} \quad [2-2-6]$$

que se obtiene multiplicando los vectores

$$\begin{vmatrix} S_k(+) \\ S_k(-) \end{vmatrix} \quad \text{y} \quad |S_k(+) \quad S_k(-)|. \quad [2-2-7]$$

El producto de cada configuración vendrá dado por los productos

$$T_{ij}^{12} T_{je}^{23} \dots T_{fi}^{n1}, \quad [2-2-8]$$

siendo  $ij$ , etc., los índices que indican las filas y columnas, respectivamente, de la matriz  $T$ . Luego  $Z$  será:

$$Z = \sum_{i,j,l,m,\dots} T_{ij}^{12} T_{jl}^{23} \dots T_{ii}^{nl} = \text{Traza de } T^N. \quad [2-2-9]$$

Si  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son los valores propios de la matriz  $T$ , tendremos:

$$Z = \lambda_1^N + \lambda_2^N. \quad [2-2-10]$$

Si  $N$  es un número alto  $\lambda_1 \gg \lambda_2 \rightarrow Z \simeq \lambda_1^N$ , para [2-2-11]

$$H = 0 \quad \lambda_{1,2} = e^J \pm e^{-J} \quad [2-2-12]$$

Se ve, pues, que  $Z$  en este caso se obtiene muy fácilmente. Aplicado al ferromagnetismo se ve, como era de esperar según las consideraciones sobre el orden anteriores, que la red monodimensional no da lugar a magnetización

$$M = \beta \left( \frac{\partial \ln Z}{\partial H} \right)_\beta$$

en ausencia de campo. Pero en dos dimensiones se obtienen resultados que cualitativamente corresponden al comportamiento experimental. El modelo de Ising en tres dimensiones no ha sido resuelto exactamente aún.

Este tipo de tratamiento puede aplicarse, con ligeras modificaciones e interacciones, entre dipolos eléctricos y puentes de hidrógeno, aunque quedan limitadas a un trabajo en dos dimensiones. Muchas veces puede ser conveniente buscar una aproximación a  $Z$  en vez de intentar hallar un valor exacto. En lo que sigue se expondrán dos de estos métodos.

### III.3. Métodos aproximados de obtención de la función de partición

a) Teoría de funciones generatrices con modelo de Ising:

Lifson (19) considera un modelo de Ising donde, en vez de distintos estados de spin, las partículas de la red pueden existir en cualquiera de un número infinito de estados.

Debido a que la energía libre, la entropía, etc., son propiedades

termodinámicas extensivas, es decir, aumentan con el número  $N$  de partículas del sistema,  $Z$  puede escribirse como

$$Z \simeq x_1^N, \quad [3-1]$$

siendo  $x_1$  una cantidad independiente de  $N$ .

Introduce luego la función generatriz  $\Gamma(x)$ , tal que

$$\Gamma(x) = \sum_{n=0}^{\infty} Z x^{-n} = \sum_{n=0}^{\infty} \left( \frac{x_1}{x} \right)^n. \quad [3-2]$$

Esta serie converge para  $x_1 < x$  y diverge en el límite  $x \rightarrow x_1$ .

Lifson sustituye la expresión de  $Z$  global y después de un poco de álgebra obtiene fácilmente  $Z$  en función de las interacciones entre vecinos próximos.

Este método es muy sencillo de aplicar cuando las partículas no pueden existir más que en un número bajo de estados y las interacciones se limitan a *un solo* vecino próximo. En nuestro laboratorio se está trabajando actualmente en un programa capaz de resolver un caso general, es decir, con  $m$  posibles estados de cada partícula e interacciones con más de un vecino próximo, lo que permite tratar aproximadamente redes de tres dimensiones.

b) Expansión de  $Z$  en función de la temperatura:

Los factores  $e^{-\beta H_i}$  que aparecen en la función de partición [II-1-2], cuando los exponentes tienden a cero en función de una variable, pueden expansionarse en una serie rápidamente convergente. Si se trabaja a altas temperaturas,  $\frac{1}{T}$  tiende rápidamente a cero, y la serie

$$e^{-\beta H_i} = 1 - \beta H_i + \frac{1}{2}(\beta H_i)^2 - \frac{1}{3}(\beta H_i)^3 + \dots \quad [2-3-3]$$

converge rápidamente. Si se está interesado en trabajar a bajas temperaturas, puede establecerse una expansión análoga en función de  $T$  en vez de  $\frac{1}{T}$ .

En lo que sigue se supone que la expresión en potencias de  $\beta$  es la conveniente. Siendo así,  $Z$  vendrá dada por

$$Z_N(T) = \sum_{l=\text{estados}} \left\{ 1 - \beta H_l + \frac{1}{2}(\beta H_l)^2 - \dots \right\} \quad [2-3-4]$$

introduciendo el promedio estadístico de  $H_i$

$$Z_N(T) = M \left\{ 1 - \beta \langle H \rangle + \frac{1}{2} \beta^2 \langle H^2 \rangle - \frac{1}{3} \beta^3 \langle H^3 \rangle + \dots \right\} \quad [2-3-5]$$

donde se representa este promedio de  $H_i$  por  $\langle H \rangle$ , de  $H_i^2$  por  $\langle H^2 \rangle$ , etc., y  $M$  = número de estados  $l$  posibles del sistema.

Esta serie puede escribirse como:

$$Z_N(T) = M \left\{ 1 - \beta b_1 + \frac{1}{2} \beta^2 b_2 - \frac{1}{3} \beta^3 b_3 \dots \right\} \quad [2-3-6]$$

Los coeficientes  $b_i$  son los llamados momentos en estadística. Tomando ahora logaritmos, se obtiene:

$$\ln Z_N(T) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{c_m}{m!} \beta^m.$$

Los coeficientes  $c_m$  son los cumulantes de la teoría estadística, y están relacionados con las cantidades  $b_i$ . Para los dos primeros términos

$$\begin{aligned} c_0 &= M \\ c_1 &= -b_1 = -\langle H \rangle \\ c_2 &= b_2 - b_1^2 = +\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2. \end{aligned} \quad [2-3-7]$$

El problema está, pues, en la obtención de los valores  $c_i$ , y como ayuda en esta dificultad se suele recurrir a diagramas del tipo empleado en la teoría de «clusters», donde cada interacción se representa por una raya; se ve así los factores que contribuyen al hacer los promedios. Por ejemplo, si se aplica esto al modelo de Ising, todos los gráficos cuyos vértices no tienen un número par de líneas originándose en cada vértice, se anulan al sumar sobre los posibles estados de spin. En la red circular, esto da lugar a que solamente contribuyan el gráfico que representa las partículas sin interacción y aquel que representa a todas ellas unidas por una línea.

Cuando se desea obtener  $Z$  para modelos complicados, llega un momento en que resulta muy difícil contar los gráficos; así los coeficientes de la expansión a altas temperaturas que se han podido obtener para la red cúbica son los 30 primeros, y solamente los 15 primeros en la red cúbica con centro en las caras.

En esta situación se suele recurrir a un análisis del comportamiento asintótico de la serie.

Toda esta materia es objeto en la actualidad de mucho estudio. Stanley (20), Green (21), Landau y Lifschitz (22) y Glasser (23) son autores que presentan en forma a la vez clara y profunda las cuestiones que aquí no se han tratado más que en sus rasgos generales.

#### IV. INTERACCIONES EN EL DNA

##### IV.1. Datos sobre la estructura

Los datos sobre la estructura espacial de los ácidos nucleicos no son todo lo precisos que sería de desear, ya que algunos ángulos y distancias se saben con un error de hasta el 5 por 100; sin embargo, considerada la situación en su conjunto, el conocimiento que se posee permite analizar el tipo de interacciones y el orden de cada tipo de interacción bastante satisfactoriamente.

La falta de precisión en estos datos es debida, por un lado, a la limitación en la resolución de los espectros de rayos X, y por otro, que es fundamental en el estudio de las interacciones moleculares, a la interdependencia existente entre la configuración de las cadenas y la forma de cristalización o semi-cristalización. Este último factor es directamente dependiente del grado de humedad de la muestra, es decir, del número de moléculas de agua que co-cristaliza con el DNA.

#### ESTRUCTURA DE UNA MOLÉCULA DE DNA

Como se sabe, el modelo construido por Crick y Watson en 1953 (24) consiste en dos cadenas de polinucleótidos apareados y formando una hélice. La separación entre dos lazos de la hélice es de 34 Å, existiendo 10 nucleótidos en cada giro. Las dos cadenas están unidas por puentes de hidrógeno establecidos entre las bases púricas y pirimídicas.

La posición del enlace glicosídico es equivalente a lo largo de cada cadena, es decir, existe total periodicidad del grupo: «desoxirribosa-fosfato-desoxirribosa». Dada la forma en hélice del polímero, las operaciones que hay que efectuar para poder aplicar esta periodicidad

están compuestas no solamente de una traslación de  $3 \cdot 4 \text{ \AA}$ , sino también de un giro de  $36^\circ$  alrededor del eje de la hélice.

### ESTRUCTURA DE LOS CRISTALES DE DNA

Langridge y otros (25, 26, 27), en sus estudios de rayos X, llegan a la conclusión de que, o bien en las diversas formas cristalinas de DNA, debidas a distintos grados de humedad, las moléculas de agua están en posiciones análogas estereoquímicamente hablando, o bien el agua no contribuye apreciablemente a la difracción, ya que las distintas formas no ofrecen diferencias en el valor del factor medio de estructura. Estos autores creen que más allá del 40 por 100 de humedad relativa los cristales de DNA (sales de K, Li, Na, Rb) pueden ser considerados como inmersos en agua de densidad  $\rho = 1$ .

El arreglo de las fibras de DNA dentro del cristal viene determinado por las posiciones de los oxígenos de los grupos fosfato que no están esterificados por el azúcar. En las figuras 3 y 4 se presenta el esquema en que están dispuestas las moléculas de DNA (sal sódica de DNA a 92 por 100 de humedad, y sal de Li a 66 por 100 de humedad).

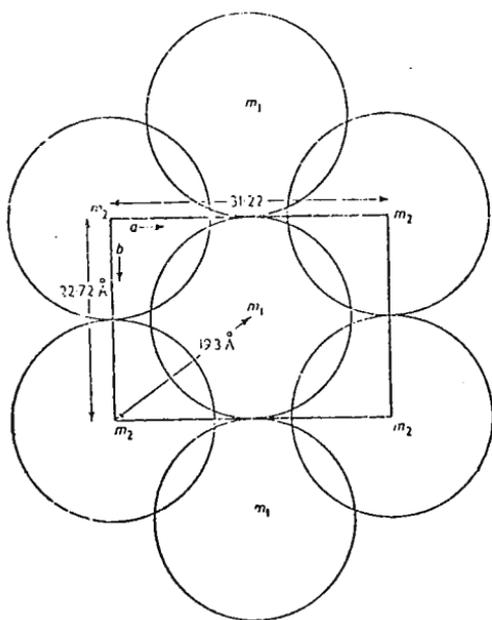


Figura 3.—Las moléculas  $m_1$  están desplazadas  $11 \text{ \AA}$  en la dirección  $c$  y relativamente a las moléculas  $m_2$ .

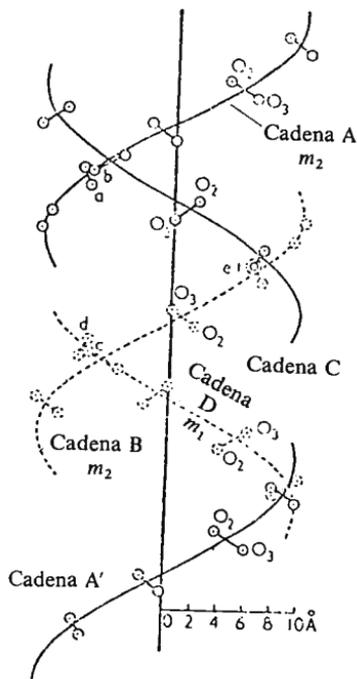


Figura 4.—Las partes contiguas de las moléculas  $m_1$  y  $m_2$  son proyectadas paralelamente a una línea en el plano  $ab$ , pasando a través de los centros de  $m_1$  y  $m_2$ . Cada cadena de ester fosfato se representa por una línea y se muestran los átomos  $O(2)$  y  $O(3)$ .

Entre los oxígenos de fosfatos pertenecientes a moléculas contiguas hay una distancia de  $2 \cdot 7 \text{ \AA}$  en esta forma cristalina. Es decir, las moléculas están muy próximas una de otra. Por otro lado, a partir de resultados obtenidos por difracción de electrones de DNA preparado en soluciones «buffer», se sabe que, al envejecer las fibras, toman estructura globular, y las cadenas constituyentes de DNA se separan. Esto se ve por la aparición de filamentos más finos, que se rompen finalmente en fragmentos pequeños.

Conociendo todos estos datos sobre la estructura espacial de los cristales de DNA, se pueden plantear ahora las preguntas: ¿Qué interacciones existen en estos sistemas? ¿Cuáles son dominantes y en qué condiciones? ¿Qué propiedades deben ser estudiadas? ¿Cómo?

En principio existen muchos enfoques posibles, pero tal vez todos pueden ser clasificados en dos tipos.

1) Estudios globales: Consideran modelos simplificados del cristal y se detienen en las interacciones individuales en función del papel que éstas pueden jugar en el comportamiento físico-químico del cristal.

2) Estudios de tipo analítico: El acento está aquí sobre las in-

teracciones fuertes entre grupos de átomos, aun cuando sean de corto alcance, es decir, de tipo local.

Evidentemente, uno y otro enfoques se completan y, en principio, si se llevan a cabo teóricamente, ambos implican un primer paso en que se tienen en cuenta las interacciones entre los distintos componentes del cristal dos a dos; y segunda etapa, en que estas interacciones son la base para una discusión de las propiedades del cristal.

Los trabajos teóricos existentes hasta ahora son fundamentalmente de tipo analítico, ya que todo lo más se discuten propiedades de una molécula de DNA (28-30). Son de hacer notar, sin embargo, el estudio sobre la conductividad del DNA de Ladik (31-33), que emplea técnicas de estado sólido, así como los trabajos sobre propiedades ópticas de polímeros de Tinoco Jr. (34-35), que intentan llevar a cabo estudios del tipo que aquí se llama global.

Hasta ahora, no obstante, no creemos que un estudio completo de cristales de DNA haya sido llevado a cabo. La razón es, evidentemente, el inmenso trabajo que esto entraña; sin embargo, parece que en la actualidad y trabajando en equipo experimentadores y teóricos, sería posible atacar este problema en forma más completa. En el siguiente capítulo se analizan en forma general las interacciones susceptibles de tener efectos medibles a grandes distancias.

## **IV.2. Interacciones entre vecinos próximos capaces de propagar el orden**

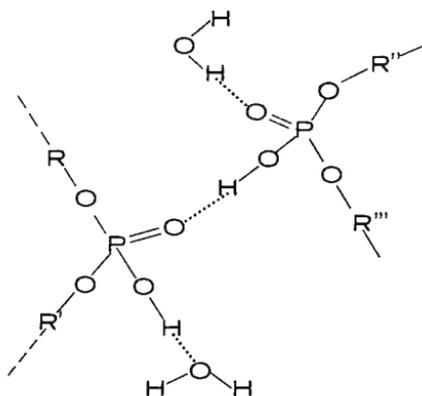
Los grupos de átomos que hay que considerar son: el fosfato, las bases, la desoxirribosa (y la ribosa) y, finalmente, el agua.

### **1. EL GRUPO FOSFATO**

Este grupo puede existir, como se sabe, en forma iónica o neutra, dando lugar a una serie de posibles asociaciones con el medio acuoso y moléculas próximas. Si se consideran los vecinos del grupo fosfato en la cadena del DNA, se encuentran interacciones de tipo van der Waals-London con la desoxirribosa, debido a las distancias y al tipo de enlaces y, ya más débiles, con las bases a ésta enlazadas. Pero si nos fijamos en el cristal (o la solución) de DNA, los datos sobre la estructura (25-26) hacen resaltar el que estos grupos son responsables de las interacciones más fuertes entre las distintas cadenas, ya que dos fosfatos de cadenas contiguas se hallan a una distancia de  $2.7 \text{ \AA}$  uno

de otro (a 40 por 100 de humedad). Esta distancia es igual a la longitud de un puente de hidrógeno. También, según los datos experimentales, se sabe que la distancia interfosfatos influye fuertemente en el tipo de estructura del cristal (25-26).

Representando esquemáticamente dos cadenas contiguas y el agua, se ve que existen toda una serie de posibilidades de asociación mediante puentes de hidrógeno.



Según que sea el fosfato de la cadena (a) o de la cadena (b) aquel al que está más cercano el hidrógeno. Se ve, pues, que los intercambios de carga pueden existir a distancia debido al posible «flíp-flap» *en cadena* de los puentes de hidrógeno.

Recordando que los cristales de  $\text{PO}_4\text{KH}_2$  son ferroeléctricos y piezoeléctricos (36-37), parece evidente que este tipo de interacción cooperativa debe ser estudiada en detalle. ¿Qué tipo de experimento podría hacerse? Lo más sencillo es investigar si una solución de  $\text{PO}_4\text{X}_2\text{H}$  a la concentración correspondiente a la del grupo fosfato en cristales de DNA, cristalizada, da lugar a fenómenos que implican transiciones entre distintos estados de simetría en función de la temperatura.

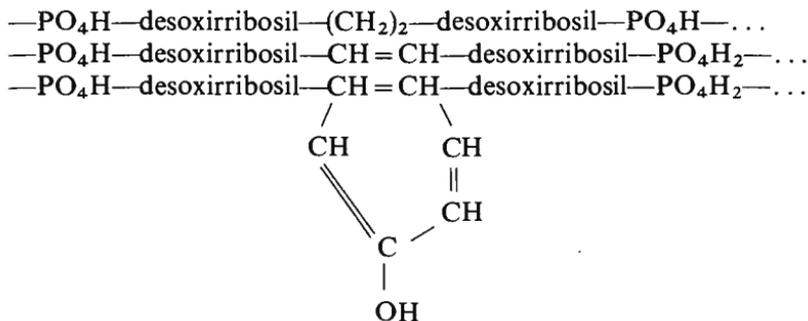
Esto se puede investigar viendo las variaciones de la constante dieléctrica, de las señales de los protones en el infrarrojo y de los espectros de difracción de neutrones en función de la temperatura.

La naturaleza de X podría ser:

$$\text{X}_1 = \text{K}$$

$$\text{X}_2 = \text{Desoxirribosil.}$$

Después se puede intentar con polímeros



Toda esta serie de experimentos darían mucha información no sólo de las interacciones en que juegan un papel directo el fosfato y el azúcar, sino que, por ausencia, iluminarían grandemente sobre las interacciones de las bases desde un punto de vista específico.

Si la estructura de estos cristales es de tipo también helicoidal, pero no poseen propiedades de tipo cooperativo, se puede descartar la hipótesis de que hay transmisión de orden a distancia debido a la interacción de los grupos fosfatos mediante un enlace de hidrógeno. Por otro lado, si la estructura no es helicoidal, una respuesta negativa no invalidaría definitivamente esta hipótesis. Una respuesta afirmativa por el contrario, tanto con ordenación helicoidal como sin ella, informaría sobre la gran importancia de estas interacciones en este tipo de cristales (no sólo en el DNA).

## 2. BASES PÚRICAS Y PIRIMIDÍNICAS

Estos cuerpos, según el modelo de Watson y Crick, no solamente son responsables del comportamiento específicamente biológico del DNA, sino también de la estructura helicoidal de la cadena doble. El que estos cuerpos contribuyan mediante sus puentes de hidrógeno a la estabilidad de las dobles cadenas es evidente; sin embargo, la autora piensa, basándose en los datos de difracción de rayos X y en los estudios de la estructura del agua de Frank, que son las interacciones entre los fosfatos los factores más estabilizados de las dobles cadenas, así como el que sea la deoxirribosa y no la ribosa, como en el RNA el azúcar. En efecto, el hidroxilo extra de la ribosa, al interaccionar con el agua, es un factor opuesto a la estructura helicoidal del polímero,

que puede ser el motivo de la existencia del RNA como hélice sencilla, o bien como en el *t*-RNA y el RNA ribosómico en estructuras donde las partes helicoidales aparecen mezcladas con lazos y ovollos. La ausencia de este factor dispersante contribuye, por el contrario, a la estabilidad de la doble hélice del DNA.

El estudio teórico de las bases ha sido extenso debido a la gran reactividad química de estas moléculas. Desde el punto de vista de las interacciones juegan un papel importante. En efecto, no solamente interaccionan dos a dos fuertemente a través de un puente de hidrógeno, sino que, además, las nubes de electrones  $\pi$  de las bases correspondientes a dos nucleótidos contiguos tienen un solape del orden de 0.2. Este segundo factor no parece ser suficiente para motivar una transferencia de carga, pero contribuye a la energía de interacción en aproximadamente  $1 eV$  (38). Es decir, solamente la contribución de los electrones  $\pi$  de las cuatro bases de dos nucleótidos aportan unos  $4 eV$  a la energía total de interacción. De Voe y Tinoco (35) discuten la contribución de las bases a la energía estimando dipolos y polarizabilidades parciales y obtienen resultados para la diferencia de entalpía debida a una ordenación helicoidal de las bases que va de 0.4 Kcal/mol del par guanina-citosina, a 7.6 Kcal/mol del par adenina-timina. Estos resultados implican que un alto porcentaje del par guanina-citosina en la composición del DNA contribuye a estabilizar la estructura helicoidal.

Las interacciones base-azúcar, debido a la configuración y a la relativa localización de los enlaces de la deoxirribosa, pueden considerarse proporcionales a  $\frac{1}{r^{-6}}$ .

Queda, no obstante, por investigar qué papel juegan las interacciones agua-bases púricas. Debido a que las sustancias que forman puentes de hidrógeno no destruyen la estructura cristalina natural del agua (hielo), sino que la coadyuvan, se podrá suponer que las interacciones con el agua de estas bases tienden a disminuir la estabilidad de la estructura helicoidal del DNA. Por otro lado, debido a que estas bases se encuentran en el interior de la hélice, están resguardadas en parte del contacto directo con el agua. Puede también suceder que jueguen un papel análogo a la urea, es decir, que sea la estructura cristalina del agua la que se destruye, y no la helicoidal del DNA. Estas cuestiones son dignas de ser consideradas con atención, tanto por experimentadores como por teóricos.

### 3. AZÚCAR

Al discutir las interacciones del fosfato y de las bases se ha mencionado ya la importancia que parece tener el hecho de que sea la deoxirribosa y no la ribosa, el azúcar que aparece en el DNA. Efectivamente, parece como si la formación de puentes de hidrógeno con el medio acuoso de los componentes del DNA contribuyera no solamente a la solubilidad de éste, sino que fuera un factor contrario a la existencia de dobles hélices. Debido a esto, en solución acuosa, cuando los grupos fosfato de distintas cadenas están alejados, las sales estabilizan a las fibras de DNA, ya que entonces los  $[R_2 - PO_4]^- Me^+$  causan distorsión de la ordenación del agua. Si el metal no existiera, al formar el fosfato enlace de hidrógeno con el agua, tendería a adaptar su posición de acuerdo con la estructura del agua del medio. Estos razonamientos están de acuerdo con los resultados obtenidos por Frank (39) sobre la estructura del agua y la influencia sobre ésta de moléculas capaces de formar puentes de hidrógeno.

### IV.3. Posibles cálculos y experimentos

Al analizar las interacciones a que da lugar el fosfato, se vieron algunos experimentos que se consideran útiles llevar a cabo. Evidentemente puede suceder que esos experimentos aporten mucha menos información de la que se cree aquí, o bien que sean de difícil realización; no obstante, la idea que parece importante retener es que la propiedad de fuerte polarización en uno u otro sentido a que da lugar cada puente de hidrógeno puede ser el origen de fenómenos de gran interés con características de cooperatividad que merece ser investigada con detenimiento empleando sistemas químicamente puros que guarden analogía con el DNA natural. La posibilidad de que los grupos fosfato *por sí solos* puedan dar lugar a interacciones de largo alcance, merece ser estudiada con atención. Otro último factor a considerar es esclarecer hasta qué punto pueden existir acoplamientos entre el movimiento protónico de los posibles puentes de hidrógeno interfosfato y los que se sabe que existen entre los pares de bases.

## BIBLIOGRAFIA

1. F. LONDON: *Z. Phys.* 63,245 (1930) y *Z. Phys. Chem. (B)* 11,222 (1930).
2. H. MARGENAU: *Phys. Rev.* 38,747 (1931).
3. J. C. SLATER, J. G. KIRKWOOD: *Phys. Rev.* 37,682 (1931).
4. R. EISENSCHITZ y F. LONDON: *Z. Phys.* 60,491 (1930).
5. R. J. BUEHLER y J. O. HIRSCHFELDER: *Phys. Rev.* 83,628 (1951); *ibid.*, 85,149 (1952).
6. O. SINANOGLU: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 47,1217 (1961).
7. M. KLESSINGER y R. MCWEENY: *J. Chem. Phys.* 42,3343 (1965).
8. J. M. PARKS y R. G. PARR: *J. Phys.* 28,335 (1958).
9. J. E. LENNARD-JONES: *Proc. Roy. Soc. (London)* A198,1,14 (1949) y *Ann. Rev. Phys. Chem.* 4,167 (1953).
10. E. HYLLERAS: *Z. Physik* 65,209 (1930).
11. H. R. HASSÉ: *Proc. Cambridge Phil. Soc.* 26,542 (1930); 27,66 (1931).
12. L. SALEM: *J. Chem. Phys.* 37,2100 (1962).
13. C. A. COULSON y P. L. DAVIES: *Trans. Faraday Soc.* 48,777 (1952).
14. E. F. HAUGH y J. O. HIRSCHFELDER: *J. Chem. Phys.* 23,1778 (1955).
15. W. KUTZELNIGG, G. DEL RÉ, G. BERTHIER: Report for the NATO Research Grant No. 223 (1967).
16. Cf. «Lectures in Statistical Mechanics». E. UHLENBECK y G. W. FORD (*Am. Mathematical Soc.*, 1963).
17. W. HEISENBERG: *Z. Physik* 49,619 (1928).
18. P. A. DIRAC: *Proc. Roy. Society* 123,714 (1929).
19. S. LIFSON: *J. Chem. Phys.* 40,3705 (1964).
20. H. E. STANLEY: *Introduction to phase transitions and critical phenomena* (Clarendon Press, Oxford 1971).
21. H. S. GREEN y C. A. HURST: *Order-Disorder Phenomena: Monographs in Statistical Physics 5*, Interscience Publishers (John Wiley & Sons) (1964).
22. L. D. LANDAU, E. LIFSCHITZ: *Statistical Physics* (Pergamon Press, Oxford 1970).
23. H. L. GLASSER: *Am. J. Phys.* 38,1033 (1970).
24. J. D. WATSON, F. H. C. CRICK: *Nature* 171,737 y 964 (1953).
25. R. LANGRIDGE, H. R. WILSON, C. W. HOOPER, M. H. F. WILKINS y L. D. HAMILTON: *Mol. Biol.* 2,19 (1960).
26. R. LANGRIDGE, D. A. MARVIN, W. E. SEEDS, H. R. WILSON, C. W. HOOPER, M. H. F. WILKINS y L. D. HAMILTON: *J. Mol. Biol.* 2,38 (1960).
27. «Structure Reports» 24 (1960).
28. H. A. NASH, D. F. BRADLEY: *J. Chem. Phys.* 45,1350 (1966).
29. F. BELEZNAY, G. BICZÓ y J. LADIK: *Acta Physica* 18n.3,213 (1965).
30. R. REIN y F. E. HARRIS: *J. Chem. Phys.* 42,2177 (1965).
31. J. LADIK, D. K. RAI y K. APPEL: *Report of the Quantum Chemistry group for research in atomic, molecular and solid state theory* (Uppsala University, Uppsala, Sweden, June 15, 1966).

32. J. LADIK y G. BICZÓ: *J. Chem. Phys.* 42,1658 (1965).
33. J. LADIK: *Electronic Aspects of Biochemistry* (Editor B. Pullman, Academic Press, 1964).
34. D. M. GRAY y I. TINOCO, Jr.: *Biopolymers* 9,223 (1970). Cf. también D. F. BRADLEY, S. LIFSON, B. MONIG: *Electronic Aspects of Biochemistry* (Editor B. Pullman, Academic Press, 1964).
35. H. DE VOE y I. TINOCO, Jr.: *J. Mol. Biol.* 4,518 (1962).
36. A. B. PIPPARD: *Phil. Mag.* 1,473 (1956).
37. C. W. GARLAND: *J. Chem. Phys.* 41,1005 (1964).
38. S. FRAGA, C. VALDEMORO: *Structure and Bonding* (1967).
39. H. S. FRANK: *Proc. Roy. Soc. A*, 247,481 y *Fed. Proc.* 24, S-1 (1965).

## CAPÍTULO IV

### *CALCULO DEL PORCENTAJE DE HELICIDAD EN POLIPEPTIDOS Y PROTEINAS*

F. GARCÍA-BLANCO

Departamento de Química-Física, Facultad de Ciencias,  
Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN . . . . .	106
I. DISPERSIÓN ÓPTICA ROTATORIA . . . . .	106
1. Fundamentos experimentales . . . . .	106
2. Tratamiento teórico de los datos experimentales . . . . .	109
3. Determinación del porcentaje helicoidal . . . . .	114
4. Aplicación al estudio de proteínas . . . . .	119
II. ESPECTROFOTOMETRÍA . . . . .	121
1. Fundamentos . . . . .	121
2. Estimación del contenido helicoidal en polipéptidos . . . . .	122
3. Aplicación a proteínas . . . . .	125

## *I N T R O D U C C I O N*

Se conocía desde hace algún tiempo que las proteínas presentaban diferente comportamiento fisicoquímico al variar las condiciones del entorno en el que se encontraban; así, una variación de la temperatura o de la fuerza iónica de las sales presentes en el medio, provocaban variaciones enormes en sus propiedades. Estas variaciones se atribuyeron inmediatamente a cambios conformacionales. Una vez establecido este punto, se comenzó el estudio de las proteínas mediante las técnicas experimentales más utilizadas. De todas ellas, la que más éxito obtuvo fue la difracción de rayos X. El trabajo de Perutz y colaboradores (1) en el estudio de la hemoglobina y mioglobina se considera, aun hoy en día, uno de los trabajos fundamentales de la química de proteínas; sin embargo, la técnica utilizada por estos autores únicamente puede ser aplicada a cristales y aun así se presentan graves problemas a la hora de interpretar los resultados, ya que la introducción de un átomo pesado en la conformación de la proteína afecta a aquélla de una manera muy difícilmente previsible, lo que restringe la utilización de los rayos X en este campo. Los cambios conformacionales pueden detectarse también mediante muy diversas técnicas, todas ellas más sencillas que los rayos X. Entre ellas están la dispersión óptica rotatoria a una o varias longitudes de onda, ultravioleta, espectros infrarrojos y, modernamente, la resonancia magnética nuclear.

Las más utilizadas en estos momentos son la D. O. R. (dispersión óptica rotatoria) y la espectrofotometría ultravioleta, por lo que nos ocuparemos principalmente de ellas.

### **I. Dispersión óptica rotatoria**

#### **1. FUNDAMENTOS EXPERIMENTALES**

En disoluciones acuosas, las proteínas presentan una levorrotación de  $-80$ .

Experimentalmente se comprobó que una proteína, al desnaturizarse, incrementaba su levorrotación, lo cual indicaba que se habían producido cambios conformacionales. De los resultados experimentales se podía deducir razonablemente que el poder rotatorio de una proteína se debe a dos efectos diferentes:

1) a su estructura primaria, es decir, a su secuencia de aminoácidos, que no hay que olvidar son levorrotatorios;

2) a la adopción por la proteína de una conformación que, necesariamente, debería ser dextrorrotatoria.

La premisa primera debe ser importantísima (la clase y colocación de aminoácidos) dentro de una cadena peptídica, y va a ser causante, naturalmente, del  $[\alpha]_D$ . Una buena aproximación para el estudio conformacional sería eliminar el efecto de las cadenas laterales, es decir, trabajar con «proteínas» formadas por la misma clase de aminoácidos; tendremos de esta forma los polipéptidos, del tipo P. G. A. (ácido poliglutámico). Si todavía deseamos obtener un modelo más sencillo que el detallado anteriormente, podemos tomar una «proteína» formada por la misma clase de aminoácidos, pero con los grupos laterales bloqueados, para, de esta forma, tener un polipéptido no electrolito; tendremos polímeros del tipo P. G. B. (poliglutamato de  $\gamma$ -bencilo).

No es de extrañar entonces la gran cantidad de artículos aparecidos sobre esta clase de polipéptidos.

¿Qué clase de conformación adoptan las proteínas y sus modelos, los polipéptidos? Experimentalmente, por medidas de rayos X, dispersión de luz, etc., se había detectado una conformación helicoidal que inmediatamente se identificó con la  $\alpha$ -hélice de Pauling y Corey, ya que explicaba cualitativamente el incremento positivo de  $[\alpha]_D$  de las proteínas y polipéptidos al desnaturizarse.

El siguiente paso consistía en producir la transición.

Los primeros trabajos con polipéptidos se realizaron con poliglutamato de  $\gamma$ -bencilo, (P. G. B.) en diferentes disolventes y a longitudes de onda comprendidas entre 300 y 800  $m\mu$  aproximadamente, como se ve en la figura 1. Como puede apreciarse en dicha figura, el P. G. B. posee dos conformaciones diferentes, según el disolvente utilizado. En determinados disolventes, el P. G. B. se encuentra en forma helicoidal, sufriendo esta conformación una dispersión anómala con la longitud de onda medida, ya que su  $[\alpha]$  pasa de un valor positivo a uno negativo. En disolventes muy polares, como es el caso del D C. A. (ácido dicloracético), no se da la conformación helicoidal.

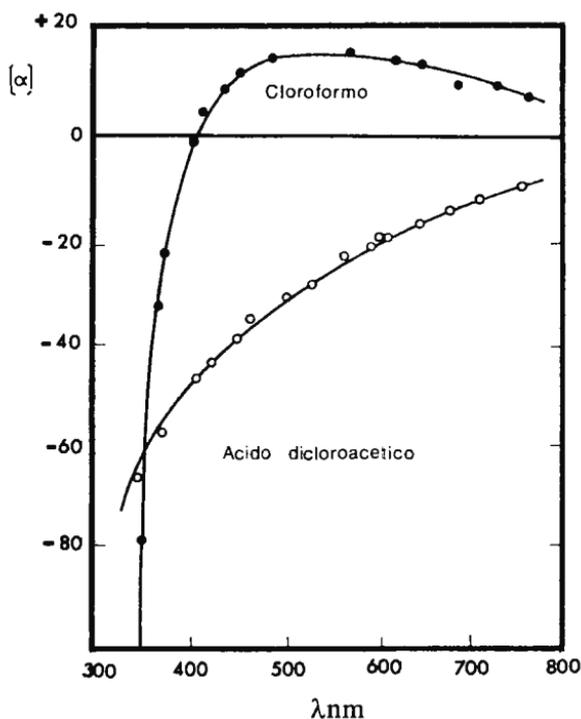


Figura 1.—D. O. R. del P. G. B. en disolventes promotores de hélice y de coil según datos de J. T. Yang y P. Doty.

El estudio de disoluciones acuosas de P. G. A. frente al P. H., nos lleva a la misma conclusión.

Estos resultados nos confirman en la idea de que la conformación estructural de la  $\alpha$ -hélice provoca por sí misma una variación en la actividad óptica, y, por lo tanto, la D. O. R. será un excelente instrumento para detectar conformaciones, como ya se dijo anteriormente. El comportamiento del P. G. B. y P. G. A. no es un caso aislado y puede extenderse, por analogía, las conclusiones a otros muchos polipéptidos.

La adopción, o, mejor dicho, la identificación de la hélice con la hélice formada por los polipéptidos o proteínas y la consideración de que únicamente contribuye la  $\alpha$ -hélice a la variación dextrógira en la estructura de las proteínas, no es más que una aproximación. Naturalmente, existen otras estructuras entre las que destaca la  $\beta$  forma. En el estudio de oligómeros de P. G. B., que se sabe forman agregados

de  $\beta$  forma (I. R.), se observa que, en malos disolventes, como el  $\text{CHCl}_3$ , da lugar a dextrorrotaciones, que posteriormente desaparecen al diluir. Existen aún otras conformaciones posibles, pero tienen aún menos importancia que la  $\beta$  forma, por lo que, en este estudio, vamos a ignorarlas.

Hasta ahora únicamente hemos comentado la Dispersión Óptica Rotatoria hasta 300 nm; sin embargo, en la última década se pudo bajar hasta 225 nm, habiéndose extendido últimamente el rango de medida hasta aproximadamente 185 nm.

Holzwarth y colaboradores (2), estudiando el dicroísmo circular de polipéptidos, observaron para la  $\alpha$ -hélice un mínimo a 233 nm, y un máximo a 199 nm; y para la forma coil, dos mínimos, uno a 238 nm, y otro a 204-205 nm. Pero, quizás, lo más importante fuera el hecho de que los datos obtenidos por D. O. R. y dicroísmo circular fueran concordantes, lo que hacía pensar nuevamente que la D. O. R. era un método realmente bueno para estudiar el cambio de conformación en polipéptidos y proteínas.

## 2. TRATAMIENTO TEÓRICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

La expresión teórica más utilizada para representar las rotaciones en regiones distantes de las bandas activas ópticamente es

$$[\alpha]_{\lambda} = \sum \frac{a_i \lambda_i^2}{(\lambda^2 - \lambda_i^2)} \quad [1]$$

siendo  $\lambda_i$  la longitud de onda de la banda activa, y  $a_i$  un parámetro proporcional a la fuerza rotacional de la banda. Si tomamos únicamente el primer término del desarrollo anterior, tendremos la ecuación de Drude de un solo término

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{k}{(\lambda^2 - \lambda_c^2)}, \quad [2]$$

ecuación que cumplen bien los compuestos con un solo efecto Cotton, o con varios que se encuentren muy próximos, pero en modo alguno indica que haya una banda activa. Este contrasentido aparente se debe principalmente a que hemos truncado el desarrollo en serie de [1] en el primer término.

Muchos polipéptidos y proteínas cumplen bien la ecuación [2], sobre todo en forma «coil», pero en la mayoría de los casos la expresión

[2] es insuficiente. La aproximación siguiente en complejidad será naturalmente, tomar los dos primeros términos de la expresión general [1] que nos da la D. O. R. Tendremos entonces una nueva expresión, que se denomina ecuación de Drude de dos términos:

$$[\alpha] = \frac{K_1}{(\lambda^2 - \lambda_1^2)} + \frac{K_2}{(\lambda^2 - \lambda_2^2)}; \quad [3]$$

si las constantes  $K_1$  y  $K_2$  tienen el mismo signo, la curva que nos da  $[\alpha]$ , con respecto a la longitud de onda, será del mismo tipo que la ecuación de Drude de un solo término. Sin embargo, si poseen signo opuesto y, además,  $|K_1| > |K_2|$  y  $\lambda_1 < \lambda_2$ , habrá lo que se denomina dispersión anómala, es decir, existirá un máximo o un mínimo y, por lo tanto, a cierta longitud de onda cambiará el signo de  $[\alpha]$ .

La ecuación de Drude de dos términos es, por otra parte, poco manejable, ya que presenta cuatro incógnitas,  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  y, aunque es una buena aproximación, en la realidad se utiliza poco.

Moffitt desarrolló la ecuación general de la D. O. R. mediante una serie de Taylor, tomando posteriormente los dos primeros términos del desarrollo, obteniendo entonces la expresión:

$$[m']_\lambda = \frac{a_0 \lambda_0^2}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} = \frac{3M_0 [\alpha]_D}{(n^2 + 2) \cdot 100},$$

que posee únicamente tres incógnitas.

Los parámetros pueden obtenerse mediante una representación gráfica:

$$[m'_\lambda](\lambda^2 - \lambda_0^2) = a_0 \lambda_0^2 + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)},$$

ya que, si el valor de  $\lambda_0$  está acertadamente escogido, obtendremos una recta al representar  $[\alpha]_\lambda(\lambda^2 - \lambda_0^2)$  frente a  $(\lambda^2 - \lambda_0^2)^{-1}$  (Figura 2).  $\lambda_0$  será la longitud de onda correspondiente a un efecto Cotton.

Si tenemos en cuenta la expresión general de la D. O. R., cada sumatorio de la expresión [1] debería poseer su  $\lambda_0$ , pero, debido a su proximidad, 193 y 225 nm, se toma un promedio de estos valores. Yang (3-4) y el mismo Moffitt (5-6), recomiendan para la utilización de esta ecuación el valor de 212 nm para  $\lambda_0$ .

El éxito de esta ecuación fue grande al aplicarla al P. G. B. en diferentes disolventes, en los que se sabía formaba hélices, obteniéndose

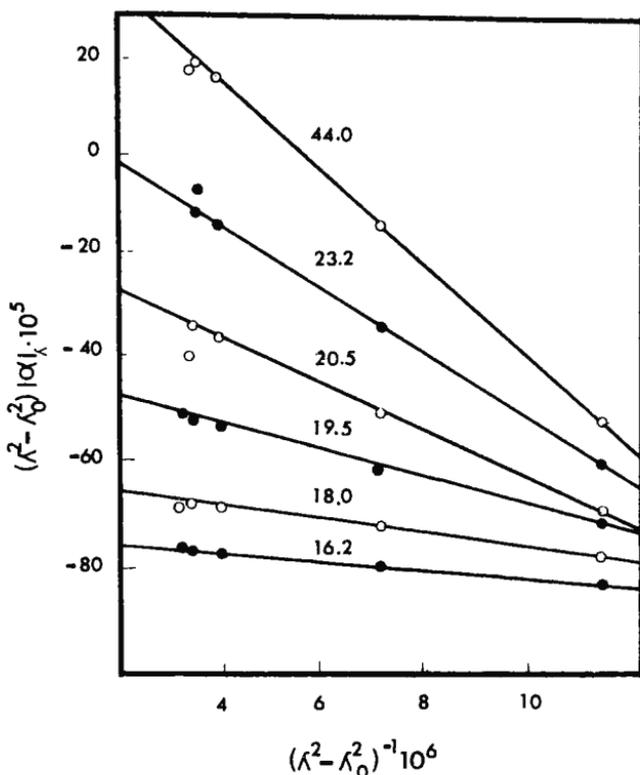


Figura 2.—Representación de Moffitt de la D.O.R. en disolución de D.C.A.: D.C.E. a varias T.

para  $b_0$  el valor de  $-630$ , mientras que  $a_0$  variaba dentro de amplios márgenes. En estos momentos se acepta como válido el valor de  $-630$  para una hélice a derechas. Es de destacar, sin embargo, que la ecuación de Moffitt no puede considerarse exacta por las dos razones citadas anteriormente y que volveremos a destacar:

- 1) se trunca el desarrollo de Taylor en los dos primeros términos;
- 2) se considera un valor promedio de los dos efectos Cotton.

Por estas razones, la ecuación de Moffitt no es más que una ecuación semiteórica y que, naturalmente, no será la única válida para describir la rotación de las  $\alpha$ -hélices.

Otro intento para explicar la D.O.R. de polipéptidos y proteínas fue realizado por Shechter y Blout (7-8-9). La D.O.R. está influenciada,

naturalmente, por los efectos Cotton de las bandas activas ópticamente, las cuales se dan en el ultravioleta. Evidentemente, cada efecto Cotton tendrá que representarse por un sumando en la expresión general que nos da la D. O. R. del compuesto tratado. Recientes estudios por dicroísmo circular indican que existen bandas a 191 y 209 (pertenecientes a transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  en  $\alpha$ -hélice), y otra a 222, producida por la transición  $n \rightarrow \pi^*$ . Shechter y Blout (7-8) dan para la D. O. R. de los polipéptidos y proteínas la siguiente expresión:

$$[m'] = \frac{a_{191}\lambda_{191}^2}{(\lambda^2 - \lambda_{191}^2)} + \frac{a_{209}\lambda_{209}^2}{(\lambda^2 - \lambda_{209}^2)} + \frac{a_{222}\lambda_{222}^2}{(\lambda^2 - \lambda_{222}^2)} + \dots,$$

que naturalmente podría transformarse en la ecuación de Moffitt mediante un desarrollo de Taylor.

La ecuación de Drude de dos términos ha sido recientemente revalorizada. Imahori (10-11) publicó que el P. G. B. la seguía muy bien si  $\lambda_1 = 190$  nm y  $\lambda_2 = 220$  nm.

Shechter y Blout la utilizan con  $\lambda_1 = 193$  nm y  $\lambda_2 = 225$  nm, denominándola «ecuación de Drude de dos términos modificada» (M. T. T. D. E.), con lo cual se reduce a:

$$[m']_{\lambda} = \frac{A_{193}\lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} + \frac{A_{225}\lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}.$$

La constante  $A_{193}$  engloba dos efectos Cotton, uno grande, a 193 nm, debido a la conformación helicoidal, y otro a 198 nm debido a la coil; análogamente, la  $A_{225}$  engloba un efecto grande de la forma helicoidal y otro pequeño para la coil.

La ecuación de Shechter y Blout se resuelve gráficamente de una manera sencilla, representando  $[m']_{\lambda}(\lambda^2 - \lambda_{225}^2)$  frente a

$$\frac{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} \lambda_{193}^2,$$

obteniéndose como ordenada en el origen  $A_{225}\lambda_{225}^2$ , y como pendiente,  $A_{193}$  (Fig. 3). Parece ser, según los autores, que los valores que se obtienen de  $A_{193}$  y  $A_{225}$  no son función de la naturaleza de la macromolécula estudiada, sino simplemente del contenido helicoidal.

De la exposición de las teorías utilizadas para estudiar la D. O. R.,

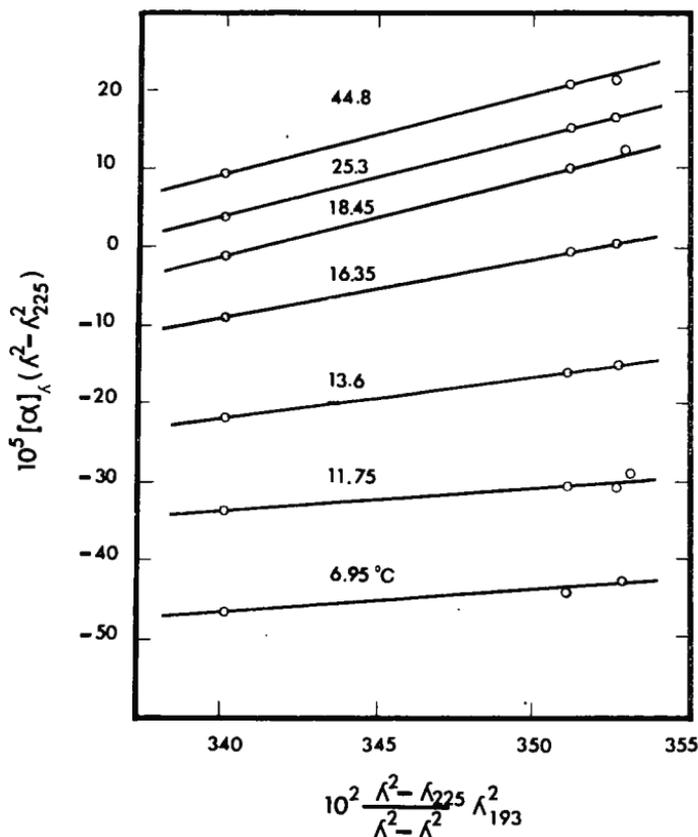


Figura 3.—Representación de Shechter y Blout de la D.O.R. de la P. C. B. L. a varias T.

se desprende que la ecuación de Drude de dos términos y, por lo tanto, la M. T. T. D. E., en esencia, reducen los cuatro términos necesarios para representar exactamente la D. O. R. por dos sumandos. Esto es, desde luego, necesario, pues de otra forma tendríamos que obtener gráficamente los cuatro parámetros necesarios, y esto no es posible; en resumen, promedian las bandas cercanas 193 y 198  $m\mu$ , por una parte, y 225  $m\mu$  por otra, simplificando de esta forma la expresión utilizable de la D. O. R. Como al crecer  $\lambda_1$  disminuye  $\lambda_2$ , es lógico que existan múltiples soluciones para el sistema.

Por otra parte, la ecuación de Moffitt solamente presenta tres magnitudes para determinar, y si a eso añadimos su mayor simplicidad, no es extraño que, aun hoy en día, se utilice para describir la D. O. R. de proteínas y polipéptidos. Modernamente, sin embargo, se ha demostrado por Shechter y Blout que su ecuación y la de Moffitt conducen a resultados completamente análogos.

### 3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE HELICOIDAL

El problema es enormemente complejo para las proteínas, ya que poseen grupos cromóforos en las cadenas laterales, que deben alterar las fuerzas rotacionales de las bandas de absorción.

Por otra parte, aunque teóricamente el problema es sencillo para los polipéptidos, no lo es realmente, ya que resulta inexplicable el hecho de que:

a) dos homopolipéptidos diferentes poseen diferente D. O. R. en disolventes iguales;

b) un mismo homopolipéptido posee diferente D. O. R. en disolventes en los cuales se encuentra en la misma conformación, pero que tengan diferente índice de refracción.

Los dos hechos anteriores son fácilmente explicables, aun a riesgo de complicar el problema, si admitimos que existen efectos de disolvente y de cadena lateral.

A pesar de estas complicaciones, parece lógico pensar que pueda existir un parámetro rotatorio que sea insensible o muy poco sensible a los efectos anteriores, y que podamos utilizar para la estimación del porcentaje helicoidal. La rotación óptica a cualquier longitud de onda es una función lineal de las fuerzas rotacionales del efecto Cotton respectivo, y es lógico pensar que, para algunas longitudes de onda, la rotación pueda ser insensible a esta clase de variaciones.

Por esta razón, *a priori*, la contribución de las regiones de una estructura dada dentro de una molécula al parámetro rotatorio de la molécula debe ser proporcional a la fracción de su residuo en esta región, siempre que se consideren válidas para el parámetro rotatorio las siguientes hipótesis:

- 1) las cadenas laterales no producen efectos Cotton;
- 2) no debe existir dependencia entre los parámetros rotatorios de los residuos pertenecientes a un mismo segmento estructural;
- 3) para un enlace peptídico, los parámetros rotatorios deben ser

insensibles a las diferencias en las cadenas laterales y a los cambios producidos en los alrededores, que provocan el paso de un residuo de una estructura a otra;

4) el error experimental en la determinación del parámetro rotatorio debe ser despreciable, con el máximo posible de contribución de las varias estructuras participantes.

Si las hipótesis anteriores son válidas, la contribución de una estructura al valor observado de D. O. R. de una proteína o polipéptido será función de la fracción de sus residuos en esa estructura. En estas circunstancias, para estimar el porcentaje de una estructura, se necesitan únicamente parámetros lineales relacionados con las fuerzas rotacionales y no rotacionales.

Los métodos para obtener el porcentaje helicoidal se dividen en:

- a) métodos a una longitud de onda;
- b) métodos de dispersión;
- c) utilización del máximo a 198 nm y del mínimo a 233.

a) **Métodos a una longitud de onda.**

Se utilizan normalmente las medidas a 589 y 546 nm. La estimación del porcentaje helicoidal se basa en que el poder rotatorio óptico helicoidal, en una hélice infinita, es proporcional a la longitud de la misma y, por lo tanto, al número de segmentos de la misma. Para obtener el porcentaje helicoidal se mide  $[\alpha]$  específica en las dos conformaciones coil y hélice, tomando estos valores como 0 y 100 por 100 helicoidal.

b) **Método de dispersión.**

1) *Ecuación de Moffitt.* Muchas proteínas obedecen la ecuación de un término de Drude; sin embargo, contienen «fracciones de  $\alpha$ -hélice» de una manera tan irregular, que pueden llegar a ser, mediante su distribución al azar, tan rígidas como una hélice.

Experimentalmente se ha podido comprobar que las proteínas que contienen menos de un 50 por 100 de hélice, obedecen la ecuación de Drude de un término.

La utilización de la ecuación de Moffitt para el cálculo del porcentaje helicoidal se basa en la elección de un valor para  $b_0$ , en la forma helicoidal, y un valor para la forma coil.

Los valores extremos normalmente utilizados son  $-630$  y  $0$ .

Las hipótesis anteriores presuponen siempre el hecho de que la hélice es a derechas y, por otra parte, no hacen ninguna referencia a la clase de hélice que contribuye al porcentaje helicoidal.

Como ejemplo diremos que los estudios de rayos X sobre la lisoenzima indicaban un contenido helicoidal del 35 por 100; la D. O. R., un 30 por 100, es decir, las dos técnicas conducen a resultados razonablemente similares, lo cual hace sobreestimar el método de la D. O. R. Sin embargo, modernamente se ha visto que la hélice en la lisoenzima está distorsionada hacia una hélice  $3_{10}$ . Todas estas incertidumbres contribuyen a reexaminar el papel de  $b_0$ .

Moffitt predijo que  $a_0$  dependía del disolvente, composición y temperatura, y que, por lo tanto, debería incluir todas las rotaciones ajenas al esqueleto peptídico. Suponiendo que todas las contribuciones rotacionales fueran aditivas,  $a_0$  podría escribirse como

$$a_0 = a_0^R + fa_0^H$$

y

$$b_0 = fb_0^H \simeq fb_0 + b_0^H,$$

donde  $f$  es la fracción de hélice,  $R$  indica residuo y  $H$  helicoidal.

Esto presupone que las rotaciones intrínsecas por residuo obedecen la ecuación de Drude de un término tomando  $\lambda_c = \lambda_0$ . Como, *a priori*, no hay razón para considerar esta igualdad, deberíamos escribir

$$m' = \frac{a_1^R \lambda_1^2}{(\lambda^2 - \lambda_1^2)} + \frac{f(a_0^H \lambda_0^2)}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)} + \frac{f(b_0^H \lambda_0^4)}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}$$

y

$$\% H = - \frac{(b_0 - b_0^R)}{630},$$

lo cual complica nuevamente el problema.

2) *Ecuación de Shechter y Blout*. Tal como dijimos anteriormente, modernamente se ha demostrado que la ecuación de Moffitt y la de Shechter y Blout conducen a resultados análogos, aunque formalmente el punto de partida es diferente.

Estos autores presuponen que, como posteriormente pudo demostrarse, en todos los polipéptidos, al representar  $A_{193}$  frente a  $A_{225}$ , daban una línea recta; es decir, al no depender estos valores del tipo de polímero considerado, tenía que darse un comportamiento universal de esta ecuación para polipéptidos y proteínas. Los dos parámetros

se relacionaban con el contenido helicoidal, obteniendo finalmente para su cálculo la expresión

$$H = \frac{A_{193} - A_{225} + 650}{55,8}$$

ecuación que adopta como valores extremos los valores obtenidos para la poli-L-metionina (100 por 100) y (0 por 100) para el copolímero de L-metionina-S-metil-L-cisteína.

Como puede observarse de todas las discusiones anteriores, los métodos de D. O. R. tienen como principal inconveniente la asignación del 0 y 100 helicoidal, consideran válidos estos límites para toda

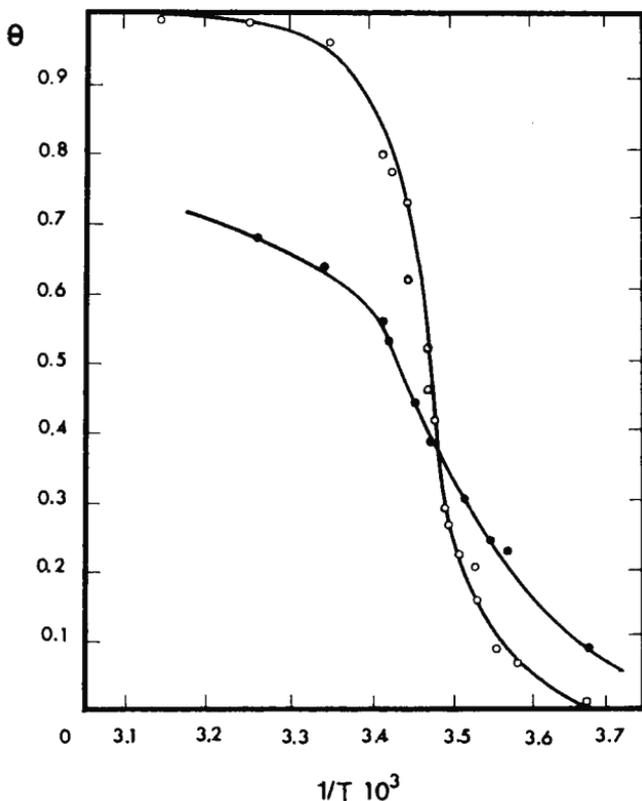


Figura 4.—Valores de  $\theta$  frente a  $1/T$  según Shechter y Blout y R. O.

clase de polipéptidos y proteínas e, incluso en el método de Shechter y Blout, se asignan además constantes universales válidas para todos ellos. Esto presenta el inconveniente de que polipéptidos como el P. G. B. o la P. C. B. L., según estas teorías, como ha podido comprobarse experimentalmente, nunca estarían completamente en la forma coil o helicoidal (Fig. 4), lo cual parece contradecir los resultados obtenidos por otras técnicas. De todo esto parece lógico deducir que las constantes universales no son tales. Sin embargo, la representación de  $A_{193}$  frente a  $A_{225}$  nos da una recta para todos los polipéptidos y proteínas conocidos, así como para copolímeros de P. C. B. L. y P. G. B. con diferentes fracciones molares de sus componentes respectivos (Fig. 5).

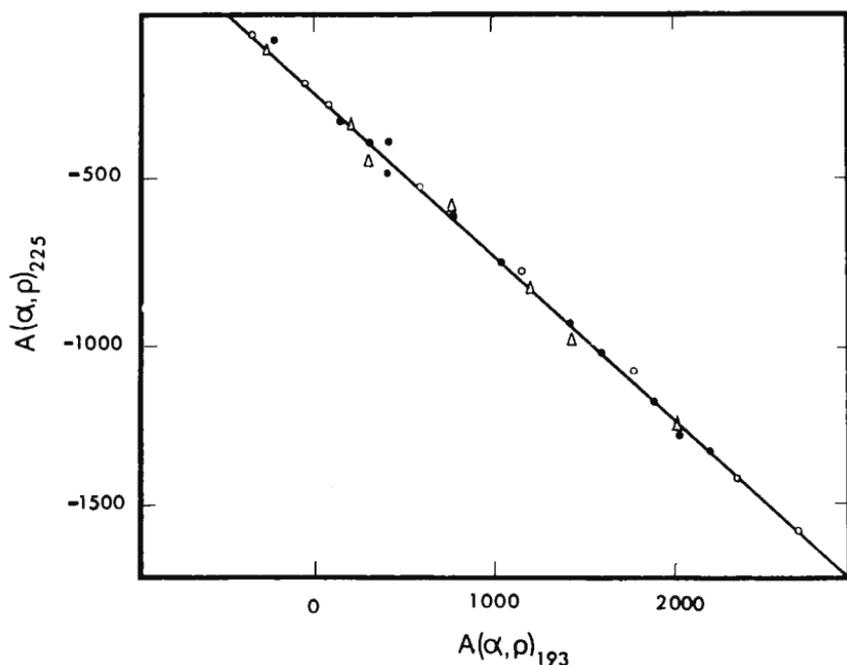


Figura 5.—Valores de  $A(\alpha, \rho)_{225}$  frente a  $A(\alpha, \rho)_{193}$  para diversos polímeros.

Esto nos hace pensar que, aunque las hipótesis de partida de Shechter y Blout son demasiado drásticas para ser reales, el comportamiento universal de  $A_{193}$  y  $A_{225}$  hace que la teoría sea aceptable, aunque

se obtienen mejores resultados variando los límites universales dados por estos autores e introduciendo valores particulares e independientes para cada sistema en particular.

Esta opinión queda justificada por el hecho de que la entalpía de transición por métodos calorimétricos no concuerda en absoluto con la obtenida a partir de las teorías clásicas de polipéptidos si tomamos los valores del porcentaje helicoidal dados por este método. Por otra parte, los valores de  $A_{193}$  y  $A_{225}$  varían con la composición del disolvente.

#### c) Otros métodos.

El hecho de que diferentes conformaciones posean diferentes efectos Cotton, ha sido utilizado para caracterizar estructuras secundarias. El máximo a 198 y el mínimo a 233 han sido los más utilizados para el estudio de conformaciones en proteínas. Pero el inconveniente que se plantea en este caso es la asignación de «escalas». Así, el  $[m']_{\lambda}$  a 233 varía para los diferentes polipéptidos entre  $-13.500$  y  $-15.400$ , e incluso su valor viene afectado por la composición del disolvente. Normalmente se toman los siguientes límites

$$\begin{aligned} [m']_{233 \text{ helice}} &= -15.000 \\ [m']_{233 \text{ coil}} &= -2.000, \end{aligned}$$

con lo que la expresión general para calcular el porcentaje helicoidal se reduce a

$$\text{porcentaje hélice} = \frac{-[m']_{233} + 2.000}{13.000}.$$

Una ecuación similar a la anterior puede obtenerse si consideramos los valores de  $[m']_{198}$  para la conformación helicoidal y coil; sin embargo, aunque los valores obtenidos en este caso son de 70 a 80.000 y de  $-5.000$ , respectivamente, y, por lo tanto, podían ser más manejables, presentan, con todo, el inconveniente de ser valores obtenidos a 198 nm, es decir, valores cercanos al límite de precisión de los instrumentos utilizados.

#### 4. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Los cálculos del contenido helicoidal en una molécula de proteína se basan en su parecido con el *modelo* creado artificialmente por nos-

otros, los *polipéptidos*. La base de todos los cálculos es considerar que pueden existir al mismo tiempo las conformaciones hélice y coil. Si esto se cumple, se puede aplicar la técnica de la D. O. R. Naturalmente, el problema se complica en este caso, debido principalmente a:

- 1) la existencia de cromóforos en la cadena lateral;
- 2) posible presencia de conformaciones distintas de la «helix-coil».

Evidentemente, si se dan cualquiera de los dos efectos, se modificará la D. O. R. de la molécula proteínica, en la región visible y ultravioleta, de una manera no determinada. Por otra parte, las teorías comentadas anteriormente son válidas únicamente si consideramos un único sentido en la hélice formada. Esto parece ser que es lo que ocurre en una gran parte de las proteínas (mioglobina, hemoglobina), pero parece muy razonable suponer que pueden existir casos en que coexistan hélices de sentidos diferentes.

Tal es el caso, por ejemplo, de la cadena *A* de la insulina, en la que, debido a las uniones por puentes de azufre, no es posible suponer hélices con idéntico sentido, aunque de momento no existen pruebas experimentales concluyentes. En este caso comentado no será posible una estimación helicoidal a partir de las medidas de D. O. R., al menos con las teorías utilizadas normalmente en polipéptidos.

Finalmente, no parece correcta la extrapolación de los valores obtenidos para polipéptidos a proteínas. Básicamente, los segmentos helicoidales obtenidos para los polipéptidos difieren de los proteínicos en su mayor tamaño. Por esta razón no parece más que una aproximación la utilización de los valores  $b_0 = -630$ ,  $[m']_{233}$  para las proteínas, máxime si tenemos en cuenta que se ha podido comprobar experimentalmente la variación de  $b_0$  y  $[m']_{233}$  con el grado de polimerización.

Además, los segmentos helicoidales no tienen un diámetro uniforme, es decir, poseen una cierta flexibilidad, que, evidentemente, hace que el modelo de  $\alpha$ -hélice no sea un modelo real, sino una mera aproximación de la realidad. En el caso de una proteína, existen diversas pequeñas regiones coil, lo cual motiva que las regiones mencionadas posean una cierta rigidez diferente de la de los polipéptidos. En resumen, podemos decir que los polipéptidos no son más que una mera aproximación más o menos afortunada de la realidad. Se puede entonces argumentar: ¿cuál es la razón de que, al menos en algunas proteínas, puedan aplicarse las ideas expuestas para los polipéptidos? Quizás se deba al hecho de que las correcciones que deben efectuarse en el

tratamiento de una proteína al tomar como modelo los polipéptidos, no sean aditivas, es decir, no provoquen una variación en el mismo sentido. Pero quizá la mejor explicación posible resida en que, precisamente, las proteínas que mejor se «adaptan» a los modelos propuestos sean las de alto contenido helicoidal. Así, por ejemplo, el contenido helicoidal obtenido para la mioglobina por difracción de rayos X y D. O. R. se diferencia únicamente en un 3 por 100 (77 y 80 por 100 respectivamente).

Por último, se debe resaltar también que cualquier grupo prostético en la cadena lateral de una proteína, o cualquier molécula pequeña que esté unida a una proteína, pueden modificar en un sentido no previsible la D. O. R. de la proteína considerada; tal es el caso de las hemoproteínas.

Por todo lo expuesto anteriormente, no es de extrañar que, al hablar de porcentaje helicoidal de proteínas, haya que indicar siempre el método por el que se ha obtenido y si es posible comprobar los valores obtenidos con los de difracción de rayos X.

Entonces los valores que pueden obtenerse por D. O. R., no tienen más que un valor *semicuantitativo*, lo que, a pesar de todo, no es impedimento para que sea el método más utilizado actualmente en la determinación del porcentaje helicoidal de proteínas.

## II. Espectrofotometría ultravioleta

### 1. FUNDAMENTOS

Los polipéptidos y proteínas absorben en el ultravioleta próximo y en el lejano. La absorción en el próximo, por encima de  $250\text{ m}\mu$ , se debe principalmente a aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina), y normalmente se utiliza para el cálculo de concentraciones de proteínas. La absorción en el lejano tiene lugar entre 160 y 240 nm, admitiéndose hoy en día la presencia de una transición carbonílica  $n \rightarrow \pi^*$ , hacia 210 nm, y de dos transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  en la zona comprendida entre 160 y 190 nm.

Los primeros trabajos sobre péptidos fueron realizados por Ham, Platt y Saidel. Estos autores vieron que, cuando se estudiaba la absorbancia molar de «polímeros» de diglicina a hexaglicina, el efecto cromóforo del grupo amida parecía ser aditivo. Por otra parte, pudo

comprobarse también que la absorbancia molar por residuo interno parecía ser la misma, y diferente de los residuos extremos. Estos resultados hicieron posible el poder asignar una absorción idéntica a cada enlace peptídico, condición indispensable, por otra parte, para poder aplicar el ultravioleta al estudio de conformaciones de polipéptidos y proteínas.

Pudo comprobarse posteriormente que el efecto cromóforo de los enlaces peptídicos era aproximadamente aditivo, siempre y cuando la longitud de la cadena fuese relativamente pequeña. En el caso de un polipéptido, por ejemplo, al aumentar la longitud de la cadena, los segmentos constituyentes pueden adoptar una cierta ordenación que, naturalmente, no es factible con cadenas cortas. Aparecerán fenómenos directamente relacionados con las citadas ordenaciones, siendo los más importantes los acoplamientos de los momentos de transición de los cromóforos y el efecto denominado hipocrómico.

De los dos efectos, el más importante para nuestro fin es, sin lugar a dudas, el hipocrómico. Consiste en que la intensidad de una banda de absorción producida por varios cromóforos es menor que la suma de los efectos cromofóricos producidos por los cromóforos presentes. Este efecto es muy acusado, llegando a ser, en nuestro caso, del orden de un 40 por 100, lo que hace apto el uso del U. V. para el estudio de diferentes ordenaciones de una macromolécula; es decir, podrá utilizarse para estudiar cambios de conformación. La disminución de la intensidad de la banda de absorción se comprobó que dependía ligeramente de la longitud de la cadena de polipéptido, lo que hacía pensar que el hipocromismo se producía prácticamente en los primeros segmentos helicoidales de la cadena polipeptídica, con lo cual pudo concluirse que, de hecho, todas las  $\alpha$ -hélices poseen el mismo grado de hipocromicidad, cualquiera que sea su longitud.

## 2. ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO HELICOIDAL EN POLIPÉPTIDOS

*Para lograr resultados* cuantitativos consistentes, es necesario conocer lo más exactamente posible las absorbancias molares de las bandas de absorción de las dos conformaciones hélice y coil. Una premisa fundamental es que, para que los valores del porcentaje helicoidal sean válidos, debe suponerse que únicamente coexisten las dos conformaciones anteriormente citadas, hipótesis que, por otra parte, también se hace al aplicar la D. O. R. al cálculo del porcentaje helicoidal.

La falta de disolventes apropiados para el estudio del problema considerado motivó que las primeras medidas efectuadas se centrasen en polipéptidos solubles en agua, eligiéndose como modelos el poliácido glutámico (P. G. A.) y la polilisina (P. L.). La transición se producía por variación de pH, y los valores obtenidos para la absorbancia se corregían por la absorción del ión carboxilato. Efectuada la corrección anterior, los valores de los coef. ext. molar ( $\epsilon$ ) en las dos conformaciones fueron (Fig. 1):

	<i>coil</i>	$\alpha$ - <i>hélice</i>
P. G. A.	7.100	4.200
P. L.	7.100	4.400

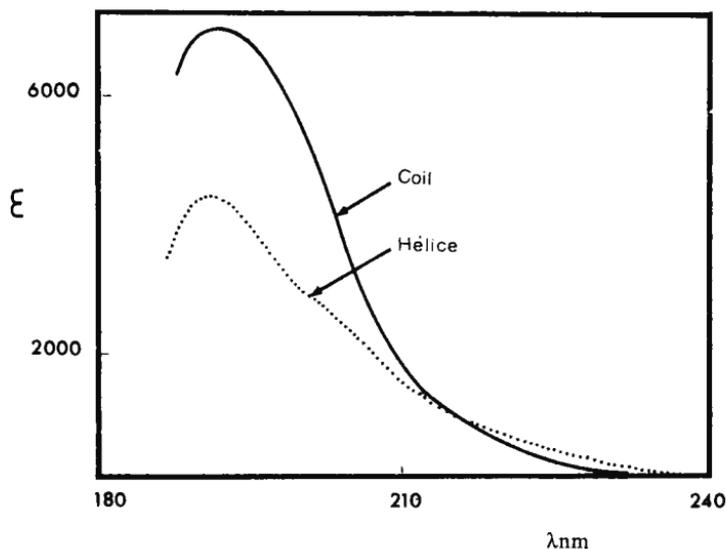


Figura 6.—Espectro ultravioleta de poli-L-lisina en disolución acuosa (según datos de Rosenheck y Doty).

Posteriormente, estos valores fueron modificados por Mc. Diarmid (12-13), quien halló, por otra parte, para la forma coil, un valor de 6.500 a 190  $m\mu$ .

Al mismo tiempo encontró que la absorbancia varía con el grado de ionización del polímero, y que la intensidad de la banda de absorción

en la forma random es función de la fuerza iónica. Por otro lado, se ha podido comprobar experimentalmente que existe una dependencia de la absorción de los grupos peptídicos con las cadenas laterales.

Todo lo expuesto anteriormente complica enormemente la elección del «valor verdadero» de la absorbancia molar de la forma coil, con la consiguiente incertidumbre en el cálculo del porcentaje helicoidal.

Como dijimos anteriormente, se observa la transición hélice-coil por la variación de los valores del coef. ext. ( $\epsilon$ ) frente al pH. La representación nos da una curva del mismo tipo que las obtenidas en D. O. R. (dispersión óptica rotatoria) (Fig. 2). Es interesante, sin embargo, hacer

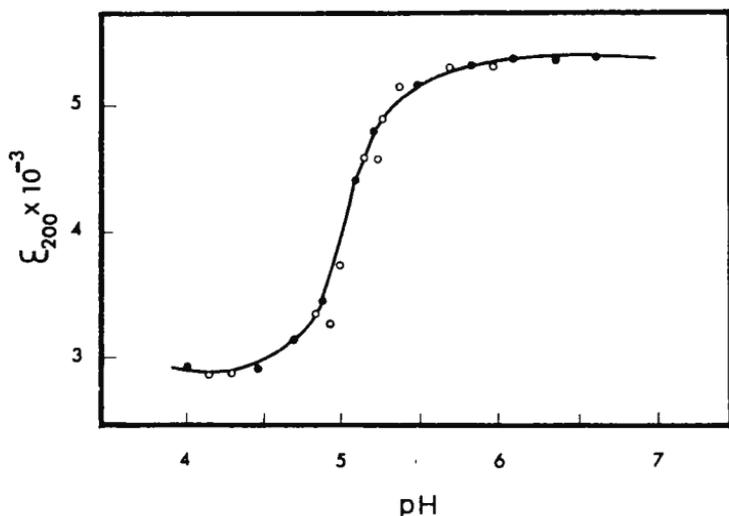


Figura 7.—Transición hélice-coil de P. G. A. (según datos de Applequist y Breslow).

notar que estas medidas deben efectuarse a concentraciones de polímero análogas a las utilizadas en D. O. R. y, como en esta técnica, en presencia de un soporte electrolítico. Además, la medida de la absorbancia debe efectuarse a una longitud de onda en la cual la absorción de los iones carboxilato sea mínima. Con todas estas precauciones, los resultados obtenidos por U. V. parecen ser comparables, dentro del semiempirismo de estos métodos, con los de otras técnicas, como la D. O. R. En resumen, puede afirmarse que la aparición y variación

del efecto hipocrómico es un método semicuantitativo apropiado para el estudio de cambios conformacionales en polipéptidos.

### 3. APLICACIÓN A PROTEÍNAS

Análogamente a lo que ocurre en la D. O. R., la interpretación de los resultados obtenidos en este caso se hace mucho más difícil. El principal problema lo presentan la presencia de cadenas laterales, que pueden contener grupos cromóforos, con lo que los valores obtenidos deben corregirse previamente, antes de su utilización, incrementándose, naturalmente, los márgenes de error que ya teníamos para los polipéptidos.

El efecto de las cadenas laterales suele ser importante, sobre todo si están formadas por aminoácidos con grupos aromáticos, como, por ejemplo, es el caso del triptófano, tirosina y fenilalanina, los cuales tienen un coef. extin. molar de 17.700 a 38.100, y 53.600 a 190 nm. Por esta razón, han sido recopilados los datos del coef. extin. molar de diferentes aminoácidos por Mc. Diarmid. Entonces, al menos teóricamente, puede estimarse la contribución total de las cadenas laterales al valor total obtenido para la absorbancia de la proteína.

Sin embargo, el problema no es tan sencillo si tenemos en cuenta que existen pequeños efectos vecinales que se manifiestan experimentalmente de una forma palpable cuando la macromolécula se desnatura. Normalmente se acepta que se deben a un efecto de disolvente, considerándose que existe una variación del entorno que rodea a los grupos cromóforos de las cadenas laterales en una proteína que pasan de una zona de alta polarizabilidad, el interior hidrofóbico de una proteína, a una zona de baja polarizabilidad, el disolvente acuoso. La explicación de los cambios de intensidad pueden entonces atribuirse a las diferencias de los enlaces de hidrógeno entre los grupos cromóforos y el disolvente. Entonces, un determinado cromóforo, en un disolvente de baja constante dieléctrica, sufrirá una variación en su frecuencia proporcional a  $f/v$ , donde  $f$  es la fuerza del oscilador de la banda correspondiente, siendo esta variación más marcada en la región de 190  $m\mu$ . Por esta razón, para reproducir lo más exactamente posible los alrededores de una proteína, se utilizarán disolventes de altos índices de refracción o detergentes, como, por ejemplo, el dodecilsulfato sódico, obteniéndose así resultados que parecen ser más correctos que las medidas en ausencia de estos productos (Tabla I).

TABLA I

Cadena lateral	COEFICIENTE EXTINCION MOLAR					
	AGUA			DEDODECIL SULFATO SÓDICO		
	190	197	205	190	197	205 m
Try	17.700	20.540	20.020	17.000	20.060	19.500
Tir	38.130	35.400	13.150	35.480	36.400	13.450
Phe	53.600	25.500	13.800	53.360	24.000	12.310
His	5.600	4.110	5.020	5.870	4.169	4.920
Arg	12.450	6.500	1.180	(11.820)	5.740))	(790)

Según datos de Mc Diarmid.

La estimación del contenido  $\alpha$ -helicoidal de una proteína, podrá de este modo obtenerse, al menos teóricamente, si conocemos:

- contribución a la absorbancia total de las cadenas laterales presentes;
- valor lo más exactamente posible de la absorbancia de las dos configuraciones presentes, hélice y coil;
- composición de la proteína.

Sin embargo, los valores obtenidos son poco consistentes, puesto que el tanto por ciento helicoidal calculado es función de la longitud de onda empleada; así, por ejemplo, el contenido helicoidal de la ribonucleasa pancreática es del 41 por 100 a 190 nm, del 36 a 197 nm y del 18 a 205 nm. Algunas veces se utiliza como valor del contenido helicoidal una media de los valores determinados a las tres longitudes de onda citadas anteriormente, pero este método no podrá, evidentemente, dar buenos resultados (Tabla II). Es lógico pensar, en este caso, en donde están las fuentes de error, intentando buscar la propia consistencia de los datos obtenidos sin preocuparse de compararlos con otras técnicas que, aunque han conducido a resultados coincidentes en algunos casos con los rayos X, sean semiempíricas, como es el caso de la D. O. R. (ec. de Moffitt o de Shechter y Blout).

Lo correcto es intentar obtener la mejor combinación de los parámetros de la hélice y coil e intentar dibujar las curvas de absorción

TABLA II

PROTEINA	Absorción U.V.			PROMEDIO	POR D.O.R.
	190 m	197 m	205 m		
Paramiosina . . . . .	103	100	115	106	92
Mioglobina . . . . .	—	—	—	—	77
Ribonucleasa pancreática . . . . .	41	36	18	32	16
Insulina . . . . .	108	80	130	106	20

Según datos recopilados por Mc Diarmid.

de las proteínas, una vez corregida la contribución de las cadenas laterales, pero aun de esta forma surgen grandes discrepancias entre los valores calculados y los experimentales, aunque no pueden atribuirse exclusivamente a aquéllas.

Como otras posibles causas de error tenemos:

a) posible presencia en la proteína de conformaciones diferentes de la  $\alpha$ -hélice;

b) posibles interacciones, en las que intervendrían las cadenas laterales;

c) diferente sentido del contenido helicoidal en proteínas y polipéptidos.

La causa a), enunciada anteriormente, presupone la presencia, junto a la conformación helicoidal, de otras conformaciones, de la que la más importante es la forma  $\beta$ , que parece ser se encuentra presente en algunas proteínas desnaturalizadas; por ejemplo, las proteínas globulares. Sin embargo, se ha demostrado que su proporción en ellas es pequeña, por lo que no puede ser un factor decisivo para explicar las grandes discordancias que surgen al aplicar la técnica de U. V.

La causa b) tampoco parece decisiva, aunque no puedan menospreciarse los efectos de disolvente.

Queda por último el factor c), que, como en D. O. R., es de gran importancia. El contenido helicoidal de las proteínas es normalmente inferior al de los polipéptidos, y se encuentra repartido entre varias secuencias, como ha podido demostrarse en la lisoenzima, hemoglo-

bina... Es de esperar entonces que estos pequeños «segmentos helicoidales» difieran de los considerados en el caso de polipéptidos, y, por lo tanto, al menos cualitativamente, puede comprenderse la inconsistencia de los resultados obtenidos. Por otra parte, si la proteína considerada tienen un gran contenido helicoidal, es de esperar que el modelo polipéptido sea «más real», y en realidad esto es lo que ocurre; así, por ejemplo, la mioglobina posee un 77 por 100 helicoidal, según la determinación por rayos X, y un 82 por 100 por U. V.

Si se acepta que la distribución de hélices en pequeños segmentos conduce a distorsiones en las curvas de absorción, el procedimiento mejor sería medir la fuerza del oscilador de la banda de absorción, en vez de las absorbancias molares a una longitud de onda, con lo cual se minimizan los errores debidos a cambios en las cadenas laterales.

Otra causa importante de error es la imprecisión en la asignación del 0 y 100 por 100 helicoidal, con el consiguiente error en la determinación de éste.

En resumen, podemos decir que la técnica de U. V., aunque se use mucho en estos momentos para determinación de cambios de conformación, es muy inferior, al menos por ahora, a la D. O. R. Indudablemente tiene ventajas sobre ésta, pero, globalmente, los resultados obtenidos con la D. O. R., aunque semicuantitativos, son más consistentes, acercándose en muchos casos a los obtenidos por métodos cristalográficos.

## BIBLIOGRAFIA

1. M. F. PERUTZ, M. G. ROSSMANN, A. F. CULLIS, H. MUIRHEAD y A. C. T. NORTH: *Nature*, 185,416 (1960).
2. G. HOLZWARTH y P. DOTY: *J. Amer. Chem. Soc.* 87,218 (1965).
3. E. R. BLOUT, P. DOTY y J. T. YANG: *J. Am. Chem. Soc.* 79,749 (1957).
4. J. T. YANG y P. DOTY: *J. Am. Chem. Soc.* 79,761 (1957).
5. W. MOFFITT y J. T. YANG: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 42,596 (1956).
6. W. MOFFITT: *J. Chem Phys.* 25,467 (1956).
7. E. SHECHTER y E. R. BLOUT: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51,695 (1964).
8. E. SCHECHTER y E. R. BLOUT: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51,1029 (1964).
9. E. SHECHTER, J. P. CARVER y E. R. BLOUT: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51,1029 (1964).
10. K. IMAHORI: *Biochim. Biophys. Acta* 37,336 (1960).
11. K. IMAHORI: *Biopolymers* 1,563 (1963).
12. R. MC. DIARMID y P. DOTY: *J. Phys. Chem.* 70,2620 (1966).
13. PH. D. MC. DIARMID: *Thesis* (Harvard Univ., Cambridge, Mass., 1965).



## CAPÍTULO V

### *EQUILIBRIOS DE ASOCIACION EN MACROMOLECULAS. TECNICAS DE ESTUDIO*

L. FRANCO Y F. MONTERO

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN . . . . .	132
I. TÉCNICAS DE EQUILIBRIO TERMODINÁMICO . . . . .	135
1. Ultracentrifugación . . . . .	135
A) Aplicación al estudio de sistemas autoasociantes . . . . .	135
B) Estudio de asociaciones proteína-ligando . . . . .	159
2. Dispersión de luz . . . . .	163
3. Técnicas espectroscópicas . . . . .	166
A) Introducción . . . . .	166
B) Resonancia magnética nuclear . . . . .	167
C) Dicroísmo circular y dispersión rotatoria óptica . . . . .	184
D) Espectroscopía ultravioleta . . . . .	189
4. Equilibrio de diálisis . . . . .	192
II. TÉCNICAS DE TRANSPORTE . . . . .	193
1. Tratamiento teórico general . . . . .	193
A) Introducción . . . . .	193
B) Forma, número y posición de los límites . . . . .	195
C) Cálculo de las constantes de equilibrio . . . . .	199
2. Ultracentrifugación . . . . .	201
A) Introducción . . . . .	201
B) Estudio de sistemas autoasociantes . . . . .	205
C) Estudio de asociaciones proteína-ligando . . . . .	209
D) Estudio de sistemas en los que la asociación está mediada por ligandos . . . . .	210
3. Electroforesis . . . . .	215
A) Introducción . . . . .	215
B) Sistemas autoasociantes . . . . .	216
C) Equilibrios de asociación proteína-ligando . . . . .	217
4. Cromatografía en geles . . . . .	220
A) Introducción . . . . .	220
B) Aplicación a sistemas autoasociantes . . . . .	221
III. OTRAS TÉCNICAS . . . . .	222
1. Técnicas de congelación del equilibrio . . . . .	222
2. Microscopía electrónica . . . . .	224

## INTRODUCCION

Un gran número de macromoléculas de interés biológico son capaces de asociarse consigo mismas o con otras moléculas cuando se encuentran en disolución. Los sistemas de asociación en que intervienen proteínas son, con gran diferencia, los más estudiados, tanto desde un punto de vista teórico como experimental, por lo que, en la presente revisión, se hará hincapié en tales sistemas, cuyo interés, desde un punto de vista funcional, supera además con creces al de otras asociaciones entre macromoléculas.

Muchas veces las asociaciones son reversibles, y es precisamente la existencia de un equilibrio lo que las hace especialmente interesantes en cuanto a su función biológica. Tal es el caso de algunas enzimas, cuyo proceso de asociación-disociación da cuenta del control de su actividad. En otras ocasiones, la asociación es irreversible, al menos «in vitro», como ocurre en la formación de complejos histona-DNA, que se trata en otro lugar de este libro (1).

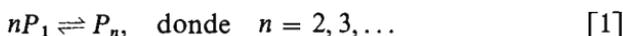
En cualquier caso, el estudio completo de un sistema asociante requiere el conocimiento de la naturaleza de las interacciones que dan lugar a la asociación, el análisis estructural de su producto y la evaluación de los parámetros fisicoquímicos implicados en el proceso de asociación, especialmente las constantes de velocidad o de equilibrio. El presente trabajo tiene como fin revisar las técnicas utilizables para la determinación de tales parámetros fisicoquímicos en equilibrios de asociación.

Concretado de este modo el objeto del capítulo, es necesario establecer una clasificación previa de las diversas modalidades de asociación de proteínas. Es de advertir que la clasificación no pretende ser exhaustiva y que los distintos tipos de sistemas se han agrupado siguiendo criterios metodológicos en cuanto a su estudio más que en orden a las consecuencias funcionales de la asociación.

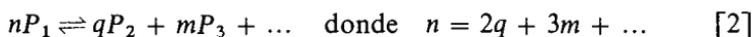
1. *Sistemas autoasociantes.* Se denominan así aquellos sistemas en que la asociación tiene lugar entre moléculas de una única especie

proteica sin la intervención de ninguna otra macromolécula ni sustancia de bajo peso molecular. En general, la proteína, que, con independencia de su estructura, se designará en lo sucesivo *monómero*, está en equilibrio con sus especies poliméricas. Según el número de éstas, los sistemas autoasociantes pueden dividirse en dos clases:

a) Sólo una especie polimérica está en equilibrio con el monómero. El equilibrio puede representarse:

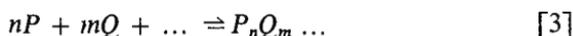


b) El monómero puede coexistir con varios polímeros:



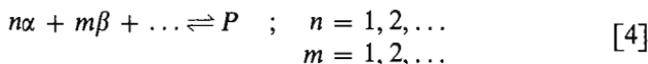
Mientras que todas las asociaciones del tipo a) son definidas, las del tipo b) pueden no serlo, es decir, puede no haber un límite para el número de especies poliméricas presentes en el equilibrio.

2. *Sistemas de asociación entre proteínas diferentes.* En este caso, en vez de existir un único monómero  $P_1$ , hay otros que también participan en el equilibrio para dar origen a polímeros complejos:



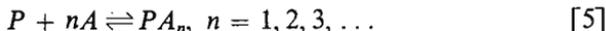
siendo  $n = 1, 2, \dots$ ;  $m = 1, 2, \dots$

Un caso particular de este tipo es el de asociación entre las diversas subunidades que, reunidas en una estructura cuaternaria adecuada, dan origen a una proteína compleja desde el punto de vista estructural, pero funcionalmente simple:

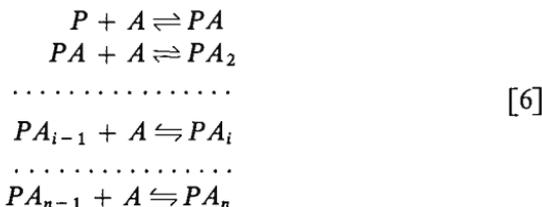


Como se puede advertir fácilmente, las diferencias entre los dos casos expuestos en este apartado son únicamente funcionales. Mientras que, en el primero,  $P, Q$ , etc., son proteínas completas, con función determinada de por sí, y el complejo  $P_nQ_m \dots$  puede tener una función que no corresponda a la suma de las específicas de cada monómero integrante, en el segundo, las subunidades  $\alpha, \beta$ , etc., carecen de función propia y sólo la tienen cuando se reúnen adecuadamente para formar  $P$ . El hecho de que el tratamiento teórico y metodológico de ambos casos sea el mismo hace que se incluyan dentro del mismo grupo de clasificación.

3. *Sistemas de asociación de proteínas con ligandos de bajo peso molecular.* Frecuentemente, las proteínas pueden asociarse con ligandos de bajo peso molecular para dar origen a equilibrios del tipo:



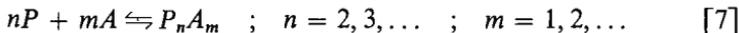
donde  $A$  representa el ligando. Sin embargo, de ordinario, el equilibrio se describe mejor según un modo de unión de ligando secuencial. Las  $n$  moléculas de  $A$  no se unen al mismo tiempo a la proteína, sino progresivamente:



Es de advertir que, en un proceso de este tipo, cada etapa tiene, normalmente, una constante de equilibrio propia.

Las asociaciones proteína-ligando son importantes desde el punto de vista funcional, ya que constituyen el fundamento de numerosos procesos de regulación enzimática.

4. *Sistemas asociantes que requieren la presencia de ligandos de bajo peso molecular.* En estos sistemas, las moléculas de proteína están en equilibrio con sus formas poliméricas sólo cuando se encuentran en presencia de algún ligando de bajo peso molecular que, de alguna manera, favorece la polimerización:



El tratamiento teórico y metodológico de estos sistemas participa del correspondiente a los tipos 1 y 3. En ocasiones, especialmente si  $m$  es muy pequeño o si  $A$  tiene poca influencia en las propiedades físicas del complejo  $P_n A_m$ , el equilibrio puede tratarse como el de un sistema autoasociante.

Para la investigación de los parámetros fisicoquímicos que rigen los equilibrios de asociación entre proteínas no son válidas, ordinariamente, las técnicas utilizadas en el caso de equilibrios químicos entre especies moleculares diversas, ya que, en el caso más general, las técnicas de análisis químico no permiten distinguir entre los monó-

meros y las especies poliméricas. Existen, sin embargo, variaciones en las propiedades físicas como consecuencia de la reacción de asociación, como son el aumento del peso molecular, cambios de conformación o de estructura electrónica, etc., que permiten el estudio más o menos directo del equilibrio de asociación.

Tales cambios de propiedades físicas pueden ponerse de manifiesto, por ejemplo, mediante técnicas de equilibrio de sedimentación, dispersión de luz, espectroscopía ultravioleta o de resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular o dispersión rotatoria óptica, diálisis, etc. La aplicación de estas técnicas no sólo no desplaza el equilibrio químico de asociación, sino que tampoco altera el equilibrio termodinámico del sistema. Sin embargo, las técnicas de transporte, como la ultracentrifugación (velocidad de sedimentación), electroforesis, cromatografías, etc., al mismo tiempo que operan en condiciones que no son las de equilibrio termodinámico, pueden conducir a un desplazamiento del equilibrio químico, por lo que los resultados obtenidos de ellas deberán interpretarse cuidadosamente.

En las secciones siguientes de este capítulo se revisan los distintos tipos de técnicas aplicables al estudio de equilibrios de asociación, estableciendo, en la medida de lo posible, las pertinentes comparaciones entre ellas.

## I. TÉCNICAS DE EQUILIBRIO TERMODINAMICO

### 1. Ultracentrifugación

#### A) APLICACIÓN AL ESTUDIO DE SISTEMAS AUTOSOCIANTES

**Determinación de pesos moleculares.**

La ultracentrifugación de equilibrio es una técnica habitual en la determinación de pesos moleculares. Son muy numerosas las revisiones dedicadas a este tema, y a ellas deberá acudir el lector en busca de una información más extensa, que caería fuera de los límites de este artículo (véanse, por ejemplo, las referencias 2-5).

En general, los distintos métodos utilizan la ecuación general del equilibrio de sedimentación, bien en su forma diferencial:

$$\frac{1}{C} \frac{dC}{dx} = \frac{\omega^2 x M (1 - \bar{v} \rho)}{RT} \quad [I-1]$$

o en alguna de sus formas integradas, como

$$\ln C = \frac{\omega^2 x^2 M(1 - \bar{v}\rho)}{2RT} + K \quad [I-2]$$

$$\ln \frac{C(x)}{C(m)} = \frac{\omega^2 M(1 - \bar{v}\rho)}{2RT} (x^2 - x_m^2) \quad [I-3]$$

donde  $C$  representará la concentración de la macromolécula,  $M$  y  $\bar{v}$  su peso molecular y volumen específico parcial, respectivamente,  $\rho$  la densidad de la disolución,  $R$  la constante de los gases y  $T$  la temperatura absoluta. La distancia de un punto cualquiera de la célula al eje de giro viene indicada por  $x$ , y el subíndice  $m$  hace referencia a la posición del menisco. La elección de una u otra ecuación depende del sistema de medida de la concentración de la macromolécula en los distintos puntos de la célula. Las ecuaciones [I-2] y [I-3] son, por ejemplo, especialmente útiles en el caso de disponer de óptica de absorción, que permite medir directamente  $C(x)$ . Así, por ejemplo, si se representa gráficamente  $\ln C(x)$  frente a  $x^2$ , se obtendrá una recta (véase ecuación [I-2]) a partir de cuya pendiente se puede determinar  $M$ .

Con óptica de Schlieren, la magnitud medida es proporcional a  $dC/dx$ , con lo que puede resultar ventajosa la utilización de la ecuación diferencial [I-1]. El cálculo de  $C$ , sin embargo, requiere entonces una mayor manipulación de los datos experimentales.

Si se utiliza óptica interferométrica, los resultados se expresan en términos de incremento en el índice de refracción. Este incremento,  $n_c$ , es la diferencia entre el índice de refracción  $n$ , de una disolución de la macromolécula de concentración  $C$ , y el índice de refracción del disolvente,  $n_0$ , y está relacionado linealmente con la concentración:

$$n_c = n - n_0 = R_i C \quad [I-4]$$

donde  $R_i$  es una constante específica del soluto. Escribiendo la ecuación [I-1] en términos del índice de refracción, se llega a

$$\frac{1}{n_c x} \frac{dn}{dx} = \frac{d \ln n_c}{d(x^2)} = \frac{\omega^2 M(1 - \bar{v}\rho)}{2RT} \quad [I-5]$$

El número absoluto de franjas observadas con óptica interferométrica,  $J$ , es directamente proporcional al incremento del índice de

refracción y al paso óptico de la célula,  $l$ , e inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz utilizada,  $\lambda$ ,

$$J = l n_c / \lambda \quad [I-6]$$

La ecuación [I-5] permite, pues, calcular  $M$  en función de  $J$ :

$$M = \frac{d \ln J(x)}{d(x^2)} \frac{2RT}{\omega^2(1 - \bar{v}\rho)} \quad [I-7]$$

Pero la ecuación [I-1] es sólo válida en el caso de sistemas ideales, y lo mismo ocurre con todas las que derivan de ella. Para sistemas no ideales, la ecuación [I-1] se convierte en:

$$\frac{1}{C} \frac{dC}{dx} = \frac{\omega^2 x M (1 - \bar{v}\rho)}{RT [1 + C(\partial \ln y / \partial C)]} \quad [I-8]$$

o bien

$$\frac{1}{C} \frac{dC}{dx} = \frac{\omega^2 x M_{ap} (1 - \bar{v}\rho)}{RT} \quad [I-9]$$

$M_{ap}$  es el peso molecular aparente, el determinado experimentalmente, relacionado con el auténtico,  $M$ , a través del coeficiente de actividad del soluto,  $y$ :

$$\frac{1}{M_{ap}} = \frac{1}{M} + \frac{C}{M} \frac{\partial \ln y}{\partial C} \quad [I-10]$$

Frecuentemente, la derivada parcial  $\partial \ln y / \partial C$  se sustituye por un desarrollo en serie (véase más adelante), con lo que

$$M_{ap} = \frac{M}{1 + BMC}, \quad [I-11]$$

siendo  $B$  el primer coeficiente del virial.

De ordinario, la relación entre  $\ln C$  y  $x^2$  es prácticamente lineal para pequeños intervalos de concentración, por lo que el peso molecular real puede obtenerse por extrapolación a dilución infinita de los valores de  $M_{ap}$  determinados a varias concentraciones.

Las asociaciones de los tipos 1, 2 y 4 (ecuaciones [1], [2], [3], [4] y [7]) implican un cambio considerable en el peso molecular, y así, la aplicación de los métodos convencionales que utilizan las ecuaciones precedentes puede dar idea, en principio, del grado de polimerización

en asociaciones definidas. Para ello bastaría determinar los pesos moleculares del monómero o monómeros y del polímero. Pero, evidentemente, tales determinaciones deberían hacerse en condiciones que asegurasen el total desplazamiento del equilibrio hacia la asociación o disociación.

En la práctica es difícil predecir las condiciones en que una proteína está totalmente asociada, lo que plantearía una primera incertidumbre. La disociación total puede, por el contrario, producirse con relativa facilidad si se conoce la naturaleza de las interacciones que dan lugar a la asociación. El uso de disoluciones de alta fuerza iónica evita, por ejemplo, la asociación debida a interacción iónica, mientras que el uso de agentes desnaturalizantes, como la urea, cloruro de guanidinio, medios bajos de pH, etc., impide la asociación debida a enlaces de hidrógeno.

Ocurre a menudo, sin embargo, que los agentes que impiden la asociación inducen cambios conformacionales en la proteína que favorecen su comportamiento no ideal, por lo que los pesos moleculares del monómero calculados en tales condiciones pueden desviarse apreciablemente del valor real. En la tabla I se recogen los pesos molecu-

TABLA I

INFLUENCIA DE LOS AGENTES INDUCTORES DE DISOCIACION EN LA DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE PROTEINAS

Proteína	Disolvente	M experimental	Ref.	M real	Ref.
Ribonucleasa	Urea 6M tampón acetato	12.000 (A)*	6	13.683 (**)	
				13.700 (A)	7
Seroalbúmina S-carboximetil- seroalbúmina	Urea 8M-KCl	74.000 (E)	9	13.740 (E)	8
				65.000 (E)	7
	Urea 8M-NaCl A. acético	77.000 (A)	10	70.000	
					11,5 M
Dodecil sulfato sódico	83.000 (A)	10			

\* (A) Peso molecular determinado por el método de Archibald.

(E) Peso molecular determinado por equilibrio de sedimentación.

\*\* Calculado a partir de su composición.

lares de varias proteínas calculados en presencia de agentes inductores de disociación, comparados con los pesos moleculares reales, calculados o determinados en disoluciones salinas diluidas. Evidentemente, todos los datos recogidos en dicha tabla se refieren a proteínas que no tienden a agregar en las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de su peso molecular real.

Así, pues, por desplazamiento del equilibrio en sistemas asociantes puede lograrse una idea —y no exacta a veces— del peso molecular del monómero, y sólo en ciertos casos puede determinarse el de las especies poliméricas. En las mejores condiciones podría conocerse aproximadamente el grado de asociación, pero por la propia naturaleza de la técnica no se obtendrían datos sobre las constantes de equilibrio y, lo que es peor, al trabajar en condiciones que distan mucho de las fisiológicas, se perdería toda posibilidad de interpretar los resultados obtenidos desde un punto de vista funcional.

Si una proteína se somete a ultracentrifugación hasta alcanzar el equilibrio en condiciones tales que se produzca asociación, se llegará, como en el caso de una proteína no asociante, a establecer un gradiente de concentración,  $dC/dx$ , a lo largo de la célula. Pero el gradiente observable será, en realidad, la suma de todos los gradientes particulares de cada especie molecular presente en el equilibrio de asociación. En cada punto de la célula, la relación entre las diversas especies será la exigida por la constante o constantes de equilibrio. Naturalmente, al coexistir dos o más estados de agregación, el peso molecular calculado a partir de la ecuación [I-1] o de las que derivan de ella será un peso molecular medio.

Adams (11, 12) demostró que, para sistemas autoasociantes, la ecuación [I-1] se convierte, en sistemas ideales, en

$$\frac{1}{C} \frac{dC}{dx} = \frac{\omega^2 x \bar{M}_w(x) (1 - \bar{v} \rho)}{RT} \quad [\text{I-12}]$$

donde  $\bar{M}_w$  representa el peso molecular promedio en peso, definido por

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} = \frac{\sum_i m_i M_i}{\sum_i m_i} = \frac{\sum_i C_i M_i}{\sum_i C_i} \quad [\text{I-13}]$$

En la ecuación [I-13],  $M_i$  es el peso molecular de la especie  $i$ ,  $C_i$  su concentración,  $n_i$  el número de moléculas y  $m_i$  la masa de dicha especie.

La ecuación [I-12] puede escribirse alternativamente en la forma

$$\frac{d \ln C}{d(x^2)} = \frac{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2}{2RT} \bar{M}_w(x) \quad [\text{I-14}]$$

En ambos casos,  $\bar{M}_w$  no tiene por qué ser constante a lo largo de la célula, ya que la ecuación que describe el gradiente de concentración puede variar de una especie molecular a otra; de aquí la notación  $\bar{M}_w(x)$ .

Si, como es el caso más general, los solutos no se comportan de modo ideal, el valor experimental de  $\bar{M}_w$  —designado en lo sucesivo como  $\bar{M}_{w,ap}$ — se aproximará al real a medida que la concentración tienda a cero. Para una concentración total  $C$  habrá, pues, que escribir:

$$\frac{d \ln C}{d(x^2)} = \frac{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2}{2RT} \bar{M}_{w,ap} \quad [\text{I-15}]$$

Por otra parte, el coeficiente de actividad de la especie  $i$ ,  $y_i$ , puede evaluarse mediante un desarrollo del tipo (11)

$$\ln y_i = iBM_1C, \quad [\text{I-16}]$$

ya que el peso molecular de la especie  $i$  es igual a  $i$  veces el peso molecular del monómero. En la ecuación [I-16], para simplificar, se han despreciado los términos de la serie en  $C^2$ ,  $C^3$ , etc. En estas condiciones, la relación entre el peso molecular medio real en un punto de la célula situado a distancia  $x$  del eje de giro,  $\bar{M}_w(x)$ , y el aparente,  $\bar{M}_{w,ap}$  viene dada por la ecuación:

$$\frac{M_1}{\bar{M}_{w,ap}} = \frac{M_1}{\bar{M}_w(x)} + BM_1C \quad [\text{I-17}]$$

Y, teniendo en cuenta que  $C = f(x)$  la ecuación [I-17] puede escribirse alternativamente (12):

$$\frac{M_1}{\bar{M}_{w,ap}} = \frac{M_1}{\bar{M}_w(C)} + BM_1C \quad [\text{I-18}]$$

De lo dicho hasta ahora se deduce con facilidad que podrá determinarse experimentalmente  $\bar{M}_{w,ap}$  en función de  $x$  o de  $C$ . En la figura 1 se representa, por ejemplo, el valor de  $\bar{M}_{w,ap}$  de la  $\beta$ -lactoglobulina B en función de la concentración. El hecho de que  $\bar{M}_{w,ap}$  aumente inicialmente con la concentración indica la existencia de autoasociación, mientras que el posterior descenso se debe al comportamiento no ideal del sistema ( $B > 0$ ) (13).

Cálculo de constantes de equilibrio en sistemas autoasociantes.

En lo sucesivo, el tratamiento teórico se circunscribirá al caso de un equilibrio monómero-dímero-trímero. De manera análoga se podrían tratar todos los sistemas autoasociantes definidos.

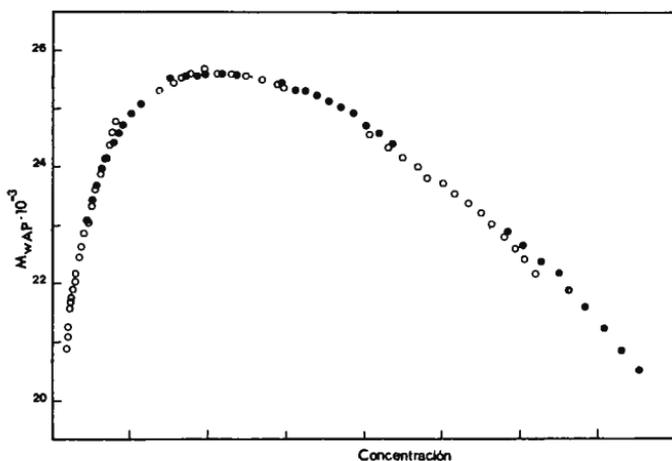


Figura 1.—Variación de  $M_{w,ap}$  con la concentración de  $\beta$ -lactoglobulina B.

En el caso particular citado, el monómero  $P$  está en equilibrio con el dímero,  $2P \rightleftharpoons P_2$ , pero también lo está con el trímero  $3P \rightleftharpoons P_3$ . Cada uno de los equilibrios tendrá, en general, una constante propia, designadas, respectivamente,  $K_2$  y  $K_3$ . Puesto que las tres especies coexisten en el equilibrio, la concentración total de proteína,  $C$ , será la suma de las concentraciones parciales, es decir,  $C = C_1 + C_2 + C_3$ , y admitiendo la relación [I-16] resulta:

$$C = C_1 + K_2 C_1^2 + K_3 C_1^3, \quad [\text{I-19}]$$

por lo que, a partir de [I-14],

$$\begin{aligned} \bar{M}_w(C) &= \frac{C_1 M_1 + K_2 C_1^2 M_2 + K_3 C_1^3 M_3}{C} = \\ &= \frac{M_1(C_1 + 2K_2 C_1^2 + 3K_3 C_1^3)}{C} \end{aligned} \quad [\text{I-20}]$$

Combinando ahora las ecuaciones [I-19] y [I-20] se puede calcular el cociente  $dC_1/C_1$ :

$$\frac{dC_1}{C_1} = \frac{dC}{C_1 + 2K_2C_1^2 + 3K_3C_1^3} = \frac{M_1dC}{C\bar{M}_w(C)} \quad [\text{I-21}]$$

La fracción en peso del monómero en el equilibrio se define como  $f_1 = C_1/C$ , por lo que,

$$dC_1 = f_1dC + Cdf_1, \quad [\text{I-22}]$$

y, teniendo en cuenta [I-21], resulta

$$\frac{d\ln f_1}{d\ln C} = \frac{M_1}{M_w(C)} - 1 \quad [\text{I-23}]$$

e integrando

$$\ln f_1 = \int_0^C \left( \frac{M_1}{M_w(C)} - 1 \right) \frac{dC}{C}. \quad [\text{I-24}]$$

Steiner fue el primero en obtener, en 1952, la ecuación precedente (14), que permite calcular  $f_1$  por integración de la función:

$$\left( \frac{M_1}{M_w(C)} - 1 \right) \frac{dC}{C}.$$

Esto puede hacerse gráficamente, ya que al representar

$$\left( \frac{M_1}{M_w(C)} - 1 \right) / C$$

frente a  $C$ , el valor de  $\ln f_1$  viene dado por el área encerrada bajo la curva entre 0 y  $C$ . Pero debe advertirse que la ecuación [I-24] sólo es válida para sistemas ideales, ya que, en su obtención, se han manejado concentraciones en vez de actividades. Adams y Williams (12) demostraron que, para sistemas no ideales, la ecuación [I-24] se convierte en:

$$\ln f_{1,ap} = \int_0^C \left( \frac{M_1}{M_{w,ap}} - 1 \right) \frac{dC}{C} = \ln f_1 + BM_1C, \quad [\text{I-25}]$$

donde  $f_{1,ap}$  es la fracción en peso aparente del monómero.

Es interesante hacer constar en este momento que  $f_{1,ap}$  puede conocerse a partir de datos experimentales por integración gráfica o numérica de la ecuación [I-25]. El área rayada en la figura 2 sería precisamente

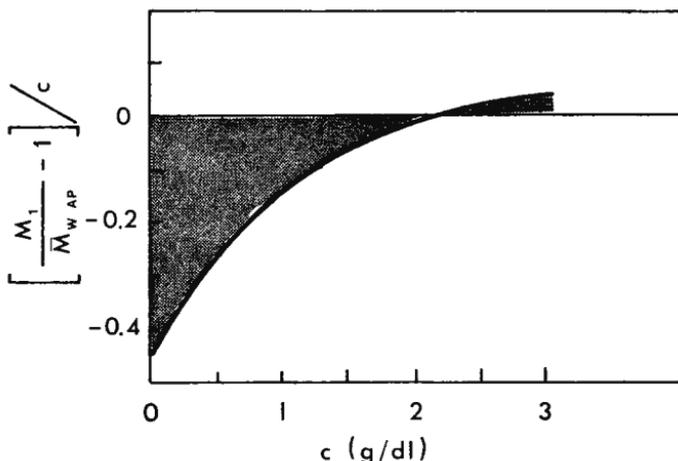


Figura 2.—Cálculo gráfico de  $\ln f_1$ . Véanse los detalles en el texto.

el valor de  $\ln f_{1,ap}$ . La curva se ha construido para un modelo teórico de asociación monómero-dímero-trímero en el que  $K_2 = 0,65$ ,  $K_3 = 0,50$  y  $BM_1 = 0,20$ .

La relación entre  $f_{1,ap}$  y  $f_1$  que aparece en la ecuación [I-25] puede expresarse también en forma exponencial:

$$f_{1,ap} = f_1 e^{BM_1 c} = \frac{C_1}{C} e^{BM_1 c} \quad [I-26]$$

Multiplicando miembro a miembro por  $C$  e introduciendo el valor de la concentración aparente del monómero,  $C_{1,ap}$ , se llega, finalmente, a:

$$C_1 = C_{1,ap} e^{-BM_1 c} \quad [I-27]$$

Para concluir el tratamiento teórico del equilibrio de autoasociación en el caso particular propuesto, es necesario evaluar el cociente  $M_1/\bar{M}_{n,ap}$ , donde  $\bar{M}_n$  es el peso molecular promedio en número, definido como

$$\bar{M}_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum C_i}{\sum (C_i/M_i)} = \frac{C}{\sum (C_i/M_i)} \quad [I-28]$$

Teniendo en cuenta [I-28] y [I-19] se puede llegar a:

$$\frac{CM_1}{\bar{M}_n(C)} = C_1 + \frac{K_2 C_1^2}{2} + \frac{K_3 C_1^3}{3} \quad [I-29]$$

$\bar{M}_n$  es función de  $x$  (o de  $C$ ), por lo que, igual que se hizo al expresar  $\bar{M}_w$ , se emplea la notación  $\bar{M}_n(C)$ .

Por otra parte, apoyándose en la ecuación [I-19], puede calcularse la expresión  $(C/C_1)dC_1$ , que, integrada, se convierte en:

$$\begin{aligned} \int_0^{C_1} \frac{C}{C_1} dC_1 &= \int_0^{C_1} (1 + K_2 C_1 + K_3 C_1^2) dC_1 = \\ &= C_1 + \frac{K_2 C_1^2}{2} + \frac{K_3 C_1^3}{3} \end{aligned} \quad \text{[I-30]}$$

y, a partir de [I-30], [I-29] y [I-21], se puede llegar a:

$$\begin{aligned} C \frac{M_1}{\bar{M}_n(C)} &= \int_0^{C_1} \frac{C}{C_1} dC_1 = \int_0^C \frac{CM_1}{C\bar{M}_w(C)} dC = \\ &= \int_0^C \frac{M_1}{\bar{M}_w(C)} dC \end{aligned} \quad \text{[I-31]}$$

Adams obtuvo en 1965 (15) la ecuación [I-31] que, por razones evidentes, es válida exclusivamente para sistemas ideales. Cuando  $BM_1 \neq 0$  es necesario utilizar  $\bar{M}_{n,ap}$  en vez de  $\bar{M}_n(C)$ , y la ecuación [I-31] debe reemplazarse por (16):

$$\begin{aligned} \int_0^C \frac{M_1}{\bar{M}_{w,ap}} dC &= \int_0^C \frac{M_1}{\bar{M}_w(C)} dC + \frac{BM_1 C^2}{2} = \\ &= \frac{CM_1}{\bar{M}_n(C)} + \frac{BM_1 C^2}{2} = \frac{CM_1}{\bar{M}_{n,ap}} \end{aligned} \quad \text{[I-32]}$$

La cantidad  $CM_1/\bar{M}_{n,ap}$  puede conocerse a partir de datos experimentales por representación gráfica de  $M_1/\bar{M}_{w,ap}$  en función de  $C$  y posterior integración gráfica o numérica entre 0 y  $C$ .

La descripción completa de un sistema autoasociante monómero-dímero-trímero, como el que se ha utilizado como ejemplo hasta ahora, requeriría el cálculo de las constantes de equilibrio  $K_2$  y  $K_3$ . Ninguna de las ecuaciones desarrolladas precedentemente permiten, por sí solas, dicho cálculo, ya que ni el valor de  $C_1$  ni el del coeficiente del virial se pueden determinar experimentalmente de un modo inmediato. Pero, no obstante, la resolución de un sistema adecuado de las ecuaciones anteriores llevará al cálculo de las constantes de equilibrio. Puesto que son cuatro las magnitudes desconocidas, será necesario plantear un

sistema de al menos cuatro ecuaciones. Siguiendo a Adams (16), esto puede realizarse con las ecuaciones [I-18], [I-19], [I-27] y [I-32].

El modo más eficaz de resolver el sistema es eliminar el término en  $K_3C_1^3$  por una adecuada combinación de las ecuaciones [I-18] y [I-19]. Entre la ecuación resultante:

$$3C = 2C_1 + K_2C_1^2 + \frac{1}{\frac{M_1}{C\bar{M}_{w,ap}} - BM_1} \quad [\text{I-33}]$$

la [I-32] y la [I-19] se puede llegar a eliminar el término en  $K_2C_1^2$  para obtener:

$$\frac{6CM_1}{\bar{M}_{n,ap}} - 5C = 2C_1 + 3BM_1C^2 - \frac{1}{\frac{M_1}{C\bar{M}_{w,ap}} - BM_1} \quad [\text{I-34}]$$

La resolución, mediante aproximaciones sucesivas, de un sistema formado por las ecuaciones [I-27] y [I-34], permite calcular las incógnitas  $BM_1$  y  $C_1$ . Una vez conocidos estos valores, el cálculo de  $K_2$  y  $K_1$  resulta inmediato a partir de las ecuaciones [I-33] y [I-19], respectivamente.

#### Análisis de sistemas autoasociantes.

En el apartado anterior se ha descrito uno de los métodos, debido a Adams (16), utilizable para el cálculo de los parámetros de un equilibrio de autoasociación a partir de los datos experimentales obtenidos en una serie de experimentos de equilibrio de sedimentación realizados en un margen de concentraciones suficientemente amplio.

Pero, como es evidente, antes de proceder a dicho cálculo es necesario conocer qué tipo de asociación se da en el equilibrio. Rao y Kegeles realizaron en 1958 el primer análisis de este tipo, estudiando la asociación de la  $\alpha$ -quimotripsina a pH 6,2 (17). Para ello utilizaron ecuaciones semejantes a la [I-14], [I-19], [I-20] y [I-24], y calcularon a partir de ellas y de  $M_1$  —conocido experimentalmente por extrapolación de  $\bar{M}_{w,ap}$  a dilución infinita— los valores de  $\bar{M}_w(C)$  en función de  $C$  para equilibrios de asociación monómero-dímero, monómero-trímero y monómero-dímero-trímero, eligiendo para el cálculo varios valores arbitrarios para  $K_2$  y/o  $K_3$ . La representación gráfica de  $\bar{M}_w(C)$  teórico

y experimental en función de  $C$  se recoge en la figura 3. Puede observarse que los datos experimentales parecen indicar que existen trímeros en el equilibrio, aunque no es posible decidir si se trata de un equilibrio monómero-trímero o monómero-dímero-trímero. La imprecisión del método, unida a las limitaciones impuestas por las ecuaciones elegidas, sólo válidas en sistemas ideales, hace que este procedimiento de análisis no sea aplicable más que como aproximación para describir la naturaleza del equilibrio.

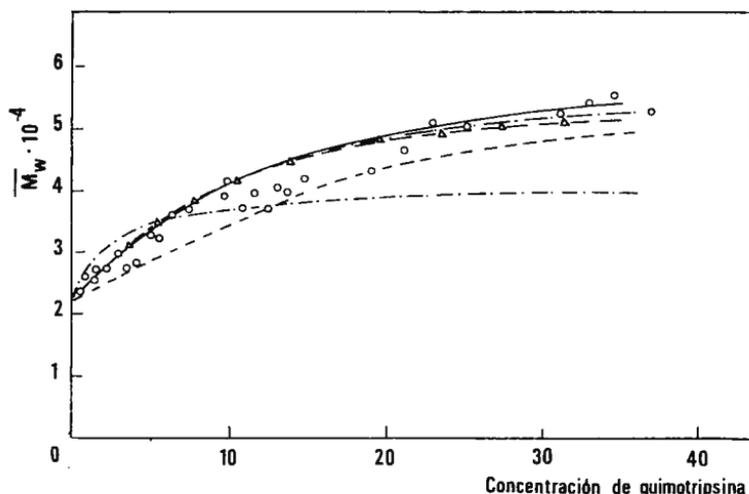


Figura 3.—Puntos experimentales y curvas teóricas de  $\bar{M}_w$  en función de la concentración de quimotripsina; ·····, calculado sólo para dimerización,  $1/K_2 = 2.07$ ; — — — —, calculado sólo para trimerización,  $1/K_3 = 116.7$ ; — · — ·, calculado sólo para trimerización,  $1/K_3 = 56.2$ ; — — — —, calculado sólo para trimerización,  $1/K_3 = 45.0$ ; — Δ —, calculado para trimerización y dimerización,  $1/K_2 = 11.1$  y  $1/K_3 = 4.5$ ; o, puntos experimentales. Reproducido con autorización de Rao y Kegeles (7).

El desarrollo de ecuaciones válidas en sistemas no ideales, como las expuestas en el apartado precedente, han permitido la utilización de métodos más exactos de análisis. Para ello, Adams ha obtenido nuevas ecuaciones, como la que describe el valor de  $M_1^2 \Sigma(C_i/M_i^2)$  (18):

$$M_1^2 \Sigma \frac{C_i}{M_i^2} = C_1 + \frac{K_2 C_1^2}{4} + \frac{K_3 C_1^3}{9} \quad [\text{I-35}]$$

Pero, teniendo en cuenta [I-31], la ecuación [I-35] puede escribirse:

$$\int_0^{C_1} \frac{CM_1}{\bar{M}_n(C)} \frac{dC_1}{C_1} = \int_0^{C_1} \left( 1 + \frac{K_2 C_1}{2} + \frac{K_3 C_1^2}{3} \right) dC_1 = [I-36]$$

$$= C_1 + \frac{K_2 C_1^2}{4} + \frac{K_3 C_1^3}{9} = M_1^2 \Sigma \frac{C_i}{M_i^2}$$

Insertando ahora la ecuación [I-21] en la [I-36], se llega finalmente a

$$M_1^2 \Sigma \frac{C_i}{M_i^2} = \int_0^C \frac{CM_1}{\bar{M}_n(C)} \frac{dC_1}{C_1} = \int_0^C \frac{M_1^2}{\bar{M}_n(C)\bar{M}_w(C)} dC [I-37]$$

que permite evaluar  $M_1^2 \Sigma(C_i/M_i^2)$  por integración gráfica a partir de una representación de  $M_1^2/\bar{M}_n(C)\bar{M}_w(C)$  frente a  $C$ .

Cuando se toma en consideración la no idealidad del sistema, la ecuación [I-37] se convierte, siguiendo de nuevo a Adams (18), en:

$$M_1^2 \left( \Sigma \frac{C_i}{M_i^2} \right)_{ap} = \int_0^C \frac{M_1^2}{\bar{M}_{w,ap}\bar{M}_{n,ap}} dC = C_1 + \frac{K_2 C_1^2}{4} + \frac{K_3 C_1^3}{9} + [I-38]$$

$$+ \frac{BM_1}{2} \int_0^C \frac{CM_1}{\bar{M}_{w,ap}} dC + BM_1 \int_0^C \frac{CM_1}{\bar{M}_{n,ap}} dC - \frac{(BM_1)^2 C^3}{6}$$

La última cantidad que Adams utiliza para su análisis de sistemas autoasociantes es el parámetro  $\psi$  (19), definido por

$$- \psi = \frac{\Sigma C_i M_i^2}{M_1^2} [I-39]$$

Puede verse fácilmente que

$$- \psi = C_1 + 4K_2 C_1^2 + 9K_3 C_1^3 [I-40]$$

y, en sistemas ideales (19),

$$- \psi = \frac{1}{2M_1^2} \frac{d(C\bar{M}_w(C))}{dC} = \frac{C\bar{M}_w(C)\bar{M}_z(C)}{M_1^2}, [I-41]$$

puesto que el peso molecular promedio  $\bar{M}_z$  es, por definición,

$$\bar{M}_z \equiv \frac{\Sigma n_i M_i^3}{\Sigma n_i M_i^2} = \frac{\Sigma C_i M_i^2}{\Sigma C_i M_i} = \frac{\Sigma C_i M_i^2}{C\bar{M}_w} = \frac{d(C\bar{M}_w(C))}{dC} [I-42]$$

La ecuación [I-41] permitiría calcular  $\psi$ , supuesto el comportamiento termodinámico ideal de los componentes del sistema. En sistemas no ideales,  $\psi$  puede calcularse (19) por la ecuación

$$\psi = \frac{\frac{d}{dC} \left( \frac{M_1}{C\bar{M}_{w,ap}} \right)}{\left( \frac{M_1}{C\bar{M}_{w,ap}} - BM_1 \right)^3} = - (C_1 + 4K_2C_1^2 + 9K_3C_1^3) \quad \text{[I-43]}$$

Como se desprende de su examen, el valor de  $\psi$  no puede determinarse directamente a partir de datos experimentales, puesto que es necesario conocer el de  $BM_1$  (\*). Por otra parte, la derivada

$$\frac{d}{dC} \left( \frac{M_1}{C\bar{M}_{w,ap}} \right)$$

ha de calcularse numéricamente (16).

Con todos estos presupuestos teóricos es posible comenzar el análisis numérico de sistemas autoasociantes. Conviene tener presente que, a partir de los resultados experimentales de varias centrifugaciones de equilibrio, se conocen, además de  $M_1$  y  $\bar{M}_{w,ap}$ , los valores de  $CM_1/\bar{M}_{n,ap}$  (cf. pág. 144),  $C_{1,ap}$  (a partir de  $f_{1,ap}$ , ya que  $f_{1,ap} = C_{1,ap}/C$ ),  $M_1^2 \Sigma (C_i/M_i^2)_{ap}$  (por integración gráfica, ecuación [I-38]). Es necesario también hallar los valores numéricos de las integrales que aparecen en el segundo miembro de la ecuación [I-38] y el de la derivada de la ecuación [I-43].

A partir de este momento el análisis se realiza suponiendo presente un tipo de asociación, por ejemplo, monómero-dímero-trímero, y calculando, como se ha indicado en el apartado anterior, los valores de  $BM_1$ ,  $C_1$ ,  $K_2$  y  $K_3$ . Si el equilibrio responde realmente a ese tipo, deben coincidir las magnitudes experimentales indicadas en el párrafo anterior con las calculadas a partir de  $BM_1$ ,  $C_1$ ,  $K_2$  y  $K_3$  empleando las ecuaciones adecuadas.

Es evidente que todas las ecuaciones obtenidas para el caso de una asociación monómero-dímero-trímero serían aplicables a equilibrios del tipo monómero-dímero o monómero-trímero sin más que hacer  $K_3$  o  $K_2$ , respectivamente, iguales a cero. Pero el análisis no

---

(\*) Aunque no se conozca el valor de  $BM_1$ , sí se puede saber su signo. En el caso expuesto en la figura 1, la presencia de un máximo en la representación de  $\bar{M}_{w,ap}$  frente a  $C$  indica que  $BM_1$  es positivo.

tendría éxito caso de existir especies poliméricas de orden superior a tres. Así, pues, en el caso de no hallar una concordancia adecuada entre los datos experimentales y calculados, sería necesario reelaborar todas las ecuaciones incluyendo la posible presencia de tetrámeros, pentámeros, etc. La dificultad práctica de este método de análisis es evidente. Los cálculos y resolución de las ecuaciones planteadas representan el primer escollo a salvar y es conveniente para ello disponer de ordenadores electrónicos. Pero la verdadera limitación del método estriba en el hecho de que, para hallar los parámetros propios de un equilibrio de asociación en el que coexisten  $n$  especies, es necesario utilizar  $n + 1$  ecuaciones diferentes por las razones expuestas previamente. Aun incluyendo en el análisis las ecuaciones que engloban el parámetro  $\psi$ , esta razón hace que no pueda realizarse el análisis cuando coexisten más de cuatro o cinco especies.

Sin embargo, es posible el estudio de sistemas autoasociantes indefinidos por el método de Adams (véase, por ejemplo, la referencia 16). En este caso, como es obvio, no tiene sentido hablar de constantes individuales de equilibrio, y todo lo que el método permite es la evaluación de una constante global intrínseca.

Barclay y Eason (20) han utilizado recientemente este método para estudiar la autoasociación de la histona F2A1 de timo de ternera. Para ello han determinado experimentalmente el cociente  $M_1/\bar{M}_{n,ap}$  para varias concentraciones y, a partir de este dato experimental, hallan el valor de  $6CM_1/\bar{M}_{n,ap} - 5C$  y comparan esta cantidad con la calculada por la ecuación [I-34] o por ecuaciones semejantes. La tabla II recoge los resultados de dicha comparación y de ella se desprende que la asociación de dicha histona sigue un proceso de equilibrio monómero-dímero-tetrámero. Las constantes de equilibrio calculadas son  $K_2 = 0,169$  ml/mg y  $K_4 = 1,237$  ml/mg.

Por otra parte, el método expuesto hasta aquí, debido fundamentalmente a Adams, incluye varias simplificaciones. En primer lugar, se ha supuesto que los volúmenes específicos parciales del monómero y especies poliméricas son iguales y, en la realidad, pueden diferir. En segundo término, si los resultados experimentales se registran con óptica de schlieren o interferométrica, para que tengan validez las ecuaciones propuestas se requiere que la variación del índice de refracción con la concentración sea la misma para cada especie, esto es,

$$(\partial n/\partial C_1)_{T,P} = (\partial n/\partial C_2)_{T,P} = \dots = (\partial n/\partial C)_{T,P}.$$

TABLA II

ANÁLISIS DE LA AUTOASOCIACIÓN DE LA HISTONA F2AI DE TIMO DE TERNERA EN NaCl 0,15 M (20)

Tipo de asociación	c (g/dl)	Valor de $6cM_1/\bar{M}_{n,ap} - 5c$	
		Experimental	Calculado
Monómero-dímero . . . . .	0,15	0,420	0,13
	0,20	0,406	0,372
	0,30	0,220	1,023
	0,50	-0,458	-1,54
Monómero-dímero-trímero . . . . .	0,15	0,30	1,95
	0,20	-2,77	-3,14
	0,30	-5,35	-6,18
Monómero-dímero-tetrámero . . . . .	0,15	-16,0	-16,5
	0,20	-2,37	-2,31
	0,30	-5,11	-5,16
	0,50	-11,8	-10,3
Monómero-trímero . . . . .	0,50	1,8	5,3

Si la ultracentrífuga está equipada con óptica de absorción, debe suceder que los coeficientes de extinción de todas las especies sean iguales.

Estas simplificaciones son necesarias para hacer posible el tratamiento teórico, pero, además, aunque éste es termodinámicamente riguroso, puesto que incluye el posible comportamiento no ideal de los solutos, sólo es válido, en rigor, para un sistema de dos componentes, disolvente y solutos. En un caso real siempre existe un tercer componente al menos, ya que el disolvente no es agua pura, sino una disolución de electrolitos. Los iones presentes pueden tomar parte en el equilibrio de asociación, que estaría entonces incluido, no en el grupo de sistemas autoasociantes, sino en el tipo 4) (ecuación [7]).

Prescindiendo de esta última posibilidad —que, por otra parte, es frecuente (véase, por ejemplo, la referencia 21)—, el tratamiento teórico de los sistemas que incluyen los disolventes mixtos (\*) está bien desarro-

(\*) Siguiendo la terminología de Fujita (3), un disolvente mixto es aquel cuyos componentes se distribuyen de modo no homogéneo, debido al campo centrífugo y a la difusión, en el transcurso de la ultracentrifugación.

llado en el caso de ultracentrifugación de especies macromoleculares no dispersas. La teoría fundamental fue establecida ya en 1958 por Williams y col. (22), y culminó con los trabajos de Casassa y Eisenberg (23). Adams ha aplicado esta teoría al caso de sistemas autoasociantes (15), y puede decirse que el uso de disolventes mixtos no resta validez a las ecuaciones obtenidas anteriormente si las disoluciones de la proteína autoasociante se dializan frente al disolvente mixto antes de la ultracentrifugación, y los volúmenes específicos parciales se determinan por referencia al medio externo de la diálisis.

#### Otros métodos de análisis numérico de sistemas autoasociantes.

El método expuesto en apartados precedentes es, sin duda, el más riguroso, a pesar de las limitaciones indicadas. No obstante, se han propuesto otros tratamientos teóricos que, aunque no gocen de la validez general del de Adams, presentan algunos rasgos peculiares que les hacen de más fácil aplicación en casos particulares.

Derechin (24) propuso un método de análisis de sistemas autoasociantes ideales en el que la relación funcional entre  $\bar{M}_w(C)$  y  $\bar{M}_n(C)$  se expresa en términos de una serie de potencias sucesivas de  $C$ , haciendo uso del teorema de McLaurin, y se evita el cálculo de la fracción en peso del monómero. Posteriormente, el mismo autor extendió su teoría a sistemas no ideales (25). En este caso, como en el método de Adams, la primera magnitud determinada a partir de los datos experimentales es  $BM_1$ . El desarrollo en serie evita el empleo de aproximaciones sucesivas que, en el método de Adams, era necesario para resolver el sistema formado por las ecuaciones [I-27] y [I-34], pero, por el contrario, es necesario conocer el orden del último término de la serie, es decir, el orden de agregación de la especie polimérica mayor. Quizá la mayor ventaja del término de Derechin estribe en el hecho de que, en un equilibrio como el representado por la ecuación [2], el desarrollo en serie de  $\bar{M}_n(C)$  viene dado por

$$\frac{M_1 C}{M_n(C)} = \sum_{i=1}^p \frac{K_i}{i} C^i,$$

donde  $p$  representa el orden máximo de asociación. Esto permite extender, sin más, la teoría al caso de asociaciones indefinidas.

Si el sistema autoasociante se desvía poco de la idealidad termodinámica, el empleo del tratamiento teórico de Haschemeyer y Bowers (26). Dicho

tratamiento se basa en el hecho de que la concentración de las especies macromoleculares crece exponencialmente con  $x$  una vez alcanzado el equilibrio. Generalizando la ecuación [I-1] para el componente  $i$  de un sistema de varios componentes se tendría:

$$\frac{d \ln C_i(x)}{d(x^2)} = \frac{\omega^2 M_i (1 - \bar{v}_i \rho)}{2RT} \equiv H_i. \quad [\text{I-45}]$$

Si la ecuación [I-45] se integra entre la posición correspondiente al menisco,  $x_m$ , y otro punto cualquiera de la célula, resulta

$$C(x) = \sum_i C_i(x_m) e^{H_i(x^2 - x_m^2)} \quad [\text{I-46}]$$

En el caso de un sistema autoasociante  $M_i = iM_1$  y si se supone que el volumen específico parcial del polímero es igual al del monómero, la ecuación [I-46] se puede escribir:

$$C(x) = \sum_i C_i(x_m) e^{iH(x^2 - x_m^2)} \quad [\text{I-47}]$$

y como  $C_i = K_i C_1^i$

$$C(x) = \sum_i K_i C_1^i(x_m) e^{iH(x^2 - x_m^2)} \quad [\text{I-48}]$$

La masa total de soluto,  $m$ , debe conservarse a lo largo de la ultracentrifugación. Evidentemente, para una célula de volumen  $V$ ,  $m = VC_0$ , siendo  $C_0$  la concentración total inicial y  $V = \int_{x_m}^{x_b} x dx$ , donde  $x_b$  representa la distancia del fondo de la célula al eje de giro.

Según Adams (27), para sistemas autoasociantes

$$C_0 = \sum_i C_1^i(x_m) K_i \frac{e^{iH(x_b^2 - x_m^2)} - 1}{(x_b^2 - x_m^2) iH} \quad [\text{I-49}]$$

y a partir de esta ecuación y la [I-48] se puede llegar a expresiones para  $K_i$  que Haschemayer y Bowers (26) resuelven, a partir de los datos experimentales, por el método iterativo de McCalla (28), utilizando una adecuada expansión en serie de Taylor y un programa LTDC (linear Taylor differential correction).

El método de análisis exponencial de Haschemayer y Bowers presenta la ventaja de su sencillez experimental, aunque la resolución de las ecuaciones planteadas sólo es posible en sistemas asociantes discretos cuando el número de especies presentes es relativamente pequeño, y requiere, en todo caso, la utilización de ordenadores elec-

trónicos. Por otra parte, como ya se ha comentado, las ecuaciones desarrolladas sólo son válidas en sistemas ideales o próximos a la idealidad.

#### Análisis gráfico de sistemas autoasociantes.

Los métodos numéricos de análisis de sistemas autoasociantes requieren en todos los casos un cálculo laborioso que, de ordinario, sólo puede resolverse mediante una adecuada programación. Sin embargo, Chun y Kim diseñaron en 1970 un método gráfico rápido para determinar el número y orden de especies poliméricas presentes en el equilibrio (29).

Si en un sistema autoasociante se desprecia el valor de  $BM_1$ , dividiendo miembro a miembro por  $M_1$  en la ecuación [I-14] se tendría:

$$\frac{\bar{M}_{w,ap}}{M_1} = \frac{1}{M_1} \sum_i \frac{C_i M_i}{C} = \sum_i f_i, \quad [\text{I-50}]$$

donde  $f_i$  representa la fracción en peso del componente  $i$  en el equilibrio (\*).

Análogamente, de [I-28] se obtendría:

$$\frac{M_1}{\bar{M}_{n,ap}} = \frac{M_1 \sum_i (C_i/M_i)}{C} = \sum_i (f_i/i) \quad [\text{I-51}]$$

Haciendo, para simplificar,  $\bar{M}_{w,ap}/M_1 = m_w$  y  $M_1/\bar{M}_{n,ap} = 1/m_n$ , en un equilibrio en el que sólo coexista una especie polimérica de orden  $n$  con el monómero, la ecuación [I-50] se puede escribir:

$$m_w = - (n - 1)f_1 + n, \quad [\text{I-52}]$$

ya que, evidentemente,  $\sum_i f_i = 1$ .

Por otra parte, las ecuaciones [I-50] y [I-51] dan origen a

$$m_w = - \frac{n}{m_n} + n + 1 \quad [\text{I-53}]$$

Al representar  $m_w$  en ordenadas y  $f_1$  en abscisas, la ecuación [I-52] da origen a un haz de rectas que confluyen en un punto de coordenadas

(\*) El sistema puede no ser ideal, y por eso se emplea la notación  $\bar{M}_{w,ap}$ , aunque, para simplificar el tratamiento, se haya hecho  $BM_1 = 0$ .

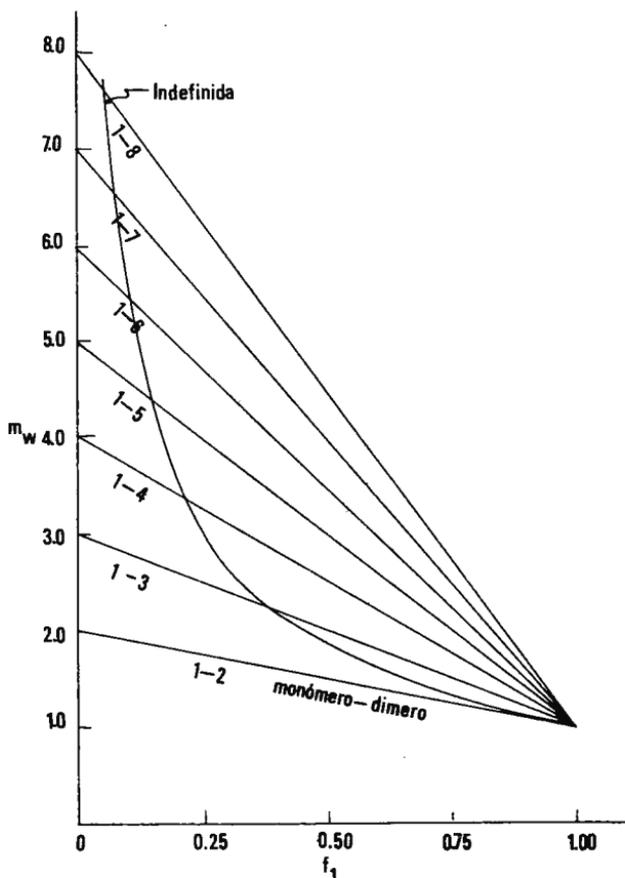


Figura 4.—Representación de  $m_w$  frente a  $f_1$ . Reproducido con autorización de Chun y Kim (29).

$m_w = 1$  y  $f_1 = 1$ , de pendiente  $-(n - 1)$  y ordenada en el origen  $n$  (fig. 4). Análogamente, la ecuación [I-53], en un sistema de  $m_w$  frente a  $1/m_n$ , representa otro haz de rectas descendentes, de pendiente  $-n$  y ordenada en el origen  $n + 1$  (fig. 5). Finalmente, las ecuaciones [I-51] y [I-52] pueden combinarse para dar:

$$\frac{1}{m_n} = \left(1 - \frac{1}{n}\right)f_1 + \frac{1}{n}, \quad [\text{I-54}]$$

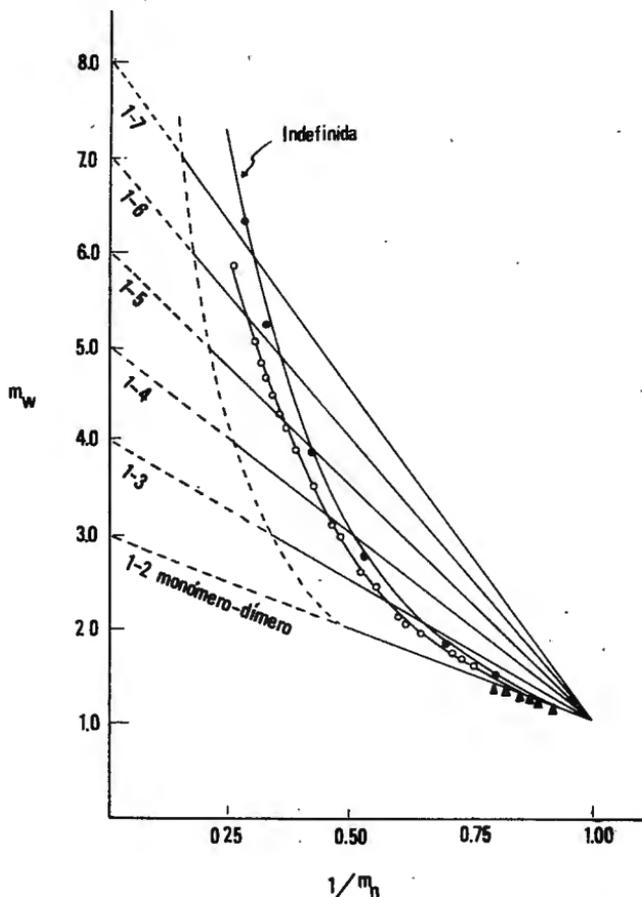


Figura 5.—Representación de  $m_w$  en función de  $1/m_n$ . Se han representado los datos experimentales correspondientes a lisozima ▲(30) y glutamato deshidrogenasa (31): ● considerando el soluto ideal; ○ teniendo en cuenta la no idealidad del soluto. Reproducido con autorización de Chun y Kim (29).

y al representar  $1/m_n$  en función de  $f_1$ , la ecuación [I-54] dará origen a otro haz de rectas de pendiente  $1 - 1/n$  y ordenada en el origen  $1/n$  (fig. 6).

Las magnitudes  $f_1$ ,  $m_n$  y  $m_w$  pueden determinarse a partir de los resultados experimentales de una serie de ultracentrifugaciones de equilibrio, como se ha discutido anteriormente, por lo que las representaciones gráficas indicadas en las figuras 4, 5 y 6 constituyen un medio de inves-

tigar la naturaleza de equilibrios del tipo  $nP \rightleftharpoons P_n$ . En la figura 5 se incluyen datos experimentales correspondientes a la lisozima y a la L-glutamato deshidrogenasa de hígado. El modo de asociación resulta patente después de examinar dicha figura.

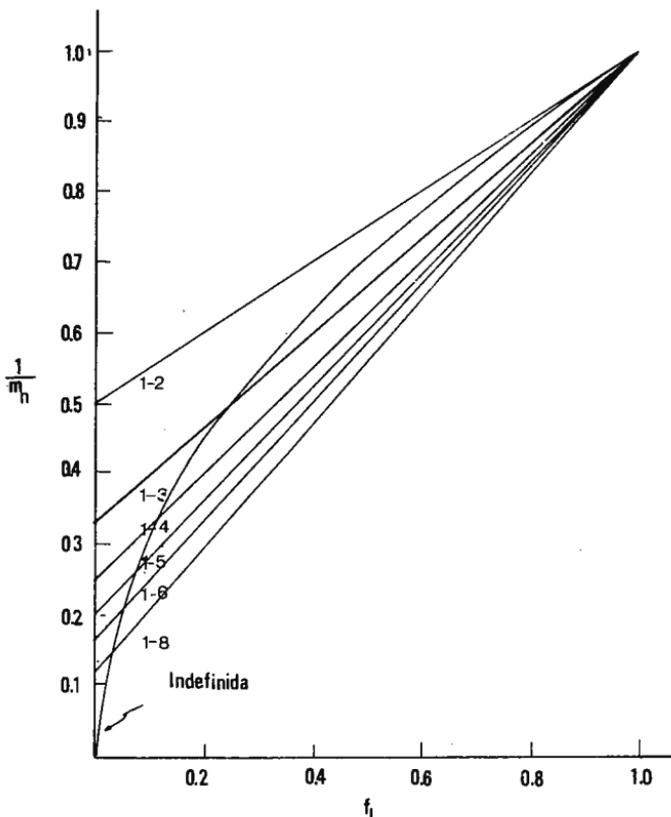
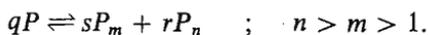


Figura 6.—Representación de  $m_n$  en función de  $f_1$ . Reproducido con autorización de Chun y Kim (29).

Cuando en el equilibrio coexisten varias especies poliméricas con el monómero, los puntos experimentales no se ajustan a ninguna de las rectas de las figuras 4, 5 y 6. Chun y Kim (29) han desarrollado también un método gráfico para el análisis de sistemas autoasociantes del tipo



En estos casos, de las ecuaciones [I-50] y [I-51] se puede obtener:

$$\frac{1}{m_n} = f_1 + \frac{f_m}{m} + \frac{f_n}{n}, \quad [\text{I-55}]$$

donde  $f_m$  y  $f_n$  representan las fracciones en peso de los polímeros de orden  $m$  y  $n$  respectivamente y, por tanto,

$$f_1 + f_m + f_n = 1 \quad [\text{I-56}]$$

Análogamente,

$$m_w = f_1 + mf_m + nf_n, \quad [\text{I-57}]$$

y combinando las ecuaciones [I-55], [I-56] y [I-57] para eliminar  $f_n$  y  $f_m$  se obtiene:

$$m \left( \frac{n}{m_n} - 1 \right) - (n - m_w) = (m - 1)(n - 1)f_1. \quad [\text{I-58}]$$

Despejando ahora el valor de  $f_1$ ,

$$f_1 = \frac{1}{(m - 1)(n - 1)} \left[ m_w + \frac{mn}{m_n} - m - n \right], \quad [\text{I-59}]$$

y diferenciando se llega a

$$\frac{dm_w}{df_1} = -mn \left[ \frac{d(1/m_n)}{df_1} \right] + (m - 1)(n - 1). \quad [\text{I-60}]$$

Del examen de la ecuación [I-60] se desprende que al representar gráficamente  $dm_w/df_1$  en función de  $d(1/m_n)/df_1$ , se obtendrá una familia de haces de rectas de ordenada en el origen  $(m - 1)(n - 1)$  y de pendiente  $-mn$ . Como fácilmente puede verse, el punto de corte de las rectas de cada haz tiene como coordenadas

$$\frac{dm_w}{df_1} = \sum_i i \frac{df_i}{df_1} = -(m - 1) \quad [\text{I-61}]$$

$$\frac{d(1/m_n)}{df_1} = \sum_i \frac{1}{i} \frac{df_i}{df_1} = 1 - \frac{1}{m} \quad [\text{I-62}]$$

El conjunto de las ecuaciones [I-60] y [I-61] son la expresión, en forma paramétrica, del lugar geométrico de los puntos de intersección de los diversos haces, y describe una parábola (fig. 7). En una representación gráfica como la de esta figura, el tipo de asociación se obtiene

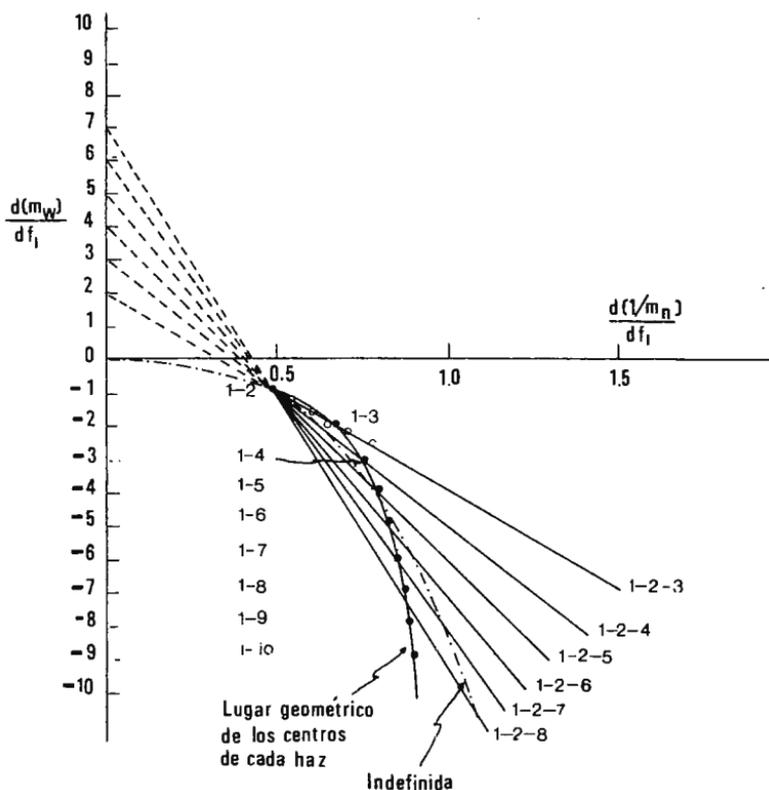


Figura 7.—Representación de  $d(m_w)/df_1$  en función de  $\frac{d(1/m_n)}{df_1}$ . Reproducido con autorización de Chun y Kim (29).

determinando primero  $m$  (a partir del punto de intersección de la recta experimental con la parábola descrita por [I-60] y [I-61] y, posteriormente,  $n$ , utilizando, bien el valor de la pendiente, bien el de la ordenada en el origen de la recta experimental.

Recientemente se ha extendido este método de análisis gráfico de asociaciones a sistemas no ideales (32). El tratamiento previo es, evidentemente, más complejo que para sistemas ideales, pero permite identificar el orden de las especies presentes en el equilibrio (hasta un máximo de tres especies incluido el monómero) mediante un método gráfico sencillo. Es también posible la evaluación gráfica del término  $BM_1$ , así como el análisis de sistemas autoasociantes indefinidos.

## B) ESTUDIO DE ASOCIACIONES PROTEÍNA-LIGANDO

Los equilibrios de asociación de proteínas con ligandos de bajo peso molecular representados por las ecuaciones [5] o [6] sólo pueden estudiarse por técnicas de equilibrio de sedimentación en casos particulares. De ordinario, el peso molecular del complejo  $PA_n$  difiere poco del de la proteína, y los métodos analíticos no son lo suficientemente sensibles para aprovechar tales diferencias en el estudio de la asociación.

Sin embargo, la utilización, cada vez más frecuente, de la óptica de absorción en las ultracentrífugas analíticas permite un adecuado estudio de la asociación proteína-ligando por equilibrio de sedimentación cuando el ligando presenta absorción a longitudes de onda distintas de las de la proteína. Este es el fundamento del método de Steinberg y Schachman (33), que dichos autores han aplicado con éxito al estudio de las interacciones entre la seroalbúmina y el naranja de metilo.

Como se ha advertido anteriormente, en un equilibrio del tipo representado por la ecuación [6], cada etapa de la asociación tiene una constante de equilibrio,  $k_i$ , que puede diferir de las demás.

Para la etapa  $i$ , el valor de dicha constante de equilibrio sería:

$$k_i = \frac{[PA_i]}{[PA_{i-1}][A]}, \quad [I-63]$$

donde  $[PA_i]$ ,  $[PA_{i-1}]$  y  $[A]$  representan las concentraciones molares de  $PA_i$ ,  $PA_{i-1}$  y A libre, respectivamente. En el equilibrio, la concentración total del ligando viene dada por:

$$C_A = [A] + \sum_{i=1}^n i[PA_i].$$

De ordinario, la unión de ligandos a proteínas se expresa como la relación entre el número de moles de A unido por mol de proteína total. Esta relación,  $r$ , será, pues,

$$r = \frac{C_A - [A]}{C} = \frac{\sum_{i=1}^n i[PA_i]}{C}, \quad [I-65]$$

donde  $C$  representa la concentración total de proteína. La ecuación [I-64] puede, por consiguiente, escribirse como

$$C_A = [A] + rC. \quad [I-66]$$

Teniendo en cuenta que  $C = \sum_{i=0}^n [PA_i]$  y aplicando la ecuación de equilibrio para cada paso se puede expresar  $r$ , de acuerdo con Klotz (34), como función de las constantes de equilibrio y de  $[A]$ :

$$r = \frac{k_1[A] + 2k_1k_2[A]^2 + \dots + ik_1k_2\dots k_i[A]^i + \dots + nk_1k_2\dots k_n[A]^n}{1 + k_1[A] + k_1k_2[A]^2 + \dots + k_1k_2\dots k_i[A]^i + \dots + k_1k_2\dots k_n[A]^n} = \frac{\sum_{i=1}^n ik_1k_2\dots k_i[A]^i}{1 + \sum_{i=1}^n k_1k_2\dots k_i[A]^i} \quad [I-67]$$

En la proteína habrá  $n$  posibles puntos de unión al ligando. Si todos ellos son equivalentes e independientes, es decir, si una vez ocupados  $i$  lugares el ligando  $i + 1$  no tiene preferencia por ninguno de los  $n - 1$  lugares libres, pueden expresarse los valores de  $k_i$  en función de  $i$ ,  $n$  y una constante de equilibrio intrínseca,  $k$ :

$$k_i = \frac{n - (i - 1)}{i} k \quad [I-68]$$

La introducción de este valor de  $k_i$  simplifica notablemente la ecuación [I-67] para llegar a:

$$r = \frac{nk[A]}{1 + k[A]} \quad [I-69]$$

Si un sistema proteína-ligando en equilibrio se somete a ultracentrifugación hasta alcanzar el equilibrio de sedimentación a velocidades relativamente bajas (equivalentes a  $10^4 \times g$ ) la proteína libre y los complejos  $PA_i$  se distribuirán en gradiente a lo largo de la célula, mientras que la concentración del ligando libre continuará siendo prácticamente constante e independiente de la distancia al eje de giro. Pero, al mismo tiempo que se establece el equilibrio de sedimentación, el equilibrio químico, representado en general por  $P + iA \rightleftharpoons PA_i$  debe continuar teniendo lugar. El cambio de  $C$  a lo largo de la célula obligará a que se establezca un gradiente de  $C_A$  por más que  $[A]$  sea constante.

La condición de equilibrio químico puede expresarse en función de los potenciales químicos de la proteína, del ligando y del complejo  $-\mu_P, \mu_A$  y  $\mu_{PA_i}$ , respectivamente— y de los pesos moleculares, es decir,

$$M_P\mu_P + iM_A\mu_A = M_{PA_i}\mu_{PA_i} \quad [I-70]$$

Al mismo tiempo, las condiciones de equilibrio de sedimentación serían:

$$d\mu_P - \omega^2 x dx = 0 \quad [I-71]$$

$$d\mu_A - \omega^2 x dx = 0 \quad [I-72]$$

Diferenciando la ecuación [I-70], introduciendo los valores de  $d\mu_P$  y  $d\mu_A$  dados por [I-71] y [I-72] y teniendo en cuenta que  $M_{PA_i} = M_P + iM_A$  se llega a:

$$d\mu_{PA_i} - \omega^2 x dx = 0. \quad [I-73]$$

La ecuación [I-73] es importante, puesto que, por su forma, representa el equilibrio de sedimentación del complejo  $PA_i$ . Teniendo en cuenta que dicha ecuación se ha obtenido a partir de las condiciones de equilibrio químico y de equilibrio de sedimentación de proteína y ligan-

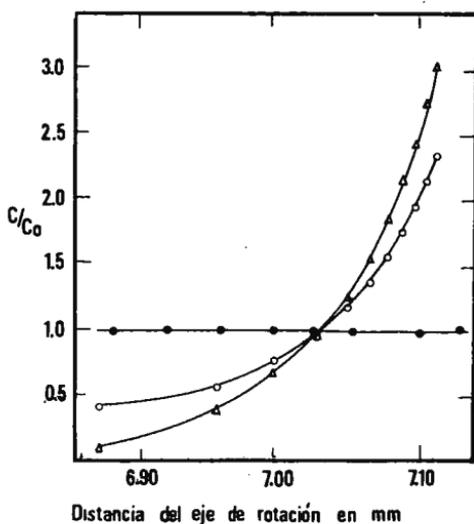


Figura 8.—Equilibrio de sedimentación del sistema seroalbúmina-naranja de metilo. La figura representa los resultados de Steinberg y Schachman (33) obtenidos con una concentración inicial de albúmina de 4 mg/ml y de naranja de metilo de  $7,8 \cdot 10^{-5} M$ , a una velocidad de 12.590 rpm. La concentración de proteína ( $\Delta$ ) se ha determinado por óptica interferométrica, y la de naranja de metilo ( $\circ$ ) por absorbancia a 440 nm. La distribución de naranja de metilo en ausencia de proteína viene indicada por  $\bullet$ . En ordenadas se representa el cociente entre  $C(x)$  y la concentración inicial  $C_0$ . Reproducida con autorización de Steinberg y Schachman (33).

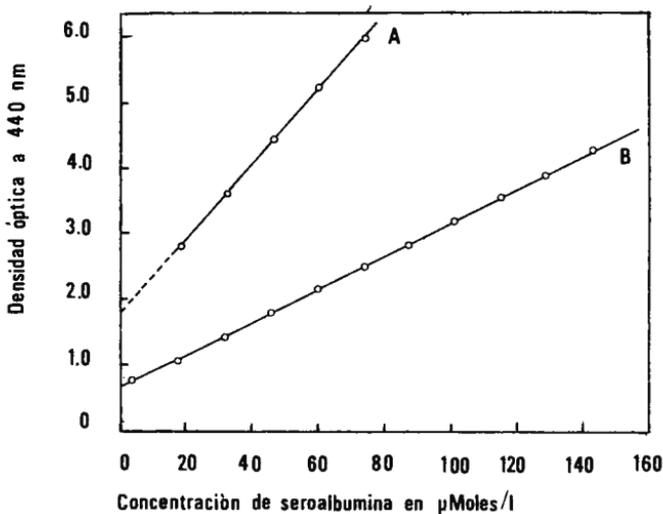


Figura 9.—Relación entre las concentraciones de naranja de metilo y seroalbúmina en el equilibrio de sedimentación. Concentraciones iniciales: A) proteína 46,5  $\mu\text{moles/l}$ ; naranja de metilo 188,8  $\mu\text{moles/l}$ . B) 46,5 y 75,3  $\mu\text{moles/l}$  respectivamente. Reproducido con autorización de Steinberg y Schachman (33).

do, su significado es que el equilibrio químico se mantiene a lo largo de toda la célula. En otras palabras, la ecuación [I-66] puede aplicarse a cualquier punto de la célula, es decir,

$$C_A(x) = [A] + rC(x) \quad [\text{I-74}]$$

La figura 8 muestra el resultado de un experimento de equilibrio de sedimentación de una mezcla de seroalbúmina y naranja de metilo. La concentración total del colorante,  $C_A$ , se ha determinado mediante absorción a 440 nm, mientras que la concentración de proteína,  $C$ , se ha estimado con óptica interferométrica. La ecuación [I-74] pone de manifiesto que, al representar gráficamente  $C_A(x)$  frente a  $C(x)$ , se obtiene una línea recta cuya ordenada en el origen es  $[A]$  y cuya pendiente es  $r$ . En la figura 9 se puede observar que los puntos experimentales se ajustan perfectamente a una recta para dos valores de concentraciones relativas de proteína y ligando.

Los valores de  $[A]$  y  $r$ , obtenidos de la figura 9, son función de las concentraciones relativas de seroalbúmina y naranja de metilo. Si el expe-

rimento se realiza para varias concentraciones relativas, es posible conocer  $n$  y  $k$ . Para ello, la ecuación [I-69] puede expresarse:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk[A]}, \quad [\text{I-75}]$$

y representando  $1/r$  en función de  $1/[A]$ , se obtendría el valor de  $n$  a partir de la ordenada en el origen y, posteriormente, el de  $k$ , a partir de la pendiente de la recta obtenida, con lo que todos los parámetros de la asociación quedan determinados.

Con algunas variantes (33), el tratamiento teórico anterior puede extenderse al caso en que el peso molecular del ligando sea lo suficientemente grande para que el ligando libre pueda también distribuirse en gradiente por efecto del campo centrífugo.

## 2. Dispersión de luz

La dispersión de luz es una técnica que permite el cálculo del peso molecular de macromoléculas y, si éstas son suficientemente grandes, puede además utilizarse para calcular el radio de giro, magnitud relacionada con la forma y dimensiones de la macromolécula. La teoría básica de la dispersión de la luz data de finales del siglo pasado y puede tratarse desde un punto de vista molecular, termodinámico o teniendo en cuenta la teoría de las fluctuaciones. Los detalles de estos tratamientos caen fuera del alcance de este libro y pueden encontrarse, en sus líneas más generales, en la revisión de Van Holde (35) o, con más detalle, en el artículo de Timasheff y Townend (36).

Si la máxima dimensión de la macromolécula es menor que  $\lambda/10$ , siendo  $\lambda$  la longitud de onda de la luz empleada, el peso molecular  $M$  está relacionado con las magnitudes determinables por dispersión de luz por la ecuación

$$\frac{\mathcal{K}C}{R_{\theta}} = \frac{1}{M} + 2BC + \dots \quad [\text{I-76}]$$

En esta ecuación  $\mathcal{K}$  es una constante óptica, función del índice de refracción del disolvente,  $n_0$ , y del de la disolución de la macromolécula,  $n$ , de su concentración,  $C$ , del número de Avogadro  $N$  y de la longitud de onda de la luz utilizada:

$$\mathcal{K} = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/dC)^2}{N\lambda^4} \quad [\text{I-77}]$$

$R_\theta$ , que aparece también en la ecuación [I-76], es la relación de Rayleigh, que liga la intensidad de la luz incidente  $I_0$  con la de la luz dispersada a un ángulo  $\theta$ ,  $i_\theta$ , y la distancia  $r$  de la célula al fotomultiplicador

$$R_\theta = \frac{i_\theta}{I_0} \frac{r^2}{1 + \cos^2 \theta} \quad [\text{I-78}]$$

La ecuación [I-76] incluye un término,  $2BC$ , para dar cuenta del comportamiento no ideal del soluto y permite calcular  $M$  midiendo  $R_\theta$  a varias concentraciones y extrapolando a dilución infinita en una representación gráfica de  $\mathcal{K}C/R_\theta$  en función de  $C$ .

Si las dimensiones de la macromolécula son comparables con  $\lambda$  (en proteínas esta situación se da sólo en algunos casos, como el de la miosina y el colágeno), la ecuación [I-76] se convierte en:

$$\begin{aligned} \frac{\mathcal{K}C}{R_\theta} &= \frac{1}{1 - (16\pi^2 R_G^2 / 3\lambda^2) \sin^2(\theta/2)} \left[ \frac{1}{M} + 2BC \right] \simeq \\ &\simeq \left[ 1 + \frac{16\pi^2 R_G^2}{3\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} \right] \left[ \frac{1}{M} + 2BC \right] \quad [\text{I-79}] \end{aligned}$$

donde  $R_G$  es el radio de giro de la macromolécula, y los demás símbolos tienen el significado ya expuesto. La ecuación [I-79] fue utilizada en primer lugar por Zimm (37) para calcular  $M$ . Para ello se representa  $\mathcal{K}C/R_\theta$  en función de  $\sin^2(\theta/2) + kC$  (\*) y se extrapola doblemente a  $C = 0$  y  $\theta = 0$ .

Si la disolución contiene una mezcla de macromoléculas, el valor de  $M$  que se obtiene, según los casos, de las ecuaciones [I-76] o [I-79] es el promedio en peso,  $\bar{M}_w$ . Este es el fundamento de la utilización de las técnicas de dispersión de luz en el estudio de las asociaciones moleculares. Por ejemplo, para un sistema  $nP \rightleftharpoons P_n$ , la constante de equilibrio puede calcularse a partir de

$$K_n = \frac{1 - f_1}{C^{n-1} f_1^n} = \frac{(1 - f_1) M_1^{n-1}}{n f_1^n c^{n-1}}, \quad [\text{I-80}]$$

donde  $c$  representa la concentración total en peso de la proteína, y los demás símbolos tienen el significado indicado en la sección I.1.

---

(\*)  $k$  es una constante arbitraria cuyo objeto es ajustar la escala a un margen adecuado para la representación gráfica.

Como se indicó anteriormente, suponiendo la idealidad del sistema,  $f_1$  puede determinarse a partir de la ecuación [I-24] si se conocen, por dispersión de luz, los valores de  $\bar{M}_w$  en función de  $C$ . El grado de asociación, necesario para completar el cálculo de  $K_n$  por la ecuación [I-80], se puede evaluar a partir de la expresión:

$$f_1 = \frac{nM_1 - \bar{M}_w}{(n-1)M_1}, \quad [\text{I-81}]$$

que se obtiene fácilmente teniendo en cuenta la definición de  $\bar{M}_w$  (ecuación [I-14]).

Townend y Timasheff (38) calcularon las constantes de equilibrio y grado de asociación de la  $\beta$ -lactoglobulina por dispersión de luz. El caso presenta una dificultad adicional, ya que dicha proteína se presenta como mezcla de dos variantes genéticas, A y B, capaces de agregar o no según las condiciones experimentales. En el medio utilizado por dichos autores sólo es capaz de agregar la variante B. Si  $y$  representa la fracción

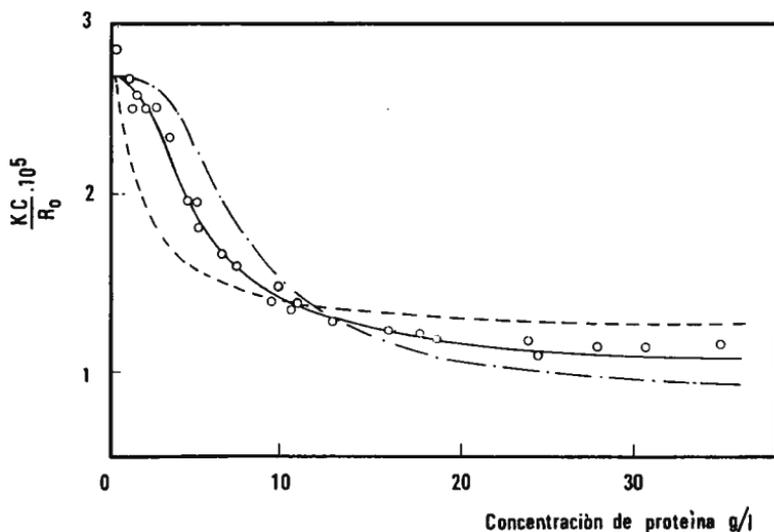


Figura 10.—Determinación del grado de asociación de  $\beta$ -lactoglobulina AB. Líneas teóricas: ———, monómero-tetrámero; - - - - -, monómero-trímero; - · - · - ·, monómero-pentámero. Obsérvese la concordancia entre los puntos experimentales (O) y la curva correspondiente al equilibrio monómero-tetrámero. Reproducida con autorización de Townend y Timasheff (38).

en peso de la  $\beta$ -lactoglobulina B en la mezcla, y  $\alpha$  la fracción en peso de esa especie agregada, la constante de equilibrio viene dada (39) por:

$$K_n = \frac{\alpha M_1^{n-1}}{n(1-\alpha)^n y^{n-1} c^{n-1}} \quad [I-82]$$

teniendo en cuenta que, en este caso,

$$\bar{M}_w = M_1 [1 + (n-1)y\alpha] \quad [I-83]$$

y conociendo  $\alpha$ , a partir de los resultados experimentales pueden evaluarse  $n$  y  $K_n$ . En la figura 10 se recogen los resultados de Townend y Timasheff (38) junto con las curvas teóricas calculadas para distintos valores de  $n$ . Puede verse que la asociación de la  $\beta$ -lactoglobulina en esas condiciones puede describirse en términos de un equilibrio monómero-tetramero.

La dispersión de luz se puede aplicar también al estudio de sistemas autoasociantes cuando el número de especies poliméricas es mayor de uno (36), pero no presenta la validez general de la ultracentrifugación para el análisis de dichos sistemas. Las dificultades experimentales suelen ser, por otra parte, mayores.

### 3. Técnicas espectroscópicas

#### A) INTRODUCCIÓN

Cada día adquieren mayor importancia los estudios espectroscópicos sobre moléculas de origen biológico, con el fin de adquirir sobre ellas, no solamente información estructural, sino también conocimiento sobre los procesos de asociación en que pueden intervenir. Este estudio es fundamentalmente importante en proteínas, a cuya estructura terciaria y cuaternaria se puede llegar por otras técnicas, tal como difracción de rayos X, pero que, con la utilización de determinadas espectroscopías, se pueden observar particularidades más definidas de las moléculas, sobre todo en procesos en los cuales se verifica alguna modificación y en asociaciones moleculares. Además, la mayoría de estas técnicas actúan sobre disoluciones, por lo que las condiciones son mucho más aproximadas al estado «in vivo» y, por consiguiente, más fácil su extrapolación.

Es interesante analizar cada una de las técnicas espectroscópicas más usuales en el estudio de asociación de proteínas, bien entre sí, bien a pequeñas moléculas, proponiendo los ejemplos más clarividentes hasta ahora investigados, con lo que se pretende dar una visión clara del campo, así como de sus propios límites de utilización.

Se hace necesario, por otra parte, una pequeña descripción teórica, lo más cualitativa posible, de cada una de las técnicas, aunque en todo caso se hará referencia a las fuentes donde se pueda encontrar una mayor información sobre este aspecto.

En general, la espectroscopía es un proceso de obtención de una información sobre una molécula, como consecuencia de la interacción de una onda electromagnética y la materia, que debe de tener alguna propiedad que interfiera con la radiación (ser vector eléctrico o magnético), dependiente de la longitud de onda aplicada.

## B) RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

En la RMN es el momento magnético del núcleo atómico el que interacciona con el vector magnético de la radiación.

Para que en un núcleo pueda tener lugar el fenómeno de la Resonancia Magnética Nuclear, es necesario que su número cuántico de espín (denominado generalmente como  $I$ ) sea distinto de cero. El  $^1\text{H}$  tiene un valor de  $I$  igual a  $1/2$ . Este número cuántico de espín nuclear resulta de la interacción de todos sus neutrones y protones.

Como consecuencia del número cuántico de espín distinto de cero, aparece en el núcleo un momento angular orbital, cuya magnitud está relacionada con  $I$  de una forma simple, según se expresa en la ecuación [I-84].

$$J = \hbar [I(I + 1)]^{1/2}, \quad \text{[I-84]}$$

donde  $J$  es la magnitud del momento angular orbital y  $\hbar$  es  $h/2\pi$ , siendo  $h$  la constante de acción de Planck.

---

(\*) Para un amplio desarrollo de esta técnica, consúltense las obras indicadas en las citas 40, 41 y 42.

Este momento angular puede presentar distintas orientaciones en el espacio, si bien dichas orientaciones no son arbitrarias y están bien determinadas entre sí, siendo su número de  $2I + 1$ .

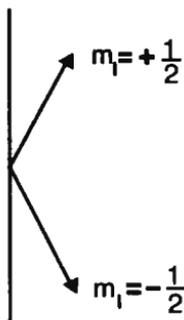


Figura 11.—Orientación en el espacio del momento angular del protón.

Para un protón, cuyo  $I$  es igual a  $1/2$ , se tendrá, por tanto, dos orientaciones distintas en el espacio de su momento angular, tal como se representa en la figura 11. Pero al ser los núcleos partículas cargadas, se produce un momento magnético como consecuencia del momento angular. Cada momento angular de distinta orientación, aunque tenga idéntica intensidad, dará lugar a un determinado momento magnético. Para el caso concreto del protón (núcleo de  $^1\text{H}$ ) se tendrían, por tanto, dos momentos magnéticos. En un sistema aislado, ambos estados estarán degenerados, o, lo que es lo mismo, tendrán la misma energía. La probabilidad de que un protón se encuentre en uno u otro estado es exactamente la misma. Luego, en principio, no habría posibilidad de obtener ninguna información al hacer interaccionar una onda electromagnética con el sistema, ya que solamente habrá absorción de energía cuando ésta se acople con la transición entre dos estados de distinta energía. En cambio, si al sistema se le somete a la presencia de un campo magnético  $H$ , aparece una diferencia de energía entre ambos estados, tal como se representa en la figura 12, como consecuencia de la distinta orientación de los dos momentos, uno a favor y otro en contra del campo magnético exterior aplicado. La energía potencial originada en cada caso es igual y de signo contrario.  $\mu_z$  es la proyección del momento magnético  $\mu$  sobre el eje  $Z$ , tomando como tal eje la dirección del campo exterior  $H$ .

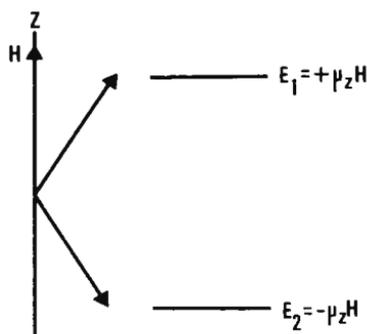


Figura 12.—Niveles de energía como consecuencia de la presencia de un campo magnético exterior.

Por lo tanto, un protón interaccionando con un campo exterior magnético puede encontrarse en dos distintos estados de energía. Entre ambos niveles pueden ocurrir transiciones. O lo que es lo mismo, un protón determinado puede pasar de un nivel a otro. Es fácil encontrar la relación entre esta transición y la longitud de onda necesaria para que una radiación electromagnética sea capaz de producirla:

$$E_1 - E_2 = \Delta E = h\nu = 2\mu_z H \quad [I-85]$$

donde  $\nu$  es la frecuencia de la onda, fácilmente despejable de la anterior ecuación.

$$\nu = \frac{2\mu_z H}{h} \quad [I-86]$$

La frecuencia necesaria para que la transición ocurra es, pues, proporcional al campo magnético aplicado. Esta frecuencia varía mucho de unos núcleos a otros, según sean sus características  $\mu_z$ . Pero, debido al pequeño valor de  $\mu$  para todos ellos, la frecuencia necesaria, sin más que aplicar la ecuación [I-86] es siempre del orden de las radiofrecuencias, a pesar de aplicar campos magnéticos muy elevados.

Aun teniendo en cuenta la cuantificación del fenómeno, se puede considerar desde un punto de vista clásico sin más que estudiar el tipo de vectores y momentos puestos en juego. Si se considera un momento magnético (como consecuencia de un espín nuclear) en estado estacionario, formando un ángulo  $\theta$  con un eje Z, en cuya dirección se aplica un campo magnético H, la ley del movimiento rotacional obliga al espín nuclear a describir un movimiento de precesión alrededor de dicho

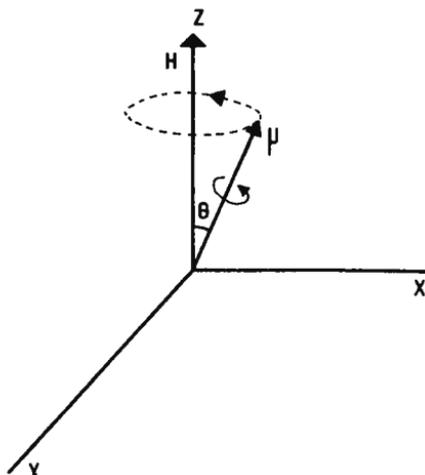


Figura 13.—Movimiento de precesión del espín nuclear alrededor del eje en el cual se ha aplicado el campo magnético.

eje  $Z$ , tal como se representa en la figura 13. Si denominamos  $w_0$  a la frecuencia de este movimiento, ésta está relacionada en forma sencilla con el campo magnético aplicado y la magnitud del momento magnético, tal como se expresa en la siguiente ecuación:

$$w_0 = \left( \frac{2\mu_z}{h} \right) H = \gamma H \quad [\text{I-87}]$$

siendo  $\gamma$ :

$$\gamma = \frac{2\mu_z}{h} \quad [\text{I-88}]$$

la denominada constante giromagnética, característica de cada especie nuclear, ya que  $\mu_z$  también lo es.

Si se aplica un campo magnético  $H_1$  en el plano  $XY$ , perpendicular a la dirección de  $Z$ , este campo intentaría modificar el ángulo  $\theta$ . Si consideramos fijo  $H_1$ , lo único que ocurriría sería una pequeña variación en la precesión, creando una ligera fluctuación. En cambio, si se consigue que el campo  $H_1$  gire alrededor del eje  $Z$  con la misma frecuencia que el movimiento de precesión del espín nuclear, se llegaría a producir la resonancia, y sólo entonces podría tener lugar una variación de  $\theta$ , teniendo lugar la transición con la consiguiente absorción de energía. Este fenómeno se esquematiza en la figura 14.

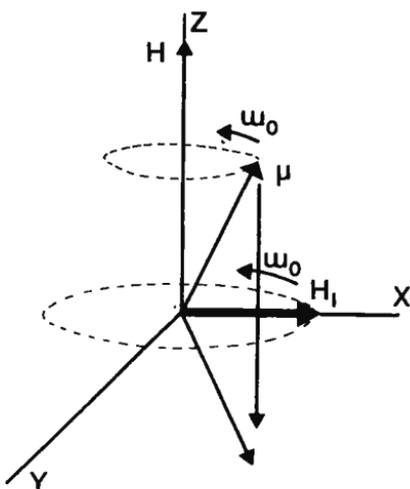


Figura 14.—Transición entre los dos estados posibles de energía como consecuencia de la presencia de un campo magnético en el plano  $XY$  que gira a la frecuencia de precesión del espín.

Es fácil conseguir este campo magnético giratorio en el plano  $XY$ . Una onda electromagnética polarizada plana es la composición de dos ondas circularmente polarizadas, de igual intensidad y frecuencia, pero de distinto sentido de giro. Si se hace incidir una onda de estas características sobre el sistema estudiado, y considerando únicamente la componente magnética de la radiación, sólo uno de los dos posibles sentidos de giro que la componen produciría el efecto de la resonancia, siempre que la frecuencia de la radiación fuera igual a la frecuencia del movimiento de precesión del espín nuclear alrededor del eje  $Z$ . El valor de esta frecuencia se expresó en la ecuación [I-87], llegando al mismo valor dado en la ecuación [I-86] cuando se consideraba desde un punto de vista mecánico cuántico la transición.

En resumen: Se necesita para observar el fenómeno de la Resonancia Magnética Nuclear aplicar un campo magnético con el fin de obtener distintos niveles de energía en estados que, de por sí, son degenerados y la incidencia de una onda electromagnética (ya se vio que su frecuencia debía ser del orden de las microondas) para producir la transición. Esta frecuencia, según se vio en la ecuación [I-87] es directamente proporcional al campo magnético aplicado y a la constante giromagnética, o sea, de la naturaleza de cada núcleo particular.

**Desplazamiento químico.**

Con lo expuesto parecería deducirse que la única información que se podría sacar en un espectro de RMN sería la distinta naturaleza de los núcleos que componen una determinada muestra. Pero esto, aparte de inútil, instrumentalmente no es posible conseguirlo, ya que es muy difícil barrer un espacio tal de longitudes de onda para que abarque todas las frecuencias de resonancia de los núcleos más habituales. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que dos núcleos de la misma naturaleza, situados en distintas regiones de una misma molécula, pueden tener distinta frecuencia de resonancia dependiendo del contexto molecular en que se encuentren. Esto es fácil de comprender teóricamente. La nube electrónica que rodea a todo núcleo en una molécula crea un campo magnético que, bien se suma, o bien se resta al campo magnético exterior aplicado, variando, como consecuencia, sin más que aplicar la ecuación [I-87], la frecuencia de resonancia. Lo que es lo mismo que, a pesar de la idéntica naturaleza de dos núcleos, pueden tener distinta frecuencia de resonancia, dependiendo del apantallamiento o desapantallamiento electrónico a que estén sometidos. Si uno de ellos está unido, por ejemplo, a un átomo muy electronegativo, estará muy desapantallado. Esta variación de frecuencias de resonancia como consecuencia de este efecto es lo que se conoce con el nombre de desplazamiento químico, y nos da una información directa sobre el tipo de resto o grupo funcional al que está unido el núcleo considerado.

No ha sido arbitrario el que se hayan hecho todos los razonamientos teóricos con el protón, pues, además de ser más fácil el tratamiento, también es el más aplicado en los estudios de RMN en moléculas orgánicas y bioquímicas, aunque cada día adquiere mayor importancia la utilización de otros núcleos, tal como el  $^{13}\text{C}$  (43-44-45).

**Fenómenos de relajación en RMN**

Los fenómenos de relajación son inherentes a los equilibrios termodinámicos y relacionados con las fluctuaciones que necesariamente caracterizan estos equilibrios. Para mejor introducir la noción de estos fenómenos es conveniente considerar en primer lugar un equilibrio químico, teniendo en cuenta que los mismos razonamientos servirán para RMN, con la salvedad de que el sistema considerado tiene distintas componentes.

En el equilibrio químico



las concentraciones de las distintas especies moleculares tomarán los valores  $C_a$ ,  $C_b$  y  $C_w$ , respectivamente. Estas concentraciones no son, sin embargo, absolutas, sino que fluctúan alrededor de estos valores. La rapidez con la cual ocurren, así como la ley que las rige, depende de la naturaleza de las moléculas, del equilibrio químico puesto en juego, etcétera, por lo que su conocimiento es valiosísimo. En la práctica no es fácil medir estas fluctuaciones, y entonces se recurre a los métodos de relajación: el sistema se pone bruscamente fuera del equilibrio (por elevación de la temperatura, por ejemplo) y se observa el retorno de las concentraciones a sus valores de equilibrio. Las fluctuaciones alrededor de los valores medios y la relajación están, en general, relacionados de una forma sencilla.

La misma descripción se puede aplicar para la relajación magnética nuclear. Si se considera un sistema, no con sólo un espín nuclear, como veníamos considerando en todos los razonamientos de la sección *a*, sino con infinidad de espines (caso real de una muestra determinada, en la cual hay muchos núcleos), éstos estarán distribuidos por igual en ambos estados degenerados, ya que poseen la misma energía y la probabilidad de permanencia es idéntica para ambos. En cambio, si se aplica un campo magnético exterior  $H$ , al aparecer un desdoblamiento energético habrá una desigual distribución de espines, a favor y en contra del campo, hasta alcanzarse una posición de equilibrio. Esta posición viene determinada por la ecuación de Boltzman.

$$n'/n = e^{-E/RT} \quad [I-90]$$

donde  $n'$  es la población en el nivel superior de energía, y  $n$  es la población en el nivel inferior. Habrá una mayor población en la dirección orientada a favor del campo (estado de menor energía), apareciendo como consecuencia una magnetización en el eje  $Z$  como consecuencia de esta desigual distribución. La transición viene expresada esquemáticamente en la figura 15. En la etapa I (sin campo magnético exterior aplicado), existe igual número de espines en ambos estados, siendo igual a cero la magnetización resultante en el eje  $Z$ . Al aplicar el campo magnético exterior  $H$ , aparece una desigual distribución en ambos niveles (etapa II), ajustándose a la ecuación [I-90] y, como consecuencia, aparece una magnetización neta  $M_z$  en el eje  $Z$ . Pero, al igual que ocurría en los equilibrios químicos, este valor de  $M_z$  no es absoluto, sino que el verdadero valor de la magnetización en el eje  $Z$  fluctúa alrededor del valor  $M_z$ . Esta fluctuación, la velocidad con que ocurre y la ley que lo rige depende,

al igual que en los equilibrios químicos, de la naturaleza del entorno molecular (o red) que rodea a los espines, o sea de la estructura, de la posibilidad de movimiento de los distintos núcleos dentro de la molécula

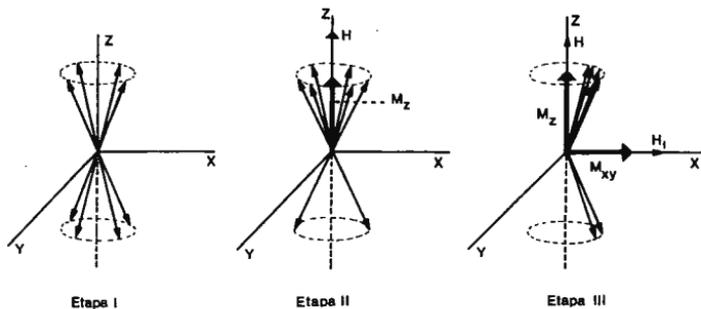


Figura 15.—Aparición de magnetización transversal y longitudinal. Véanse los detalles en el texto.

que se considere. Siguiendo con el paralelismo, al igual que ocurría en los equilibrios químicos, estas fluctuaciones son difíciles de medir, pero están relacionadas de forma sencilla con los procesos de relajación. Si eliminamos de momento el campo magnético exterior  $H$  (cambio brusco de equilibrio), lo que tarde en desaparecer la magnetización en el eje  $Z$  (tiempo de relajación  $T_1$ ), o lo que es lo mismo, lo que tarde en establecerse la población de equilibrio será una medida indirecta de las posibilidades moleculares en lo que se refiere a su libertad de giro y reorientación. Esta magnetización en el eje  $Z$  desaparece por cesión de energía del sistema de espines a la red, por lo que, además de llamarse al tiempo que tarda en reestablecerse el equilibrio tiempo de relajación  $T_1$ , también se le denomina tiempo de relajación espín-red, o también tiempo de relajación longitudinal, para diferenciarlo del tiempo de relajación transversal, que estudiaremos a continuación. Este tiempo de relajación no es otra cosa que el valor inverso de la constante cinética de intercambio que tiene lugar entre ambos estados de energía, cinética, por otra parte, de primer orden.

Según se ve en la figura 15, aun después de aplicar el campo magnético exterior no aparece magnetización neta en el plano  $XY$ , ya que la distribución de espines alrededor del eje  $Z$  es estadística, y, por ende, homogénea. Pero si se hace incidir una onda electromagnética con la misma frecuencia que la de precesión de los espines alrededor del eje  $Z$ ,

tiene lugar el paso de una distribución estadística alrededor del eje  $Z$  a una distribución orientada de los espines para girar al unísono con el campo magnético de la radiación aplicada, tal como se representa en la etapa III de la figura. Aparece como consecuencia en esta etapa una magnetización neta en el plano  $XY$ , magnetización transversal como consecuencia de una mayor distribución de espines en el mismo sentido que el campo magnético giratorio  $H_1$ . Pero de nuevo esta magnetización no toma un valor absoluto  $M_{xy}$ , sino que fluctúa alrededor de ese valor. Una medida indirecta de esa fluctuación nos la da el tiempo de relajación  $T_2$ , que es lo que tarda en desaparecer esta magnetización transversal una vez suprimida la radiación que lo produjo. En este caso no hay cesión de energía a la red, sino simple reajuste entre espines, por lo que también se le denomina tiempo de relajación transversal o espín-espín. Este tiempo de relajación es el responsable de la anchura de la banda de absorción, en la cual se puede medir directamente, según se expresa en la siguiente ecuación:

$$T_2 = \frac{1}{\pi \Delta w_{1/2}} \quad [I-91]$$

siendo  $\Delta w_{1/2}$  la anchura a la altura media del pico de absorción.

Según se observa en la ecuación [I-91], a mayor tiempo de relajación  $T_2$ , menor anchura del pico de absorción, siendo conveniente, por tanto, que  $T_2$  sea grande para obtener mayor resolución en el espectro. Ahora bien, se ha insinuado que los procesos de relajación están íntimamente ligados con la posibilidad de movimiento, rotación, choque, etc., de las moléculas dentro del sistema. Cada tiempo de relajación lleva asociado un tiempo de correlación, tiempo que es muy pequeño para sólidos (donde apenas hay movimientos de sus partículas), haciéndose muy grandes para líquidos, donde se puede conseguir alta resolución.

Quizá sea aquí el momento oportuno para indicar que las proteínas se encuentran en un punto intermedio, y en general la resolución depende del tamaño molecular. Para proteínas de peso molecular superior a 20.000 no se pueden observar detalles. También existe una dependencia con la estructura que adopta la proteína. Por ejemplo, en hélice los tiempos de relajación disminuyen tanto que llega a desaparecer incluso la señal. Ha sido éste un procedimiento muy utilizado para averiguar qué aminoácidos se encuentran directamente implicados en los trozos de hélice de una proteína determinada (46).

$T_2$  puede, por tanto, ser medido directamente en la anchura de la banda de absorción. En muchos casos  $T_1 \simeq T_2$ , y también es este procedimiento para el cálculo de  $T_1$ . En cambio, en casos en que no sea segura dicha identidad, o bien cuando la anchura del pico no puede ser medida con exactitud, se suele emplear el método de saturación para el cálculo de  $T_1$ . El campo magnético  $H_1$  tiende a igualar las poblaciones de los dos niveles de energía. Ya que la absorción es debida precisamente a dicha diferencia de población, si la intensidad de la radiación se incrementa, la señal de absorción disminuye eventualmente y debe, por fin, desaparecer. Este fenómeno se denomina saturación, y es un método directo de medida de  $T_1$ . La señal de resonancia se observa primero con una radiofrecuencia de lo bastante baja intensidad como para evitar la saturación. Entonces se incrementa  $H_1$  hasta que la señal sea muy pequeña. Si  $H_1$  se vuelve ahora a su valor original, la señal se incrementa exponencialmente con el característico tiempo  $T_1$  hasta alcanzar su antiguo valor, ya que el proceso de retorno a la población de exceso en el bajo nivel de energía no es otro que la relajación espín-red.

Es evidente que la técnica está muy limitada, por las propias características de las proteínas, como anteriormente se ha discutido. Sin embargo, aparte de la información que han dado respecto a estructura de proteínas (46), o a algunas características de determinado residuo dentro de una proteína (como son el estudio de las variaciones de los desplazamientos químicos de los protones de histidina de ribonucleasa (47), también pueden dar información respecto a los equilibrios de asociación de proteínas a pequeñas moléculas, ya que no sobre sistemas autoasociantes, debido al alto peso molecular de las asociaciones resultantes y como consecuencia a la baja o nula resolución obtenida, según se ha discutido en párrafos anteriores. Es en este campo donde se han desarrollado numerosos métodos de cálculo de constantes de disociación, sitios de asociación y otras características aplicadas a sistemas bioquímicos tan interesantes como asociaciones enzima-inhibidor o enzima-sustrato. Para estos casos concretos se han aprovechado tanto los datos de desplazamientos químicos como los datos de relajación, que se tratarán de exponer lo más esquemática y claramente posible.

#### a) *Estudios sobre desplazamientos químicos*

Cuando una molécula pequeña se asocia a una proteína, es evidente que el desplazamiento químico de muchos de sus protones variará,

debido al nuevo entorno molecular en que se encuentran. Esta variación, en general, se observa de una forma mucho más acusada en algún protón determinado de la molécula de ligando, el que más directamente esté implicado en la asociación. Esta observación, que al principio fue exclusivamente cualitativa, se ha conseguido cuantificar, dándonos una amplia información sobre la asociación.

Supongamos un equilibrio del tipo



donde  $P$  es una molécula de proteína (generalmente una enzima),  $A$  es una molécula pequeña (ligando, que puede ser un inhibidor, un sustrato, etc.) y  $PA$  es el producto de la asociación. Si suponemos que las concentraciones en el equilibrio de las distintas especies moleculares que componen la mezcla toman los valores  $C_P$ ,  $C_A$  y  $C_{PA}$  respectivamente, la constante de disociación tendrá el valor indicado en la siguiente expresión:

$$K_D = \frac{C_P \cdot C_A}{C_{PA}} \quad [I-93]$$

Si se realiza un espectro de RMN de la mezcla se obtendrá una señal de algún protón de  $A$  cuyo desplazamiento químico será una media entre el desplazamiento químico correspondiente a  $A$  libre y a  $A$  asociado ( $PA$ ), siempre que el proceso de intercambio sea lo suficientemente rápido. La desviación respecto a estos dos valores extremos estará relacionada con la proporción de  $A$  en cada uno de los estados y vendrá expresada por la siguiente ecuación:

$$\delta_{obs} = \delta_A \frac{C_A}{C_A^o} + \delta_{PA} \frac{C_{PA}}{C_A^o} \quad [I-94]$$

donde  $\delta_A$  es el desplazamiento químico correspondiente al ligando libre;  $\delta_{PA}$  el correspondiente al ligando asociado a la proteína y  $\delta_{obs}$  el debido a la mezcla cuando ésta se encuentra en el equilibrio.

Ahora bien, como

$$C_A = C_A^o - C_{PA} \quad [I-95]$$

la ecuación [I-94] la podremos expresar de la forma:

$$\delta_{obs} = \delta_A \frac{C_A^o}{C_A^o} - \delta_A \frac{C_{PA}}{C_A^o} + \delta_{PA} \frac{C_{PA}}{C_A^o} \quad [I-96]$$

$C_A^0$  es la concentración inicial de ligando.

Operando en la anterior ecuación se llega a la expresión

$$\frac{\delta_{obs}^*}{\Delta} = \frac{C_{PA}}{C_A^0} \quad [I-97]$$

donde

$$\delta_{obs}^* - \delta_A = \delta_{obs}^* \quad [I-98]$$

$$\delta_{PA} - \delta_A = \Delta \quad [I-99]$$

si se sustituye el valor de  $C_{PA}/C_A^0$  obtenido en [I-97] en la ecuación [I-93], y teniendo en cuenta además que

$$C_A = C_A^0 - C_{PA} \quad [I-100]$$

$$C_P = C_P^0 - C_{PA} \quad [I-101]$$

se llega a la expresión final:

$$K_D \frac{\delta_{obs}^*}{\Delta} = \left( C_P^0 - C_A^0 \frac{\delta_{obs}^*}{\Delta} \right) \left( 1 - \frac{\delta_{obs}^*}{\Delta} \right) \quad [I-102]$$

Si  $\delta_{obs}^*/\Delta \ll 1$ , o lo que es lo mismo, según se observa en la ecuación [I-97] la concentración de ligando es muy superior a la de proteína, la ecuación [I-102] quedará reducida de la forma:

$$\frac{1}{\delta_{obs}^*} = \frac{C_A^0}{C_P^0 \Delta} + \frac{(K_D + C_P^0)}{C_P^0 \Delta} \quad [I-103]$$

Si se representa gráficamente  $1/\delta_{obs}^*$  frente a  $C_A^0$  manteniendo  $C_P^0$  constante, se obtendrá una línea recta, cuya pendiente y ordenada en el origen serán, respectivamente:

$$\text{tg } \alpha = \frac{1}{C_P^0 \Delta} \quad [I-104]$$

y

$$b = \frac{K_D + C_P^0}{C_P^0 \Delta} \quad [I-105]$$

pudiéndose determinar de las anteriores ecuaciones el valor de  $K_D$  y de  $\Delta$ , y ya que, según la ecuación [I-99]  $\Delta = \delta_{PA} - \delta_A$  como  $\delta_A$  es conocida, se puede calcular fácilmente el desplazamiento químico del

protón del ligando unido a la proteína, dato que proporciona información sobre la localización de ese protón en el contexto de la molécula.

Se podrían citar numerosos sistemas concretos resueltos con este tipo de cálculo. M. A. Raftery y col. lo han aplicado a numerosos sistemas Enzima-Inhibidor (48-49-50-51), concretamente con el sistema lisozima en su unión a diversos inhibidores y sustratos relacionados. Así, en la unión de metil- $\beta$  N acetil D glucosamina a lisozima, el grupo metil-acetoamido del inhibidor experimenta un desplazamiento químico a alto campo. Midiendo estas variaciones en los desplazamientos, llegan a calcular  $K_D$  y  $\delta_{PA}$ . Experimentos realizados con otros inhibidores homólogos al anterior, tales como  $\alpha$ -N acetil glucosamina,  $\beta$ -N acetil glucosamina, metil  $\alpha$ -N acetil glucosamina, acetoamido ciclohexano, etcétera, muestran la indudable importancia del grupo acetoamido en la unión al enzima. El promedio de influencia magnética del medio experimentado en el estado acomplexado por los grupos acetoamido de  $\beta$ -N acetil glucosamina, metil  $\beta$ -N acetil glucosamina y metil  $\beta$ -N acetil glucosamina es el mismo, mientras que para  $\alpha$ -N acetil glucosamina es distinto. Este hecho hace pensar que el protón dihidroxilo del carbono 1 de este inhibidor interacciona con la enzima y causa un cambio en la orientación de la unión. Estudios semejantes con quimotripsina han sido llevados a cabo por T. McL. Spotswood y col. (52).

#### b) Estudios sobre tiempos de relajación

Se ha estudiado anteriormente cómo, cuando una molécula pequeña se une o asocia a una macromolécula, varían de forma sustancial los desplazamientos químicos de algunos de sus protones, generalmente de aquellos que más directamente están implicados en la asociación. Pero, además, también se produce un ensanchamiento, en general selectivo, de las señales de estos protones. La mayoría de las veces este ensanchamiento es mucho más acusado que la propia variación de los desplazamientos químicos. También se vio (ecuación [I-91]) que la anchura de la banda de absorción estaba directamente relacionada con el tiempo de relajación  $T_2$ , por lo que se interpreta este ensanchamiento como una consecuencia de la inmovilización parcial de la molécula de ligando al unirse a la macromolécula.

Si se considera nuevamente el equilibrio expresado en la ecuación [I-92], en el espectro de RMN se observa para un determinado protón un tiempo de relajación tal ( $T_{2obs}$ ) distinto al correspondiente cuando sólo se considera el ligando libre ( $T_{2A}$ ). Se puede expresar la proporción

de relajación debida a la asociación como diferencia entre el tiempo de relajación observado en la mezcla y el del ligando libre:

$$\frac{1}{T_{2as}} = \frac{1}{T_{2obs}} - \frac{1}{T_{2A}} \quad [\text{I-106}]$$

Swift y Connick (58) fueron capaces de relacionar esta magnitud con otras características del espectro y del equilibrio, obteniendo la siguiente expresión:

$$\frac{1}{T_{2as}} = \frac{\alpha(1/T_{2PA})^2 + 1/T_{2PA}\tau_{PA} + \Delta\delta_{PA}^2}{\tau_{PA}[(1/T_{2PA} + 1/\tau_{PA})^2 + \Delta\delta_{PA}^2]} \quad [\text{I-107}]$$

donde  $\alpha$  es la fracción molar del ligando unido a la proteína,  $1/T_{2PA}$  es el inverso del tiempo de relajación correspondiente al ligando asociado a la proteína,  $\tau_{PA}$  es el tiempo de permanencia o vida media del complejo  $PA$  y  $\Delta\delta_{PA}$  es la variación en los desplazamientos químicos como consecuencia de la asociación.

En los casos en que  $\Delta\delta_{PA}$  es muy pequeño, en comparación con las variaciones en la anchura de la banda de absorción, la ecuación [I-107] se puede reducir sustancialmente, quedando la expresión:

$$\frac{1}{T_{2as}} = \frac{\alpha}{(T_{2PA}) + \tau_{PA}} \quad [\text{I-108}]$$

Si el equilibrio es de intercambio lento, entonces ocurrirá que el tiempo de permanencia o vida media del complejo  $PA(\tau_{PA})$  será grande, y siempre muy superior a  $T_{2PA}$  por lo que la ecuación [I-108] se puede simplificar de la forma:

$$\frac{1}{T_{2as}} = \frac{\alpha}{\tau_{PA}} \quad [\text{I-109}]$$

o, lo que es lo mismo, teniendo en cuenta la ecuación [I-106]:

$$\frac{1}{T_{2obs}} = \frac{1}{T_{2A}} + \frac{\alpha}{\tau_{PA}}, \quad [\text{I-110}]$$

por lo que el estudio de los fenómenos de relajación en RMN dan una información directa sobre la cinética del proceso.

En cambio, la mayoría de los equilibrios observados de este tipo (proteína-ligando) son de intercambio rápido, es decir, en todos ellos

la vida media del complejo  $PA$  es muy inferior a  $T_{2PA}$ , con lo que en este caso la ecuación [I-108] quedará reducida:

$$\frac{1}{T_{2as}} = \frac{\alpha}{T_{2PA}} \quad [\text{I-111}]$$

o lo que es lo mismo

$$\frac{1}{T_{2obs}} = \frac{1}{T_{2A}} + \frac{1}{T_{2PA}} \alpha \quad [\text{I-112}]$$

Por otra parte, la expresión general de la constante de disociación (ecuación [I-93]) se puede expresar en función de la fracción molar de ligando unido a la proteína y de las concentraciones iniciales de ligando y proteína:

$$K_D = \frac{C_A^0(1 - \alpha) \cdot (C_P^0 - \alpha C_A^0)}{\alpha C_A^0} \quad [\text{I-113}]$$

de donde se puede fácilmente deducir

$$C_A^0 = \frac{-K_D}{1 - \alpha} + \frac{C_P^0}{\alpha} \quad [\text{I-114}]$$

En el caso en que el ligando esté en gran exceso, la fracción de ligando unido a la proteína será mucho menor que 1, por lo que la anterior ecuación nos quedará reducida de la forma:

$$C_A^0 = -K_D + \frac{1}{\alpha} C_P^0 \quad [\text{I-115}]$$

Si se escogen unas concentraciones tales de  $A$  que den un mismo  $T_{2obs}$ , arbitrariamente seleccionado, o lo que es lo mismo, un idéntico  $\alpha$  (y ya que  $\tau_{AP}$  es inherente al fenómeno y naturaleza del complejo, esta afirmación vale tanto para procesos de intercambio lento —ecuación [I-110]— como para procesos de intercambio rápido —ecuación [I-111]), y se representa frente a concentraciones de  $C_P^0$ ; resultará una recta cuya ordenada en el origen será  $-K_D$ , y la pendiente  $1/\alpha$ , según se deduce fácilmente de la ecuación [I-115].

A los mismos resultados se llega sin más que despejar de la ecuación [I-115]:

$$\alpha = \frac{C_P^0}{K_D + C_A^0} \quad [\text{I-116}]$$

valor que sustituido en la ecuación [I-116] resulta:

$$\frac{1}{T_{2as}} - \frac{1}{T_{2A}} = \frac{C_P^o}{K_D + C_A^o} \cdot \frac{1}{T_{2PA}} \quad [\text{I-117}]$$

y teniendo en cuenta la ecuación [I-96] resulta la expresión final:

$$\frac{1}{\Delta w_{1/2}} = \frac{\pi T_{2PA}}{C_P^o} K_D + \frac{\pi T_{2PA}}{C_P^o} C_A^o \quad [\text{I-118}]$$

donde si se representa  $1/\Delta w_{1/2}$  frente a  $C_A^o$  manteniendo  $C_P^o$  constante se obtendrá una recta cuya ordenada en el origen será

$$\frac{\pi T_{2PA}}{C_P^o} K_D \quad \text{y la pendiente} \quad \frac{\pi T_{2PA}}{C_P^o}$$

pudiendo, pues, calcular tanto  $T_{2PA}$  como  $K_D$ .

Si se añade una segunda molécula de ligando en competencia con la primera, se obtendrá una disminución en la anchura de sus señales como consecuencia del desplazamiento a que es sometido por el otro ligando en competencia. En un equilibrio de este tipo y siguiendo los mismos razonamientos empleados hasta ahora, es posible relacionar esta variación con la relación existente entre ambas constantes de equilibrio:

$$\frac{1}{\Delta w_{1/2}} = \frac{\pi C_A^o T_{2PA}}{C_P^o} \left( 1 + \frac{K_D}{K_D'} \frac{C_A^o}{C_A^o} \right) \quad [\text{I-119}]$$

donde  $C_A^o'$  y  $K_D'$  están referidas al segundo ligando. Si en la ecuación [I-119] se mantiene constante el valor de  $C_A^o/C_P^o$  y se representa  $1/\Delta w_{1/2}$  frente a  $C_A^o/C_A^o'$ , se puede llegar a obtener el valor de  $K_D/K_D'$ .

En los procesos de intercambio lento se puede obtener además, según ya se ha indicado, aparte de información sobre el equilibrio, también sobre la cinética de la reacción. Naturalmente, para aplicar un criterio u otro hay que tener un conocimiento previo de qué tipo de intercambio se trata, pero esta información no es difícil de conseguir. Usualmente,  $1/T_{2PA}$  es una función directamente proporcional a la velocidad de giro o posibilidad de choque de la molécula de complejo  $PA$ , y su valor disminuye cuando la temperatura aumenta. Luego, al aumentar la temperatura, aumentará también  $T_{2PA}$  y, como consecuencia, si el proceso es de intercambio rápido, donde el incremento de la anchura de la banda es debido fundamentalmente al tiempo de relajación  $T_2$ , al

aumentar la temperatura se obtendrá una mayor resolución en los picos como consecuencia del aumento de  $T_2$ . Por otra parte  $\tau_{PA}$  es inversamente proporcional a la constante  $K_{-1}$  del equilibrio proteína-ligando ( $P + A \xrightleftharpoons[K_{-1}]{K_1} PA$ ) y decrece invariablemente cuando la temperatura aumenta, por lo que se observaría, no una mayor resolución, sino todo lo contrario si el intercambio es lento, donde el factor  $\tau_{PA}$  tiene un considerable valor.

El valor obtenido de  $T_{2PA}$  también incluye amplia información sobre la asociación. La contribución de las interacciones dipolo-dipolo al tiempo de relajación  $T_{2PA}$  para un par de protones fue calculado por Solomon (53) y se expresa en la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{T_{2PA}} = \frac{3\gamma^4 \hbar^2}{20r^6} \left( 3t_c + \frac{5t_c}{1 + \omega_0^2 t_c^2} + \frac{2t_c}{1 + \omega_0^2 t_c^2} \right) \quad [I-120]$$

donde  $r$  es la distancia protón-protón,  $t_c$  es el tiempo de correlación de choque molecular,  $\omega_0$  es la frecuencia de Larmor y  $\gamma$  es la constante giromagnética.

Todos estos procedimientos han sido aplicados a numerosos ejemplos biológicos. G. C. K. Roberts (54) hace un detallado estudio en la asociación de sulfacetamida a albúmina de suero. Aparte de los cálculos del correspondiente  $K_D$ , observa una mayor variación en los  $T_2$  correspondientes a los protones aromáticos del ligando, por lo que concluye que es por estos protones por donde se realiza la asociación. Lanir y Navon (55) realizaron numerosos estudios de unión de sulfonamidas a carbonilanhidrasa de bovino, determinando no sólo las constantes de disociación de los complejos, sino que también realizaron el estudio competitivo de unión de varias especies al mismo sistema enzimático, así como calcularon los tiempos de correlación de choque molecular y el tanto por ciento de contribución de interacción dipolo-dipolo de dichas asociaciones. También se han realizado estudios de asociación de albúmina a penicilina (56) y ribonucleasa a 3'-OMP (57), sacándose sustanciosas conclusiones. Estudios similares, aunque utilizando espectros de RMN de  $^{13}C$  en vez de protones, se han realizado sobre hemoglobina (44).

## C) DICROÍSMO CIRCULAR Y DISPERSIÓN ROTATORIA ÓPTICA

Ambas técnicas utilizan como radiación incidente una luz polarizada plana. Cuando una sustancia es ópticamente activa, a una longitud de onda a la cual absorbe, la radiación resultante después de atravesar la muestra es una luz polarizada elíptica. La medida de su elipticidad da, mediante una sencilla relación, el valor del dicroísmo circular, que no es otra cosa que la diferencia entre los coeficientes de extinción molar de la sustancia de que se trate con respecto a luz polarizada circular a izquierdas y a derechas:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad [\text{I-121}]$$

donde  $\Delta\varepsilon$  es el dicroísmo circular,  $\varepsilon_L$  es el coeficiente de extinción molar con respecto a la luz polarizada circular a izquierdas, y  $\varepsilon_R$  es el coeficiente de extinción molar con respecto a luz polarizada circularmente a derechas. Como se ha dicho, está relacionada de forma simple con la elipticidad de la luz polarizada elíptica que emerge de la muestra, según la siguiente ecuación:

$$[\theta] = 3.300 \Delta\varepsilon \quad [\text{I-122}]$$

donde  $[\theta]$  es la elipticidad.

Es fácil comprender por qué ambas magnitudes están relacionadas. Una luz polarizada plana se puede considerar como composición de dos luces polarizadas circulares una a derechas y otra a izquierdas, de igual intensidad y frecuencia. Si al atravesar una sustancia ópticamente activa una de las dos componentes es absorbida con mayor intensidad que la otra, el resultado de la composición de estas dos nuevas radiaciones, polarizadas ambas circularmente en distinto sentido, con la misma frecuencia, pero distinta intensidad, da como consecuencia una luz polarizada elíptica, como se esquematiza en la figura 16. Por lo que se comprende fácilmente que la elipticidad sea en realidad una medida del dicroísmo circular. Naturalmente, sólo habrá dicroísmo circular allí donde haya una banda de absorción.

Si se hace incidir luz polarizada plana sobre una sustancia ópticamente activa a una longitud de onda lejos de una banda de absorción,

---

(\*) Para un amplio desarrollo teórico e instrumental de estas técnicas, consúltense las citas 59, 60 y 61.

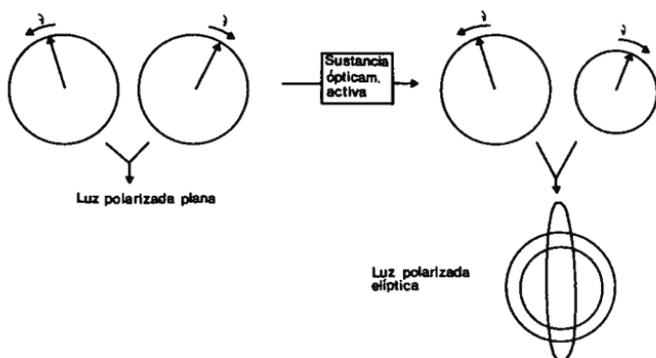


Figura 16.—Formación de luz polarizada elíptica al pasar una luz polarizada plana a través de una sustancia ópticamente activa a una longitud de onda a la cual hay absorción.

no habrá lógicamente dicroísmo circular, pero, en cambio, ocurre una desviación en el plano de polarización de la luz, que gira con respecto al incidente un ángulo  $\alpha$ . A este fenómeno se le denomina rotación óptica. En realidad, lo que ocurre, al igual que sucedía con la absorción, es que una sustancia ópticamente activa tiene distinto índice de refracción con respecto a la luz polarizada circular a derechas y a izquierdas, resultando también una luz polarizada plana, pero, debido al diferente retraso que experimenta cada uno de sus dos componentes, tiene desviado su plano de polarización respecto al incidente, como se puede observar en la figura 17.

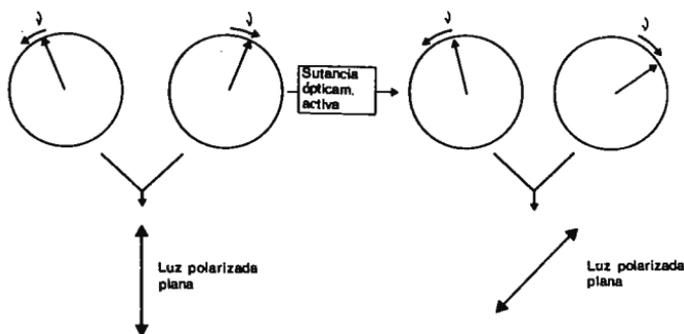


Figura 17.—Desviación del plano de polarización de una luz polarizada plana al atravesar una sustancia ópticamente activa lejos de una banda de absorción.

Pero la magnitud más empleada no es precisamente el ángulo de giro  $\alpha$ , sino la rotación específica,  $[\alpha]$ , que es característica de cada sustancia, y está relacionada de forma sencilla con el ángulo de giro según la siguiente expresión:

$$[\alpha] = \alpha/dC \quad [I-123]$$

donde  $d$  es el paso óptico y  $C$  la concentración de la muestra.

En una banda de absorción, como es fácil comprender, no se puede observar una desviación en el plano de polarización, ya que, debido al dicroísmo circular, la radiación resultante es una luz polarizada elíptica. Lo que sí se observa es un cambio brusco en la desviación del plano de polarización antes y después de la banda de absorción. A este fenómeno se le denomina efecto Cotton. Para cada banda de absorción se tendrá, pues, un dicroísmo circular y un efecto Cotton.

Existe una magnitud mucho más característica de la rotación óptica que la rotación específica, la denominada rotación molar  $[m]$ , relacionada directamente con  $[\alpha]$  y con el peso molecular  $M$  y el índice de refracción  $n$  de la sustancia

$$[m] = [\alpha] \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M}{100} \quad [I-124]$$

El valor de  $m$  para cada longitud de onda es calculable por la ecuación de Drude, siempre que se opere lejos de una banda de absorción, ya que esta ecuación deja de cumplirse en las proximidades debido al efecto Cotton:

$$[m] = \frac{96 \pi \mathcal{N}}{hC} \frac{R \lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} \quad [I-125]$$

donde  $\mathcal{N}$  es el número de Avogadro,  $h$  la constante de acción de Planck,  $\lambda_o$  la longitud de onda a la cual absorbe la sustancia,  $\lambda$  la longitud de onda a la cual se considera la rotación y  $R$  es la denominada fuerza rotacional, que no es otra cosa que el área encerrada en la curva de dicroísmo a la longitud de onda  $\lambda_o$ . En la figura 18 se hace una representación de la ecuación de Drude y su desviación respecto a la curva correspondiente de representar las rotaciones molares a distintas longitudes de onda (Dispersión Rotatoria Óptica)

Cuando existen varias especies moleculares en una mezcla, la rotación molar obtenida se puede relacionar con la de cada uno de los componentes de la mezcla:

$$[m]C = \sum_i [m_i]C_i \quad [\text{I-126}]$$

donde  $C_i$  es la concentración de cada componente.

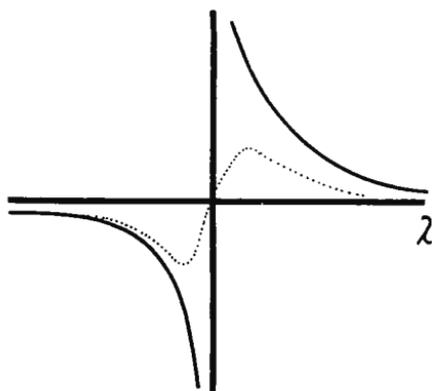


Figura 18.—Comparación de la representación de la ecuación de Drude frente a la variación de rotación óptica; ———, ecuación de Drude; - - - -, rotación óptica.

Si se considera la ecuación de Drude, en la cual está incluido el término  $R$  (fuerza rotacional) que depende fundamentalmente del dicroísmo circular, es fácilmente deducible la relación entre rotación molar y dicroísmo circular, relación que viene expresada por la ecuación de Kroning-Kramer:

$$[m'] = 2,303 \frac{9.000}{\pi^2} \int_0^{\infty} \Delta\epsilon_{\lambda'} \frac{\lambda'}{\lambda^2 - \lambda'^2} d\lambda' \quad [\text{I-127}]$$

A cada valor de  $\lambda$ , por tanto, es previsible el valor de  $[m]$  sin más que considerar los distintos dicroísmos circulares que puedan influir sobre él. Hay regiones en que es más sencillo medir el dicroísmo circular, y en otras la dispersión rotatoria óptica, aunque es fácil comprender que ambos valores nos darán idéntica información.

Ambas técnicas han sido muy aplicadas al estudio estructural de proteínas (62). Ninguna información se podría sacar respecto al estudio de asociaciones de proteínas si dicha asociación no llevara consigo algún cambio estructural que se manifieste en una variación de las magnitudes medibles por estas técnicas. Es interesante ver de qué forma se puede relacionar el cambio de estas magnitudes con otras características del equilibrio de asociación, o llegar a conocer parámetros del producto de la asociación que, por existir en equilibrio con los monómeros que la forman, es imposible adquirir información directa sobre él.

Si se considera el equilibrio



caso estudiado por ejemplo en el glucagón, que se ajusta perfectamente a este modelo (63) se puede expresar su constante de equilibrio de la forma

$$K = \frac{C_{P_3}}{C_P^3} \quad [\text{I-129}]$$

llamando  $\alpha$  al grado de asociación y  $C_P^0$  a la concentración inicial de monómero es evidente que

$$C_{P_3} = \alpha C_P^0 \quad [\text{I-130}]$$

valor que es sustituido en [I-129] y operando resulta:

$$C_P^3 = \frac{\alpha \cdot C_P^0}{K} \quad [\text{I-131}]$$

Si se supone que el monómero a una determinada longitud de onda posee una rotación molar  $m_1$ , la cual podemos conocer en unas condiciones (de pH o de concentración) en las cuales no haya asociación, y que como resultado del equilibrio esta rotación molar varía hasta alcanzar un determinado valor  $m$  a una determinada concentración  $C_P^0$ , esta rotación molar, tal como se vio en la ecuación [I-126], se puede expresar en función de los componentes de la muestra, que serán por una parte el monómero  $P$  y, por otra, el trímero  $P_3$

$$mC_P^0 = m_1C_P + m_3C_{P_3} \quad [\text{I-132}]$$

donde  $m_3$  es la rotación del trímero. Si se denomina

$$m - m_1 = \Delta m \quad [\text{I-133}]$$

$$m_3 - m_1 = \Delta m_\infty \quad [\text{I-134}]$$

y se sustituye en la ecuación [I-132]  $C_P$  y  $C_{P_3}$  por los valores obtenidos en las ecuaciones [I-130] y [I-131] resulta la expresión final:

$$\Delta m^{1/3} C_P^{0-2/3} = (K_D \Delta m_\infty)^{1/3} - \frac{1}{\Delta m_\infty} (K_D \Delta m_\infty)^{1/3} \Delta m \quad [\text{I-135}]$$

En esta ecuación si se representa  $\Delta m^{1/3} C_P^{0-2/3}$  frente a  $\Delta m$  se puede obtener el valor de  $\Delta m_\infty$  y por donde  $m_3$ . Naturalmente, esta ecuación no es aplicable para el caso en que no se trate de un equilibrio monómero-trímero, para el que habría que encontrar otra expresión.

Estos estudios han sido aplicados a numerosos sistemas. Aparte del ya citado del glucagón, en el cual se estudia la autoasociación dependiente con la concentración de monómero, se ha obtenido amplia información en la asociación de lisozima en disolución (64) y en la interacción de haptenos con proteínas del mieloma de ratón y anticuerpos específicos (65).

#### D) ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

Los fundamentos teóricos de esta técnica están bien fundamentados y son en todo semejantes a la espectroscopía visible, con la única variación de los grupos cromóforos que absorben y las transiciones electrónicas que tienen lugar (66).

Ampliamente utilizados en estudios estructurales de macromoléculas (desnaturalización, cambios estructurales, etc.), se han aplicado también con éxito al estudio de asociación de proteínas, bien a pequeñas moléculas (caso típico de formación del complejo enzima sustrato) como a la asociación de proteínas entre sí. Siempre que, como resultado de la interacción, tanto iónica como covalente, se produzca un cambio en el medio que rodea al grupo cromóforo, tal que se manifieste en una desviación en la longitud de onda a la que absorba, es posible relacionar este cambio con las características de dicha asociación.

Como método experimental es muy utilizada en todos los casos la espectroscopía de diferencia (67), que, en esencia, consiste en obtener automáticamente la diferencia de absorción entre la proteína libre y

asociada. Instrumentalmente, el problema está resuelto. En los espectrofotómetros de diferencia existen dos cubetas por las cuales pasa alternativamente el haz luminoso, obteniéndose directamente las diferencias de absorbancias.

En general se puede llegar a calcular por este procedimiento la constante de disociación del complejo  $PA$ , coincidiendo sus valores en los casos estudiados con los obtenidos por los procedimientos cinéticos clásicos. Dicha constante está relacionada con la diferencia de absorbancias de la forma:

$$\Delta E_{\lambda} = \Delta E_{\lambda}^0 \left( \frac{C_A/K_D}{1 + C_A/K_D} \right) C_P^0 \quad [\text{I-136}]$$

donde  $\Delta E_{\lambda}^0$  es el valor de  $\Delta E_{\lambda}$  cuando no hubiera proteína libre en la cubeta  $M_2$  (Figura 19),  $K_D$  la constante de disociación del complejo  $PA$ . Linealizando esta ecuación es posible encontrar el valor de  $K_D$ .

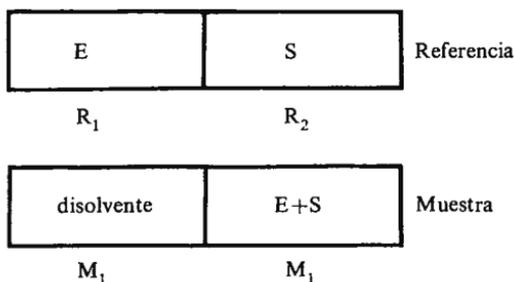


Figura 19.—Esquema de la disposición de cubetas en un espectrofotómetro de diferencia. Reproducido con autorización de Benmouyal y Trowbridge (68).

Diversos experimentos en este sentido se han realizado con tripsina y quimotripsina (68) y lisozima (69). A veces se produce también una sustancial variación en grupos cromóforos del ligando, caso, por ejemplo, de la unión de desoxitimidina 3',5' difosfato al centro activo de nucleasa de estafilococo (70).

Existen numerosas proteínas que experimentan asociaciones o disociaciones en condiciones tales en que el único parámetro variable

es la concentración de las mismas. Ejemplos de tales sistemas son la insulina (71), quimotripsina (72), tripsina (73), glutámico deshidrogenasa (74), hemoglobina (75) y hexoquinasa (76). Es posible aplicar la espectroscopía ultravioleta al estudio de estas asociaciones. Es muy conveniente en estos casos, y puesto que la dependencia es respecto a la concentración, hacer la disposición experimental tal como se esquematiza en la figura 20 (espectroscopía de diferencia de concentraciones) (77). Lo único que varía en ambas cubetas es la concentración de proteína, ya que la cantidad puesta en ambas es idéntica y el volumen es distinto, con lo que se obtendrá un espectro diferencial, en el cual las diferencias serán debidas exclusivamente a la asociación. Si se denomina  $C_{Pr}$  y  $C_{Pm}$  a las concentraciones de proteína en las cubetas de referencia y muestra, respectivamente, y  $d_r$  y  $d_m$  al paso óptico de ambas, como la sección es idéntica y la cantidad total de proteína también, se ha de cumplir la relación:

$$C_{Pr}d_r = C_{Pm}d_m \quad [I-137]$$

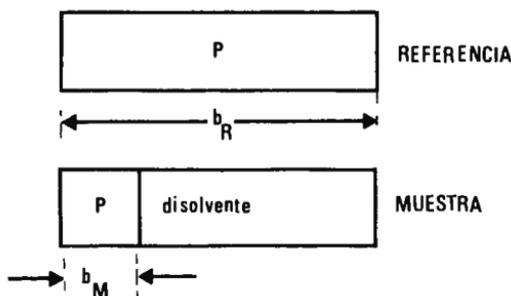


Figura 20.—Esquema de la disposición de cubetas para espectroscopía de diferencias de concentraciones. Reproducido con autorización de Fisher y Cross (77).

Por otra parte, en el espectro de diferencia, la absorbencia observada, así como los coeficientes de extinción molar adoptarán las expresiones:

$$\Delta E_\lambda = \Delta E_m^\lambda - \Delta E_r^\lambda \quad [I-138]$$

$$\Delta \epsilon_\lambda = \Delta \epsilon_m^\lambda - \Delta \epsilon_r^\lambda \quad [I-139]$$

Además, teniendo en cuenta la relación existente entre absorbencia y coeficiente de extinción molar

$$E = \epsilon C d \quad [I-140]$$

se podrá escribir

$$\Delta E_{\lambda} = E_m^{\lambda} \cdot C_{Pm} \cdot d_m - E_r^{\lambda} \cdot C_{Pr} \cdot d_r \quad [\text{I-141}]$$

Combinando las ecuaciones [I-137 y [I-141] y teniendo en cuenta la definición dada en la ecuación [I-139], se obtiene fácilmente

$$\frac{\Delta E_{\lambda}}{C_{Pm} \cdot d_m} = \Delta \epsilon_{\lambda} \quad [\text{I-142}]$$

que es la ecuación fundamental para un espectro de diferencias de concentraciones.

Amplia aplicación ha tenido este método en el estudio de asociación de la glutámico-deshidrogenasa (78), consiguiendo, en combinación con otras técnicas, conocimiento sobre particularidades de la asociación. También ha sido utilizado en el estudio del glucagón (79) y en la dimerización de la insulina (80).

#### 4. Equilibrio de diálisis

El método de equilibrio de diálisis, ampliamente desarrollado por Klotz en 1946 (81), se puede aplicar tanto al estudio de asociaciones de proteínas a pequeños ligandos como a la asociación de proteínas entre sí, siempre que las especies moleculares puestas en juego en el equilibrio posean una acusada diferencia de tamaño. Se ha de disponer para el desarrollo de esta técnica de una membrana tal que sea permeable a una de ellas, lógicamente, la de menor tamaño molecular, e impermeable a la otra especie molecular. Cuando se alcance el equilibrio, la concentración de la sustancia para la cual la membrana es permeable fuera de la bolsa de diálisis será igual a la concentración de esta misma especie molecular sin unir a la proteína dentro de la bolsa de diálisis. El fácil acceso a este dato que nos proporciona la técnica del equilibrio de diálisis hace directamente aplicables las ecuaciones obtenidas anteriormente en este mismo capítulo. Así, por ejemplo, se ha conseguido estudiar la asociación de conalbumina a lisozima (83).

Tiene la ventaja este método, como se ha indicado, de poder medir directamente, poniendo a punto una técnica analítica adecuada, la concentración de una de las especies moleculares del equilibrio en su

estado libre; lógicamente, de aquella para la cual la membrana es permeable.

Cuando las especies reaccionantes poseen una carga neta aun después de combinadas, se producirá una desigual distribución de iones a lo largo de la membrana como consecuencia del efecto Donnan, no pudiéndose aplicar directamente las ecuaciones, ya que varía la actividad de la especie de menor tamaño molecular dentro y fuera de la membrana. Sin embargo, conociendo la carga neta de la proteína es posible calcular la distribución Donnan y evaluar hasta qué punto van a modificarse las anteriores ecuaciones (82). En varios sistemas de proteínas la consideración del efecto Donnan es importante, y preciso es tenerlo en cuenta (84).

Cuando el efecto Donnan se reduce a proporciones despreciables, la actividad de la molécula dentro y fuera de la membrana es igual, y, por tanto, la concentración de la especie molecular que se mide fuera de la membrana alcanza el mismo valor que la concentración de la misma especie no unida dentro de la membrana.

Este método, aparte de las desventajas anteriormente apuntadas, presenta otras no menos importantes. Debido al largo tiempo que generalmente ha de transcurrir hasta que se consigue el equilibrio, puede ocurrir una sustancial desnaturalización de la proteína.

## II. TECNICAS DE TRANSPORTE

### 1. Tratamiento teórico general

#### A) INTRODUCCIÓN

Las propiedades de los diversos componentes de un sistema asociante pueden ser lo suficientemente distintas para exhibir un comportamiento diferente en técnicas que incluyen transporte (velocidad de sedimentación, electroforesis, cromatografías, etc.). Evidentemente, si se considera una dimerización  $2P \rightleftharpoons P_2$ , el coeficiente de sedimentación del monómero,  $s_1$ , será menor que el del dímero,  $s_2$ . Pero esto no significa que, como consecuencia de un experimento de velocidad de sedimentación, hayan de resultar siempre dos límites en la célula de la ultracentrífuga, ya que las condiciones de equilibrio químico pueden oponerse a una separación neta de  $P$  y  $P_2$ .

Es menester tener en cuenta que, en el estudio de un equilibrio de asociación, los parámetros fisicoquímicos de más interés son las constantes de equilibrio. Pero cuando la técnica utilizada para su estudio implica un transporte de las distintas especies, que tendería a desplazar el equilibrio químico, es necesario considerar para un adecuado planteamiento teórico no sólo las constantes de equilibrio, sino también las constantes de velocidad de las reacciones implicadas en el mismo. Ya en 1942, Longworth y McInnes (85) establecieron una clasificación de los distintos sistemas asociantes en términos de las constantes de velocidad de las reacciones de formación y descomposición. En un equilibrio general del tipo  $A \rightleftharpoons B$ , la constante de equilibrio puede expresarse como

$$K = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{II-1}]$$

donde  $k_1$  y  $k_2$  son las velocidades de reacción  $A \rightarrow B$  y  $B \rightarrow A$  respectivamente, siempre que el orden cinético de ambas reacciones venga indicado por su estequiometría.

En términos termodinámicos, el equilibrio queda totalmente definido al conocer  $K$ , pero para predecir su comportamiento frente a una técnica de transporte es fundamental, en muchos casos, estimar los valores de  $k_1$  y  $k_2$ .

Si  $k_1 \ll k_2$ ,  $K$  será muy pequeña y en el equilibrio predominará la especie  $A$ . Si el equilibrio se desplaza, como consecuencia del transporte,  $B$  se convertirá inmediatamente en  $A$ , mientras que  $A$  tardará mucho más en convertirse en  $B$ . La consecuencia de todo esto es que, al someter el sistema en equilibrio a una técnica de transporte, se comportará prácticamente como si sólo estuviese presente la especie  $A$ . Por el contrario, si  $k_1 \gg k_2$ , esto es si  $K \gg 1$ , siguiendo un elemental razonamiento análogo, se ve que el sistema comportaría como si sólo se encontrara la especie  $B$ .

Sin embargo, cuando  $k_1 \simeq k_2$ ,  $K \simeq 1$  y la proporción de especies  $A$  y  $B$  en el equilibrio es muy semejante. Pero, a efectos de transporte, es muy distinto que esta condición se cumpla siendo  $k_1$  y  $k_2$  pequeñas o grandes. En efecto, si ambas constantes de velocidad son pequeñas, al separarse por transporte las especies  $A$  y  $B$ , cada una de ellas invertiría mucho tiempo en convertirse en la otra, por lo que el sistema se comportaría prácticamente como una mezcla de dos especies no reaccionantes. Si, por ejemplo, se somete a ultracentrifugación una proteína

en equilibrio con su dímero y las velocidades de dimerización y de rotura del dímero son muy pequeñas, se obtendrían, con óptica de schlieren, dos máximos, uno correspondiente al coeficiente de sedimentación de la especie  $P$  y otro correspondiente al de  $P_2$ .

Pero si  $k_1$  y  $k_2$  son muy grandes y próximas entre sí, aunque en el equilibrio las concentraciones de  $A$  y  $B$  sean semejantes, como en el caso anterior, no puede determinarse *a priori* el número de límites (o de máximos en la curva de schlieren) que resultarían de un transporte de ambas especies. Este hecho resulta evidente al considerar que tan pronto  $B$  se separe de  $A$  en busca del equilibrio físico, tenderá a restablecerse el equilibrio químico mediante las reacciones  $B \rightarrow A$  y  $A \rightarrow B$ .

Por razones obvias, este último caso es el más interesante desde un punto de vista teórico, ya que los casos anteriores se resuelven con mucha mayor facilidad. Por ese motivo, la discusión subsiguiente se centrará en la predicción del número, forma y posición de los límites observables cuando se somete a alguna técnica de transporte un sistema en el que  $k_1 \simeq k_2 \gg 0$ .

## B) FORMA, NÚMERO Y POSICIÓN DE LOS LÍMITES

Un sistema sometido a un transporte no se encuentra en equilibrio termodinámico, sino que existe en cada uno de sus puntos un flujo —de materia en el caso presente— que tiende a llevar a los componentes del sistema al equilibrio. El tratamiento teórico de tales sistemas puede hacerse por métodos cinéticos, perdiendo entonces el rigor que caracteriza al método termodinámico, pero también puede hacerse uso de la termodinámica de procesos irreversibles.

Los tratamientos cinéticos han sido desarrollados fundamentalmente por Gilbert (86-88) y por el grupo de Kegeles (17, 89-92), mientras que Fujita ha desarrollado el método termodinámico (3). Aunque éste es más correcto, los resultados no difieren demasiado de los del método cinético, y, sin embargo, su complejidad es notablemente superior, por lo que en la presente revisión se hará referencia tan sólo al tratamiento cinético.

El modelo ideal de sistema de transporte que se utilizará en el desarrollo teórico es una disolución de dos componentes encerrada en una célula de sección longitudinal rectangular y sometida a un campo uniforme paralelo al lado mayor del rectángulo.

La ecuación de continuidad para este sistema será:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -v \frac{\partial c}{\partial x} + D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \quad [\text{II-2}]$$

donde  $v$  es la velocidad con que se mueve el soluto, cuya concentración en peso es  $c$ , como consecuencia del campo aplicado, y  $D$  es el coeficiente de difusión del soluto en el disolvente utilizado.

Cuando, en vez de un soluto único, se tiene una mezcla de compuestos relacionados entre sí por una reacción química, el balance de masa debe incluir sumandos que indiquen la aparición o desaparición del componente debidas a reacción química. Por ejemplo, para la reacción  $A \rightleftharpoons B$ , las ecuaciones de continuidad serían:

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} = -v_A \frac{\partial c_A}{\partial x} + D_A \frac{\partial^2 c_A}{\partial x^2} - k_1 c_A + k_2 c_B \quad [\text{II-3}]$$

$$\frac{\partial c_B}{\partial t} = -v_B \frac{\partial c_B}{\partial x} + D_B \frac{\partial^2 c_B}{\partial x^2} - k_2 c_B + k_1 c_A. \quad [\text{II-4}]$$

Para proseguir el análisis es conveniente introducir una serie de simplificaciones. En primer lugar, si el sistema se comporta de un modo ideal y si  $K = k_1/k_2$ ,  $k_1 c_A$  será igual a  $k_2 c_B$ , con lo que las ecuaciones [II-3] y [II-4] se reducen (86,87) a:

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} = -v_A \frac{\partial c_A}{\partial x} + D_A \frac{\partial^2 c_A}{\partial x^2} \quad [\text{II-5}]$$

$$\frac{\partial c_B}{\partial t} = -v_B \frac{\partial c_B}{\partial x} + D_B \frac{\partial^2 c_B}{\partial x^2} \quad [\text{II-6}]$$

En segundo lugar, si se tiene en cuenta que los efectos de la difusión sobre el límite varían con la raíz cuadrada del tiempo, mientras que el cambio de posición del límite debido al transporte es directamente proporcional al tiempo, puede ignorarse —en primera aproximación— la difusión (88-92) con lo que las ecuaciones [II-5] y [II-6] quedan simplemente como:

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} = -v_A \frac{\partial c_A}{\partial x} \quad [\text{II-7}]$$

$$\frac{\partial c_B}{\partial t} = -v_B \frac{\partial c_B}{\partial x}. \quad [\text{II-8}]$$

Hasta ahora se ha considerado una reacción general  $A \rightleftharpoons B$ . Concretando a un equilibrio de asociación de una proteína  $nP \rightleftharpoons P_n$ , las ecuaciones [II-7] y [II-8] toman la forma:

$$\left(\frac{\partial c_1}{\partial t}\right)_x = -v_1 \left(\frac{\partial c_1}{\partial x}\right)_t \quad \text{[II-9]}$$

$$\left(\frac{\partial c_n}{\partial t}\right)_x = -v_n \left(\frac{\partial c_n}{\partial x}\right)_t; \quad \text{[II-10]}$$

donde los subíndices 1 y  $n$  hacen referencia al monómero y al  $n$ -mero respectivamente. Sumando las ecuaciones [II-9] y [II-10] y teniendo en cuenta que  $K_n = c_n/c_1^n$  se llega a

$$\left(\frac{\partial c_1}{\partial t}\right)_x + nK_n c_1^{n-1} \left(\frac{\partial c_1}{\partial t}\right)_x = -v_1 \left(\frac{\partial c_1}{\partial x}\right)_t - v_n nK_n c_1^{n-1} \left(\frac{\partial c_1}{\partial x}\right)_t \quad \text{[II-11]}$$

Haciendo

$$\left(\frac{\partial c_1}{\partial t}\right)_x = -\left(\frac{\partial x}{\partial t}\right)_{c_1} \left(\frac{\partial c_1}{\partial x}\right)_t \quad \text{[II-12]}$$

y sustituyendo en [II-11]

$$\left(\frac{\partial x}{\partial t}\right)_{c_1} (1 + nK_n c_1^{n-1}) = v_1 + v_n nK_n c_1^{n-1}. \quad \text{[II-13]}$$

Gilbert (86) define una velocidad relativa,  $\delta$ , como

$$\delta = \frac{\left(\frac{\partial x}{\partial t}\right)_{c_1} - v_1}{v_n - v_1} \quad \text{[II-14]}$$

que, a la vista de la ecuación [II-13] se puede expresar:

$$\delta = \frac{v_1 + v_n nK_n c_1^{n-1}}{v_n - v_1} - v_1 = \frac{nK_n c_1^{n-1}}{1 + nK_n c_1^{n-1}} \quad \text{[II-15]}$$

A partir de las ecuaciones anteriores pueden expresarse  $c_1$  y  $c_n$  en función de  $\delta$ :

$$c_1 = \left( \frac{1}{nK_n} \frac{\delta}{1 - \delta} \right)^{\frac{1}{n-1}} \quad \text{[II-16]}$$

$$c_n = K_n \left( \frac{1}{nK_n} \frac{\delta}{1 - \delta} \right)^{\frac{n}{n-1}} \quad \text{[II-17]}$$

La concentración total de proteína en un punto de la célula donde la velocidad relativa sea  $\delta$  será, pues,

$$c_1 + c_n = \left( \frac{1}{nK_n} \frac{\delta}{1 - \delta} \right)^{\frac{1}{n-1}} \left( 1 + \frac{1}{n} \frac{\delta}{1 - \delta} \right) \quad \text{[II-18]}$$

Pero en la definición de  $\delta$  (ecuación [II-14]) la derivada  $(\partial x / \partial t)_{c_1}$  puede también expresarse simplemente como  $x/t$ , siendo  $x$  la distancia entre el límite inicial y un punto donde la concentración del monómero sea  $c_1$ . En estos términos, la concentración total,  $c$ , puede obtenerse de la ecuación [II-18] en función de  $x$  y de  $t$ :

$$c = c_1 + c_n = \left[ \frac{1}{nK_n} \frac{(x/t) - v_1}{v_n - (x/t)} \right]^{\frac{1}{n-1}} \left[ 1 + \frac{1}{n} \frac{(x/t) - v_1}{v_n - (x/t)} \right] \quad \text{[II-19]}$$

La ecuación [II-19] describe la concentración total de proteína en un punto de la célula separado por una distancia  $x$  de la posición inicial del límite, al cabo de un tiempo  $t$ . Puede ser de utilidad para predecir el comportamiento de un sistema en equilibrio en una técnica de transporte si se utiliza óptica de absorción para registrar experimentalmente los resultados. El número de límites vendrá dado por el número de puntos de inflexión al representar, para cada valor de  $t$ ,  $c$  frente a  $x$  y su posición se podrá calcular a partir de los valores de  $x$  que anulen la segunda derivada de la ecuación [II-19] (o de la ecuación [II-18] de la que procede). Para calcular  $(\partial c / \partial x)_t$ , es conveniente hacer

$$\left( \frac{\partial c}{\partial x} \right)_t = \left( \frac{\partial (c_1 + c_n)}{\partial x} \right)_t = \left( \frac{\partial (c_1 + c_n)}{\partial \delta} \right)_t \left( \frac{\partial \delta}{\partial x} \right)_t \quad \text{[II-20]}$$

y tener en cuenta que

$$\left(\frac{\partial \delta}{\partial x}\right)_t = \frac{1}{(v_n - v_1)t} \quad [\text{II-21}]$$

con lo que

$$\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)_t = \frac{1}{(v_n - v_1)t} \frac{1}{n-1} \left(\frac{1}{nK_n}\right)^{\frac{1}{n-1}} \delta^{\frac{2-n}{n-1}} \left(\frac{1}{1-\delta}\right)^{\frac{2n-1}{n-1}} \quad [\text{II-22}]$$

o bien

$$\left(\frac{\partial c}{\partial x}\right)_t = \frac{1}{(v_n - v_1)t} \frac{1}{n-1} \left(\frac{1}{nK_n}\right)^{\frac{1}{n-1}} \left[\frac{(x/t) - v_1}{v_n - v_1}\right]^{\frac{2-n}{n-1}} \left[\frac{v_n - v_1}{v_n - (x/t)}\right]^{\frac{2n-1}{n-1}} \quad [\text{II-23}]$$

En este momento conviene advertir que las ecuaciones [II-22] y [II-23] describen las curvas que se obtendrían a tiempo  $t$  al registrar los resultados del experimento con óptica de schlieren.

Derivando la ecuación [II-22], se pueden obtener los valores de  $\delta$  que hagan mínimo el de la derivada  $(\partial c/\partial x)_t$ . Existe un único mínimo para

$$\delta_{\min} = \frac{(x/t) - v_1}{v_n - v_1} = \frac{n-2}{3(n-1)} \quad [\text{II-24}]$$

Así, pues, si  $x$  se expresa en términos de una «distancia reducida»  $x/t(v_n - v_1)$  la posición del mínimo sólo depende de  $n$ .

El cálculo precedente puede efectuarse también para equilibrios en los que coexistan con el monómero dos o más especies poliméricas (87), aunque, naturalmente, las ecuaciones resultantes son más complejas y no es posible determinar teóricamente el número de límites.

### C) CÁLCULO DE LAS CONSTANTES DE EQUILIBRIO

Del examen de las ecuaciones [II-14] y [II-15] se desprende que, para un sistema  $nP \rightleftharpoons P_n$ , cuya constante de equilibrio sea  $K_n$  el máximo valor que puede alcanzar el cociente  $x/t$  viene dado exclusivamente por la concentración total. Si ésta es lo suficientemente baja para que el valor de  $x/t$  coincida con el correspondiente al mínimo, sólo se ob-

servaría un máximo en la curva de schlieren. Pero, a medida que la concentración total aumenta, lo hace también  $x/t$ , y cuando alcanza un valor superior al correspondiente al mínimo, comenzarán a observarse dos picos. Estas predicciones teóricas están de acuerdo con los resultados experimentales (véase, por ejemplo, la figura 21).

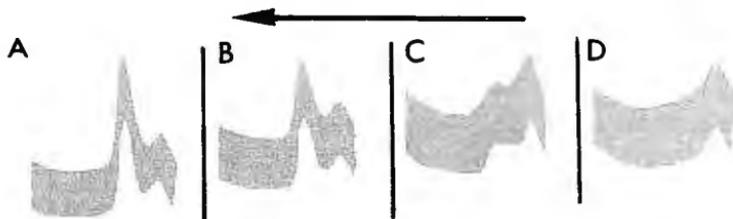


Figura 21.—Sedimentación de mercuripapaina a diferentes concentraciones totales: A) 22,8 B) 13,0 C) 6,5 D) 3,3 g/l. Valores de  $s$ : A) 4,8 B) 3,5 C) 3,7 D) 3,2 S. Reproducido con autorización de Nichol y col. (92).

Por otra parte, la posición del mínimo es sólo función de  $n$ ; la concentración en el punto de la célula que corresponde a dicho mínimo será tan sólo función de  $n$  y  $K_n$  e independiente de la concentración total. Esto significa que, al aumentar la concentración total, sólo incrementará el área correspondiente al límite más rápido. Siguiendo el tratamiento del grupo de Kegeles (véase, por ejemplo, la referencia 92), si la concentración en el punto en que aparece el mínimo de la curva de schlieren se denomina  $\Delta_s$ , al aplicar la ecuación [II-18] a la posición de dicho mínimo indicada por [II-24] se obtiene, despejando  $K_n$ ,

$$K_n = \Delta_s^{1-n} \frac{[2(n^2 - 1)]^{n-1}(n - 2)}{[n(2n - 1)]^n} \quad \text{[II-25]}$$

La ecuación [II-25] permite calcular el valor de la constante de equilibrio a partir de los datos experimentales obtenidos por técnicas de transporte.

En las secciones siguientes se tratará de la aplicación de esta teoría general a técnicas de transporte concretas: ultracentrifugación, electroforesis y cromatografía en geles.

## 2. Ultracentrifugación

### A) INTRODUCCIÓN

Determinación de los coeficientes de sedimentación.

La magnitud que se determina en un experimento de velocidad de sedimentación es el coeficiente de sedimentación. En el caso de un único soluto viene definido por la relación(\*).

$$s(c) \equiv \frac{\mathcal{J}}{\omega^2 xc} \quad [\text{II-26}]$$

donde  $\mathcal{J}$  representa el flujo (masa de soluto transportada por unidad de superficie y tiempo) debido a sedimentación del soluto en un punto de la célula,  $x$ , donde su concentración es  $c$ . El coeficiente de sedimentación está relacionado con el peso molecular del soluto, y su coeficiente de difusión  $D(c)$  a través de la ecuación

$$s(c) = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)D(c)}{RT[1 + c(\partial \ln y / \partial c)]} \quad [\text{II-27}]$$

o bien, ya que  $s(c)$  y  $D(c)$  pueden determinarse independientemente para varias concentraciones y extrapolarse a  $c = 0$ ,

$$s^0 = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)D^0}{RT} \quad [\text{II-28}]$$

que es la conocida ecuación de Svedberg. Esta es sólo aplicable cuando la ecuación [II-26] se define para un punto de la célula en el que  $(\partial c / \partial x) = 0$ . En un experimento de velocidad de sedimentación realizado con un único soluto, la concentración, luego de un cierto tiempo de centrifugación, es nula en las proximidades del menisco. Crece posteriormente en la zona del límite entre disolvente y disolución y se estabiliza después, formando una meseta. Es, pues, en esta zona

---

(\*) Es muy frecuente definir el coeficiente de sedimentación como velocidad de sedimentación por unidad de campo centrífugo,

$$s \equiv \frac{\partial x}{\partial t} \frac{1}{\omega^2 x}$$

En términos más rigurosos es preferible utilizar la ecuación [II-26] (4) para dar cuenta de la dependencia de  $s$  con respecto a  $c$ .

de meseta donde debe definirse el valor del coeficiente de sedimentación. Introduciendo esta precisión en la ecuación [II-26] se tendría:

$$s(c_p) \equiv \frac{\mathcal{J}_p}{\omega^2 x c_p} \quad [\text{II-29}]$$

donde los subíndices  $p$  indican que tanto el flujo como la concentración corresponden al *plateau* o meseta.

No es posible determinar experimentalmente la velocidad de transporte del soluto en la zona de la meseta de un modo directo. Pero puede demostrarse que siempre hay un punto en el límite que se desplaza a igual velocidad que las macromoléculas de la meseta (35). Este punto coincide aproximadamente con el máximo de la curva  $(\partial c/\partial x)$  en función de  $x$ , es decir, con el máximo de la curva que se obtiene al registrar los resultados con óptica de schlieren, siempre que dicha curva sea perfectamente gaussiana.

En ese caso, el coeficiente de sedimentación se obtiene a partir de la ecuación

$$\frac{d \ln x_{\max}}{dt} = \omega^2 s(c_p) \quad [\text{II-30}]$$

donde  $x_{\max}$  simboliza la distancia del punto correspondiente al máximo de la curva de schlieren al eje de giro. En efecto, al representar  $\ln x_{\max}$  en función de  $t$  se obtiene una recta cuya pendiente es  $\omega^2 s(c_p)$ .

Los errores que se cometen al efectuar la aproximación mencionada anteriormente en el caso de un soluto único son menores del 1 por 100 (93). Pero si el pico es asimétrico —como ocurre cuando el soluto es paucidiserso—, la velocidad de las macromoléculas en la meseta es igual a la de desplazamiento del segundo momento de la curva que representa  $(\partial c/\partial x)$  en función de  $x$ . El valor de  $x$  correspondiente a dicho punto,  $x^*$ , puede calcularse (35) mediante:

$$x^{*2} = \frac{\int x^2 \left( \frac{\partial c}{\partial x} \right) dx}{\int \left( \frac{\partial c}{\partial x} \right) dx} \quad [\text{II-31}]$$

Las integrales que aparecen en la ecuación [II-31] pueden evaluarse numéricamente a partir de los datos obtenidos con óptica de schlieren. El cálculo no es sencillo y es conveniente disponer de un programa adecuado (5).

Si el coeficiente de sedimentación se calcula a partir del desplazamiento de  $x^*$ , se obtiene en realidad un valor,  $\bar{s}$ , que representa el promedio en peso de los coeficientes de sedimentación de las distintas macromoléculas presentes en la meseta (2) (\*). Esto es cierto aun en el caso de solutos relacionados entre sí por medio de una reacción química, como ocurre en los sistemas asociantes. El cálculo de  $\bar{s}$  puede, pues, dar una idea sobre la asociación aunque, como se discutirá más adelante, no es posible calcular los parámetros de dicha asociación a partir de  $\bar{s}$  exclusivamente.

#### Aplicación de la teoría general de sistemas de transporte al caso de la ultracentrifugación.

Las ecuaciones [II-2]-[II-25] se han obtenido para el sistema de transporte ideal descrito en II.1.B. Este sistema difiere de la ultracentrifugación en varios extremos. En primer lugar, en un experimento de velocidad de sedimentación, ya que la velocidad angular es ordinariamente alta, el campo centrífugo no puede considerarse uniforme a lo largo de  $x$ . Por otra parte, la sección longitudinal de la célula no es rectangular, sino de forma de sector circular, a no ser que se utilice una célula con pieza central multicanal. Este hecho obligaría a incluir en las ecuaciones de continuidad basadas en [II-2] un término que diera cuenta de la dilución radial.

Además de estas diferencias —que son propias de las exigencias instrumentales de la ultracentrifugación— pueden apuntarse todas las debidas a las simplificaciones introducidas en el tratamiento de Gilbert. La difusión —ignorada en el tratamiento teórico precedente— que tiene lugar en cualquier experimento real de transporte hace que la forma de los límites sea distinta de la prevista teóricamente. El tratamiento termodinámico de Fujita (3) incluye la corrección por dilución radial, pero también ignora la difusión, por lo que de su aplicación no derivan especiales ventajas sobre la teoría expuesta.

Así, pues, en principio, es evidente que aun prescindiendo del posible comportamiento no ideal de los solutos, las ecuaciones deducidas en [II-1] no tendrán validez absoluta en ultracentrifugación. Sin embargo, la divergencia más importante entre el modelo ideal que describen y la ultracentrifugación es la debida a los efectos de la presión sobre la constante de equilibrio, que se desarrolla en el apartado siguiente.

---

(\*) Para una discusión completa del significado de  $\bar{s}$  debe consultarse el artículo de Creeth y Pain (4), p. 268.

### Efectos de la presión sobre las constantes de equilibrio.

Ya que los experimentos de velocidad de sedimentación se realizan con campos centrífugos elevados, las diferencias de presión hidrostática en los diversos puntos de la célula pueden ser considerables (hasta de 500 atm). Si la reacción de asociación lleva implícito un cambio de volumen molar, la constante de equilibrio será dependiente de la presión y, por tanto, variará a lo largo de  $x$ . Esta variación puede expresarse, relacionada con el incremento de presión hidrostática, por la ecuación

$$\ln K(x) = \ln K(x_m) + \frac{\Delta V}{RT} \frac{\rho\omega^2}{2} (x^2 - x_m^2) \quad [\text{II-32}]$$

donde  $\Delta V$  representa el incremento de volumen molar como consecuencia de la reacción. Kegeles y col. (94) han estudiado los efectos del cambio de presión sobre el equilibrio químico en el transcurso de una centrifugación. La influencia es considerable, ya que estos autores han calculado que, por ejemplo, en una reacción  $2P \rightleftharpoons P_2$ , si el volumen específico parcial del monómero es 0,790 y el del dímero 0,776 la constante de equilibrio varía desde el menisco ( $x_m = 5,7$  cm) hasta el fondo de la célula ( $x_b = 7,2$  cm) en un factor de  $10^{36}$  cuando el rotor gira a 60.000 rpm.

Esta variación de la constante de equilibrio a lo largo de la célula puede acarrear importantes consecuencias sobre el número y forma de los límites. Al someter a centrifugación un sistema que experimente una reacción química del tipo  $A + B \rightleftharpoons C$  la teoría de Gilbert predice la existencia de dos o tres máximos en la curva de schlieren (87). Pero teniendo en cuenta la variación de  $K$  a lo largo de la célula, pueden resultar hasta cinco picos, cuatro positivos y uno negativo (94), como se aprecia en la figura 22. El hecho de que en determinados puntos de la célula  $\partial c/\partial x$  pueda ser negativo (es decir, que la concentración total disminuya al aumentar la distancia al eje de giro) dará origen a convección que modificará la forma de los límites y hará difícil la interpretación de los resultados, no sólo en términos de la teoría de Gilbert (86-88), sino aun teniendo en cuenta las modificaciones de Kegeles y col. (94).

Todas estas limitaciones hacen que la aplicación de las técnicas de velocidad de sedimentación al estudio de equilibrios de asociación sea más limitada que la de las de equilibrio de sedimentación, descritas en la sección I.1. No obstante, las técnicas de velocidad de sedimen-

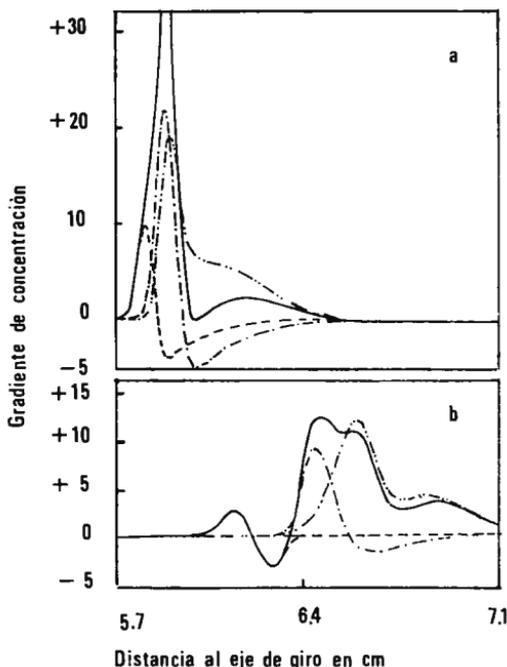


Figura 22.—Gradientes teóricos en un equilibrio  $A + B \rightleftharpoons C$ . Las densidades, pesos moleculares y coeficientes de sedimentación de  $A$ ,  $B$  y  $C$  son respectivamente 1,31, 1,32 y 1,33; 70.000, 140.000 y 210.000; 4S, 6S y 8S.  $K = 1$ . Reproducido con autorización de Kegeles y col. (94).  
 — Total; - - - A; - · - B; · · · C.

tación presentan ciertas ventajas, siendo la más importante el ahorro de tiempo que supone en la experimentación, que han inducido a bastantes autores a utilizarlas. En las secciones II.1.B, II.1.C y II.1.D se dará cuenta brevemente de algunos ejemplos de aplicación.

## B) ESTUDIO DE SISTEMAS AUTOASOCIANTES

Un sistema autoasociante puede dar origen a un único pico de schlieren cuando se somete a un experimento de velocidad de sedimentación. Hay, sin embargo, tres procedimientos para discernir si en el límite se encuentra una única especie molecular o tiene lugar en dicha zona un equilibrio químico entre varios componentes.

En primer lugar, el coeficiente de sedimentación medio  $\bar{s}$  debe aumentar con la concentración si tiene lugar autoasociación. En la

figura 23 se observa claramente dicha dependencia. Hay que advertir que el coeficiente de sedimentación puede aumentar como consecuencia del comportamiento no ideal del soluto si el coeficiente del virial es negativo. Pero tanto el hábito de la curva como la magnitud del incremento de  $s$  permiten decidir, de ordinario, entre ambas posibilidades.

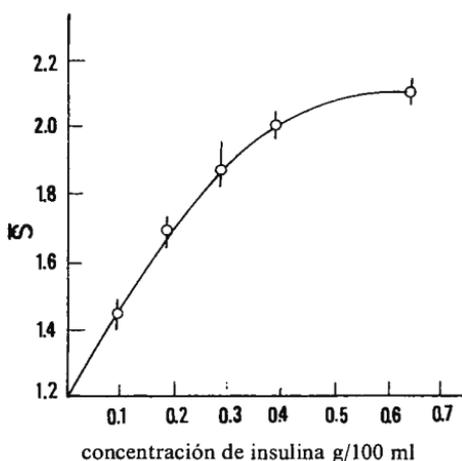


Figura 23.—Variación del coeficiente de sedimentación de la insulina con la concentración. Reproducido con autorización de Coates (5).

Por otra parte, caso de existir equilibrio en el límite, lo más probable será que  $K$  sea función bien de la temperatura, bien de la presión. En este caso, por cambios de dichas condiciones puede modificarse el aspecto de las curvas de schlieren.

Timasheff y Townend (95,96) encontraron, por ejemplo, que la  $\beta$ -lactoglobulina (mezcla de las variantes *A* y *B*) a concentración de 30 g/l y pH 4,65 daba origen a un único pico de schlieren, prácticamente simétrico cuando la ultracentrifugación se realizaba a 25°. Al repetir la operación a 15°, manteniendo invariables las restantes condiciones, el pico dejaba de ser simétrico, mientras que al trabajar a 8° y, sobre todo, a 2° aparecían dos picos. Se trata, pues, de un sistema autoasociante, cuya constante de equilibrio es función de la temperatura.

La presión puede variarse haciendo flotar sobre la disolución que se centrifuga capas de diferente espesor de aceite mineral (97) o también acelerando y decelerando bruscamente el rotor. Más adelante se mencionará un ejemplo de este tipo de técnica.

Por los procedimientos que se acaban de exponer es posible poner de manifiesto la presencia de equilibrios de asociación en el transcurso de una ultracentrifugación, pero, a pesar de todas sus limitaciones, es necesario acudir a la teoría general de sistemas de transporte para evaluar los parámetros fisicoquímicos de dicho equilibrio. En efecto, aunque se determine el valor  $\bar{s} = \sum s_i c_i / \sum c_i$  puede verse fácilmente que el valor de  $M$  que resultaría de su sustitución en la ecuación de Svedberg [II-28] no corresponde a  $\bar{M}_w$  en el caso general en que el coeficiente de fricción de cada polímero sea proporcional a una potencia de su peso molecular.

Un sistema autoasociante muy estudiado por técnicas de transporte es el ya mencionado de la  $\beta$ -lactoglobulina. La variante  $A$  es capaz de agregar en el intervalo de pH 3,7 - 5,2 en tampones de fuerza iónica 0,1 M. Townend y col. (96) sometieron a ultracentrifugación  $\beta$ -lactoglobulina  $A$  en dichas condiciones y obtuvieron curvas de schlieren bimodales. A partir de la ecuación [II-24] hallaron un valor de  $n = 4$ , y, de la ecuación [II-25], obtuvieron una constante de equilibrio para la tetramerización  $K_4 = 3 \cdot 10^{11}$  litros<sup>3</sup> · mol<sup>-3</sup>. Los resultados concuerdan bien con los obtenidos por dispersión de luz:  $K_4 = 4 \cdot 10^{11}$  litros<sup>3</sup> · mol<sup>-3</sup> (98).

Gilbert y Gilbert (99) estudiaron el mismo sistema por un método diferente. Calcularon experimentalmente los valores de  $\bar{s}$  para el pico más rápido (\*) de la curva de schlieren y representaron gráficamente la relación entre  $\bar{s}$  y  $c$  (fig. 24). Por otra parte, establecieron las siguientes relaciones entre el coeficiente de sedimentación del monómero  $s_1$  y del polímero  $s_n$  con la concentración:

$$s_1 = s_1^0(1 - gc) \quad [\text{II-33}]$$

$$s_n = s_n^0(1 - gc) \quad [\text{II-34}]$$

en las que  $g$  es una constante común.

A partir de estas ecuaciones y teniendo en cuenta que

$$s = \frac{s_1 c_1 + s_n c_n}{c_1 + c_n}, \quad [\text{II-35}]$$

---

(\*) Es menester tener presente que  $\bar{s}$ , calculado a partir de  $x$  del pico más rápido, es el coeficiente de sedimentación medio en peso de las especies presentes en la segunda meseta (monómero y polímero). Si el cálculo se realiza a partir del pico más lento, el resultado puede ser distinto, ya que, de ordinario, la concentración de polímero en la primera meseta será menor.

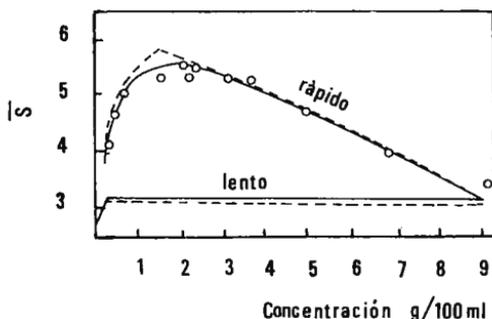


Figura 24.—Variación del coeficiente de sedimentación de los picos rápido y lento en la asociación de la  $\beta$ -lactoglobulina A en función de la concentraciones totales. Reproducido con autorización de Gilbert y Gilbert (99).

podieron calcular la relación teórica entre  $\bar{s}$  y  $c$  suponiendo  $n = 4$ . El valor de  $g$  (necesario en las ecuaciones [II-33] y [II-34]) se obtuvo a partir de la pendiente de la parte recta de la curva descrita por los puntos experimentales de la figura 24 por un método descrito previamente por Gilbert (100), y el de  $K_4$  se estimó en  $5 \cdot 10^{11}$  litros<sup>3</sup> · mol<sup>-3</sup>. Finalmente, Gilbert y Gilbert (99) determinaron  $s_1^0$  por extrapolación de  $\bar{s}$  a dilución infinita y, a partir de este dato estimaron  $s_4^0$  (\*). La variación teórica de  $\bar{s}$  en función de  $c$ , obtenida con todos estos datos (fig. 24), se ajusta perfectamente a los puntos experimentales, con lo que se comprueba la validez de las predicciones realizadas.

El método, que quizá no haya sido utilizado con la profusión que merece, puede permitir el cálculo de todos los parámetros del equilibrio  $nP \rightleftharpoons P_n$  con los datos de una serie de experimentos de velocidad de sedimentación obtenidos a varias concentraciones. Todas las cantidades necesarias para la construcción de la curva teórica de  $\bar{s}$  en función de  $c$  se obtienen experimentalmente —como se ha indicado— a excepción de  $n$  y  $K_n$ . Sin embargo, disponiendo de un programa adecuado es posible encontrar los valores de  $n$  y  $K_n$  para lograr un ajuste óptimo con los puntos experimentales. El desarrollo de estos programas puede constituir una interesante línea de investigación futura.

(\*) Dada la relación que existe entre el coeficiente de sedimentación, el peso molecular y el coeficiente de fricción (véase la ecuación de Svedberg), es posible el cálculo de  $s_n^0$  en función de  $s_1^0$  si se adoptan valores para los correspondientes coeficientes de fricción.

## C) ESTUDIO DE ASOCIACIONES PROTEÍNA-LIGANDO

Es posible el análisis de un sistema en equilibrio  $P + nA \rightleftharpoons PA_n$  por velocidad de sedimentación si se cumplen las condiciones indicadas en el apartado I.1.B, es decir, si el ligando absorbe luz a alguna longitud de onda en la que el coeficiente de extinción de la proteína sea nulo.

Los coeficientes de sedimentación medios de la proteína y el ligando,  $\bar{s}_P$  y  $\bar{s}_A$ , respectivamente, serán:

$$\bar{s}_P = \frac{\sum_{i=0}^n [PA_i] s_{PA_i}}{C} \quad [\text{II-36}]$$

$$\bar{s}_A = \frac{[A] s_A + \sum_{i=1}^n i [PA_i] s_{PA_i}}{C_A} \quad [\text{II-37}]$$

Para desarrollar los cálculos siguientes, debidos a Steinberg y Schachman (33), es necesario suponer que el incremento  $m$  que se produce en el coeficiente de sedimentación de la proteína para cada molécula de ligando unida es constante. En ese caso,

$$s_{PA_i} = s_P + im \quad [\text{II-38}]$$

Por consiguiente

$$\bar{s}_P = s_P + rm \quad [\text{II-39}]$$

donde  $r$  tiene el significado descrito en II.1.B.

A partir de las ecuaciones [II-37] y [II-38] y teniendo en cuenta el valor de la constante intrínseca de equilibrio definida por la ecuación [I-68] se llega a:

$$[A] = \frac{C_A \left( \bar{s}_P - \bar{s}_A - \frac{\bar{s}_P - s_P}{n} \right) + C(\bar{s}_P - s_P)}{\bar{s}_P - \bar{s}_A - \frac{\bar{s}_P - s_P}{n}} \quad [\text{II-40}]$$

Si  $n$  es grande y el peso molecular de A es pequeño en comparación con el de P,  $(\bar{s}_P - s_P)/n$  puede despreciarse, por lo que la ecuación [II-40] se reduce a:

$$[A] = C_A \frac{\bar{s}_P - \bar{s}_A}{\bar{s}_P - \bar{s}_A} + C \frac{\bar{s}_P - s_P}{\bar{s}_P - s_A} \quad [\text{II-41}]$$

Todavía puede introducirse una nueva simplificación en [II-41]. Si la asociación del ligando no aumenta mucho el peso molecular del complejo, como, por otra parte, el coeficiente de fricción del complejo puede ser mayor que el de la proteína,  $\bar{s}_P$  puede ser muy próximo a  $s_P$ . Despreciando, pues, el segundo término la ecuación [II-41] se puede escribir simplemente(\*):

$$[A] = C_A \frac{\bar{s}_P - \bar{s}_A}{\bar{s}_P - s_A} \quad \text{[II-42]}$$

La ecuación [II-42] permite calcular  $[A]$  para cada valor de  $C_A$  a partir de los resultados experimentales (\*\*). La inserción de  $[A]$  y  $C_A$  en la ecuación [I-65] conduce a la evaluación de  $r$ ,  $y$ , posteriormente, a la de  $n$  y  $k$  mediante representación gráfica de la ecuación [I-75].

#### D) ESTUDIO DE SISTEMAS EN LOS QUE LA ASOCIACIÓN ESTÁ MEDIADA POR LIGANDOS

En gran número de ocasiones, la asociación de proteínas depende de la presencia de ligandos de bajo peso molecular, frecuentemente iones inorgánicos. Estos sistemas conducen a equilibrios como el descrito por la ecuación [7]. La trascendencia biológica de dichos sistemas es grande y son, por ejemplo, numerosas las enzimas o complejos multienzimáticos cuya asociación depende de la presencia de ligandos (101).

Sin embargo, el avance en la comprensión de las derivaciones funcionales de estos sistemas no se ha visto acompañado, de ordinario, de la necesaria profundización fisicoquímica en el estudio del equilibrio de asociación. La causa fundamental es el escaso desarrollo de la teoría de las asociaciones mediadas por ligandos. Por este motivo, tales sistemas se han tratado sólo cualitativamente o, a lo sumo, se ha aplicado a ellos la teoría general de sistemas autoasociantes, lo cual no es rigurosamente válido.

---

(\*) Steinberg y Schachman han demostrado experimentalmente la validez de esta simplificación en el sistema seroalbúmina-naranja de metilo (33).

(\*\*) En principio,  $\bar{s}_P$  puede determinarse a partir de la curva de schlieren, y  $\bar{s}_A$  de la derivada de la curva de absorbancia a 444 nm. En la práctica, dicha determinación es compleja, ya que, por las particulares exigencias instrumentales derivadas de utilizar conjuntamente óptica de absorción y de schlieren, el cálculo a partir del segundo momento no es posible. El lector debe consultar el artículo original de Steinberg y Schachman (33) para encontrar una discusión detallada.

Cann elaboró, en el caso la electroforesis, la primera teoría sobre la influencia de la asociación mediada por ligandos en el transporte de macromoléculas (102-103), y, recientemente, Morimoto y Kegeles (21) han desarrollado el tratamiento teórico y lo han aplicado al estudio por ultracentrifugación de la asociación de la hemocianina de la langosta de mar *Homarus americanus*.

Cuando se somete a ultracentrifugación el suero de este crustáceo, aparece, en óptica de schlieren, un único pico, correspondiente a la hemocianina —que constituye la mayor parte de la proteína de suero—, con un coeficiente de sedimentación de 25 S. Cuando se centrifuga la hemocianina aislada en tampones de pH 4,0 – 9,0 con concentración de  $\text{Ca}^{++}$  libre ( $[\text{Ca}^{++}]$ ) 5 mM, da también origen a un único pico simétrico de coeficiente de sedimentación 25 S. A pH superior a 9, la hemocianina comienza a disociarse y aparecen en óptica de schlieren dos picos que no se resuelven. La concentración de  $\text{Ca}^{++}$  ejerce una crítica influencia en la disociación. Así, por ejemplo, a pH 9,6 el área del pico más lento aumenta a medida que la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  disminuye. Los coeficientes de sedimentación de ambos picos varían también ligeramente con la concentración de  $\text{Ca}^{++}$ , oscilando alrededor de 25 S y 17 S. También aparece, a concentraciones bajas de ese ion, un nuevo máximo al que corresponde un coeficiente de sedimentación de 5 S.

El aumento del pH tiene un efecto paralelo al de la disminución de  $\text{Ca}^{++}$ . En todos los casos, el pico correspondiente al componente de 5 S se resuelve perfectamente de los otros dos, lo que, en términos de la teoría de Gilbert (véase II.1.B), indica *a priori* que dicho componente no interviene en el equilibrio. Por el contrario, las especies de 17 y 25 S no se resuelven totalmente en ningún caso, lo que parece indicar que se encuentran realmente en equilibrio. Esto se pudo comprobar mediante la técnica de Josephs y Harrington (97), expuesta más arriba. La figura 25 muestra los efectos del cambio brusco de presión sobre la forma de la curva de schlieren. Los resultados son ya inequívocos en orden a afirmar que existe un rápido equilibrio entre las especies de 17 y 25 S. El hecho de que entre ambos picos, aunque no se resuelvan, aparezca un mínimo, excluiría, según la teoría de Gilbert, un equilibrio de dimerización (véase la ecuación [II-24]). Pero, de acuerdo con Cann y Goad (102), un equilibrio monómero-dímero puede dar origen a un mínimo en la curva de schlieren si la dimerización está mediada por la presencia de ligandos. El hecho de que el pH y la concentración

de  $\text{Ca}^{++}$  influyan notablemente en la sedimentación de la hemocianina parece apuntar a esta última posibilidad. Admitiendo, pues, que la especie de 25 S sea dímero de la de 17 S, el equilibrio se representaría:

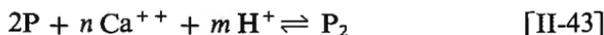


Figura 25.—Efecto de la presión sobre la forma de la curva de schlieren en la sedimentación de la hemocianina. Sobre las disoluciones se ha depositado una capa de aceite mineral y la velocidad del rotor se ha pasado bruscamente de 42.040 rpm (A) a 59.780 rpm (B) y de nuevo a 42.040 rpm (C). Reproducido con autorización de Morimoto y Kegeles (21).

y las especies de 5 S serían las subunidades del monómero que no intervienen en el equilibrio. Puesto que, a concentraciones relativamente altas de  $\text{Ca}^{++}$  ( $[\text{Ca}^{++}] = 0,014 \text{ M}$ ), el equilibrio está desplazado hacia  $\text{P}_2$ , el peso molecular de esta especie,  $M_2$ , puede calcularse a partir de la ecuación [I-10]:

$$\frac{1}{M_{2,ap}} = \frac{1}{M_2} + \frac{c_2}{M_2} \frac{d \ln y_2}{dc_2} \quad [\text{II-44}]$$

Morimoto y Kegeles (21) determinaron  $M_{2,ap}$  en función de la concentración de proteína por el método de Archibald y, por extrapolación a concentración nula, obtuvieron para  $M_2$  un valor de  $9,4 \cdot 10^5$ . El valor de  $M_1$ , calculado de igual forma en medios cuya concentración en iones  $\text{Ca}^{++}$  sea lo suficientemente baja para desplazar el equilibrio hacia el monómero resultó ser  $4,7 \cdot 10^5$ .

Para determinar  $\bar{M}_w$  cuando coexisten en equilibrio P y  $\text{P}_2$  es necesario suponer que

$$1 + c_2 \frac{d \ln y_2}{dc_2} = 1 + c_1 \frac{d \ln y_1}{dc_1} = 1 + c \frac{d \ln y}{dc} \quad [\text{II-45}]$$

por lo que el peso molecular medio real,  $M_w$  puede expresarse:

$$\bar{M}_w = \bar{M}_{w,ap} \frac{M_2}{M_{2,ap}} \quad [\text{II-46}]$$

donde  $M_2/M_{2,ap}$  se conoce experimentalmente en función de la concentración.

Puede definirse una constante de equilibrio que tenga en cuenta sólo la concentración de las especies proteicas,  $K_P$ ,

$$K_P = \frac{c_2 y_2}{c_1^2 y_1^2} \quad [\text{II-47}]$$

Suponiendo que las actividades de los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{H}^+$  son constantes y diferenciando la ecuación [II-47] se llega a

$$1 + c_2 \frac{d \ln y_2}{dc_2} = 2 \left( 1 + c_1 \frac{d \ln y_1}{dc_1} \right) \frac{d \ln c_1}{d \ln c_2} \quad [\text{II-48}]$$

y, teniendo en cuenta [II-45] se obtiene:

$$\frac{d \ln c_2}{d \ln c_1} = 2 \quad [\text{II-49}]$$

La ecuación [II-49] equivale a expresar:

$$K_P = \frac{c_2}{c_1^2} \quad [\text{II-50}]$$

Hay que advertir que a la ecuación [II-50], obtenida a partir de la igualdad supuesta en [II-45], puede llegarse también admitiendo la ecuación [I-16] propuesta por Adams y Fujita (11), como se ha visto en la sección I.

Expresando ahora  $\bar{M}_w$  en términos de concentración de los componentes (ecuación [I-14]) se tiene:

$$\bar{M}_w = \frac{c_1 M_1 + c_2 M_2}{c} \quad [\text{II-51}]$$

de donde se llega fácilmente a

$$c_1 = \frac{(M_2 - \bar{M}_w)c}{M_2 - M_1} \quad [\text{II-52}]$$

y

$$c_2 = \frac{(\bar{M}_w - M_1)c}{M_2 - M_1} \quad [\text{II-53}]$$

Pero teniendo en cuenta la influencia de los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{H}^+$  en el equilibrio (ecuación [II-43]), la constante real,  $K$ , será:

$$K = \frac{c_2 y_2}{c_1^2 y_1^2 [\text{Ca}^{++}]^n y_{\text{Ca}^{++}}^n [\text{H}^+]^m y_{\text{H}^+}^m} \quad \text{[II-54]}$$

Tomando logaritmos se obtiene

$$\log \frac{c_2 y_2}{c_1^2 y_1^2} = -n \log \frac{1}{[\text{Ca}^{++}] y_{\text{Ca}^{++}}} - m \log \frac{1}{[\text{H}^+] y_{\text{H}^+}} + \log K \quad \text{[II-55]}$$

y suponiendo válida la ecuación [II-45]

$$\frac{c_2 y_2}{c_1^2 y_1^2} = \frac{c_2}{c_1^2} = K_P \quad \text{[II-56]}$$

Mediante las ecuaciones [II-52] y [II-53] se puede calcular  $c_1$  y  $c_2$  para cada valor de  $c$  a partir de los datos experimentales y, si se suponen constantes los coeficientes de actividad en el intervalo de concentraciones utilizado pueden determinarse los valores de  $m$ ,  $n$  y  $K$  haciendo uso de la ecuación [II-55]. En efecto, al representar gráficamente  $\log(c_2/c_1^2)$  frente a  $\log(1/[\text{Ca}^{++}])$  a  $\text{pH}$  constante, se obtendrá una línea recta de pendiente  $-n$  y ordenada en el origen  $K$ . De manera análoga puede calcularse  $m$ . Los resultados (21) indican que  $n = 5 \pm 1$  y  $m = 3 \pm 1$ , con lo que resulta para  $K$  un valor medio de  $2,48 \cdot 10^{41}$ . Los valores de  $K_P$  y  $K$  se recogen en la tabla III; puede verse que, dada la constancia de  $K$  y las grandes oscilaciones de  $K_P$ , el equilibrio se describe perfectamente por la ecuación [II-43], y las predicciones teóricas son válidas.

TABLA III

CONSTANTES DE EQUILIBRIO EN LA ASOCIACION DE HEMOCIANINA

$\text{pH}$	$[\text{Ca}^{++}]$ (mM)	$\bar{M}_{w,ap}$	$K_P$	$K \cdot 10^{-41}$
9,6	3,1	650.000	1,00	2,24
9,6	3,6	720.000	2,89	2,89
9,6	4,1	770.000	5,02	2,82
9,6	4,7	820.000	9,49	2,14
9,6	5,3	840.000	18,00	2,82
9,4	3,6	890.000	9,21	2,29
9,5	3,6	760.000	4,35	2,19
9,7	3,6	670.000	1,27	2,51

### 3. Electroforesis

#### A) INTRODUCCIÓN

La electroforesis constituye un método de separación de macromoléculas aprovechando sus diferencias en movilidad electroforética, velocidad de migración por unidad de campo eléctrico. Esta movilidad,  $u$ , se puede expresar, en el caso de que la macromolécula sea una esfera de radio  $r$ , como

$$u = \frac{Q}{6\pi\eta r} \frac{g(\kappa r)}{1 + \kappa r} \quad [\text{II-57}]$$

donde  $Q$  es la carga de la macromolécula,  $\eta$  la viscosidad del medio y  $\kappa$  es el parámetro de Debye-Hückle, función de la constante dieléctrica del medio,  $\mathcal{D}$ , de su fuerza iónica,  $I$ , de la temperatura absoluta, de la constante de Boltzman  $k$ , el número de Avogadro y la carga del electrón:

$$\kappa = \left( \frac{8\pi N e^2}{1.000 \mathcal{D} k T} \right)^{1/2} I^{1/2} \quad [\text{II-58}]$$

El término  $g(\kappa r)$  que aparece en la ecuación [II-57] es la función de Henry, que varía entre 1 para  $r = 1$  y 1,5 para  $r = \infty$  (\*).

En la realidad, la ecuación [II-57] sólo describe de un modo aproximado el comportamiento de una macromolécula en un campo eléctrico. La dificultad de aplicar el método termodinámico al transporte electroforético hace que el rigor de las ecuaciones deducidas no sea satisfactorio. Al mismo tiempo, el tratamiento cinético que conduce a la ecuación [II-57] sólo permite incluir el peso molecular en macromoléculas de forma conocida, siempre que se disponga de un medio complementario para determinar su carga, cosa que no es sencilla de ordinario. Por todos estos motivos no pueden estudiarse los equilibrios de asociación por electroforesis de modo tan extenso como por ultracentrifugación, ya que, por ejemplo, no es posible la determinación de  $\overline{M}_w$ .

Por otra parte, la electroforesis presenta ciertas ventajas sobre la ultracentrifugación. La teoría de Gilbert se dedujo (véase [II-1]) para

---

(\*) Una discusión completa de la ecuación [II-57] caería fuera de los límites de este libro. Pueden encontrarse detalles sobre su obtención y sobre el significado de la función de Henry en la reciente revisión de Cann (104).

transporte en una célula de sección longitudinal rectangular, y esta condición se cumple plenamente en la electroforesis libre. Además, el campo eléctrico  $E$  puede considerarse constante a lo largo de la zona en que tiene lugar la separación (\*), por lo que las suposiciones que condujeron al establecimiento de la ecuación de continuidad [II-2] se adaptan mejor a la electroforesis que a la ultracentrifugación. En este caso, la ecuación [II-2] toma la forma:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -uE \frac{\partial c}{\partial x} + D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad \text{[II-59]}$$

En consecuencia, a pesar de los inconvenientes que pueda tener la electroforesis en la determinación de características moleculares, la técnica resulta particularmente idónea para el estudio de equilibrios de asociación mediante la teoría de Gilbert. Finalmente, hay que tener en cuenta que, debido a que en una célula de electroforesis no hay más diferencias de presión entre sus diversos puntos que las debidas a la altura —y éstas son despreciables—, las constantes de equilibrio son invariables en todos los puntos, aun cuando los volúmenes específicos parciales de reaccionantes y productos sean muy diferentes.

No obstante, hay que advertir que, para que la determinación experimental de los parámetros del equilibrio sea factible, se requiere que las velocidades de las distintas especies presentes sean distintas. En un equilibrio  $nP \rightleftharpoons P_n$ , el coeficiente de sedimentación del  $n$ -mero es siempre mayor que el del monómero, pero la movilidad electroforética  $u_n$  no tiene por qué ser mayor que  $u_1$ . Esto podría ser una limitación de la aplicación de la electroforesis al estudio de asociaciones, pero, en la práctica, es frecuente que las movilidades de las distintas especies sean diferentes.

## B) SISTEMAS AUTOASOCIANTES

La metodología expuesta en la sección II.2.B para el estudio de sistemas autoasociantes por técnicas de velocidad de sedimentación es

---

(\*) Suponer  $E$  constante equivale a admitir que la conductividad de la disolución permanece invariable en todos los puntos de la célula. Esto es aproximadamente cierto si, para determinar el valor del campo eléctrico, se mide la conductividad de la disolución de macromoléculas en vez de la del tampón y las movilidades se determinan en la rama descendente.

aplicable a la electroforesis libre. Es de destacar que también en este caso es necesario estimar el grado de polimerización por otras técnicas antes de poder calcular la constante de equilibrio mediante la ecuación [II-25]. Sistemas como el de la  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -quimotrip-sina, etc., cuyos equilibrios de asociación se conocen a través de técnicas de ultracentrifugación (equilibrio y velocidad de sedimentación) y dispersión de luz, han sido también objeto de numerosas investigaciones mediante electroforesis. En general los resultados obtenidos por velocidad de sedimentación coinciden con los hallados por electroforesis. Las curvas de schlieren obtenidas por ambas técnicas y los valores de  $\Delta$ , calculados a partir de ellas son prácticamente semejantes cuando los resultados de electroforesis se registran en la rama descendente (\*).

En ocasiones, como se ha comentado anteriormente, puede aparecer un único pico en la curva de schlieren aun cuando el sistema se encuentre en equilibrio de asociación. La electroforesis libre permite un modo de discernir la presencia de especies en equilibrio en el límite que da origen a dicho máximo. El campo puede invertirse al cabo de un cierto tiempo de desarrollo; un estrechamiento del pico indicaría necesariamente la presencia de al menos dos especies en el límite, ya que, de existir una sola especie, la curva de schlieren debería ensancharse por efecto de la difusión.

### C) EQUILIBRIOS DE ASOCIACIÓN PROTEÍNA-LIGANDO

Muchas proteínas, cuando se las somete a electroforesis libre a pH inferior a su punto isoeléctrico en tampones del tipo ácido acético-acetato sódico-NaCl dan origen a curvas de schlieren, cuya forma depende de la concentración del tampón, pero no de la fuerza iónica total del medio. Esta dependencia queda bien patente al examinar la figura 26, que recoge los resultados obtenidos por Cann y Phelps (105) con la ovoalbúmina. Estos resultados se han interpretado de ordinario (104) como consecuencia de la interacción de la proteína con moléculas no disociadas del ácido del tampón. El estudio teórico de estas interacciones se consideró en un principio como un medio de corregir

---

(\*) Aunque a menudo se ignore, la presencia de iones minerales influye con frecuencia en la asociación. Por ese motivo, la comparación de resultados obtenidos por técnicas diferentes es sólo viable cuando el tampón utilizado en ambos casos es el mismo.

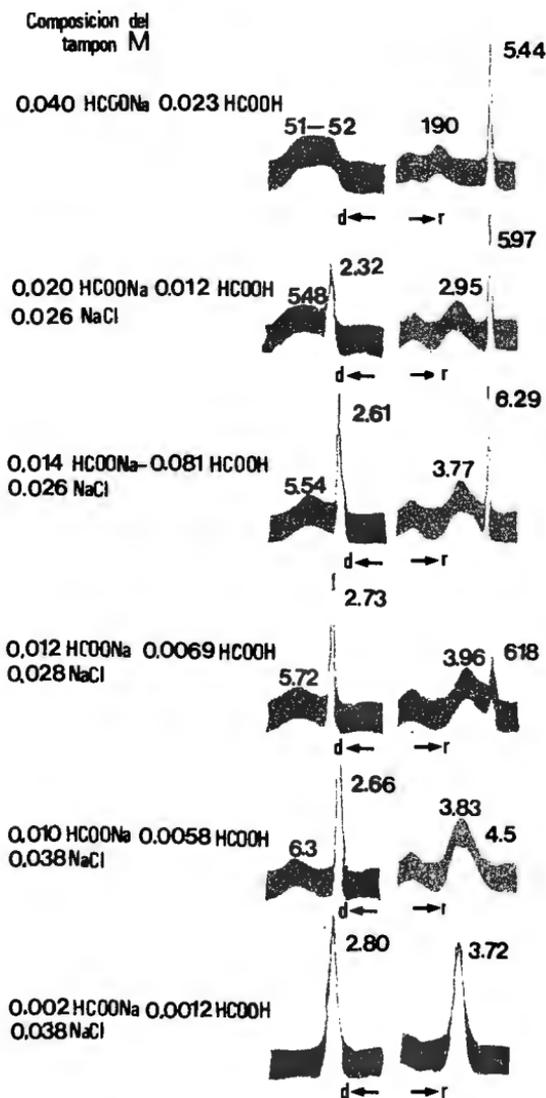


Figura 26.—Efectos de la concentración del tampón sobre la electrofóresis de la seroalbúmina. *d*: rama descendente; *r*: rama ascendente.

los resultados experimentales obtenidos a diferentes concentraciones de tampón, pero, dado el interés actual por el estudio de los equilibrios de asociación, el desarrollo teórico realizado proporciona una base excelente para la investigación de equilibrios del tipo descrito por la ecuación [5] siempre que el ligando A no esté cargado.

El estudio teórico más completo es el debido a Cann y Goad (102,106), que, en líneas generales, se discute a continuación. Si  $c$  es la concentración total de proteína,  $c_1$  la de proteína no asociada y  $c_A$  la concentración total de ligando, la ecuación de continuidad [II-59] para la conservación de la proteína puede escribirse:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial(c_1 + [PA_n])}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - u_1 E \frac{\partial c_1}{\partial x} + D_{PA_n} \frac{\partial^2 [PA_n]}{\partial x^2} - u_{PA_n} E \frac{\partial [PA_n]}{\partial x} \quad \text{[II-60]}$$

Análogamente, la ecuación [II-59] puede aplicarse a la conservación de A, resultando

$$\frac{\partial c_A}{\partial t} = \frac{\partial(n[PA_n] + [A])}{\partial t} = nD_{PA_n} \frac{\partial^2 [PA_n]}{\partial x^2} - nu_{PA_n} \frac{\partial [PA_n]}{\partial x} + D_A \frac{\partial^2 [A]}{\partial x^2} \quad \text{[II-61]}$$

ya que, suponiendo despreciable el flujo electroendosmótico la movilidad de la especie no cargada A es nula.

Si la velocidad de las reacciones directa e inversa de la asociación son lo suficientemente grandes para suponer que el equilibrio químico tiene lugar en todos los puntos de la célula, la concentración de  $PA_n$  puede expresarse:

$$[PA_n] = Kc_1[A]^n \quad \text{[II-62]}$$

donde  $K$  es la constante de equilibrio. Si la concentración del ligando A es suficientemente grande comparada con la de proteína, el establecimiento del equilibrio no afectará apreciablemente a la concentración del ligando, que puede considerarse constante, y la ecuación [II-62] se expresará simplemente

$$[PA_n] = K'c_1 \quad \text{[II-63]}$$

donde  $K' = K[A]^n$ . Admitiendo esto, la ecuación [II-60] puede replantearse de modo que sólo aparezca la variable  $c$  relacionada con los coeficientes de difusión y movilidades medias en peso. A partir de este

punto, puede realizarse un tratamiento semejante al de Gilbert (véase [II-1]), aunque, por razones evidentes, no debe despreciarse el término de difusión. De esta manera se llega a expresar el gradiente de concentración de proteína y de ligando en función de la distancia para distintos tiempos. Es evidente que, para llegar a un resultado numérico que exprese el valor de dicho gradiente, es necesario dar valores arbitrarios a  $K$  y  $n$  hasta lograr un ajuste óptimo. El cálculo es extraordinariamente complejo y sólo puede abordarse con ayuda de un computador. Este método no ha sido aún suficientemente explotado para la investigación de equilibrios proteína-ligando de interés biológico. Sobre los métodos que usan la ultracentrifugación (apartados I.1.B y II.2.C) presenta la ventaja de que no requiere que el ligando presente ninguna propiedad óptica especial.

#### 4. Cromatografía en geles

##### A) INTRODUCCIÓN

La cromatografía en geles puede utilizarse con finalidad preparativa o analítica. En ambos casos puede emplearse la técnica zonal, pero el análisis frontal presenta ventajas en el segundo (107). La figura 27 muestra los resultados obtenidos con una misma proteína por las técnicas zonal y frontal. En esta última, la concentración de soluto pasa de ser nula a igualar la concentración inicial  $c_0$  a través de un límite cuya forma corresponde con la integral de una curva de Gauss. Después de una meseta en la que la concentración es constante e igual a  $c_0$ , decrece siguiendo una curva enantiográfica de la del primer límite, siempre que el soluto se comporte de modo ideal.

El volumen de elución  $V_e$  se determina a partir del máximo de la curva en el análisis zonal o por la posición de los límites (volumen para el cual la concentración de soluto es  $c_0/2$ ) en el análisis frontal. Un experimento de análisis frontal permite así obtener dos valores de  $V_e$ , que deben coincidir si el soluto es ideal.

Al representar gráficamente el volumen de elución de varias proteínas en función del logaritmo de su peso molecular, se obtiene una línea recta dentro de los límites de exclusión del gel utilizado (108,109). En realidad, esto es cierto sólo para proteínas cuya forma y volumen específico parcial sean iguales, ya que la magnitud molecular de la que depende  $V_e$  es el volumen hidrodinámico.

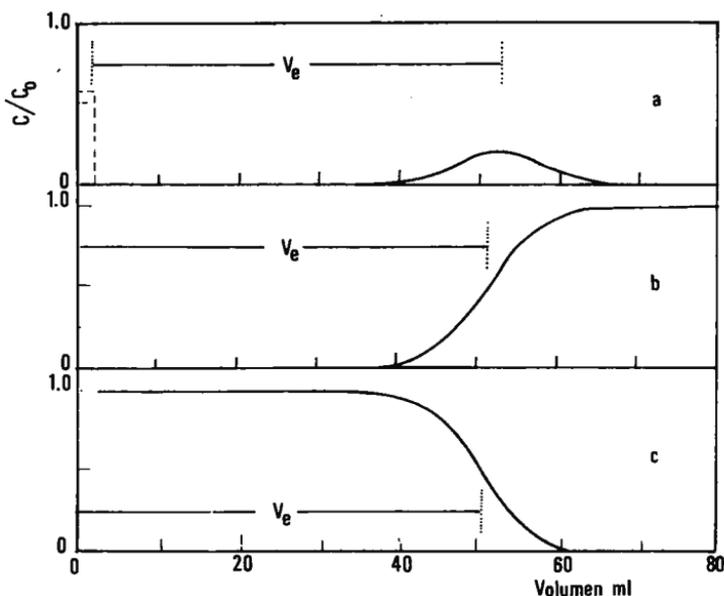


Figura 27.—Cromatografía en gel de dextrano de ovoalbúmina: a) análisis zonal; b) análisis frontal, límite delantero; c) análisis frontal, límite posterior.

Cuando el soluto presenta dispersidad en su peso molecular, se puede calcular un volumen de elución promedio en peso, definido como:

$$\bar{V}_{e,w} = \frac{\sum c_i V_{e,i}}{\sum c_i} = \frac{\sum c_i V_{e,i}}{c_0} \quad [\text{II-64}]$$

que coincide con la posición del primer momento del límite (110), es decir

$$\bar{V}_{e,w} = \frac{1}{c_0} \int_0^{c_0} V_e dc \simeq \frac{1}{c_0} \sum V_e \Delta c \quad [\text{II-65}]$$

Es evidente que, en este caso, el valor de  $M$  calculado a partir de  $\bar{V}_{e,w}$  será  $\bar{M}_w$ .

## B) APLICACIÓN A SISTEMAS AUTOASOCIANTES

Si se somete a cromatografía en geles un sistema en rápido equilibrio  $nP \rightleftharpoons P_n$ , la fracción en peso del monómero,  $f_1$ , puede calcularse

en función de los volúmenes de elución del monómero  $V_{e,1}$ , del polímero  $V_{e,n}$  y del sistema en equilibrio,  $\bar{V}_{e,w}$ , a partir de la ecuación [II-64]:

$$f_1 = \frac{c_1}{c_0} = \frac{\bar{V}_{e,w} - V_{e,n}}{V_{e,1} - V_{e,n}} \quad [\text{II-66}]$$

El valor de  $V_{e,1}$  puede conocerse con facilidad (por extrapolación de  $\bar{V}_{e,w}$  a concentración nula). Si es posible realizar el experimento en condiciones que aseguren la total polimerización, puede también determinarse  $V_{e,n}$ , lo que permite obtener  $f_1$  para una serie de valores de  $c_0$  sin más que aplicar la ecuación [II-66]. Con estos datos se puede calcular  $n$  y la constante de equilibrio  $K_n$ , ya que, expresando en forma logarítmica la ley de acción de masas en función de  $c_0$  y  $f_1$ , se tiene:

$$\log(1 - f_1)c_0 = \log K_n + n \log f_1 c_0 \quad [\text{II-67}]$$

y representando gráficamente  $\log(1 - f_1)c_0$  frente a  $\log f_1 c_0$ , se obtienen, a partir de la ordenada en el origen y de la pendiente respectivamente, los valores de  $K_n$  y  $n$ .

Si es posible conocer  $V_{e,n}$ , la cromatografía en geles presenta, por su sencillez experimental, ventajas sobre las técnicas de ultracentrifugación o electroforesis para la determinación de los parámetros de equilibrios de asociación. En el caso de que no sea posible asegurarse de la total polimerización del sistema, sería necesario emplear otros procedimientos para la evaluación de  $n$  y  $K_n$ . Los detalles pueden encontrarse en la revisión de Winzor (107) o en el artículo original del mismo autor (111).

### III. OTRAS TÉCNICAS

#### 1. Técnicas de congelación del equilibrio

Todas las técnicas que se han descrito hasta ahora suponen que el equilibrio químico de asociación se mantiene en todos los puntos del sistema, aunque, como ocurre en las técnicas de transporte, el sistema no se encuentre en equilibrio termodinámico. La técnica que se describe en esta sección supone la rápida congelación del equilibrio químico y la aplicación de técnicas de separación convencionales para investigar la naturaleza de las especies presentes en el mismo. Dado lo reciente de la introducción de técnicas adecuadas para la congelación

del equilibrio, su empleo en el estudio de los parámetros fisicoquímicos de equilibrios de asociación no está sino comenzado, aunque el éxito inicial abre un interesante campo de investigación.

En 1970, Davies y Stark (112) comprobaron que, si las concentraciones relativas de proteína y reactivo son adecuadas, al tratar un sistema en equilibrio del tipo descrito por la ecuación [2] con suberimidato de dimetilo, se establecen enlaces covalentes entre los monómeros de cada oligómero, pero no se reticulan los oligómeros entre sí. Así, pues, al finalizar la reacción, la composición de la mezcla es idéntica a la del equilibrio, pero los oligómeros son incapaces de disociarse, puesto que las unidades monoméricas que los constituyen han quedado reticuladas entre sí por enlaces covalentes.

La asociación de los distintos oligómeros entre sí puede evitarse fácilmente si, a partir de este momento, se trabaja en medios que induzcan disociación, como el cloruro de guanidinio, urea, detergentes, medios de alta fuerza iónica, etc.

Gratzer y col. (113) han utilizado recientemente esta técnica para investigar la autoasociación del glucagón. La aplicación del equilibrio de sedimentación (véase sección I.1) a este sistema indicó, aunque no de modo claro, la presencia de monómeros, dímeros y hexámeros (114). Por otra parte, los datos obtenidos por técnicas de dicroísmo circular son indicativos, como se ha comentado anteriormente (sección I.2) de un equilibrio monómero-trímero (63).

Gratzer y col. (113), después de congelar el equilibrio por reticulación con suberimidato de dimetilo, separaron las distintas especies por cromatografía en geles en presencia de cloruro de guanidinio 6M. Sólo obtuvieron, además del correspondiente al monómero, un pico, cuyo volumen de elución correspondía con el previsto para el trímero. Para asegurar el resultado calcularon el peso molecular del polímero en presencia de cloruro de guanidinio 6M (\*) y obtuvieron un valor

---

(\*) La determinación de pesos moleculares en cloruro de guanidinio 6M es difícil cuando, como en este caso, el soluto es de pequeño tamaño molecular. Su escasa absorción en el ultravioleta, así como el bajo valor de  $\partial n/\partial c$ , unido a la naturaleza del agente disociante (que absorbe luz ultravioleta y tiene un índice de refracción elevado), hacen imposible la utilización de óptica de absorción o de schlieren. Por otra parte, debido al bajo peso molecular del glucagón, no es posible llegar a anular la concentración en el menisco (equilibrio a alta velocidad), lo que también dificulta la utilización de óptica interferométrica. Es posible, sin embargo, utilizar esta última mediante un ingenioso método cuyos detalles pueden encontrarse en la publicación original (113).

de 9.600. Como el peso molecular del glucagón es 3.647, la única especie polimérica queda perfectamente definida como trímero.

## **2. Microscopia electrónica**

Cuando el monómero es de un tamaño suficiente, puede distinguirse de sus polímeros mediante microscopía electrónica. Sin embargo, la posibilidad de utilizar esta técnica para la investigación de equilibrios está limitada por el hecho de que la preparación de la muestra exige unas condiciones en las que no es posible asegurar que el equilibrio se mantenga.

Williams y Harrison (115) estudiaron la asociación de la ferritina, aprovechando que el núcleo de hierro de esta proteína permite observarla al microscopio electrónico sin necesidad de utilizar contraste. En el caso normal, el tener que utilizar unas condiciones experimentales predeterminadas para lograr un contraste adecuado impide, como se ha comentado, la utilización de esta técnica. No obstante, la utilización conjunta de microscopía electrónica con técnicas de congelación de equilibrio, no realizada hasta la fecha, abre, al menos potencialmente, una nueva dirección de trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

1. F. MONTERO, en este volumen, p. 541.
2. H. K. SCHACHMAN: *Ultracentrifugation in Biochemistry* (Academic Press, New York, 1959).
3. H. FUJITA: *The Mathematical Theory of Sedimentation Analysis* (Academic Press, New York 1962).
4. J. M. CREETH y R. M. PAIN: *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 17,217 (1967).
5. J. H. COATES, en *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry* (ed. S. J. Leach). Part B, p. 1 (Academic Press, London and New York 1970).
6. R. TRAUTMAN y C. F. CRAMPTON: *J. Am. Chem. Soc.* 81,4036 (1959).
7. C. TANFORD: *Physical Chemistry of Macromolecules* (John Wiley & Sons, New York 1961).
8. H. K. SCHACHMAN: *Ultracentrifugation, Diffusion and Viscosimetry*, en *Methods in Enzymology*, vol. 4 (Academic Press, New York, 1957).
9. R. H. PAIN: *Biochem. J.* 88,234 (1963).
10. B. S. HARRAP y E. F. WOODS: *Biopolymers* 3,595 (1965).
11. E. T. ADAMS y H. FUJITA, en *Untracentrifugal Analysis in Theory and Experiment* (ed. J. W. Williams) p.119 (Academic Press, New York 1963).
12. E. T. ADAMS y J. W. WILLIAMS: *J. Am. Chem. Soc.* 8 ,3454 (1964).
13. D. A. ALBRIGHT y J. W. WILLIAMS: *J. Phys. Chem.* 71,2780 (1967).
14. R. F. STEINER: *Arch. Biochem. Biophys.* 39,333 (1952).
15. E. T. ADAMS: *Biochemistry* 4,1646 (1965).
16. E. T. ADAMS: *Fractions No. 3* (Beckman Instruments, Inc., 1967).
17. M. S. N. RAO y G. KEGELES: *J. Am. Chem. Soc.* 89,5724 (1958).
18. E. T. ADAMS: *Fred. Proc.* 26,778 (1967).
19. E. T. ADAMS: *Biochemistry* 6,1864 (1967).
20. A. B. BARCLAY y R. EASON: *Biophys. Biochim. Acta* 269,37 (1972).
21. K. MORIMOTO y G. KEGELES: *Arch. Biochem. Biophys.* 142,247 (1971).
22. J. W. WILLIAMS, K. E. VAN HOLDE, R. L. BALDWIN y H. FUJITA: *Chem. Rev.* 58,715 (1958).
23. E. F. CASASSA y H. EISENBERG: *Advan. Protein Chem.* 19,287 (1964).
24. M. DERECHIN: *Biochemistry* 7,3253 (1968).
25. M. DERECHIN: *Biochemistry* 8,921 (1969).
26. R. H. HASCHEMEYER y W. F. BOWERS: *Biochemistry* 9,435 (1970).
27. E. T. ADAMS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51,509 (1964).
28. T. R. MCCALLA: *Introduction to Numerical Methods and Fortran Programming* (J. Wiley and Sons, New York 1967).
29. P. W. CHUN y S. J. KIM: *Biochemistry* 9,1957 (1970).
30. E. T. ADAMS y D. L. FILMER: *Biochemistry* 5,597 (1966).
31. H. EISENBERG y G. TOMKINS: *J. Mol. Biol.* 31,37 (1968).

32. P. W. CHUN, S. J. KIM, J. D. WILLIAMS, W. R. COPE, L. H. TANG y E. T. ADAMS: *Biopolymers* 11,197 (1972).
33. I. Z. STEINBERG y H. K. SCHACHMAN: *Biochemistry* 5,3728 (1966).
34. I. M. KLOTZ: *Arch. Biochem.* 9,109 (1946).
35. K. E. VAN HOLDE: *Physical Biochemistry* p.180 (Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N. J., 1971).
36. S. N. TIMASHEFF y R. TOWNEND, en *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry Part B*, p.147 (Acad. Press, London and New York 1970).
37. B. H. ZIMM: *J. Chem. Phys.* 16,1093 (1948); *ibid.*, 16,1099 (1948).
38. R. TOWNEND y S. N. TIMASHEFF: *J. Am. Chem. Soc.* 82,3168 (1960).
39. R. TOWNEND y S. N. TIMASHEFF: *J. Am. Chem. Soc.* 82,3161 (1960).
40. J. C. METCALFE, en *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry Part B* (Acad. Press, London and New York 1970).
41. R. M. LYNDEN-BELL y R. KHARRIS: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (ed. Alan Carrington) (University of Southampton 1969).
42. J. P. COHEN: *Biochimie* 53,173 (1971).
43. J. P. COHEN: *J. Biol. Chem.* 246,3725 (1971).
44. E. CHIANCONE, J. E. NORME y J. WYMAN: *J. Mol. Biol.* 70,675 (1972).
45. J. WYMAN: *Advan. Protein Chem.* 19,223 (1964).
46. E. M. BRADBURY, C. CRANE-ROBINSON, H. GOLDMAN, H. W. E. RATTLE y R. M. STEPHENS: *J. Mol. Biol.* 29,507 (1967).
47. A. S. V. BURGEN, G. C. K. ROBERTS y J. FEENEY, *Embo Course on Protein NMR* (Cambridge, abril, 1971).
48. M. A. RAFTERY, F. W. DAHLQUIST y S. M. PARSONS: *J. Biol. Chem.* 243,4175 (1968).
49. M. A. RAFTERY y F. W. DAHLQUIST: *Biochemistry* 7,3269 (1968).
50. M. A. RAFTERY y T. RAND-MEIR: *Biochemistry* 7,3281 (1968).
51. M. A. RAFTERY, F. W. DAHLQUIST, S. M. PARSONS y R. G. WOLCOTT: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 62,44 (1969).
52. T. MCL SPOTSWOOD: *J. Am. Chem. Soc.* 89,5052 (1967).
53. I. SOLOMON: *C. R. Acad. Sci. Ser. A* 248,92 (1959).
54. G. C. K. ROBERTS y O. JARDEZKY: *Advan. Protein Chem.* 24,447 (1970).
55. A. LANIR y G. NAVON: *Biochemistry* 10,1024 (1971).
56. J. J. FISHER y O. JARDEZKY: *J. Am. Chem. Soc.* 87,3237 (1965).
57. D. H. MEADOWS, J. L. MARKLEY, J. S. COHEN y O. JARDEZKY: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58,1307 (1967).
58. T. J. SWIFT y R. E. CONNICK: *J. Chem. Phys.* 37,307 (1962).
59. K. E. VAN HOLDE: *Physical Biochemistry* (Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliff, N. J., 1971).
60. W. KANZMAN: *Quantum Chemistry* (Acad. Press, Inc., New York 1957).
61. J. SCHELLMAN y C. A. SCHELLMAN: *The Proteins* vol.2 (Acad. Press, Inc., New York 1964).
62. F. G. BLANCO, en este volumen p.105.
63. W. B. GRAZTER y G. H. BEAVEN: *J. Biol. Chem.* 244,6675 (1969).
64. L. A. HOLLADAY y A. J. SOPHIANOPOULOS: *J. Biol. Chem.* 247,1976 (1972).
65. J. H. ROCKEY y P. C. MONTGOMERY: *Biochemistry* 11,3172 (1972).
66. J. W. DONOVAN: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry* (ed. S. J. Leach) Part B (Academic Press., London and New York 1970).

67. T. T. HERSCOVITS y M. LASKOW: *J. Biol. Chem.* 237,3418 (1962).
68. P. BENMOUYAL y C. G. TROWBRIDGE: *Arch. Biochem. Biophys.* 115,67 (1966).
69. K. HAYASHI, T. IMOTO y M. FUNATSU: *J. Biochem.* 55,516 (1964).
70. P. CUATRECASAS, S. FUCHS y C. B. AUFINSEN: *J. Biol. Chem.* 242,4759 (1967).
71. M. LASKOWSKI, Jr.: *Federation Proc.* 25,20 (1966).
72. G. W. SCHWERT: *J. Biol. Chem.* 179,655 (1949).
73. L. W. CUNNINGHAM: *Discussions Faraday Soc.* 13,58 (1953).
74. J. A. OLSEN y C. B. ANFISEN: *J. Biol. Chem.* 197,67 (1952).
75. E. O. FIELD y J. R. P. O'BRIEN: *Biochem. J.* 60,656 (1955).
76. H. K. SCHACHMAN: *Brookhaven Symp. Biol.* 13,40 (1960).
77. H. F. FISHER y D. G. CROSS: *Arch. Biochem. Biophys.* 110,217 (1965).
78. H. F. FISHER y D. G. CROSS: *Arch. Biochem. Biophys.* 110,222 (1965).
79. M. H. BLANCHARD y M. V. KING: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25,298 (1966).
80. J. A. RUPLEY y M. PRAISMAN: *Biochem. Biophys. Acta* 140,185 (1967).
81. I. M. KLOTZ, F. M. WALKER y R. B. PIVAN: *J. Am. Chem. Soc.* 68,1486 (1946).
82. G. SCATCHARD, I. H. STEINBERG y S. H. ARMSTRONG: *J. Am. Chem. Soc.* 72,535 (1950).
83. L. EHRENPREIS y R. C. WARNER: *Arch. Biochem. Biophys.* 61,38 (1956).
84. L. W. NICHOL, D. J. WINZOR y J. M. CREETH: *J. Phys. Chem.* 64,1086 (1960).
85. L. G. LONGSWORTH y D. A. MCINNES: *J. Gen. Physiol.* 25,507 (1942).
86. G. A. GILBERT: *Discussions Faraday Soc.* 20,68 (1955).
87. G. A. GILBERT: *Proc. Roy. Soc. A* 250,377 (1959).
88. G. A. GILBERT y R. C. JENKINS: *Proc. Roy. Soc. A* 253,420 (1959).
89. J. L. BETHUNE y G. KEGELES: *J. Phys. Chem.* 65,433 (1961).
90. J. L. BETHUNE y G. KEGELES: *J. Phys. Chem.* 65,1755 (1961).
91. J. L. BETHUNE y G. KEGELES: *J. Phys. Chem.* 65,1761 (1961).
92. L. W. NICHOL, J. L. BETHUNE, G. KEGELES y E. L. HESS: *The Proteins* (ed. H. Neurath) vol. 2 p.305 (Academic Press, New York and London 1964).
93. T. F. FORD y E. F. FORD: *J. Phys. Chem.* 68,2843 (1964).
94. G. KEGELES, L. RHODES y J. L. BETHUNE: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58,45 (1967).
95. S. N. TIMASHEFF y R. TOWNEND: *J. Am. Chem. Soc.* 82,3157 (1960).
96. R. TOWNEND, R. J. WINTERBOTTOM y S. N. TIMASHEFF: *J. Am. Chem. Soc.* 82,3161 (1960).
97. R. JOSEPHS y W. F. HARRINGTON: *Federation Proc.* 26,728 (1967).
98. S. N. TIMASHEFF y R. TOWNEND: *J. Am. Chem. Soc.* 83,464 (1961).
99. L. M. GILBERT y G. A. GILBERT: *Nature* 194,1173 (1962).
100. G. A. GILBERT: *Nature* 186,882 (1960).
101. L. W. NICHOL y D. J. WINZOR: *Migration of Interacting Systems*. p.1 (Clarendon Press, Oxford, 1972).
102. J. R. CANN y W. B. GOAD: *J. Biol. Chem.* 240,148 (1965).
103. J. R. CANN: *Interacting Macromolecules* (Academic Press, New York 1970).
104. J. R. CANN, en *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry* (ed. S. J. Leach) Part A p.369 (Academic Press, New York 1970).
105. J. R. CANN y R. A. PHELPS: *J. Am. Chem. Soc.* 79,4672 (1957).
106. J. R. CANN y W. B. GOAD: *J. Biol. Chem.* 240,1162 (1965).
107. D. J. WINZOR, en *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry* (editor L. J. Leach) Part A p.451 (Academic Press, London and New York 1970).

108. J. R. WHITAKER: *Anal. Chem.* 35,1950 (1963).
109. P. ANDREWS: *Biochem. J.* 96,595 (1965).
110. L. W. NICHOL y A. G. OGSTON: *J. Phys. Chem.* 69,1754 (1965).
111. D. J. WINZOR, J. P. LOKE y L. W. NICHOL: *J. Phys. Chem.* 71,4492 (1970).
112. G. E. DAVIES y G. R. STARK: *Proc. Natl. Acad. U.S.* 66,651 (1970).
113. W. B. GRATZER, J. M. CREETH y G. H. BEAVEN: *Eur. J. Biochem.* 31,505 (1972).
114. J. C. SWANN y G. G. HAMMES: *Biochemistry* 8,1 (1969).
115. M. A. WILLIAMS y P. M. HARRISON: *Biochem. J.* 110,265 (1968).

## CAPÍTULO VI

### *ESPECTROMETRIA DE RELAJACION QUIMICA*

E. GALLEGO

Instituto de Química-Física «Rocasolano». Consejo Superior  
de Investigaciones Científicas

INTRODUCCIÓN . . . . .	230
I. LÍMITES DE TIEMPO DE LA CINÉTICA QUÍMICA . . . . .	231
II. MÉTODOS DE ESTUDIO DE REACCIONES RÁPIDAS . . . . .	232
1. Técnicas de flujo . . . . .	233
2. Métodos competitivos . . . . .	236
3. Métodos de perturbación . . . . .	236
4. Métodos de resonancia magnética . . . . .	237
III. MÉTODOS DE RELAJACIÓN QUÍMICA . . . . .	237
IV. TÉCNICAS DE SALTO DE TEMPERATURA . . . . .	240
V. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LOS MÉTODOS DE RELAJACIÓN . . . . .	243
1. Reacciones de un solo paso . . . . .	243
2. Análisis de los datos cinéticos experimentales . . . . .	246
3. Reacciones de varios pasos . . . . .	248
VI. APLICACIONES DE LA ESPECTROMETRÍA DE RELAJACIÓN QUÍMICA . . . . .	255
1. Aplicaciones en Química Inorgánica . . . . .	256
2. Aplicaciones en Química Orgánica . . . . .	257
3. Aplicaciones en Bioquímica . . . . .	259
VII. LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE RELAJACIÓN QUÍMICA . . . . .	265

## INTRODUCCION

Desde hace ya aproximadamente cuarenta años se viene dedicando una gran atención al estudio de reacciones rápidas en disolución. Este interés se ha debido al convencimiento gradual, por parte de los químicos, de que el curso de los fenómenos químicos complejos está determinado por los procesos moleculares elementales, que son extremadamente rápidos en muchos casos. Este interés no se limita a algunos campos químicos aislados, como las reacciones de transferencia de protones o de electrones o la formación de enlaces de hidrógeno o de complejos metálicos, sino que se extiende al estudio de la dinámica de los procesos biológicos.

Recordaremos algunos ejemplos concretos tomados de diversos campos de investigación; uno de los más importantes es el estudio del mecanismo de acción de las enzimas, que como catalizadores son capaces de aumentar la velocidad de una transformación química hasta en un millón de veces en algunos casos. Para comprender la naturaleza de estos procesos es necesario estudiar cuantitativamente los pasos de reacción individuales, generalmente muy rápidos, de todos los compuestos reaccionantes e intermedios implicados en el mecanismo total. Otro campo de estudio de gran actualidad es el de la biosíntesis de proteínas; la síntesis de proteínas en el crecimiento celular y en la división celular es un proceso rápido a nivel molecular, donde la incorporación de un aminoácido, que es un mecanismo químicamente complicado, transcurre dentro de una centésima de segundo. Cualquiera de los procesos elementales involucrados deben completarse, por tanto, dentro de tiempos muchos más cortos.

Al considerar procesos biológicos significativos, vienen a la memoria fenómenos cuya rapidez es obvia; por ejemplo: la transmisión nerviosa, la percepción sensorial, la contracción muscular, etc., que, a pesar de ser fenómenos muy complejos, tienen lugar en fracciones de un segundo a un milisegundo, y pueden ser analizados, por supuesto, en términos de pasos moleculares aún más rápidos (1).

Estas consideraciones justifican, aunque sea en términos muy ge-

nerales, la atención que se presta en la actualidad al estudio de las reacciones rápidas en disolución. Este estudio es fundamentalmente de carácter cinético, es decir, tiene por objeto la determinación de las velocidades de las reacciones químicas y de los factores de que dependen dichas velocidades para lograr, en definitiva, dilucidar el mecanismo de la reacción correspondiente.

Vamos, pues, a comenzar indicando cómo se miden las velocidades de reacción. Los procedimientos clásicos para la medida de la velocidad de una reacción química comienzan con la mezcla de las sustancias que deben reaccionar entre sí en la disolución. Con ello la reacción se pone en marcha y se fija el instante de comienzo, a partir del cual pueden ser medidos los tiempos de reacción. A continuación se realiza, a determinados intervalos de tiempo, un análisis de la mezcla reaccionante o se sigue continuamente el curso de la reacción, registrando algunas propiedades características de los productos formados. Con ello se determina cómo han variado las concentraciones de los participantes en la reacción en el transcurso del tiempo. Es evidente que este procedimiento debe presentar dificultades si la duración de la reacción es aproximadamente del mismo orden o menor que la duración del proceso de mezcla. Normalmente, la mezcla de los sistemas reaccionantes exige, al menos, un segundo, de modo que los procedimientos clásicos de este tipo son inutilizables para reacciones que se lleven a cabo en un segundo o en un tiempo inferior.

En este punto se plantea la cuestión de si los métodos clásicos son capaces de cubrir prácticamente el intervalo de tiempo de los procesos químicos. Para responder a esta cuestión con precisión es preciso plantearse la pregunta en una forma más explícita: ¿Cuáles son los procesos químicos más rápidos posibles que podemos esperar? Vamos a precisar cuáles son los límites de tiempo de la cinética química.

## I. Límites de tiempo de la cinética química

El intervalo de tiempo de nuestro mundo físico incluye, aproximadamente, 40 órdenes de magnitud en segundos. Abarca desde un tiempo elemental del orden de magnitud de  $10^{-23}$  seg. (dado por la relación de la longitud más pequeña detectable, el diámetro de una partícula elemental, y la velocidad de la luz) hasta la edad del universo, que, según diferentes métodos, ha sido cifrada en varios billones de

años, o sea de unos  $10^{17}$  seg. Aunque no puede fijarse un límite superior para las reacciones químicas, podemos considerar que el intervalo clásico de tiempo para la cinética química se extiende entre el tiempo mínimo de 1 seg. y cualquier tiempo más largo, usualmente no superior a 2 ó 3 años; es decir, unos  $10^8$  seg. Por el contrario, sí existe un límite inferior de velocidad de las reacciones químicas, impuesto por la velocidad de movimiento llevado a cabo por cualquier partícula que esté implicada en una transformación química. Este límite se encuentra en la zona de tiempo de la espectroscopía molecular ( $10^{-10}$  a  $10^{-15}$  seg.); concretamente puede considerarse establecido en la región infrarroja, ya que, incluso en el caso de las transiciones electrónicas, es el movimiento de las partículas pesadas (átomos, grupos atómicos o moléculas) el que determina la velocidad de transformación.

La mayoría de los procesos químicos elementales son aquellos en los que participan dos especies separadas. En disolución, en condiciones normales de temperatura (en las que todas las reacciones biológicas importantes tienen lugar), tal proceso está limitado por la velocidad de encuentro, por difusión, entre los reactivos. La frecuencia de tales encuentros, que, por ser procesos bimoleculares, dependen de la concentración, exceden difícilmente de  $10^{11}$  seg.<sup>-1</sup> incluso a concentraciones muy elevadas de reactivo (1M). Es decir, los procesos moleculares primarios, que imponen el límite superior de velocidad de cualquier transformación química, pueden llevarse a cabo en el intervalo de tiempo de 1 a  $10^{-11}$  seg., coincidiendo el límite inferior, aproximadamente, con el límite de tiempo de los procesos que pueden estudiarse por espectroscopía molecular.

Con lo que acabamos de exponer queda situado, dentro de la coordenada tiempo, el campo de estudio a que nos vamos a referir. Vamos a precisar ahora qué lugar ocupan los métodos de relajación química dentro de los métodos de estudio de reacciones rápidas (2).

## II. Métodos de estudio de reacciones rápidas

Entre los métodos experimentales que permiten estudiar una reacción en disolución, que se lleva a cabo en un tiempo inferior a un segundo, citaremos en primer lugar el de las técnicas de flujo, que es una variante del método clásico de iniciar una reacción mediante la mezcla de los reactivos.

## 1. TÉCNICAS DE FLUJO

Hasta 1923 no existía ningún método directo para medir la velocidad de reacciones químicas rápidas en fase líquida con tiempo de vida media de menos de 10 seg. Hartridge y Roughton (3) extendieron el intervalo de tiempo observable aproximadamente 10.000 veces, ideando un método que podría ser utilizado para seguir reacciones con tiempos de vida medios a partir de 10 seg. hasta un milisegundo. El fundamento del método consiste en que las dos disoluciones cuya reacción se desea estudiar se sitúan en recipientes separados y se inyectan en una cámara especial de mezcla. El fluido mezclado que emerge de ella pasa, a través de un tubo de observación, a velocidad constante, y su composición es determinada en diversas secciones del tubo por métodos ópticos, térmicos, eléctricos, químicos u otros métodos de análisis aplicables a fluidos que se mueven rápidamente. Si  $d$  es la distancia en cm. entre la cámara de mezcla y la sección del tubo en la que se hace la observación, y  $u$  es la velocidad lineal media en cm./seg. del fluido en movimiento, entonces el tiempo medio que ha transcurrido para que tenga lugar la reacción es simplemente  $t = \frac{d}{u}$  seg. Por ejemplo, si la sección del tubo que se examina está situada a 3 cm. de la cámara de mezcla y  $u = 1.000$  cm./seg., el tiempo correspondiente es  $t = 3/1.000 = 3$  msec. Este tiempo está asociado de una manera unívoca a un estado bien definido de la reacción. Es más, se puede decir que, cuando la mezcla atraviesa la sección  $s$  del tubo, está en el estado en que se encontraría en el tiempo  $t$  si hubiese permanecido inmóvil. Así, cualquier distancia dada a partir de la cámara de mezcla representa una medida directa de la edad del sistema de reacción. Se pueden hacer observaciones bien en el sistema de flujo a distancias variables, a partir de la cámara de mezcla, o a una distancia fija con diferentes velocidades de flujo. Es también posible observar directamente el transcurso de la reacción después de parar el flujo. Este último método se llama «stopped flow method» (método de flujo parado). Consiste en detener repentinamente el flujo de la mezcla de los dos líquidos y seguir inmediatamente, por un método óptico u otra técnica adecuada, el progreso de la reacción química en el «flujo parado» en el tubo de observación. Con los métodos de registro electrónico de que se dispone desde hace unos veinte años, el método del flujo parado ha pasado a ser de importancia capital en la medida de reacciones químicas rápidas, y en particular en las de los sistemas enzimáticos.

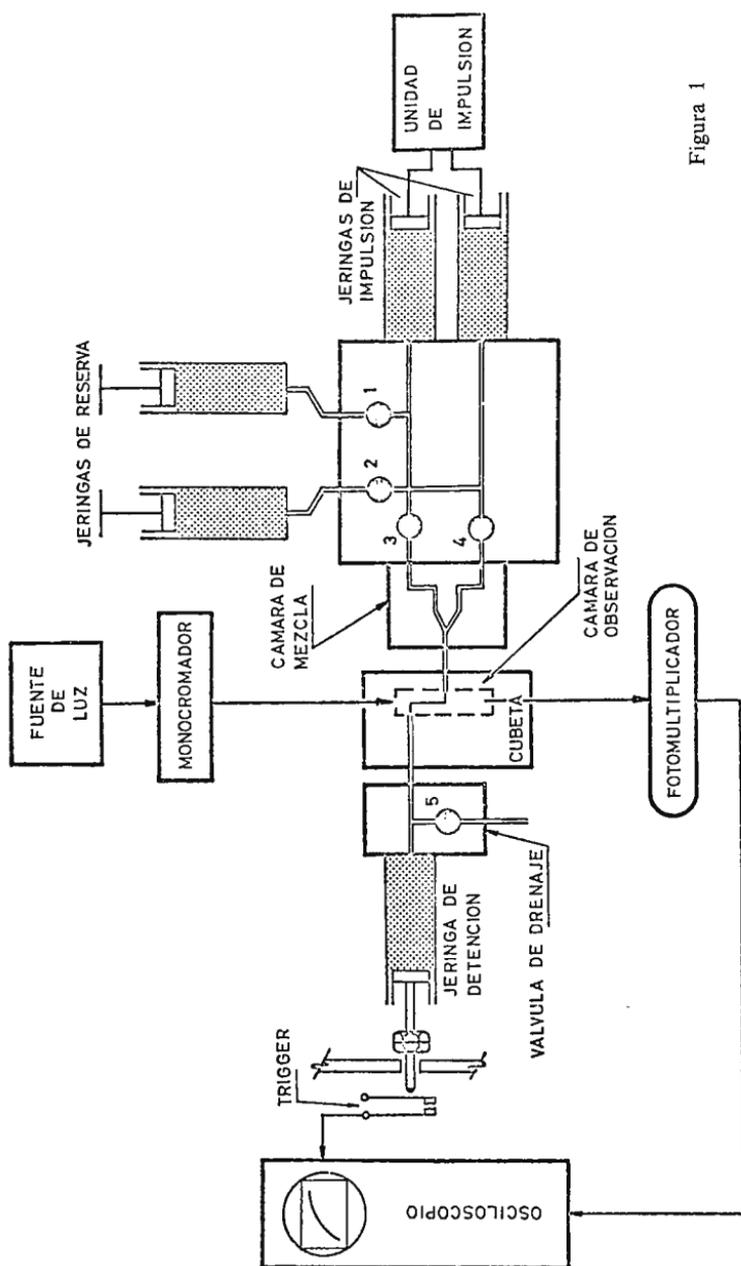


Figura 1

En la figura 1 se representa un esquema del aparato de «stopped flow» de la firma Durrum de Palo Alto (California). Consta esencialmente de las jeringas de reserva de los reactivos, las jeringas de impulsión, la cámara de mezcla, la célula de observación, la jeringa de detención del flujo, con su correspondiente tubo de drenaje, y la placa de detención del émbolo de esta jeringa. El extremo del émbolo de la jeringa de detención actúa sobre el «trigger» que va unido al osciloscopio. El rayo luminoso que, procedente de la fuente, atraviesa la célula de observación después de haber pasado por el monocromador, incide sobre el fotomultiplicador, que envía la señal al osciloscopio, donde, finalmente, se observa sobre la pantalla una curva o curvas exponenciales, que representan la variación de la concentración del componente que se haya elegido para seguir su variación. Se fotografía el oscilograma correspondiente y, a partir de la curva exponencial, se calcula la constante de velocidad que corresponde a la reacción en cuestión.

Pese a las diversas mejoras previsibles en este tipo de aparatos y similares, parece improbable que estas técnicas permitan estudiar reacciones con vidas medias de menos de 0,1 mseg. La limitación viene impuesta por el tiempo de mezcla y de transporte al punto de observación. Por tanto, para reducir este límite se debe utilizar un principio completamente diferente para iniciar la reacción, que evite el proceso de mezcla.

Incluyendo los métodos de flujo dentro de los métodos clásicos, existe una laguna entre las dos zonas de tiempo citadas (la zona clásica de la cinética química y el campo de la espectroscopía molecular) que se extiende desde  $10^{-3}$  a  $10^{-11}$  seg. Hay muchas reacciones químicas, de casi todas las categorías posibles, cuyas vidas medias caen en esta zona, o mejor dicho, dentro de ella tienen lugar la mayoría de los pasos elementales de las reacciones químicas de interés. Fue, por tanto, una exigencia desarrollar nuevas técnicas, capaces de estudiar reacciones que se llevan a cabo entre un mseg. y  $10^{-11}$  seg., que son las que designamos como reacciones rápidas o ultra-rápidas.

Los métodos que, utilizando nuevos principios, evitan el proceso de mezcla son los llamados métodos competitivos y métodos de perturbación (4).

## 2. MÉTODOS COMPETITIVOS

Son aquellos en los que el sistema de reacción se somete constantemente a un proceso cinético físico que compite con la transformación química. Si el proceso físico se conoce, el estado estacionario resultante del sistema dará información acerca de las velocidades de reacciones. Las técnicas de flujo podrían ser consideradas en este sentido como un ejemplo típico de este grupo. La competición tiene lugar entre el transporte de la mezcla de reacción y la reacción química, y da lugar a una distribución estacionaria de los productos de reacción en el tubo de observación.

Otros procesos de transporte que pueden entrar en competición con una reacción química son la difusión y la migración iónica. En estos procesos están basados los llamados métodos electroquímicos (galvanostáticos, potencióstáticos, polarográficos y de corrientes catalíticas). Dentro de los métodos competitivos se encuentran además las técnicas fotoestacionarias y de fluorescencia.

## 3. MÉTODOS DE PERTURBACIÓN

Son aquellos en los que el sistema, que se encuentra en equilibrio o en estado estacionario, se somete a una perturbación rápida, variando los parámetros externos; por ejemplo, la presión o la temperatura, o por irradiación. El proceso de reequilibrio resultante se observa directamente. Hay dos grupos distintos de método de perturbación:

A) Métodos de pequeñas perturbaciones. Se basan en la variación rápida de un parámetro externo, tal como la presión, la temperatura o la densidad del campo eléctrico, que da lugar a una perturbación del equilibrio o estado estacionario de la reacción, observándose entonces el subsiguiente proceso de reequilibrio.

B) Métodos de grandes perturbaciones. Utilizan el principio de que la absorción de energía procedente de cuantos de luz o de partículas aceleradas da productos inestables, tales como moléculas excitadas o radicales, que están lejos de su estado de equilibrio. Su desaparición durante el restablecimiento del equilibrio se puede seguir por espectrofotometría o conductimetría. El sistema de reacción al que se aplican estos métodos puede estar muy lejos del equilibrio en el estado inicial

(contrariamente a lo que ocurre en los métodos de pequeñas perturbaciones) y las velocidades de reacción pueden ser despreciables hasta que se aplique la perturbación (bien en forma de flash de luz-flash fotólisis-o de un pulso de electrones-pulso de radiolisis).

Los métodos de pequeñas y grandes perturbaciones son complementarios y entre los dos cubren casi todos los problemas posibles de las reacciones rápidas. Los métodos de relajación tienen su campo de aplicación propio en el estudio de reacciones en las que una gran perturbación alteraría el curso de la reacción, como es el caso de las reacciones biológicas.

#### 4. MÉTODOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA

Un tercer grupo, intermedio entre los métodos de competición y de perturbación, es el de la resonancia magnética: Resonancia magnética nuclear RMN y resonancia de spin electrónico RSE. En ellas se relacionan el tiempo de vida media con el ensanchamiento de las líneas de resonancia.

### III. Métodos de relajación química

El fundamento teórico de los métodos de relajación química es el siguiente: todo equilibrio depende de ciertas condiciones externas de acuerdo con las leyes termodinámicas. Como es sabido, la constante de equilibrio  $K$  es función de la temperatura, de la presión y del campo eléctrico:  $K = f(T, P, E)$  según las relaciones:

$$\frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta H}{RT} \quad (\Delta H = \text{variación de entalpía de la reacción correspondiente}).$$

$$\frac{\partial \ln K}{\partial P} = - \frac{\Delta V}{RT} \quad (\Delta V = \text{variación de volumen que tiene lugar en la reacción considerada}).$$

$$\frac{\partial \ln K}{\partial |E|} = \frac{\Delta M}{RT} \quad (\Delta M = \text{variación del momento eléctrico, en reacciones dipolares}).$$

Por tanto, si en un sistema en equilibrio se varía uno de los parámetros externos —temperatura, presión o campo eléctrico— se inicia una

reacción que tiende a llevar al sistema a un nuevo estado de equilibrio: el que corresponde a las nuevas condiciones termodinámicas. El tiempo requerido para lograr el establecimiento del nuevo equilibrio se puede medir directamente. Si la perturbación del equilibrio inicial se verifica mucho más rápidamente que la reacción química de «auto-ajuste» a las nuevas condiciones, se observa que la reacción química sigue con un *cierto retraso* a la perturbación, por lo que este proceso se conoce con el nombre de relajación química.

El concepto de relajación fue introducido en la física por Maxwell en 1877. El término relajación en relación con un proceso molecular es utilizado ampliamente por los físicos para describir cualquier proceso retardado de auto-ajuste del sistema molecular perturbado a la nueva posición de equilibrio que le corresponde. Ejemplos clásicos de fenómenos de relajación molecular son los procesos de orientación de dipolos en un campo eléctrico alternante (Debye, 1913). Einstein hizo en 1920 el primer tratamiento teórico correspondiente a equilibrios químicos respecto a fenómenos de relajación relacionados con la absorción de sonido, pero entonces la tecnología no estaba suficientemente desarrollada para llevar a cabo estudios experimentales.

Fue Eigen, en 1954, el que introdujo el concepto de relajación química. Asimismo, las técnicas experimentales de relajación química que permiten la investigación de reacciones rápidas, que transcurren en el intervalo de 1 milisegundo a 1 nanosegundo, fueron desarrolladas en la década 1954-1964 por Eigen y sus colaboradores en el Instituto Max-Planck de Química Física de Göttingen.

En cualquier estudio directo de velocidades de reacción se presentan dos problemas:

- a) iniciar la reacción;
- b) seguir su curso en el tiempo.

Esto significa que hay que enviar una señal al sistema de reacción para poner en marcha la reacción y que el sistema tiene a su vez que devolvernos una señal que nos informe de su respuesta.

Los métodos conocidos colectivamente como «métodos de relajación química» soslayan las dificultades encontradas para la mezcla rápida: las reacciones no son puestas en marcha al mezclar los reactivos, sino desplazando un sistema químico de su posición de equilibrio, es decir, la reacción se inicia virtualmente en el instante de producirse la perturbación.

La perturbación debe llevarse a cabo mucho más rápidamente de lo que la reacción química, en su proceso de auto-ajuste, sea capaz de seguir para adaptarse a las nuevas condiciones de equilibrio.

El desarrollo tecnológico permite, en la actualidad, incrementar homogéneamente variables tales como la temperatura o la densidad de campo eléctrico en un tiempo del orden de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  seg. La discontinuidad o rapidez de la variación del parámetro externo respecto a la velocidad del proceso de relajación química se expresa con el sufijo «salto», que se emplea para designar las diversas técnicas de relajación.

No es suficiente, sin embargo, perturbar el sistema rápidamente. El proceso de relajación química subsiguiente debe ser también registrado rápidamente y libre de distorsión. Los avances de la electrónica moderna permiten seguir magnitudes físicas, tales como la conductividad, la densidad óptica o la fluorescencia, con suficiente rapidez. Por tanto, las diversas técnicas de relajación consisten en diferentes combinaciones de métodos de perturbación y de registro, que dependen de las exigencias específicas del problema particular.

De acuerdo con la posibilidad de variación de los tres parámetros citados: temperatura, presión y campo eléctrico, se han desarrollado las siguientes técnicas experimentales.

#### Técnicas de salto de temperatura.

Los cambios rápidos de temperatura pueden lograrse:

- a) por descarga instantánea de un condensador de alto voltaje, cargado a unos 50-60 kV., a través de una disolución conductora.
- b) por un flash de radiación luminosa;
- c) con un rayo laser;
- d) con un pulso de microondas.

#### Técnicas de salto de presión.

a) Un cambio rápido de presión puede obtenerse aplicando presiones de hasta 100 atm a la disolución que contiene el sistema en equilibrio y anulando repentinamente esta presión, lo que puede lograrse por rotura de una membrana.

b) Saltos de presión positivos requieren una técnica completamente diferente, por ejemplo, la de los llamados tubos de choque.

### Técnicas de salto eléctrico.

Pueden lograrse cambios muy rápidos en la intensidad del campo eléctrico, de 0 a  $10^5$  voltios/cm., con ayuda de cables coaxiales, que sirven como condensadores de alto voltaje.

En otras técnicas de relajación, la perturbación puede ser de carácter periódico. Entre éstas figuran las de cambios periódicos de presión y temperatura, por medio de ultrasonidos, y la perturbación de sistemas que tengan moléculas dipolares, por medio de un campo eléctrico alternante.

Cada método está ligado a las condiciones especiales del sistema a investigar. Así, solamente existe una dependencia de la presión cuando en la reacción correspondiente se produce una variación de volumen ( $A + B \rightleftharpoons AB$ ,  $\Delta V = V_A + V_B - V_{AB} \neq 0$ ,  $V$  = volumen molar parcial). Asimismo, hay que esperar una notable variación de campo sólo cuando en la reacción se produce una neutralización de cargas ( $A^+ + B^- \rightleftharpoons AB$ ). Una variación del momento eléctrico de los componentes ( $\Delta\mu = \mu_A + \mu_B - \mu_{AB} \neq 0$ ;  $\mu$  = momento dipolar), también tendría por consecuencia un efecto de campo ciertamente débil. La condición correspondiente a un método de relajación por temperatura será que el equilibrio a investigar —o uno acoplado con él— tenga una variación finita de calor ( $\Delta H = H_A + H_B - \Delta H_{AB} \neq 0$ ,  $H$  = entalpía molar parcial). Precisamente en el caso de las transformaciones químicas, se cumple generalmente esta condición.

El parámetro más útil para perturbar sistemas químicos es la temperatura, porque la mayoría de los equilibrios están asociadas con un calor finito de reacción y, por tanto, los métodos basados en su variación pueden considerarse como los métodos óptimos para las exigencias de la bioquímica. Vamos a centrar, por ello, nuestra atención en las técnicas de salto de temperatura.

## IV. Técnicas de salto de temperatura

Dentro de las técnicas de salto de temperatura, es especialmente adecuada para el estudio de sistemas químicos la que se basa en que la conductividad eléctrica de las disoluciones acuosas se puede elevar hasta tal punto, por adición de electrólitos indiferentes, que con ayuda de impulsos de alta tensión se pueden conseguir saltos de temperatura homogéneos de varios grados, muy abruptos.

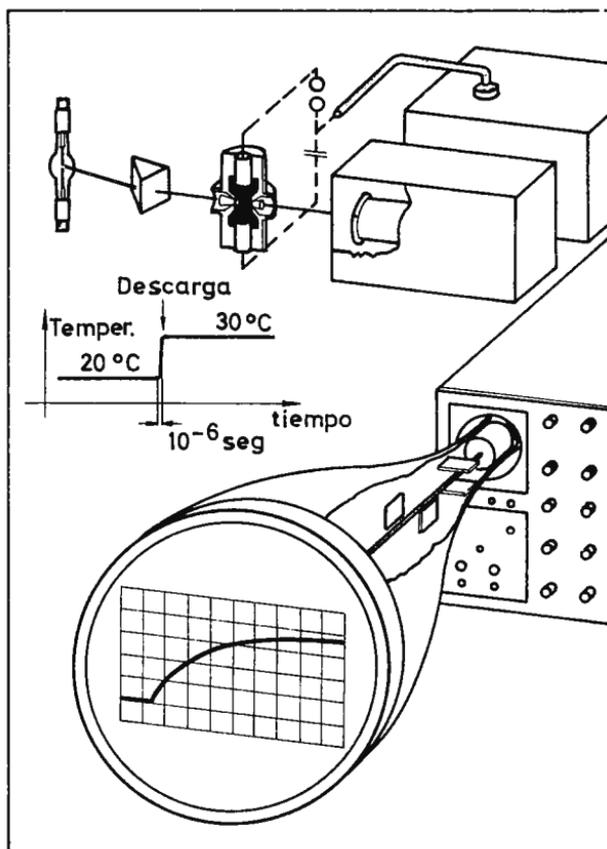


Figura 2 .

En la figura 2 se puede ver un esquema de un aparato de salto de temperatura. Consta esencialmente de: una fuente de radiación visible y ultravioleta, un monocromador de red, la célula en la que se encuentra el sistema reaccionante, el condensador de alto voltaje y su circuito de descarga, un fotomultiplicador y un osciloscopio.

El rayo luminoso procedente de la fuente pasa por el monocromador, que selecciona la radiación de frecuencia previamente elegida para el análisis de la mezcla, atraviesa la célula que contiene la disolución

e incide sobre el fotomultiplicador. La señal de salida del amplificador es recogida en un osciloscopio en cuya pantalla aparece una curva exponencial que refleja el proceso de relajación, es decir, la variación de concentraciones del sistema al pasar del equilibrio inicial al equilibrio final.

Para señalar el contraste entre el tiempo, muy breve, que dura la perturbación y el tiempo de relajación del sistema, se reproduce en el esquema la curva de variación de la temperatura, de  $20^\circ$  a  $30^\circ$ , que tiene lugar en  $1 \mu\text{seg.}$ , una vez realizada la descarga del condensador. El sistema químico en equilibrio, contenido en la célula de observación, se calienta descargando un condensador, cargado inicialmente a 10.000-100.000 voltios, a través de la célula. La energía utilizada para el calentamiento es igual a  $1/2 CV^2$ , siendo  $C$  la capacitancia del condensador y  $V$  el voltaje de descarga. Un aparato típico produce 45.000.000 de vatios en  $1 \mu\text{seg.}$  La temperatura aumenta como una función exponencial del tiempo caracterizada por la constante de tiempo  $t = 1/2 RC$  ( $R =$  resistencia de la disolución). Así, por ejemplo, para un valor de  $R = 40 \Omega$  y un valor de  $C = 0,017 \mu F$ , la constante de tiempo asciende a  $0,34 \mu\text{seg.}$

Cuando la reacción ocurre en un tiempo mucho mayor que  $RC/2$ , se considera que el calentamiento ocurre instantáneamente respecto a aquélla.

El seguimiento del transcurso de la reacción se lleva a cabo por un método óptico. La espectrofotometría ofrece las más amplias posibilidades de aplicación haciendo accesible la investigación de complicados sistemas de reacciones bioquímicas. La variación de las concentraciones de los compuestos absorbentes se puede determinar experimentalmente por la variación de la intensidad de la radiación luminosa registrada. Para ello se aplica la ley de Lambert-Beer.

$$\Delta I = \varepsilon \cdot d \cdot I_A \Delta C$$

donde:

$\Delta I$  = variación de la intensidad luminosa.

$\varepsilon$  = coeficiente de extinción molar.

$d$  = espesor de la célula.

$I_A$  = intensidad de la luz que incide sobre el fotomultiplicador antes de llevarse a cabo el salto de temperatura.

$\Delta C$  = variación de la concentración del componente absorbente.

Es necesario, por supuesto, que alguno de los componentes reaccionantes se distinga por una banda de absorción específica de suficiente intensidad. En los casos en los que no se dé esta condición se puede hacer factible la investigación de la reacción utilizando una segunda reacción que actúa como un sistema indicador, cuyo equilibrio está acoplado al de la primera.

## V. Fundamentos teóricos de los métodos de relajación

Después de la perturbación del sistema que se encuentra en equilibrio, el sistema se desplaza a su nuevo estado de equilibrio según las ecuaciones cinéticas correspondientes. La concentración de los diversos componentes se aproxima al nuevo equilibrio a una velocidad que está determinada solamente por el mecanismo particular de reacción implicado, es decir, por las concentraciones individuales y las constantes de velocidad de los pasos elementales. En otras palabras, el proceso de relajación química permite *rescatar* la reacción correspondiente al equilibrio, o dicho de otro modo, permite investigar la dinámica del equilibrio químico. Un requisito necesario es que la perturbación sea pequeña, de tal modo que las concentraciones varíen solamente en unos pocos tantos por ciento. Las pequeñas perturbaciones dan lugar, por supuesto, a pequeños efectos y obligan, por tanto, a poner grandes exigencias en la sensibilidad del equipo de registro, pero la simplificación del tratamiento matemático compensa sobradamente esta desventaja. Bajo estas condiciones, las ecuaciones diferenciales que describen los procesos cinéticos de cada paso individual se pueden simplificar despreciando todos los productos de concentraciones. Con ello se linealizan las ecuaciones de velocidad y se puede aplicar el álgebra de matrices para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales lineales.

Consideraremos independientemente dos casos: el de las reacciones de un solo paso elemental y el de las reacciones de múltiples pasos.

### 1. REACCIONES DE UN SOLO PASO

En el caso de una reacción que consiste en un único paso elemental, tal como, por ejemplo,  $A + B \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} AB$ , los cambios de concentración que tienen lugar después de una perturbación se pueden representar por una función exponencial. Así, si designamos por:

- $C_0$  = concentración del componente  $A$  en el equilibrio inicial, es decir, en el tiempo  $t = 0$  antes de producir la perturbación.
- $C_\infty$  = concentración final en el nuevo equilibrio, para un tiempo  $t = \infty$  (porque la función exponencial tiende asintóticamente a este valor).
- $(C)$  = concentración actual en el instante  $t$ .
- $\tau$  = tiempo de relajación.

El cambio de concentración como una función del tiempo se puede expresar por

$$(C_\infty - C) = (C_\infty - C_0) \cdot e^{-t/\tau}$$

o bien designando la variación actual de la concentración de  $C$  por  $\Delta C = C_\infty - C$  y la diferencia total de concentraciones en los dos estados de equilibrio por  $\Delta C_0 = C_\infty - C_0$ .

$$(\Delta C) = (\Delta C)_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad [1]$$

La representación gráfica del cambio de concentración definido por esta función puede verse en la figura 3.

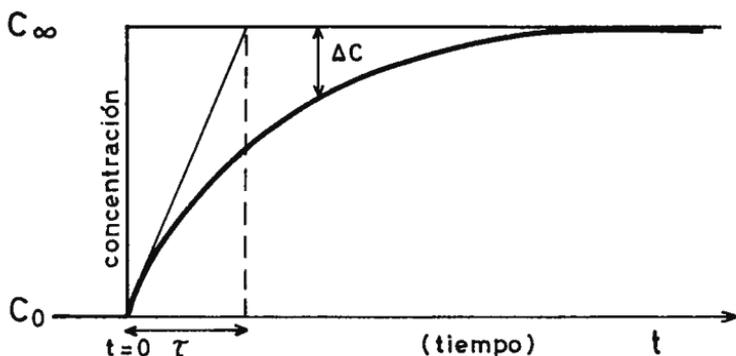


Figura 3

Otros autores utilizan una notación distinta, de carácter más general. La ecuación cinética lineal correspondiente a la variación de concentración  $x_i$  de uno de los compuestos reaccionantes, tomando

como valor de referencia no la concentración del equilibrio inicial, sino un determinado valor de referencia  $C_i^0$ , se puede expresar por

$$\frac{dx_i}{dt} + \frac{1}{\tau} x_i = \frac{1}{\tau} \bar{x}_i; \quad [2]$$

o bien:

$$\tau \dot{x}_i + x_i = \bar{x}_i; \quad [3]$$

$x_i$  y  $\bar{x}_i$  se definen como diferencias de concentración de las especies reaccionantes, siendo:

$x_i = c_i - c_i^0$ , la diferencia entre la concentración actual  $c_i$  y un valor de referencia  $c_i^0$ ;

$\bar{x}_i = \bar{c}_i - c_i^0$ , la diferencia entre la concentración  $\bar{c}_i$  en el nuevo equilibrio y el valor de referencia  $c_i^0$ ;

$\tau$ , una constante de tiempo, llamada tiempo de relajación, cuyas dimensiones son  $\text{seg}^{-1}$ , que está relacionada con las constantes de velocidad y las concentraciones en el equilibrio, como veremos más adelante. La ecuación [2] sólo es válida si  $\bar{x}_i - x_i \ll c_i$  es decir, si la variación total de concentración es mucho menor que el valor de la concentración  $c_i$  (condición de pequeña perturbación). Integrando [2], se obtiene la función

$$(x_i) = (\bar{x}_i)_0 e^{-t/\tau},$$

análoga a la función [1], que describe la curva exponencial representada en la figura 4. Las figuras 3 y 4 representan las curvas que pueden observarse en la pantalla del osciloscopio en los dos casos posibles: que la concentración del componente  $i$  aumente o disminuya, respectivamente, al pasar del equilibrio inicial al equilibrio final.

Una idea intuitiva de lo que representa el tiempo de relajación puede obtenerse si se tiene en cuenta que la variación temporal de  $c$  (representada por la tangente a la curva) es máxima inmediatamente después del salto de temperatura, y disminuye a partir de entonces constantemente. Si permaneciese tan rápida como al principio, se alcanzaría el nuevo equilibrio después de un cierto tiempo  $\tau$  (proyección de la tangente sobre el eje de abscisas), que podría determinarse del modo más simple, trazando la tangente a la curva en el tiempo  $t = 0$  (cf. fig. 3). Pero como el trazado de una tangente a una curva de este

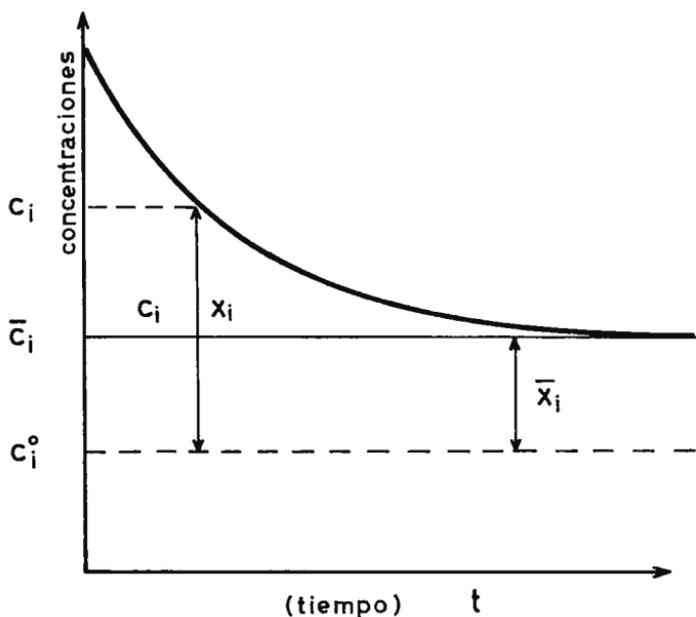


Figura 4

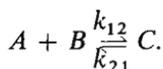
tipo es muy impreciso, lo que se hace en realidad es transformar la ecuación exponencial [1] en la ecuación lineal

$$\log(\Delta C) = \log(\Delta C)_0 - \frac{1}{\tau} t.$$

Representando  $\log \Delta C$  frente a  $t$ , se obtiene el valor de  $1/\tau$  como pendiente de la recta. En algunos casos se pueden llegar a obtener hasta cuatro tiempos de relajación de un mismo oscilograma; pero el registro del oscilograma debe realizarse de tal modo, que se obtengan curvas exponenciales casi puras.

## 2. ANÁLISIS DE LOS DATOS CINÉTICOS EXPERIMENTALES

Los tiempos de relajación se determinan, pues, experimentalmente. El problema que se plantea a continuación es determinar en cada caso la expresión que relaciona los tiempos de relajación con las constantes de velocidad. Como ejemplo vamos a considerar el caso de la reacción bimolecular de un solo paso:



La ecuación cinética está dada por

$$-\frac{dA}{dt} = -\frac{dB}{dt} - \frac{dC}{dt} = k_{12}A \cdot B - k_{21}C,$$

siendo  $A$ ,  $B$  y  $C$  las concentraciones en el equilibrio inicial.

Para el componente  $A$  resulta:

$$\frac{dA}{dt} = -k_{12}A \cdot B + k_{21}C.$$

Designando por  $\Delta A$ ,  $\Delta B$  y  $\Delta C$  las variaciones de concentración de los componentes  $A$ ,  $B$  y  $C$ , y por  $\bar{A}$ ,  $\bar{B}$  y  $\bar{C}$  las concentraciones en el nuevo equilibrio, resulta:

$$\Delta A = A - \bar{A} \quad \Delta B = B - \bar{B} \quad \Delta C = C - \bar{C};$$

y por tanto:

$$\begin{aligned} \frac{d(\Delta A)}{dt} &= -k_{12}(\bar{A} + \Delta A)(\bar{B} + \Delta B) + k_{21}(\bar{C} + \Delta C) = \\ &= -k_{12}\bar{A}\bar{B} - k_{12}\bar{A}\Delta B - k_{12}\bar{B}\Delta A - k_{12}\Delta A\Delta B + k_{21}\bar{C} + k_{21}\Delta C; \end{aligned}$$

teniendo en cuenta la ley de conservación de la masa:

$$\Delta A = \Delta B = -\Delta C,$$

y la condición de equilibrio:

$$k_{12}\bar{A}\bar{B} = k_{21}\bar{C},$$

se obtiene:

$$\frac{d(\Delta A)}{dt} = -k_{12}\bar{A}\Delta A - k_{12}\bar{B}\Delta A - k_{12}\Delta A\Delta A - k_{21}\Delta A;$$

despreciando el término  $k_{12}\Delta A \cdot \Delta A$  por ser  $\Delta A$  muy pequeño (condición de pequeña perturbación), resulta, finalmente, la ecuación linealizada:

$$\frac{d(\Delta A)}{dt} = -[k_{21} + k_{12}(\bar{A} + \bar{B})]\Delta A;$$

e integrando:

$$(\Delta A)_t = (\Delta A)_0 \cdot e^{-[k_{21} + k_{12}(\bar{A} + \bar{B})]t},$$

o sea:

$$\frac{1}{\tau} = k_{21} + k_{12}(\bar{A} + \bar{B}); \quad [5]$$

representando  $1/\tau$  frente a la variable de concentración  $(\bar{A} + \bar{B})$ , se obtiene  $k_{21}$  como ordenada en el origen y  $k_{12}$  como pendiente de la línea recta resultante, y, por tanto, puede calcularse la constante de equilibrio  $K = k_{12}/k_{21}$ , que define el estado de equilibrio químico.

### 3. REACCIONES DE VARIOS PASOS

En una reacción aislada, simple, el tiempo de relajación es una magnitud característica solamente de este sistema, de un solo paso, como acabamos de indicar.

Si tenemos un sistema de varias reacciones en las que no hubiese acoplamiento alguno, cada tiempo de relajación estaría relacionado con cada una de las reacciones aisladas. En este caso ideal, después de someter el sistema a una perturbación, tienen lugar los cambios de concentración correspondientes a cada paso elemental, y el proceso aparece representado fenomenológicamente como una suma de términos exponenciales:

$$(\Delta C)_t = (\Delta C_0)_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + (\Delta C_0)_2 \cdot e^{-t/\tau_2} + (\Delta C_0)_3 \cdot e^{-t/\tau_3} + \dots$$

que en la pantalla del osciloscopio darían una imagen del tipo indicado en la figura 5. Cada intervalo de tiempo  $\Delta t_1, \Delta t_2, \Delta t_3, \dots$  representa una «ventana de tiempo» en la que se puede observar el proceso elemental único, representado por la función exponencial correspondiente que tiene lugar en ese intervalo de tiempo.

Las variables de operación del osciloscopio permiten obtener cada una de estas curvas exponenciales por separado siempre que los tiempos de relajación correspondientes estén suficientemente separados. A partir de cada una de las curvas exponenciales aisladas, se determinan los dos parámetros que caracterizan la función exponencial: la amplitud  $(\Delta c_0)_i$  y el tiempo de relajación  $\tau_i$ .

Este caso ideal, sin embargo, ya no es cierto si existe acoplamiento entre las reacciones que dé lugar a interferencias entre los procesos simples. Un acoplamiento entre diferentes reacciones se presenta siempre que uno de los reactivos participa en diferentes reacciones o si el producto de una reacción cataliza a otra. En un sistema bioquímico sencillo están presentes, en general, varios equilibrios y varios pasos elementales de reacción.

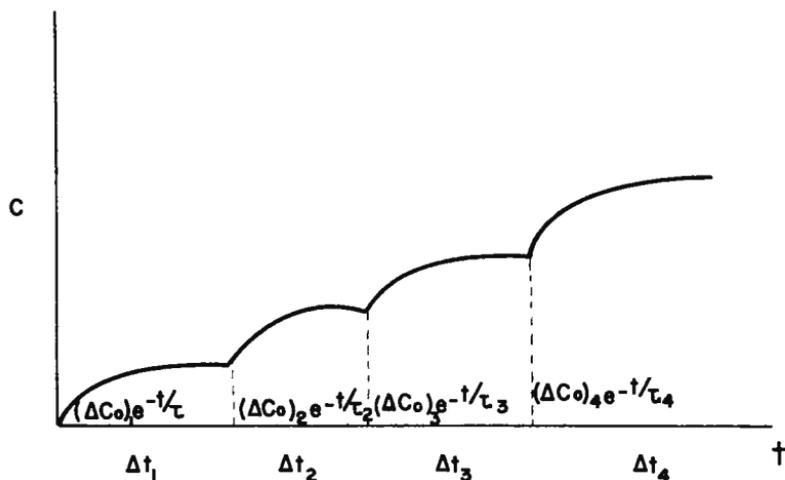


Figura 5

En un sistema de pasos múltiples, los tiempos de relajación no corresponden, generalmente, a los pasos de reacción simples. Esto es una consecuencia del acoplamiento entre las diferentes reacciones, análogo al acoplamiento de vibraciones en un sistema de osciladores múltiples (tal como una molécula que contiene varios grupos atómicos). Las frecuencias de resonancia resultantes de tal sistema corresponden a los llamados «modos normales de vibración» en lugar de corresponder a los «modos de vibración simples» de los osciladores aislados. Análogamente, los tiempos de relajación de los sistemas de reacción acoplados corresponden a los «modos normales de reacción». En un sistema de múltiples pasos acoplados, se obtendrá, por lo tanto, un espectro de tiempos de relajación, cada uno de los cuales está relacionado ahora con los modos normales del sistema.

El conjunto de las constantes de tiempo (tiempos de relajación) y las amplitudes constituyen lo que se llama espectro de relajación del sistema en cuestión. Gráficamente vendría representado por un espectro de líneas del tipo que puede verse en la figura 6, sobre la coordenada tiempo, comparable a los espectros moleculares de vibración rotación. Hay, pues, una estrecha analogía entre la espectroscopia regular (ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas, etc.) y la espectrometría de relajación. La primera trata con fenómenos de resonancia: la frecuencia en el espectro da información sobre las constantes de fuerza y los momentos de inercia. La segunda trata de la relajación,

## Espectro de relajación.

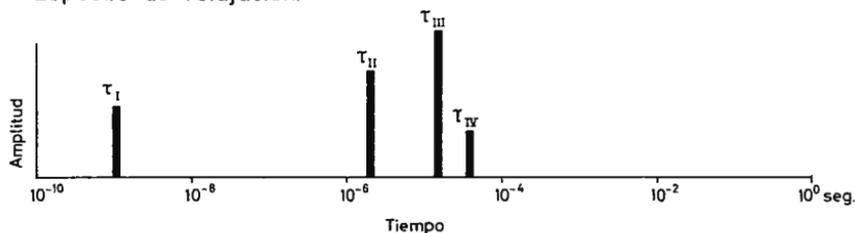


Figura 6

es decir, con los fenómenos de equilibrio, y en ella las constantes de tiempo dan información acerca de las velocidades de transformación química.

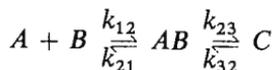
De acuerdo con estas ideas se realiza el análisis cinético de los datos experimentales.

En general, el cálculo de las expresiones que relacionan los tiempos de relajación con las constantes de velocidad se hace de acuerdo con el siguiente esquema:

- 1.º) Escribir el esquema de reacción probable.
- 2.º) Definir las variables de reacción.
- 3.º) Escribir las ecuaciones cinéticas correspondientes y linealizarlas.
- 4.º) Resolver la ecuación secular correspondiente al sistema de ecuaciones diferenciales lineales obtenido.

Como ejemplo consideraremos el caso de una reacción bimolecular seguida de una isomerización del complejo formado, es decir, de dos reacciones simples acopladas por la especie intermedia  $AB$ , común a ambas. Hay muchos ejemplos de este tipo de sistema de reacción en todos los campos de la química. Dentro de la bioquímica corresponde a la reacción de un enzima con su sustrato, formando el complejo intermedio  $AB$  enzima-sustrato.

- 1.º) Esquema de reacción:



- 2.º) Variables de reacción:

Designando por  $x_1$  la variación de las concentraciones de  $A$  y  $B$ :

$$\Delta A = \Delta B = x_1$$

y por  $x_2$  la variación de la concentración de  $AB$ :

$$\Delta AB = x_2,$$

teniendo en cuenta la ley de conservación de la masa:

$$\Delta A + \Delta AB + \Delta C = 0$$

resulta

$$\Delta C = -(\Delta A + \Delta AB) = -(x_1 + x_2)$$

con las dos variables de concentración elegidas,  $x_1$  y  $x_2$  se pueden expresar todas las variaciones de concentración.

### 3.º) Ecuaciones cinéticas y linearización

$$\frac{dA}{dt} = -k_{12}(A)(B) + k_{21}(AB)$$

$$\frac{d(\Delta A)}{dt} = -k_{12}(A)(\Delta B) - k_{12}(B)(\Delta A) + k_{21}(AB)$$

$$\frac{dx_1}{dt} = -k_{12}[(A) + (B)]x_1 + k_{21}x_2 \quad [6]$$

$$\frac{d(\Delta AB)}{dt} = k_{12}(A)(B) + k_{32}(C) - k_{21}(AB) - k_{23}(AB)$$

$$\frac{d(\Delta AB)}{dt} = k_{12}A\Delta B + k_{12}B\Delta A + k_{32}\Delta C - (k_{21} + k_{23})\Delta AB$$

$$\frac{dx_2}{dt} = [k_{12}[(A) + (B)] - k_{32}]x_1 - [k_{21} + k_{23} + k_{32}]x_2 \quad [7]$$

Se tiene así un sistema de dos ecuaciones diferenciales en cuyo primer miembro están las variables de reacción elegidas y en el segundo las constantes de velocidad y las concentraciones en el equilibrio de  $A$  y  $B$ . Haciendo:

$$\begin{aligned} -k_{12}[(A) + (B)] &= a_{11} \\ k_{21} &= a_{12} \\ k_{12}[(A) + (B)] - k_{32} &= a_{21} \\ -(k_{21} + k_{23} + k_{32}) &= a_{22} \end{aligned} \quad [8]$$

las ecuaciones de velocidad se pueden escribir en la forma:

$$\begin{aligned}\dot{x}_1 &= a_{11}x_1 + a_{12}x_2 \\ \dot{x}_2 &= a_{21}x_1 + a_{22}x_2\end{aligned}\quad [9]$$

o bien en forma vectorial

$$\vec{\dot{x}} = A \cdot \vec{x}$$

siendo  $\vec{x}$  y  $\vec{\dot{x}}$  los vectores columna de las variables de concentración y de las derivadas, respectivamente, y  $A$  la matriz de los coeficientes de velocidad:

$$\vec{\dot{x}} = A \cdot \vec{x} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix}$$

Debido al acoplamiento de las dos reacciones, la variación con el tiempo de la concentración  $x_1$ ,  $dx_1/dt$ , es función no sólo de  $x_1$  (especie  $A$ ), sino también de  $x_2$  (especie  $AB$ ), y la variación con el tiempo de la concentración de  $x_2$ ,  $dx_2/dt$  es función también de  $x_1$  y de  $x_2$ . Para que cada una de estas variables  $dx_1/dt$ ,  $dx_2/dt$ , que representan la variación de las concentraciones con el tiempo, sea función de una sola concentración, se hace un cambio de variables de tal modo que:

$$\begin{aligned}a_{11}x_1 + a_{12}x_2 &= \lambda_1 x_1 \\ a_{21}x_1 + a_{22}x_2 &= \lambda_2 x_2\end{aligned}\quad [10]$$

o lo que es lo mismo:

$$\begin{aligned}(a_{11} - \lambda_1)x_1 + a_{12}x_2 &= 0 \\ a_{21}x_1 + (a_{22} - \lambda_2)x_2 &= 0\end{aligned}\quad [11]$$

el sistema [11] de ecuaciones lineales homogéneas tienen soluciones no triviales solamente si:

$$\begin{vmatrix} a_{11} - \lambda_1 & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} - \lambda_2 \end{vmatrix} = 0\quad [12]$$

los valores de  $\lambda$  que cumplen esta ecuación secular, llamados valores propios de la matriz de coeficientes del sistema [11], son tales que con ellos se cumple:

$$\begin{aligned}\frac{dx_1}{dt} &= \lambda_1 \cdot x_1 \\ \frac{dx_2}{dt} &= \lambda_2 \cdot x_2\end{aligned}\quad [13]$$

las ecuaciones [13] son del tipo de la ecuación general:

$$\frac{dx_1}{dt} + \frac{1}{\tau} x_1 = \frac{1}{\tau} \bar{x}_i$$

ya que:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{1}{\tau} (\bar{x}_i - x_1)$$

y por tanto  $\lambda_1$  representa un *tiempo de relajación normal* de la variable

$$x_1, \quad \left( \frac{1}{\tau_1} \right)$$

y  $\lambda_2$  un *tiempo de relajación normal* de la variable

$$x_2, \quad \left( \frac{1}{\tau_2} \right)$$

En general, la ecuación característica

$$|A - \lambda E| = 0 \quad [14]$$

da los  $n$  valores propios  $\lambda_i$  como raíces de una ecuación de orden  $n$ . Si más de dos tipos de relajación similares están presentes, la evaluación de la ecuación [14] puede ser complicada, pero siempre se puede resolver

En nuestro caso, de la ecuación secular:

$$\begin{vmatrix} a_{11} - \lambda & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

resulta la ecuación de segundo grado

$$\begin{aligned} (a_{11} - \lambda)(a_{22} - \lambda) - a_{12}a_{21} &= 0 \\ \lambda^2 - (a_{11} + a_{22})\lambda + (a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}) &= 0 \end{aligned}$$

De ella se deduce:

$$\begin{aligned} \lambda_1 + \lambda_2 &= a_{11} + a_{22} \\ \frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} &= k_{12}[A + B] + k_{21} + k_{23} + k_{32}; \end{aligned} \quad [15]$$

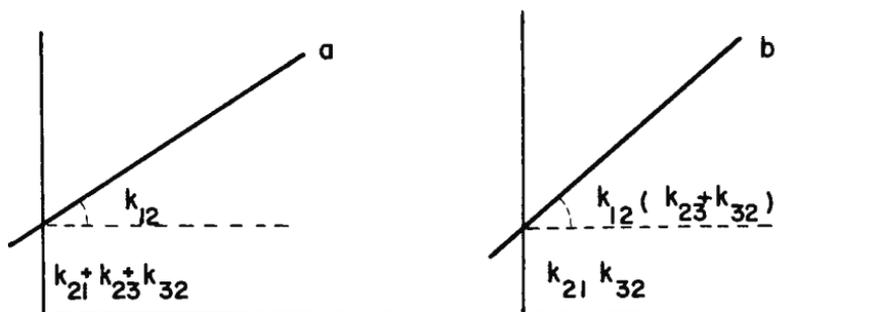
por otra parte,

$$\frac{1}{\tau_1} \frac{1}{\tau_2} = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}.$$

Sustituyendo  $a_{11}$ ,  $a_{12}$ ,  $a_{21}$  y  $a_{22}$  por las expresiones dadas en [8] y simplificando se obtiene:

$$\frac{1}{\tau_1} \cdot \frac{1}{\tau_2} = k_{12}(k_{23} + k_{32})(A + B) + k_{21}k_{32}, \quad [16]$$

representando las ecuaciones [15] y [16] frente a  $(A + B)$  se obtienen dos líneas rectas (a) y (b).



Las pendientes dan:  $k_{12}$  y  $k_{12}(k_{23} + k_{32})$  y las ordenadas en el origen:  $(k_{21} + k_{23} + k_{32})$  y  $k_{21}k_{32}$ , respectivamente, resultando:

$$k_{12} = \text{pendiente de (a)}$$

$$k_{21} = \text{ordenada en el origen de (a)} - \frac{\text{pendiente de (b)}}{\text{pendiente de (a)}}$$

$$k_{32} = \frac{\text{ordenada de (b)}}{k_{21}}$$

$$k_{23} = \text{ordenada en el origen de (a)} - (k_{21} + k_{32}).$$

Todas las constantes de velocidad se pueden determinar, por tanto, directamente. A partir de ellas se calculan finalmente las constantes de equilibrio  $K = k_{12}/k_{21}$ ;  $K' = k_{23}/k_{32}$ .

Un análisis completo de un espectro de relajación no se reduce exclusivamente a los tiempos de relajación. Los valores absolutos de la variación de las concentraciones  $-(\Delta C)_0$ , designados generalmente como amplitudes, encierran la información referente a las magnitudes termodinámicas, de tal modo que su análisis matemático permite determinar, por ejemplo, la entalpía de la reacción.

Para ultimar la revisión del estado actual de las técnicas de relajación química, indicaremos brevemente cuáles son los problemas planteados actualmente en este campo de la cinética química.

No es necesario extender la resolución de la escala temporal, ya que las velocidades de reacción de los procesos elementales químicos tienen lugar en el intervalo de tiempo que es accesible con los métodos ya desarrollados, si bien su ampliación por debajo del nanosegundo facilitaría el estudio de los procesos elementales físicos. Más importante que cualquier mejora en el tiempo de resolución sería un aumento de la sensibilidad, que está estrechamente ligada al problema de la relación señal/ruido.

En resumen, podemos decir que actualmente parece posible analizar cualquier mecanismo de reacción química compleja, en términos de sus pasos elementales. El nivel que pueda alcanzarse en el conocimiento de la estructura fina de tal mecanismo, dependerá del grado en que se logre mejorar la sensibilidad de la detección.

## VI. Aplicaciones de la espectrometría de relajación química

Una vez expuestos los fundamentos teóricos y las técnicas experimentales de la espectrometría de relajación química, es oportuno indicar, aunque sea brevemente, los campos de investigación fundamentales en los que se han aplicado estos nuevos métodos, para el estudio cinético de reacciones extremadamente rápidas.

Siguiendo las ideas expuestas por Eigen (6), se pueden clasificar estas aplicaciones dentro de tres áreas diferentes de investigación:

- A) Química inorgánica;
- B) Química orgánica;
- C) Bioquímica.

En general, pueden distinguirse siete tipos distintos de reacciones, susceptibles de ser investigados con los métodos de relajación (1):

1. Reacciones de transferencia de protones: disociación ácido-base, recombinación de aceptores o donores con exceso o defecto de protones, hidrólisis, tamponización, catálisis ácido-base, interconversión ceto-enólica, etc.

2. Formación de enlace de hidrógeno (asociación y cambios estructurales en polipéptidos y proteínas y en ácidos nucleicos).

3. Isomerismo rotacional.

4. Hidratación.
5. Formación de complejos con metales.
6. Reacciones de transferencia de electrones.
7. Reacciones enzima-substrato: incluyendo reacciones enzima-inhibidor, proteína-colorante y reacciones hapteno-anticuerpo.

## 1. APLICACIONES EN QUÍMICA INORGÁNICA

Más de las tres cuartas partes de los elementos naturales y artificiales conocidos son metales. En disolución acuosa se encuentran normalmente, como iones cargados positivamente, rodeados por una o varias capas de moléculas de agua unidas coordinativamente. En química inorgánica tienen lugar muchas reacciones en las cuales un ión metálico, en disolución, cargado positivamente, se une con uno o varios ligandos cargados negativamente, para dar un complejo. La velocidad de este tipo de reacciones es tan rápida, que en la literatura científica se ha considerado normalmente como «inmedible». La investigación experimental del mecanismo de muchas reacciones inorgánicas se ha hecho accesible solamente, desde la introducción de los métodos de relajación. Para que el ión central metálico se una con otro ligando, éste debe penetrar a través de las capas de hidratación. Puesto que las moléculas de agua de la capa de coordinación interna son las que están más fuertemente ligadas, esta sustitución debe ser la más lenta. Las investigaciones de relajación han confirmado esta suposición en numerosos tipos de iones metálicos. El mecanismo de esta gradual sustitución se pone de manifiesto por un espectro de relajación con varias constantes de tiempo. Al químico le interesa, ante todo, la sustitución de la capa de coordinación interna, porque determinadas propiedades específicas del ión metálico como son la carga, el radio, el número de coordinación y la estructura electrónica se ponen directamente de manifiesto durante este proceso.

El examen de los resultados obtenidos (7) permite establecer las siguientes conclusiones: En los iones alcalinos y alcalinotérreos, las constantes de velocidad están determinadas fundamentalmente por el radio y la carga. Cuanto más pequeño es el radio y más elevada es la carga, tanto más fuertemente están unidas las moléculas de agua que se han de substituir, y, por tanto, tiene lugar más lentamente su sustitución. El aumento del número de coordinación hace más lábil la capa de coordinación dando lugar a un aumento de la velocidad de reacción



(por ejemplo, en los lantánidos). Influencias específicas de la estructura electrónica se ponen de manifiesto, especialmente en los metales de transición. La mayoría de las constantes de velocidad de sustitución están en el intervalo de  $10^3$  a  $10^9 \text{ seg}^{-1}$ .

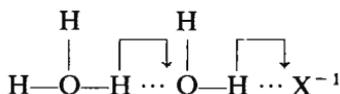
Una discusión detallada de los mecanismos de sustitución puede verse en la referencia (7).

Con los métodos de relajación química, se han estudiado dos tipos de complejos con metales: los que tienen aniones inorgánicos como ligandos y los formados con moléculas orgánicas ionizadas, tales como los complejos de calcio y magnesio, con  $\text{ADP}^-$  y  $\text{ATP}^{-1}$  (1) y (5).

## 2. APLICACIONES EN QUÍMICA ORGÁNICA

El protón, en solución acuosa, se comporta de una manera similar a un ión metálico hidratado, cuya «esfera de coordinación interna» comprende cuatro moléculas de agua, formando el conjunto un complejo muy estable, el  $\text{H}_3\text{O}_4^+$ , que es detectable por espectrometría de masas.

En las reacciones protolíticas, la molécula que reacciona con el protón está asociada con moléculas de agua, por enlaces de hidrógeno. El protón puede penetrar en este complejo, sin sustituir directamente las moléculas de agua, según un «mecanismo de salto», que se puede representar esquemáticamente por:



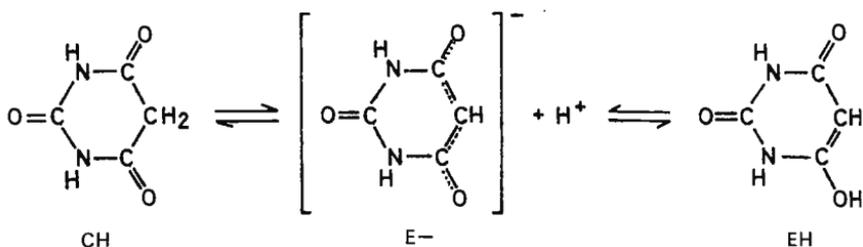
(las líneas de puntos representan enlaces de hidrógeno).

La velocidad del «mecanismo de salto» de un protón, determinada por medidas de relajación, en cristales de hielo, es de  $10^{13} \text{ seg}^{-1}$ . Ello supone que la velocidad de recombinación de un protón, con cualquier aceptor, es superior a la de cualquier otra reacción controlada por difusión. Las velocidades de difusión del protón y del ión hidróxilo, sobrepasan a las de cualquier otra especie iónica o molecular. Es decir, la reacción de neutralización  $\text{H}^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$ , es la más rápida de las reacciones de este tipo, siendo la constante de velocidad bimolecular de  $1,3 \cdot 10^{11} \text{ lit} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ .

Se han estudiado muchas reacciones protolíticas, que demuestran la influencia de la estructura molecular, las interacciones electrostáticas, la estructura electrónica y la formación de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. Solamente a través de la formación de enlaces de hidrógeno puede ser transferido el protón con la extrema rapidez citada.

La cinética de la transferencia de protones se ha estudiado detalladamente en un gran número de ácidos y bases orgánicas (8). Como ejemplo representativo, de otros muchos estudios similares, Eigen y col. (9) han determinado las constantes de velocidad de reacciones de imidazol con diversos donadores de protones. Estas son de gran importancia en los sistemas de reacción bioquímicos debido a la capacidad de tamponamiento y de donar y aceptar protones, que tiene el imidazol, en el intervalo de pH próximo a 7.

Asimismo es muy representativo el estudio de la transformación ceto-enólica de compuestos heterocíclicos, por ejemplo, del ácido barbitúrico, cuyo esquema de reacción es:

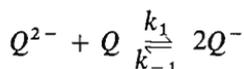


#### Transferencia de electrones.

Es interesante comparar las reacciones de intercambio de protones, citadas anteriormente, con las de transferencia de otra partícula elemental: el electrón.

Como ejemplo, consideraremos el sistema quinona-hidroquinona, que es uno de los sistemas redox más importantes, tanto en los sistemas biológicos como en diversos procesos tecnológicos. Durante muchos años se supuso que las reacciones en las que estaban implicadas la quinona y la hidroquinona, tenían lugar a través de una semiquinona, como radical intermedio.

Combinando el método de salto de temperatura y la técnica de flujo, se ha podido determinar la cinética de la reacción:



( $Q^{2-}$  = hidroquinona ionizada,  $Q$  = quinona,  $Q^{-}$  = semiquinona) y determinar las constantes  $k_1$  y  $k_{-1}$ .

Del estudio de diversos sistemas de reacción redox similares, se deduce que la velocidad de transferencia de electrones se aproxima al límite de la de los procesos cinéticos controlados por difusión, pero son algo más pequeñas.

### 3. APLICACIONES EN BIOQUÍMICA

La biología constituye, hoy día, el campo de aplicación más importante de la espectrometría de relajación. Por este motivo se han desarrollado diversos métodos, proyectados con las características necesarias para hacer accesible la investigación de secuencias de reacciones biológicas complejas.

El estudio de la cinética de los sistemas biológicos requiere el empleo de métodos que no alteren el sistema de reacción, con el fin de que los procesos biológicos sean investigados en su «transcurso natural», sin forzar las fronteras relativamente estrechas de las condiciones naturales en las que se desarrolla la vida. Las pequeñas perturbaciones, como son las utilizadas en las técnicas de relajación, satisfacen esta exigencia y, además, permiten un análisis completo de los pasos elementales de las reacciones investigadas.

Uno de los campos más representativos de la aplicación de los métodos de relajación química es el del estudio de la cinética de las reacciones enzimáticas. Las velocidades globales de la catálisis enzimática eran ya accesibles a los bioquímicos, pero sólo ahora, mediante las técnicas de relajación química, es posible penetrar en la «estructura fina» de sus mecanismos de reacción.

Como es sabido, las velocidades de las reacciones enzimáticas son tan elevadas que es necesario diluir las enzimas a concentraciones de 0,1 a 10  $\mu\text{g/ml} \cdot (10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M, aproximadamente) para poder seguir las reacciones convenientemente. En estas condiciones, las medidas cinéticas dan muy poca información de los procesos rápidos del estado pre-estacionario, tales como la formación de los complejos enzima-

substrato. Ahora bien, esta clase de interacciones entre proteínas y pequeñas moléculas está recibiendo cada vez más atención, ya que es precisamente a este nivel en el que entra en juego la alta selectividad de las reacciones bioquímicas. Con objeto de detectar los diversos intermediarios implicados en estos procesos, es necesario aumentar la concentración de la enzima hasta que sea del orden de la del substrato, es decir,  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M. Esto significa un incremento de 3 a 5 órdenes de magnitud respecto a las concentraciones de enzimas utilizadas normalmente en la cinética del estado estacionario. Entonces, las reacciones bimoleculares, tales como la unión de un substrato a su enzima específico, están aceleradas por el mismo factor, dando lugar a vidas medias de reacción del orden de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  seg. Es obvio que se necesitan métodos especiales, de gran poder de resolución en el tiempo, para investigar las reacciones que tienen lugar en estas condiciones. Los métodos de relajación química, que, además de no perturbar el sistema de reacción, tienen el poder de resolución necesario, resultan, por tanto, adecuados para el estudio de este tipo de reacciones.

Numerosos mecanismos enzimáticos se han analizado mediante estas técnicas, en diversos laboratorios, en el curso de los últimos años (10)-(11)-(12) y (13).

Como ejemplo representativo de las posibilidades que ofrece el empleo de la espectrometría de relajación, indicaremos brevemente los resultados a que ha dado lugar su aplicación en la investigación del mecanismo de acción de las enzimas alostéricas.

Desde hace ya largo tiempo se sabe que ciertas enzimas, al unirse a sus substratos, no siguen la ley de acción de masas, sino que presentan un comportamiento cooperativo. Según este mecanismo, las primeras moléculas del substrato se unen a la enzima con una afinidad relativamente pequeña, pero logran «despertar la tendencia» de la enzima a unirse con nuevas moléculas de substrato. Esta crece al aumentar la población de moléculas del substrato dispuestas para su unión con la enzima, de tal modo que, finalmente, en la proximidad de la saturación, la enzima se une con mucha mayor afinidad a las moléculas del substrato. La interacción de la hemoglobina con el oxígeno tiene este carácter cooperativo: en el pulmón, en presencia de una elevada cantidad de oxígeno, tiene lugar una saturación completa, pero si la presión parcial de oxígeno disminuye por debajo de un límite determinado, la hemoglobina parece «desinteresarse» de su unión con el substrato y libera de nuevo todo el oxígeno. Si se mide la saturación de la enzima con el

substrato, y se representa en función de la concentración de substrato, se obtiene una curva sigmoide en lugar de una curva hiperbólica, como correspondería a un mecanismo regido por la ley de acción de masas.

Para explicar esta interacción cooperativa, Monod, Changeux y Wyman (14) han propuesto un modelo, según el cual, la enzima, que consta de varias subunidades, se puede presentar en dos conformaciones espaciales distintas: una conformación con gran afinidad para el substrato forma R, (o sea, con alta actividad catalítica) y otra con poca afinidad, forma T.

Las características de este modelo son tres: a) La molécula proteica existe en dos estados estructurales diferentes. b) La transformación estructural es un proceso que se puede caracterizar con la designación «todo o nada». c) Las subunidades son equivalentes e independientes. Tal modelo queda descrito con tres parámetros, y las ecuaciones cinéticas correspondientes reproducen perfectamente las curvas sigmoideas obtenidas experimentalmente, describiendo la unión del substrato con ambas formas, así como la isomerización de la enzima.

Koshland (15) ha propuesto un modelo alternativo que, con tres parámetros, logra una reproducción exacta de las curvas de saturación. El mecanismo de acción enzimática correspondiente, denominado «induced fit», ofrece otra explicación física del aumento de afinidad a medida que la proteína se satura con el ligando. En este mecanismo se pone el énfasis en los cambios secuenciales de la estructura de la subunidad y la afinidad del ligando, postulando que el ligando, en cada subunidad, y sólo en ella, induce una transformación estructural. Por el contrario, el modelo alostérico de Monod, postula la existencia de un pre-equilibrio «alostérico», entre dos conformaciones de la proteína oligomérica, cada una de las cuales tiene una afinidad diferente para el ligando, según se describe en el capítulo siguiente.

Se han estudiado diversas enzimas, implicadas en distintos mecanismos de regulación, que presentan una respuesta sigmoideal, de velocidad y unión, respecto a la concentración de substratos, activadores o inhibidores. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que estas interacciones cooperativas de moléculas de ligando están relacionadas íntimamente con la estructura de las subunidades de la enzima y con los cambios conformacionales que acompañan a la acción del ligando. En el curso de la investigación relativa a la unión de la coenzima NAD (dinucleotido de nicotinamida y adenina) con la enzima GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), se estimó que este caso par-

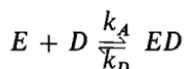
ticular es un sistema ideal para el estudio de la interacción homotrópica de ligandos. Considerando, además, que la unión del NAD con la enzima GAPDH podría constituir un sistema idóneo para probar la versatilidad y el poder de la espectrometría de relajación, como técnica de investigación cinética, Kirschner y col. (16) y (17) han estudiado dicho mecanismo de unión utilizando la técnica de relajación de salto de temperatura.

En condiciones experimentales (pH 8,5; 40°C), que dan lugar a curvas de titulación sigmoidales, el espectro de relajación obtenido para este sistema es relativamente simple. El empleo de instrumentos de alta estabilidad y sensibilidad (18), ha permitido determinar la existencia de cinco tiempos de relajación, pero solamente tres de ellos son de carácter significativo en el mecanismo cinético estudiado y están suficientemente bien separados en el eje del tiempo para poder establecer expresiones analíticas simples que relacionan las constantes de tiempo con las constantes de velocidad y las concentraciones de equilibrio. Se ponen así de manifiesto dos procesos rápidos, cuyas constantes de tiempo corresponden a los intervalos  $1/\tau_1 = 10^3$  a  $10^4 \text{ seg}^{-1}$  y  $1/\tau_2 = 10^2$  a  $10^3 \text{ seg}^{-1}$ , y un tercer proceso, relativamente lento, cuya constante de tiempo es  $1/\tau_3 = 0,1$  a  $10 \text{ seg}$ .

Las velocidades de los dos procesos rápidos aumentan al aumentar la concentración de NAD; la naturaleza de esta dependencia permite identificar, en principio, los procesos rápidos con dos tipos diferentes de reacciones bimoleculares, que corresponden probablemente a dos tipos diferentes de sitios de unión. Por el contrario, el hecho de que la velocidad del proceso lento disminuye gradualmente al aumentar la concentración de NAD, hasta alcanzar un valor constante, y de que resulta ser independiente de la concentración de la enzima, permite asignar este proceso a una reacción de isomerización de la enzima entre dos estados estructurales diferentes que, de acuerdo con la designación utilizada por Monod para las enzimas alostéricas, llamaremos estado R y estado T.

La secuencia de procesos que tienen lugar después de una perturbación rápida del equilibrio por un salto de temperatura puede describirse de la siguiente forma: En la fase inicial,  $10^{-6}$  a  $10^{-2} \text{ seg}$ ., todas las reacciones que representan los procesos de isomerización entre las estructuras R y T son tan lentas que pueden ser despreciadas. Los únicos procesos que tienen lugar son las reacciones bimoleculares

de las formas R y T con el NAD. El primer proceso de relajación se puede identificar inequívocamente con una reacción de segundo orden:



Durante el proceso de reequilibrio de la reacción más rápida, el otro proceso, menos rápido, se puede despreciar, porque es demasiado lento, y, por tanto, el primer proceso de relajación se puede considerar como un proceso aislado. La dependencia de la concentración viene dada por la ecuación

$$1/\tau_1 = k_D + k_A(\bar{E} + \bar{D}),$$

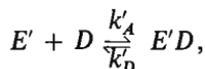
donde  $\bar{E}$  indica la concentración de equilibrio de los sitios de unión libres de la enzima, y  $\bar{D}$  la concentración del NAD<sup>+</sup> libre. A concentraciones elevadas de ligando, la concentración de los *sitios* de unión libres resulta despreciable comparada con la concentración de ligando libre, siendo entonces

$$1/\tau_1 = k_D + k_A \cdot \bar{D}.$$

El *sitio* de unión implicado en el proceso de relajación más rápido se puede identificar como un sitio de alta afinidad que corresponde a la forma R.

El valor de la constante de disociación  $K = k_D/k_A$  resulta ser:  $K = (8 \pm 2) \cdot 10^{-5}$  M.

El segundo proceso de relajación es también claramente de segundo orden y se puede identificar con una reacción del tipo:



en la que  $E'$  representa una segunda configuración de la enzima, la forma T, distinta a la representada con el símbolo  $E$ . En esta reacción se cumple la relación:

$$1/\tau_2 = k'_D + k'_A \left( \bar{D} + \bar{E}' \left[ \frac{K + \bar{D}}{K + \bar{D} + \bar{E}'} \right] \right)$$

que a concentraciones elevadas de NAD<sup>+</sup> se reduce a:

$$1/\tau_2 = k'_D + k'_A \cdot D.$$

El *sitio* de unión correspondiente se puede identificar como un *sitio* de baja afinidad, que corresponde a la forma T, siendo la constante de disociación  $K' = (2,5 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$  M.

Como se ha indicado anteriormente, el tiempo de relajación del proceso más lento es consistente con una lenta isomerización de la enzima.

Puesto que el espectro de relajación, tal como queda indicado, es relativamente simple, resulta factible examinar si es consistente con las predicciones cualitativas de los mecanismos posibles que se han propuesto para explicar la unión cooperativa. El mecanismo secuencial está caracterizado por cinco híbridos conformacionales de la enzima, que están relacionados entre sí por cuatro reacciones de unión consecutivas. Por lo tanto, en la cinética de relajación correspondiente a este mecanismo solamente se puede observar la superposición de procesos de segundo orden. Las isomerizaciones no transcurren como pasos elementales observables independientemente. Es evidente que el mecanismo secuencial no puede dar cuenta de la existencia de  $\tau_3$ . Se demuestra teóricamente que, aunque el mecanismo alostérico, para una enzima tetramérica, está caracterizado por nueve tiempos de relajación, solamente tres de ellos son detectables, de acuerdo con las observaciones experimentales. Dentro de los límites de error del método, se puede establecer la conclusión de que el apoenzima existe solamente en dos conformaciones tetraméricas.

La cooperatividad entre las subunidades es tan elevada, que la transición estructural tiene que ser un proceso «todo o nada». En otras palabras, los resultados experimentales obtenidos utilizando las técnicas de espectrometría de relajación indican que todos los postulados específicos que caracterizan el modelo de Monod parecen cumplirse dentro de los límites de error experimentales.

Teniendo en cuenta las conclusiones expuestas, consideramos que la enzima GAPDH (de levadura) es el primer ejemplo de una proteína alostérica, para la cual el mecanismo concertado, propuesto por Monod, constituye, al menos en una primera aproximación, una descripción adecuada. En rigor, esta conclusión sería válida solamente, por supuesto, para las condiciones particulares en que se ha realizado el experimento. Sin embargo, cambios moderados de temperatura (de 40° a 20° C) y de pH (de 8,5 a 9,0) no alteran las características cualitativas del espectro de relajación.

Al establecer estas conclusiones conviene recordar que, en general, los datos cinéticos proporcionan información solamente para excluir ciertos mecanismos, pero no para demostrar incuestionablemente la existencia de un mecanismo determinado en particular. Es evidente la conveniencia de preguntarse siempre, una vez evaluados e interpretados los resultados experimentales, si existen otros mecanismos que podrían dar cuenta de las observaciones realizadas. Respecto a las conclusiones establecidas por nosotros, se puede afirmar que diversos estudios de la unión de  $\text{NAD}^+$  a GAPDH de levadura realizados independientemente por otros investigadores, en las mismas condiciones que las utilizadas en las medidas de relajación, pero utilizando técnicas diferentes, concuerdan con las predicciones del modelo concertado.

## VII. Limitaciones de las técnicas de espectrometría de relajación química

Es obvio el interés que tiene siempre el presentar un estudio crítico de las limitaciones que ofrece toda técnica experimental. Por ello, para ultimar esta breve revisión de algunas de las posibilidades que tiene la espectrometría de relajación química en la investigación de reacciones rápidas, consideramos oportuno referirnos a las limitaciones inherentes a esta nueva técnica. Entre los diversos estudios de este tipo merece citarse el reciente trabajo de Loudon y Koshland (18), en el que demuestran que, en algunos casos, puede obtenerse el mismo tipo de espectros de relajación para mecanismos de reacción que son indudablemente distintos. Por otra parte, debido a que los errores experimentales son del orden del 10 al 25 por 100, pueden obtenerse curvas que no sean distinguibles experimentalmente, aunque teóricamente deban ser perfectamente distinguibles.

Estas limitaciones de la espectrometría de relajación química no significan que esta técnica no constituya un método de investigación de un valor excepcional. Actualmente, la espectrometría de relajación es el único método que permite investigar procesos demasiado rápidos —que no se podrían estudiar por el método de «stopped flow»— en los que están implicadas macromoléculas del más alto interés biológico. Además de los mecanismos enzimáticos anteriormente citados, se han investigado con estas nuevas técnicas algunos de los mecanismos de acción de los ácidos nucleicos, especialmente los correspondientes a los procesos de transferencia del código genético.

Se puede afirmar que los resultados más fascinantes a que darán lugar los métodos de relajación química serán los que se logren en el estudio de las reacciones biológicas. Estamos en el umbral de un nuevo período de la investigación científica, en el que la moderna cinética de reacciones puede contribuir a la comprensión de los procesos de auto-organización molecular y programas de formación y regulación que condicionan la evolución de la vida. Este podría ser, ciertamente, el primer paso hacia la elaboración de una teoría física de la evolución.

#### BIBLIOGRAFIA

1. M. EIGEN y K. KUSTIN: I.C.S.U. REVIEW 5,97 (1963).
2. M. EIGEN, *Der Zeitmassstab der Natur*. Jahrbuch der Max-Planck Gesellschaft (1966).
3. H. HARTRIDGE y F. J. W. ROUGHTON: Proc. Roy. Soc. (London), A104,376 (1923).
4. M. EIGEN y L. DE MEYER: *Technique of Organic Chemistry* (Ed. A. Weissberger) Interscience (New York, 1963) VIII p.2.<sup>a</sup> p. 728.
5. M. EIGEN, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation Conferences on Chemical Research*. III: Molecular Structure p. 161-189 (1959).
6. M. EIGEN, *Die «Unmessbar» schnellen Reaktionen*: Nobelvortrag (11 diciembre 1967). Ed. The Nobel Foundation (1968).
7. M. EIGEN: Pure and Appl. Chem. 6,97 (1963).
8. M. EIGEN, W. KRUSE, G. MASS y L. DE MAEYER: Prog. React. Kin. 2,285 (1964).
9. M. EIGEN, G. G. HAMMES y K. KUSTIN: J. Am. Chem. Soc. 82,3482 (1960).
10. M. EIGEN y G. G. HAMMES: Advances in Enzymol 25,1 (1963).
11. P. FASELLA y G. G. HAMMES: Biochemistry 6,1798 (1967); J. E. ERMAN y HAMMES: J. Am. Chem. Soc. 88,5607,5614 (1966).
12. G. G. HAMMES y CHENG-WEN WU: Biochemistry 10,2150 (1971).
13. G. M. LOUDON y D. E. KOSHLAND: Biochemistry 11,229 (1972).
14. J. MONOD, J. WYMAN y P. CHANGEUX: J. Mol. Biol. 12,88 (1965).
15. D. E. KOSHLAND, G. NEMETHY y D. FILMER: Biochemistry 5,365 (1966).
16. K. KIRSCHNER, M. EIGEN, R. BITTMAN y B. VOIGT: Proc. Nat. Acad. Sci. 56,1661 (1966).
17. K. KIRSCHNER, E. GALLEGO, I. SCHUSTER y D. GOODALL: J. Mol. Biol. 58,29 (1971).
18. G. M. LOUDON y D. E. KOSHLAND: Biochemistry 11,229 (1972).

## CAPÍTULO VII

# INTERACCIONES MOLECULARES Y REGULACION DEL METABOLISMO

A. M. MUNICIO

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Universidad Complutense de Madrid.

INTRODUCCIÓN . . . . .	269
I. REGULACIÓN METABÓLICA . . . . .	271
1. Generalidades . . . . .	271
2. Regulación de la actividad enzimática . . . . .	273
3. Regulación de la síntesis de enzimas . . . . .	279
II. ALOSTERISMO Y TRANSICIONES ALOSTÉRICAS . . . . .	285
1. Conceptos generales . . . . .	285
2. Alostерismo y control de la actividad enzimática . . . . .	287
3. Niveles estructurales de las proteínas . . . . .	289
4. Cambios conformacionales . . . . .	294
III. UNIÓN DE LIGANDOS. MÉTODOS DE REPRESENTACIÓN . . . . .	300
1. Teoría de la unión de ligandos . . . . .	300
2. Representación de Hill . . . . .	307
3. Representación de Scatchard . . . . .	312
IV. CINÉTICA DE LAS REACCIONES ALOSTÉRICAS. MÉTODOS DE REPRESENTACIÓN. . . . .	317
V. MODELOS ALOSTÉRICOS . . . . .	325
1. Generalidades . . . . .	325
2. Modelo de Monod, Wyman y Changeux . . . . .	327
3. Modelo de Koshland, Némethy y Filmer . . . . .	336
4. Problemática de los modelos alostéricos . . . . .	357
VI. HISTÉRESIS ENZIMÁTICA . . . . .	364
VII. ESQUEMAS GENERALES DE REGULACIÓN ENZIMÁTICA . . . . .	366
1. Control de la actividad enzimática . . . . .	366
2. Control de la síntesis de enzimas . . . . .	371
3. Regulación del metabolismo de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico . . . . .	372

VIII.	CONTROL DEL METABOLISMO POR MODIFICACIÓN QUÍMICA DE ENZIMAS . . . .	391
	1. Introducción . . . . .	391
	2. Glucógeno fosforilasa y glucógeno sintetasa . . . . .	393
	3. Modificación química de histonas . . . . .	405
	4. Glutamina sintetasa . . . . .	408
IX.	CONTROL DE METABOLISMO POR SISTEMAS ENZIMÁTICOS AUTOASOCIANTES . . .	413
	1. Introducción . . . . .	413
	2. Acetil-CoA carboxilasa . . . . .	422
X.	COMPLEJOS MULTIENZIMÁTICOS . . . . .	429
	1. Introducción . . . . .	429
	2. Acido graso sintetasa . . . . .	431
	3. Sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo de aminoácidos aromáticos . . . . .	451
	4. DNA polimerasa . . . . .	459
	5. Aspártico transcarbamilasa . . . . .	461

## INTRODUCCION

En el estudio de las interacciones que ocurren a base de moléculas de trascendente significación biológica, cabe distinguir los aspectos físicos que a ellas subyacen y su repercusión en el orden bioquímico. Es precisamente este segundo aspecto el que se va a desarrollar en este capítulo.

La *funcionalidad bioquímica* de las interacciones moleculares radica, en buena medida, en su contribución a la fenomenología de la *regulación del metabolismo* y aparece ciertamente ligada al fenómeno conocido como *alosterismo*. Conceptos estos, pues, de regulación, interacciones y alosterismo que con frecuencia se interpenetran, pero acerca de los que cabe hacer ciertas precisiones previas.

La *regulación del metabolismo* como fenómeno multifactorial viene afectada por múltiples variables, entre las que, sin duda, la contribución de la *regulación enzimática* es la de mayor significado y la que guarda conexión más directa con las interacciones a nivel molecular. Regulación enzimática que, a su vez, viene sustentada —de un lado— por los propios *niveles de la enzima*, fruto del distinto grado de actividad genética, y —de otro— por la *actividad catalítica* que la enzima sea capaz de exhibir.

Ambos tipos de regulación enzimática se manifiestan en virtud de la intervención de diferentes y variados motivos de interacción a nivel molecular. La actividad catalítica de una enzima ofrece la más simple y directa manifestación de interacción en la formación del complejo enzima-sustrato. Son, sin embargo, las enzimas poseedoras de estructura cuaternaria las que son capaces de exhibir una modulación de su actividad en términos de interacción molecular entre las subunidades. Estas subunidades, aunque poseen la información necesaria para su estructura tridimensional, no constituyen la forma funcional de la enzima, sino que precisan de una cierta interacción entre ellas para que se manifieste la actividad catalítica. Estas interacciones pueden adquirir un grado de complejidad como el que exige la interpretación de las características cinéticas anormales de las enzimas conocidas como

alostéricas, capaces de dar lugar a transiciones conformacionales a base de la interacción entre subunidades o con pequeñas moléculas conocidas como ligandos. *Transiciones conformacionales* que median las interacciones indirectas entre localizaciones de unión topográficamente distintas, y que se conocen como efectos alostéricos; transiciones conformacionales que se establecen entre formas más activas y menos activas —habitualmente conocidas como R (Relaxed) y T (Tight)— a las que de manera preferente se unen los activadores o inhibidores alostéricos, una de cuyas manifestaciones en el orden regulador es la denominada retroinhibición.

Estas *propiedades alostéricas* de las enzimas que pueden aparecer modificadas mediante la formación o rotura de enlaces covalentes, con la implicación de nuevas enzimas, que de esta forma llevan a cabo una amplificación del comportamiento regulador. Así, pues, el alosterismo va a representar un fenómeno físico que subyace de forma trascendente a los mecanismos de regulación enzimática y que va a participar en el complejo esquema de la más general regulación del metabolismo.

Varios tipos de interacción a nivel molecular han de ocurrir asimismo como consecuencia del control de los niveles de enzimas. Dejando a un lado las interacciones propias del mecanismo de síntesis proteica, su regulación —inducción, represión— es dependiente de la interacción de un ligando sobre la proteína represora. En el mismo orden de ideas puede mencionarse la participación de interacciones moleculares en otros tipos de control fisiológico, hormonal, del sistema nervioso, etc.; así, en la acción del músculo, en los procesos de conducción nerviosa y transmisión sináptica, en el proceso visual, en la función de membranas con respecto particular a mecanismos de excitación y transporte activo, en la translocación de los ribosomas, etc., existen —con distinto grado de fundamento— proteínas con estructura cuaternaria y cambios conformacionales, constituyendo la base de sus mecanismos.

El control alostérico del comportamiento cinético de las enzimas está relacionado con el control de la síntesis. Por ejemplo, la síntesis de una enzima se detiene o disminuye en respuesta a un aumento en la concentración de un metabolito determinado, que puede ser el producto final de una secuencia de reacciones en las que la enzima participa; en general, esta disminución afecta de forma coordinada a todas las enzimas de la secuencia. Por el contrario, el control alostérico por retroinhibición tiene lugar, generalmente, sobre una única enzima del

proceso. Ambos tipos de mecanismos, retroinhibición de una enzima aislada y represión coordinada del conjunto de enzimas de la secuencia metabólica, se presentan con frecuencia de modo simultáneo, con lo que se da un control fino a través de la modulación de la actividad catalítica a la vez que se produce una gran economía celular por medio de la regulación coordinada de los niveles de enzimas.

Los aspectos reguladores de las enzimas poseedoras de estructura cuaternaria adquieren una nueva dimensión ante las propiedades de los complejos multienzimáticos a base de interacciones heterólogas entre macromoléculas enzimáticas diferentes que influyen la estructura y función catalítica de las enzimas implicadas.

## I. Regulación metabólica

### 1. GENERALIDADES

La *regulación del metabolismo* viene caracterizada por la gran complejidad que es capaz de manifestar, a la que contribuye en primer lugar la multiplicidad de etapas enzimáticas integradoras de las secuencias metabólicas, aun de las más sencillas; etapas que pueden constituir puntos de control ejercido bajo formas variadas.

A la complejidad de la regulación metabólica contribuyen otros factores, como la existencia de metabolitos reguladores multifuncionales, la presencia de múltiples efectores actuantes sobre la misma reacción enzimática y las concentraciones variables de enzimas, sustratos y efectores. Los sistemas glicolisis-gluconeogénesis y lipogénesis constituyen procesos metabólicos en los que es posible ejemplificar los anteriores aspectos de regulación metabólica.

La *multiplicidad de etapas enzimáticas* y un ejemplo sencillo de la posibilidad de conexiones metabólicas entre sistemas diversos —glicolisis y lipogénesis— pueden verse en la figura 1. La unidad básica para la síntesis de ácidos grasos, acetyl-CoA, se genera en la descarboxilación oxidante del ácido pirúvico, posición final común de la degradación glicolítica. A partir de esta unidad se biosintetizan ácidos grasos, para lo que se requiere la integración de otros sistemas que suministran el poder reductor necesario a la reducción del acetilo, catalicen la carboxilación para formar la unidad condensante (malonil-CoA), condensen estas unidades y lleven a cabo las adecuadas hidrataciones

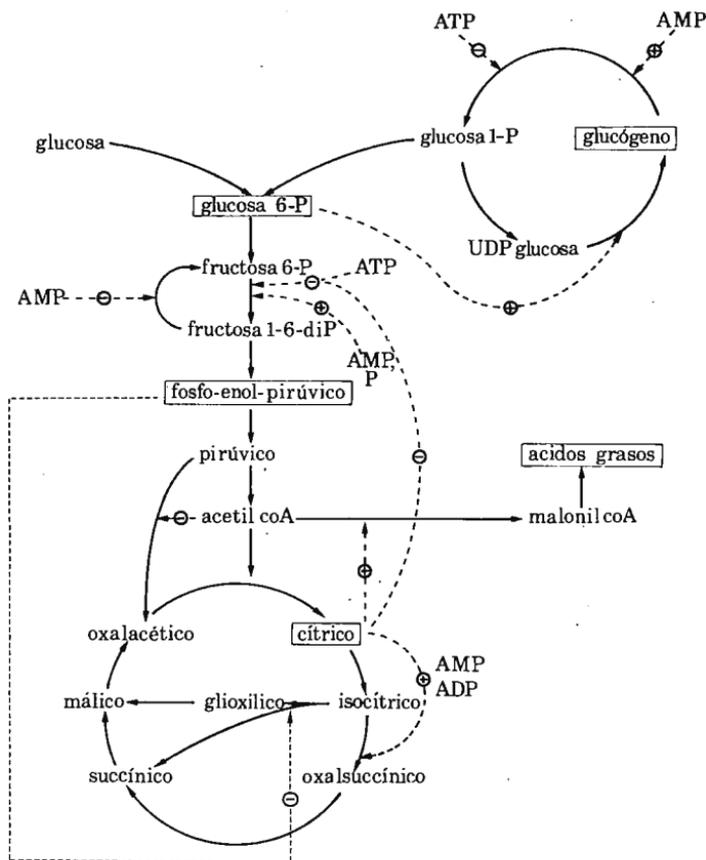


Figura 1

e hidrogenaciones, suministren la energía necesaria bajo la forma de ATP y regeneren la coenzima A por desacilación o transacilación.

Dicho esquema va a servir asimismo para poner de manifiesto la existencia de *metabolitos capaces de influenciar de forma multivalente* la compleja situación metabólica; ejemplo significativo lo constituye la especial situación del citrato, que puede participar en esquemas de suministro de energía, poder reductor, acetil-CoA y como efector de enzimas. Su posición en el ciclo de Krebs queda vinculada a la producción de energía; el suministro de poder reductor para la síntesis de ácidos grasos se debe a la presencia extramitocondrial de la isocitrónico

deshidrogenasa; la escisión extramitocondrial del citrato es causa parcial de la presencia de acetil-CoA; como efector metabólico ejerce un efecto positivo sobre la acetil-CoA carboxilasa, y negativo sobre la fosfofructoquinasa.

## 2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El control directo de la actividad enzimática por metabolitos fue comprobada inicialmente en los procesos de biosíntesis de los aminoácidos valina-isoleucina (1) y de pirimidinas (2). La treonina desaminasa, primer sistema enzimático de la transformación metabólica treonina  $\rightarrow$   $\rightarrow$  isoleucina, resulta inhibida por la isoleucina, producto final de la transformación; este control negativo de la actividad enzimática por los productos finales había de desarrollarse ampliamente en gran número de sistemas bacterianos y de otros organismos y dar lugar a formas más complejas de mecanismos de retroinhibición: cooperativa, concertada, cumulativa, etc.

Frente a los anteriores esquemas de regulación exhibidos por diversos tipos de procesos de biosíntesis, la regulación de los procesos catabólicos viene caracterizada por la intervención de productos finales del metabolismo energético (fosfato, pirofosfato, nucleotidos).

Especial interés han de presentar en el orden regulador los procesos que participan de ambos tipos de funciones, biosintéticas y degradativas; dentro de este esquema, las relaciones glucolisis-gluconeogénesis ofrecen una significación especial. En todos los casos, la vía principal de la gluconeogénesis implica la reversión de la glucolisis, en la que las etapas termodinámicamente irreversibles se obvian con la presencia de una reversibilidad funcional a base de sistemas enzimáticos propios; sin embargo, la formación de precursores gluconeogénicos adopta en cada caso mecanismos metabólicos particulares. En la figura 2 se representan esquemáticamente algunas de dichas relaciones en *E. coli*, así como el control ejercido sobre la actividad enzimática. Desde el punto de vista operacional, este esquema puede dividirse en los siguientes apartados:

- 1) Fructosa-6-P  $\rightarrow$  Fructosa-1,6-P  $\rightarrow$   $\rightarrow$  fosfoenolpirúvico (PEP)
- 2) PEP  $\rightarrow$  oxalacético  $\rightarrow$  aspártico (o málico)
- 3) Pirúvico  $\rightarrow$   $\rightarrow$   $\rightarrow$  acetil-CoA
- 4) Acetil-CoA  $\rightarrow$  cítrico  $\rightarrow$  isocítrico  $\rightarrow$   $\alpha$ -cetoglutárico.

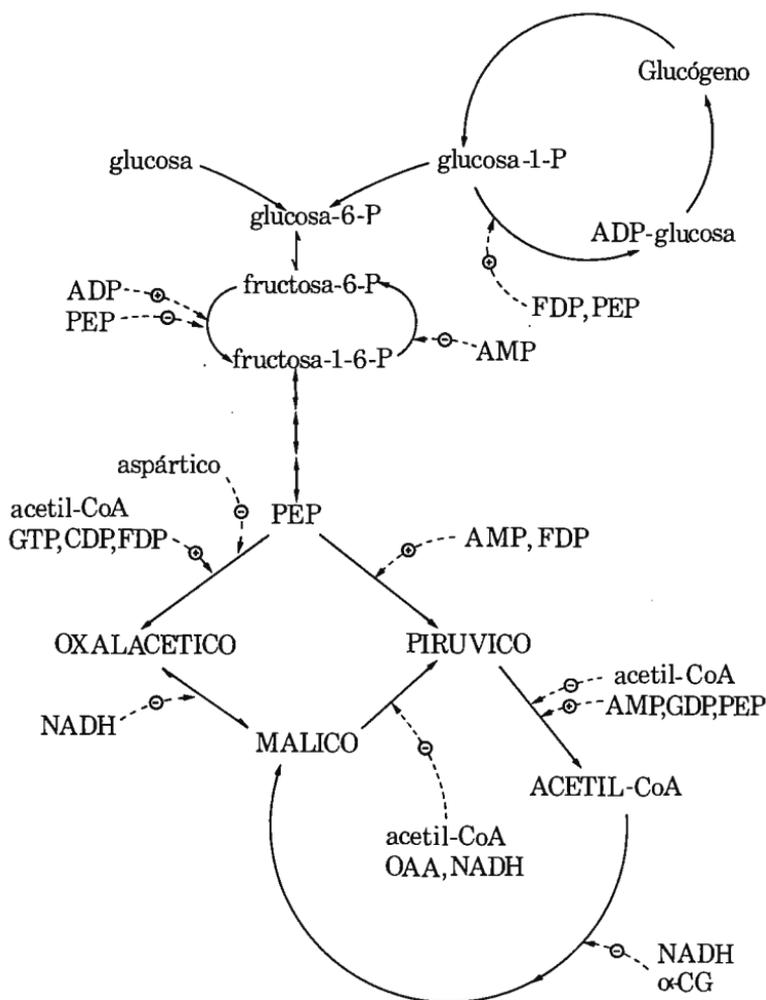


Figura 2

El producto final de cada una de estas secuencias biosintéticas actuará como retroinhibidor de la primera etapa enzimática correspondiente. Así, la fosfofructoquinasa, primera enzima de la secuencia 1), se inhibe por PEP en *E. coli* y preparaciones de mamíferos; la PEP-carboxilasa, primera enzima de la secuencia 2), se inhibe por una serie de ácidos dicarboxílicos, de los que el ácido aspártico posee la acción

más eficaz; la acetil-CoA ejerce un control negativo de la actividad de la pirúvico deshidrogenasa, primera enzima del complejo multienzimático que actúa sobre el pirúvico; el  $\alpha$ -cetoglutárico, producto final de la secuencia 4), inhibe la citrato sintetasa de *E. coli*.

Por otro lado, una serie de controles ligados al metabolismo energético producen efectos contrarios sobre las enzimas que de modo independiente catalizan la reversibilidad funcional de determinadas etapas (fig. 2); sirvan de ejemplo los controles que se ejercen sobre fosfofructoquinasa y fructosa difosfatasa. La primera de ellas en *E. coli* se activa y la segunda se inhibe por ADP o AMP; sin embargo, cuando la célula se encuentra energéticamente saturada, esto es, cuando la relación ATP/AMP es muy elevada, este sistema de control no es de gran significación por los bajos niveles de ADP y AMP. Al contrario, cuando el suministro de energía es bajo, estos efectores tienden a incrementar la velocidad de las reacciones conducentes a la formación de ATP. Así, al ya mencionado efecto del ADP sobre la fosfofructoquinasa en *E. coli* hay que añadir la activación por AMP de una de las dos pirúvico quinasa y la activación por AMP de la pirúvico deshidrogenasa.

La misma situación metabólica glucolisis-gluconeogénesis va a servir para ilustrar el control de enzimas diferentes que conducen a la formación de un compuesto único. En las bacterias entéricas, la formación de PEP puede tener lugar, en condiciones gluconeogénicas, por la acción de dos enzimas PEP carboxiquinasa y PEP sintetasa; la primera de ellas se induce cuando se utilizan como fuentes carbonadas compuestos de cuatro carbonos (succínico, málico), en tanto que la segunda lo es cuando se utilizan como fuente carbonada compuesto de tres carbonos (alanina, pirúvico, láctico) (fig. 3).

Dado que las células contienen pirúvico quinasa, el PEP formado durante la gluconeogénesis podría dar lugar a triosa-P, pero también podría revertir a pirúvico y ATP; este conjunto aparece controlado por la existencia de dos pirúvico quinasa, una de las cuales se activa por FDP, y la otra es constitutiva y se activa por AMP. Otros ejemplos de duplicación de enzimas sometidas a distinto tipo de control son las enzimas málicas, dependientes, respectivamente, de  $\text{NADP}^+$  y de  $\text{NAD}^+$ ; las dos isocítrico deshidrogenasas, dependientes de  $\text{NADP}^+$ ; las dos glutámico deshidrogenasas, dependientes de  $\text{NADP}^+$ , etc.

Dentro del control directo de la actividad enzimática hay que señalar las interrelaciones que se establecen entre sistemas de regulación

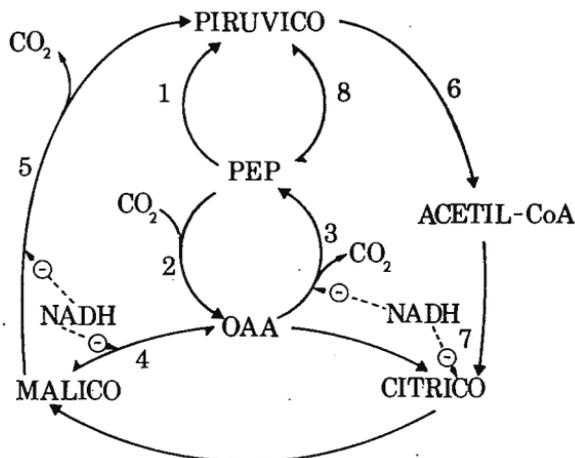


Figura 3.—1. Pirúvico quinasa.—2. PEP carboxilasa.—3. PEP carboxi-quinasa.—4. Málico deshidrogenasa.—5. Enzima málica.—6. Pirúvico deshidrogenasa.—7. Citrónico sintetasa.—8. PEP sintetasa.

pertenecientes al mismo proceso metabólico. En la figura 4 se observan los sistemas de control que se establecen en *E. coli* en el transcurso del proceso glicolítico.

En primer término, puede apreciarse cómo el PEP puede utilizarse por las células para llevar a cabo toda una serie de síntesis; además, puede transformarse en pirúvico y oxalacético por mediación respectiva de la pirúvico quinasa y PEP carboxilasa. En el orden regulador, PEP actúa como retroinhibidor de la fosfofructoquinasa, pero también controla en *E. coli*, y de forma alostérica las enzimas, en que, como sustrato, participa de las vías catabólica (pirúvico quinasa) y anaplerótica (PEP carboxilasa). A su vez, la propia síntesis de acetil-CoA es modulada a través de su influencia sobre la actividad del complejo de pirúvico deshidrogenasa; la acetil-CoA, de otro lado, activa fuertemente la PEP carboxilasa —y, en presencia de FDP, la activación resulta de naturaleza cooperativa—, que va a permitir el logro de gran cantidad de esenciales ingredientes celulares (aminoácidos, bases nitrogenadas). Todo ello, al lado de su participación en el proceso de biosíntesis de ácidos grasos, hace de los niveles de acetil-CoA un factor de especial significación en la regulación metabólica de la glicolisis y las rutas anapleróticas.

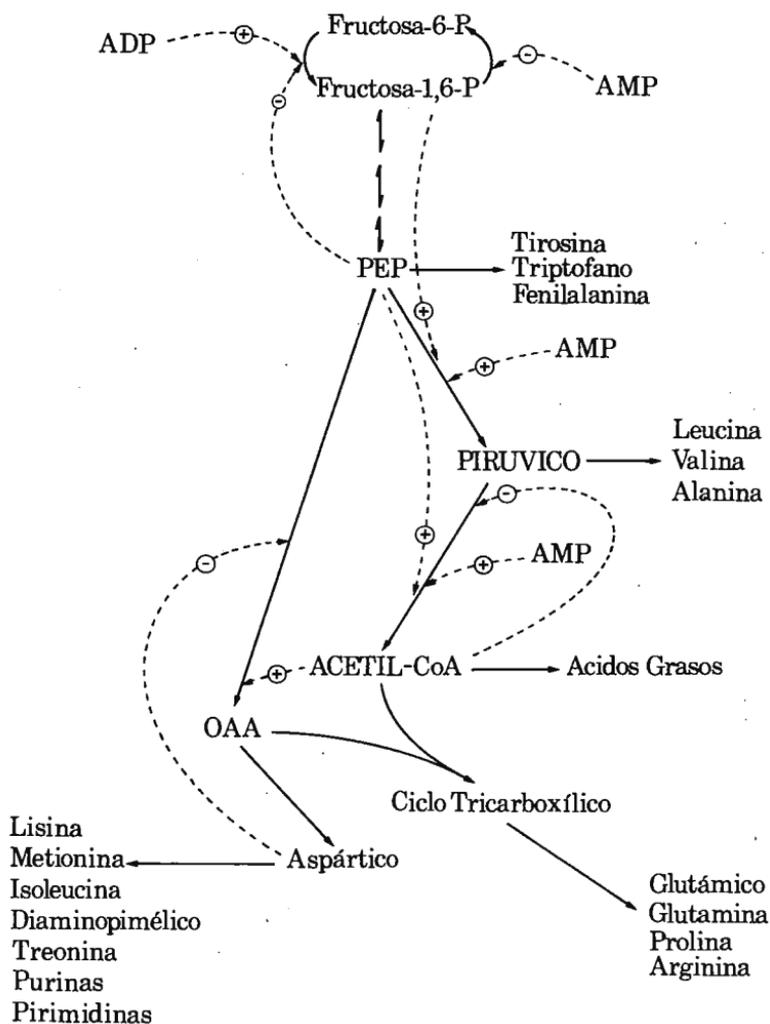


Figura 4

Se ha hecho ya mención de cómo la formación de precursores gluconeogénicos adopta situaciones metabólicas particulares de la entidad biológica; así, en *Pseudomonas* y *Arthrobacter* no se encuentra la PEP carboxilasa, y el oxalacético se produce, como en levaduras y animales, por la pirúvico carboxilasa dependiente de ATP.

En tercer lugar, en el conjunto de la regulación en cascada que ofrece el proceso glicolítico en *E. coli*, los ácidos dicarboxílicos de cuatro átomos de carbono ejercen sobre la PEP carboxilasa una fuerte retro-inhibición; dicha enzima adquiere notable importancia cuando las bacterias crecen en medios de glucosa, glicerina o pirúvico, en tanto que resulta inhibida en su actividad cuando se utilizan compuestos de cuatro carbonos. Como quiera que la enzima tiene una baja afinidad para el PEP, resulta relativamente fácil la inhibición casi completa de la actividad.

La *presencia de múltiples efectores* actuantes sobre una única etapa del metabolismo y su contribución a la complejidad de la regulación del metabolismo han sido ya puestos de manifiesto. Dentro de esta idea cabe destacar la especial susceptibilidad que a su control ofrece la acetil-CoA carboxilasa, cuya actuación constituye la etapa primera hacia la biosíntesis de los ácidos grasos; toda una serie de efectores, tales como citrato, isocitrato, ATP,  $Mg^{2+}$ , palmitoil-CoA, palmitoil-carnitina, palmítico, han sido descritos como modificadores de la actividad enzimática de la acetil-CoA carboxilasa.

Las etapas enzimáticas individuales pueden ser controladas, a su vez, por cambios en los niveles de enzima, sustratos y efectores. Por lo que hace referencia a los *niveles de efectores como instrumento de control* de la actividad enzimática, debe señalarse el interés que ofrecen los nucleótidos de piridina reducidos en la regulación de gran número de enzimas y procesos metabólicos, tales como el ciclo tricarboxílico, la gluconeogénesis, el proceso oxidativo de las pentosas y, sobre todo, en la regulación de procesos anfibólicos. En la figura 3 se muestra la capacidad reguladora que el NADH ejerce sobre las bacterias del grupo entérico en la formación y empleo de oxalacético; regulación que en este caso ha de ser más fina que en organismos eucarióticos, en donde la compartimentalización celular contribuye a solventar determinadas exigencias o requerimientos metabólicos. Así, cuando se produce oxalacético, puede serlo con finalidades diferentes; por ejemplo, para colaborar con la acetil-CoA en la puesta en marcha y mantenimiento del ciclo tricarboxílico, o también para contribuir a la formación del ácido aspártico y compuestos del mismo derivados; la reconversión del oxalacético en pirúvico vía málico sería un tanto innecesaria, dada la producción de pirúvico directamente a partir de PEP. En estas circunstancias de convergencia de reacciones en puntos centrales de ramificación, la presencia de NADH juega un papel primordial; el

NADH inhibe alostéricamente la actividad de la enzima 4 (málico deshidrogenasa) y de la enzima 5 (enzima málica). De esta forma, si el oxalacético se ha producido en respuesta a la activación de la PEP carboxilasa por acetyl-CoA (fig. 4) y ha de impedirse su conversión en málico, el sistema enzimático que realiza la transformación oxalacético  $\rightarrow$  málico debe estar inhibido; así, la enzima málica de *E. coli* exhibe una estructura adecuada para producir un comportamiento alostérico en presencia de oxalacético y concentraciones crecientes de NADH. Más adelante podrá comprobarse cómo ello equivale, en el aspecto cinético, a una velocidad sigmoidea, que se acentúa con el incremento de la concentración del sustrato, y a una disminución simultánea de  $V_{\max}$  de la reacción; en el aspecto fisiológico, supone que el oxalacético posee un umbral bajo el cual —a un determinado nivel de NADH— no puede convertirse en málico. El comportamiento subsiguiente de la enzima málica y su inhibición alostérica por NADH, NADPH, acetyl-CoA y, sobre todo, por oxalacético, añaden nuevos elementos de control a la transformación oxalacético  $\rightarrow$  pirúvico.

### 3. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ENZIMAS

La regulación enzimática como ingrediente central de la regulación del metabolismo en general ha quedado centrada en sus dos aspectos fundamentales: *control directo de la catálisis y regulación genética de la síntesis de enzimas*. Examinada como queda la problemática general del control de la actividad enzimática y la base física sobre la que se soporta, se contempla a continuación el panorama que ofrece la elaboración de los niveles de enzimas y las formas biológicas con arreglo a las que sobre ellos puede incidirse.

Entre las ideas que hasta este momento se han ido puntualizando figuran la participación del alosterismo en los mecanismos de regulación enzimática, considerada en su más amplia acepción, y la relación entre el control alostérico del comportamiento cinético de las enzimas y el control de la síntesis; relación esta que era tan sólo establecida como manifestación conjunta de la doble posibilidad de incidencia reguladora sobre la velocidad de las reacciones enzimáticas. Es ya momento, pues, de dejar constancia de que las interacciones a nivel molecular van a ejercer una función primordial sobre la elaboración de los niveles de enzimas, o, lo que es lo mismo, sobre el control genético de la síntesis de proteínas.

El control genético de los niveles de enzimas está basado en el establecimiento de los mecanismos precisos de síntesis de proteínas, logrado sobre todo utilizando sistemas bacterianos (3-6), y en las ideas de inducción y represión enzimáticas llevadas a cabo por metabolitos que, al incidir sobre la síntesis inmediata de mRNA específicos, modulan la presencia de los referidos niveles.

En el esquema que aparece en la figura 5 se compendia de forma simple el proceso regulable de la síntesis de proteínas y algunas de sus

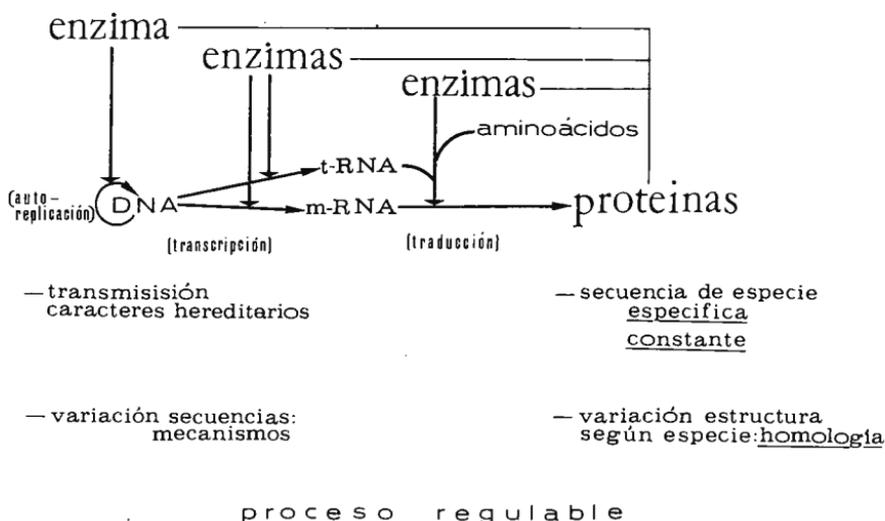


Figura 5

propiedades consustanciales. En primer término, la estructura química del DNA, al autorreproducirse, da lugar a la transmisión de los caracteres hereditarios; pero al transcribirse es causa de la constancia y la especificidad del ordenamiento de los aminoácidos en las proteínas de la misma especie biológica; transcripción y traducción son las dos etapas en las que se materializa el cambio de contenido informativo correspondiente a la transmisión DNA → proteínas. En segundo lugar, queda constancia en la figura 5 de que los cambios que, con arreglo a mecanismos diversos, pueden ocurrir en la estructura del DNA, pueden dar lugar a variaciones en la estructura de las proteínas, con un elevado grado de repercusión en el orden biológico. La naturaleza regulable

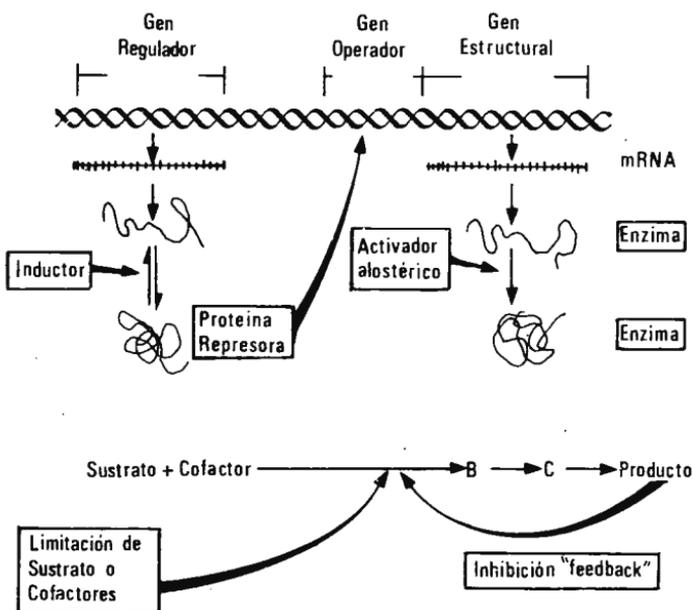


Figura 6

del proceso de la formación de proteínas se bosqueja en la figura 6; proceso regulable que ya podemos considerarlo encasillado dentro del conjunto de sistemas de regulación que actúan con mecanismos diferentes y a distintos niveles; proceso regulable también sobre el que las interacciones moleculares se van a manifestar bajo la forma de un control negativo o de un control positivo de la transcripción. El *control positivo de la transcripción* está fundado en las especiales características de la RNA-polimerasa, que son examinadas de forma más profunda en otro capítulo de esta obra. El *control negativo de la transcripción* está fundado en la existencia de las proteínas represoras, elaboradas por los genes reguladores, y en la funcionalidad de las histonas; ambos elementos centrales del control negativo de la transcripción, proteínas represoras y proteínas histonas, tienen fundamentada su actuación a través de interacciones con el DNA, que, asimismo, quedan recogidas en otros lugares de esta obra. Así, pues, el producto de los genes reguladores actúa como inhibidor de la actividad de los genes estructurales; en el caso de los sistemas inducibles, este producto es activo por sí mismo;

pero en el caso de los sistemas reprimibles se requiere un factor de bajo peso molecular. Dado el equilibrio



para los sistemas inducibles,  $R$  mismo es activo como represor y  $R'$  es inactivo; en tanto que, para los sistemas reprimibles,  $R'$  es el represor activo. En el primer caso, el producto resultante de la interacción represor-inductor no se une al DNA operador, mientras que en el segundo tan sólo el producto resultante de la interacción represor-correpresor se combina con el DNA operador.

Al conocimiento de los datos actuales sobre la regulación de los niveles de enzimas se ha llegado principalmente: *a*) mediante el estudio de las propiedades de los mutantes del gen regulador (*i*); *b*) mediante el estudio de las propiedades de los mutantes del gen operador (*o*); *c*) mediante el aislamiento y estudio de las propiedades de las proteínas represoras; *d*) mediante el estudio de la unión de las proteínas represoras al gen operador; *e*) estudio de formas alteradas de las proteínas represoras por mutaciones.

Diversas proteínas represoras han sido aisladas y estudiadas, y entre ellas se encuentran las del operón «lac» (7), del fago  $\lambda$  (8), del colifago 434 (9), de la biosíntesis de arginina por *E. coli* K-12 (10), siendo la mejor conocida de todas ellas la proteína represora del operón «lac».

La proteína represora del operón «lac» posee un peso molecular de unos 150.000 y se disocia por tratamiento con dodecilsulfato sódico, o incluso por simple conservación en subunidades de peso molecular aproximado de 40.000, lo que sugiere una estructura tetramérica (11); estas subunidades conservan la propiedad de unirse al inductor «gratuito» no metabolizable, isopropil- $\beta$ -D-galactosido, pero no la de unirse al DNA operador. Las cadenas polipeptídicas constituyentes de las subunidades poseen metionina-aminoterminal y lisina-carboxiloterminal y son de naturaleza ácida con un punto isoeléctrico 5.6. En una preparación cruda de esta proteína represora se ha obtenido un valor de 4.7 para la relación del número de localizaciones de unión al inductor (IPTG) al número de localizaciones de unión al operador; valor que significa, en líneas generales, que la forma tetramérica representa la forma de unión de la proteína represora al operador. Los resultados acerca de la interacción de la proteína represora con el ligando IPTG son contradictorios, obteniéndose, según las preparaciones,

respuestas cooperativas o debidas a localizaciones de unión no interaccionantes.

Las proteínas represoras de los fagos  $\lambda$  y 434 se han aislado como sencillas cadenas polipeptídicas, de pesos moleculares respectivos 28.000 y 26.000, las cuales unen a sus respectivos operadores bajo la forma de tetrámeros en rápido equilibrio con los monómeros (12).

El tetrámero represor del operón «lac» corresponde, aproximadamente, al diámetro 70-100 Å de una proteína globular, que se acoplaría a un fragmento de DNA correspondiente a dos-tres vueltas de hélice, o lo que es lo mismo, a 20-30 pares de bases; longitud que suministraría una estabilidad suficiente a la interacción represor-operador no covalente. Otra cuestión a este respecto la constituye el grado de helicidad del DNA operador requerido para la unión de la proteína represora; esta unión podría realizarse por reconocimiento externo de la doble hélice o por participación aislada de ambas cadenas en la unión. Los datos obtenidos permiten sugerir la idea de que el represor actúa por simple unión a la parte externa del DNA operador, leyendo la secuencia de bases especialmente a lo largo del surco grande.

A la vista de esta presentación de la regulación de la síntesis de enzimas, y, por tanto, de sus niveles, queda puesto de manifiesto cómo a ella subyacen los mismos mecanismos físicos básicos propios de la modulación de la actividad enzimática.

Sin embargo, ha de tenerse también presente que los niveles actuales de enzimas pueden ser el resultado de dos mecanismos generales: a) alteración en la velocidad de síntesis enzimática, y b) estabilización o labilización de la enzima en presencia de una continuada síntesis; mecanismos especialmente válidos para células animales, en que la degradación de proteínas es un proceso continuo que puede alterarse de modo independiente a la velocidad de su síntesis (13).

Variaciones en los niveles de enzimas presentes en los tejidos animales pueden provocarse mediante diversos tipos de alteraciones fisiológicas, nutritivas y hormonales, así como por la administración de variados agentes farmacológicos. No es un cometido fácil, sin embargo, averiguar los niveles precisos de enzimas determinadas en los tejidos, ya que lógicamente es insuficiente el dato experimental de la actividad enzimática observada. El conocimiento directo de los niveles enzimáticos a través del aislamiento y purificación de la enzima particular, además de ser un procedimiento extraordinariamente laborioso, puede muy bien conducir a resultados experimentales poco comparables. Son las

técnicas inmunológicas las que en la actualidad sirven de manera preferente a la averiguación de la cantidad de una proteína específica; exige este procedimiento la obtención de los anticuerpos correspondientes a la proteína objeto de medida, previamente obtenida en estado de pureza, lo que, una vez logrado, hace que el método sea fácil, reproducible y capaz de llevar a cabo gran número de determinaciones simultáneas. Puede argüirse como principal demérito del método la posibilidad de variaciones estructurales, que, sin afectar al comportamiento inmunológico, son capaces de incidir sobre la actividad enzimática. Se han determinado por este procedimiento, y a modo de ejemplo, acetil-CoA carboxilasa (14), glucosa-6-P-deshidrogenasa (15), catalasa (16), etc.

Definida la modificación de los niveles, resta la averiguación de la causa responsable de la misma, alteración de la síntesis o de la degradación, para lo que se hace uso de variados procedimientos isotópicos (17).

Han sido descritas toda una serie de enzimas afectadas en sus niveles por la acción de los efectos antes mencionados. Así, alteraciones en la dieta afectan los niveles de acetil-CoA carboxilasa en hígado (18), arginasa (19), serina-deshidratasa (20), isoenzima 5 de láctico deshidrogenasa (21), etc. Diversas hormonas son capaces de inducir variaciones en ciertas enzimas; así, glucocorticoides (22) e insulina y glucagón (23) elevan los niveles de tirosina-transaminasa, hecho ciertamente de interés dada la naturaleza fisiológicamente antagonista de ambas hormonas pancreáticas; se ha sugerido que las tres hormonas puedan actuar a través de diferentes mecanismos, tales como la inducción de cambios a través de isoenzimas (24). Los glucocorticoides elevan, asimismo, los niveles de glutámico-alanina transaminasa de hígado debido a una elevación de la velocidad de síntesis (25); la triptofano oxigenasa aumenta su concentración en el hígado por acción de la hidrocortisona (26).

Probada la modificación de los niveles de enzimas bajo las influencias nutritivas, hormonales o farmacológicas, resulta necesario comentar las posibilidades de su actuación a nivel de los mecanismos de síntesis o degradación de proteínas.

En este aspecto, quizás sea necesario hacer notar en un principio la incierta existencia, al menos, de operones en las células animales, aunque se haya demostrado la similar respuesta de varias enzimas a la acción de circunstancias nutritivas u hormonales; así, por ejemplo, la insulina afecta de forma análoga a las enzimas gluconeogénicas del

hígado de rata (27), pero asimismo se ha demostrado (28) la no localización en el mismo cromosoma de diversas enzimas glicolíticas.

La regulación enzimática en las células animales parece más bien estar vinculada al metabolismo de los ácidos ribonucleicos. Ciertas hormonas esteroídicas afectan los niveles de rRNA y tRNA (29-31) y diversos tipos de compuestos son capaces de interactuar con ciertas proteínas, como la unión de estradiol (32), aldosterona (33) y dietilstilbestrol (34) a proteínas de distintos órganos (histonas, cromatina, etcétera.). Ello conexas este tipo de regulación con la función de las histonas y otras proteínas nucleares, que, al modificarse estructuralmente (fosforilación, acetilación, etc.) mediante reacciones enzimáticas mediadas por el AMPc, pueden permitir una modulación de la síntesis de enzimas (35).

Otras posibilidades de regulación se han establecido a nivel de la estabilización selectiva y control de la traducción del mRNA (36), variaciones en las propiedades receptoras de los ribosomas hacia los tRNA (37).

Frente a estas posibilidades de regulación en orden a los mecanismos de síntesis, existen las que actúan a nivel de los procesos degradativos, que pueden abarcar desde las actividades degradativas inespecíficas hasta la necesidad de proteínas específicas. Una variación en la concentración de sustratos, cofactores, etc., inducida por alteraciones nutritivas u hormonales, puede ejercer un efecto más o menos específico sobre la estabilidad de las enzimas (38). Asimismo se ha descrito la existencia de proteínas modificadoras de la actividad de ciertas enzimas, como glutamina-sintetasa (39), ornitina-transcarbamilasa (40), glucosa-6-P-deshidrogenasa (41).

## II. Alosterismo y transiciones alostéricas

### 1. CONCEPTOS GENERALES

Antes de entrar en la consideración del control de la actividad enzimática como uno de los grandes sistemas de regulación, vamos a establecer y definir un cierto número de principios. Se designa como *poder catalítico* de una enzima su capacidad para incrementar la velocidad de una reacción química; la relación de velocidades de la reacción en presencia y en ausencia de la enzima es el *factor catalítico*. *Residuos*

*catalíticos*, *residuos de especificidad* y *centro activo* hacen referencia a unos restos de aminoácidos o a una zona de la enzima implicados en la reacción enzimática; *residuos catalíticos*,  $x_1$  y  $x_2$ , son los restos de aminoácidos directamente implicados en los cambios covalentes que tienen lugar durante la reacción enzimática; *residuos de especificidad* son los restos de aminoácidos implicados tanto en la unión del sustrato como en los procesos subsiguientes de la reacción no implicados directamente en los cambios covalentes; *centro activo* se utiliza para designar la región próxima a los restos catalíticos y que participa en la unión y reacción de los sustratos (fig. 7).

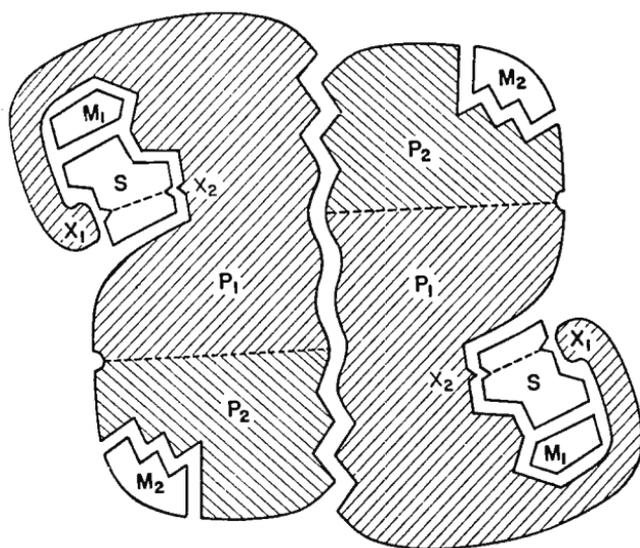


Figura 7

El término *enzima alostérica* (42) se utiliza para designar una enzima capaz de exhibir las siguientes características: 1) contener una localización diferente de la del centro activo cuya participación es esencial a los mecanismos de regulación; 2) exhibir una cinética de naturaleza sigmoidea; 3) participar al comienzo de un proceso metabólico o en las etapas de ramificación del mismo. *Efecto alostérico* es el efecto de un modificador *M*, unido a una localización diferente de la del centro activo

y que influencia la actividad o capacidad de unión de éste por medios indirectos. *Localización alostérica* se utiliza frecuentemente como sinónimo de *localización reguladora*, significando la localización que une los modificadores o efectores, regulando la actividad enzimática; en un sentido estricto, la idea de «alosterismo» es más amplia que la que exige la existencia de localizaciones reguladoras; así, la hemoglobina, sin poseer localizaciones reguladoras, entra de lleno en el concepto de proteínas alostéricas, caracterizadas por la posesión de propiedades cooperativas.

El término *ligando* se usa para designar en general pequeñas moléculas que se unen a la enzima mediante enlaces no covalentes, y actúan como sustratos, activadores o inhibidores. *Modificador* o *efector* se utiliza indistintamente para designar cualquier ligando capaz de afectar la actividad catalítica de la enzima sin alterarse durante la reacción. Un efector positivo incrementa la actividad o capacidad de unión de un segundo ligando, en tanto que un efector negativo la disminuye.

El concepto de *cambio conformacional* supone un cambio en la posición media de los núcleos atómicos sin afectar los enlaces covalentes.

## 2. ALOSTERISMO Y CONTROL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El *control directo de la actividad enzimática* puede tener lugar a través del mecanismo catalítico mismo o por su acoplamiento con otros procesos.

La actividad enzimática depende así, pues, y en primer lugar, de la concentración de sustrato y de coenzimas. La cinética sencilla de Michaelis-Menten establece que, al aumentar la concentración de sustrato, se incrementa la velocidad de reacción hasta alcanzar un valor máximo. Distintos tipos de coenzimas son necesarias a la actividad catalítica de diversas enzimas, de forma que la concentración de aquéllas en la célula puede ejercer una función reguladora. Por otro lado, la unión de la enzima al sustrato viene representada por una gráfica hiperbólica; pero, cuando la estructura cuaternaria de la enzima está constituida por múltiples subunidades, la gráfica se hace sigmoidea debido al efecto de la interacción de las subunidades sobre la unión del sustrato; en la figura 8 puede fácilmente verse cómo, en este segundo caso, pequeñas variaciones en la concentración de sustrato pueden originar una mayor variación en la velocidad de reacción, con lo que

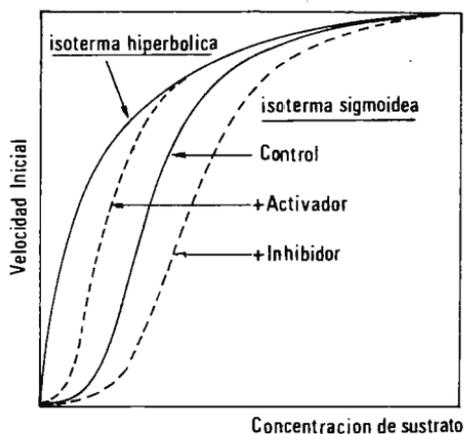


Figura 8

se destaca la influencia que la concentración de sustrato puede ejercer en la regulación enzimática.

Los mecanismos reguladores en los que el control de la actividad enzimática se ejerce por acoplamiento con otros procesos, se centran en dos tipos de procesos: el primero implica la *unión del ligando regulador* a una localización enzimática diferente de la del centro activo, con la producción de interacciones cooperativas entre las subunidades adyacentes; el segundo tiene lugar por *modificación covalente de la enzima* mediante la actuación de una nueva enzima o grupo de enzimas que intervienen de modo sucesivo «en cascada». Ambas formas de control están ligadas a la existencia en las enzimas de cambios conformacionales.

La regulación mediante la unión de ligandos a las proteínas enzimáticas tiene, a su vez, dos versiones fundamentales. En primer término, la *retroinhibición* (inhibición «feedback»), en la que el ligando regulador es el producto final de un proceso metabólico que puede impedir su propia formación al inhibir la actividad de una de las primeras enzimas del proceso. En segundo lugar, la *activación por precursores*, en la que el ligando regulador es el primer sustrato de un proceso y activa una enzima posterior de la secuencia de reacciones.

La *modificación química* representa un mecanismo regulador de gran significación biológica e indica que se unen o separan de la proteína

ciertos grupos específicos mediante la formación o rotura de enlaces covalentes.

A estos dos tipos de mecanismos reguladores deben añadirse otros varios. En primer término, las *reacciones de asociación-disociación* de proteínas, con un significado central en los mecanismos «in vivo» de control. Estas reacciones de asociación-disociación pueden, a su vez, referirse a la exclusiva *polimerización de enzimas* (sistemas autoasociantes) o a los *complejos multienzimáticos*, constituidos por proteínas con diferente especificidad enzimática; ambos mecanismos de regulación se fundamentan en las interacciones proteína-proteína, bajo cuya idea químico-física deben asimismo reunirse las interacciones subunidad-subunidad en las enzimas alostéricas.

El control hormonal y el control ligado al estado energético de la célula son, finalmente, otros mecanismos mediante los que se puede regular la actividad enzimática.

Desde un punto de vista integrador, puede hoy afirmarse que la mayoría de las enzimas intracelulares están constituidas por un número definido de subunidades que interaccionan para formar estructuras oligoméricas del tipo de las denominadas «configuraciones cerradas». Sin embargo, en ciertos casos se van a presentar «configuraciones abiertas», es decir, agregados de subunidades que forman oligómeros filamentosos; son los casos, dignos de destacar, de la acetil-CoA carboxilasa y de la glutaminasa.

### 3. NIVELES ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas poseen tres niveles de organización estructural —primaria, secundaria y terciaria—, aunque entre las dos últimas categorías sea difícil establecer en algunos casos una demarcación muy definida. En cualquier caso, ello supone una división de gran valor conceptual en orden al estudio de las relaciones estructura-función-estabilidad de estas macromoléculas.

La *estructura primaria* de las proteínas implica el establecimiento de un orden o secuencia, con arreglo a la cual se unen entre sí los aminoácidos para originar la cadena polipeptídica. A su vez, esta ordenación ha de aportar datos acerca de los aminoácidos más próximos en su organización espacial; esta localización relativa de los aminoácidos da lugar al nivel de organización que se conoce como *estructura secundaria*, y que se expresa en términos de distancias interatómicas, ángulos de enlace,

rotación restringida y enlaces no covalentes. Esta estructura se puede apreciar de modo claro en muchas proteínas fibrosas bajo la forma de hélices  $\alpha$ , en proteínas en estado cristalino, en cadenas polipeptídicas en disolventes orgánicos, etc. El plegamiento de las cadenas polipeptídicas en moléculas compactas globulares origina un nivel superior de organización: la denominada *estructura terciaria*; esta estructura trata, pues, de las relaciones espaciales de la molécula considerada en su conjunto. Las fuerzas responsables de la estabilidad de las estructuras secundaria y terciaria no experimentan restricción alguna en cuanto a su naturaleza y contribuyen con frecuencia a reforzarse mutuamente; en cuanto a la naturaleza de los enlaces, pueden éstos ser covalentes y no covalentes. Entre los enlaces covalentes, el puente disulfuro encierra una especial significación, ya que contribuye con gran frecuencia al entrecruzamiento de regiones distantes de la estructura polipeptídica; son ejemplos de ello las estructuras de la tripsina, ribonucleasa, lisozima, etcétera, y alcanzan, quizás, su máxima expresión en las estructuras de las inmunoglobulinas, en donde están presentes numerosos puentes disulfuro, que, además de unir localizaciones diferentes de la misma cadena polipeptídica, lo hacen también entre posiciones determinadas de distintas cadenas. Otros tipos de enlaces covalentes, tales como éster, fosfodiéster, peptídicos, etc., tienen escasa significación en la estructura terciaria de proteínas.

El comportamiento hidrodinámico de las proteínas en solución se comporta con arreglo a tres tipos de modelos. El primero de ellos puede representarse por las proteínas globulares antes mencionadas, con forma de elipsoides de revolución con pequeñas relaciones axiales; las disoluciones de estas macromoléculas son ligeramente más viscosas que el disolvente puro. Un segundo tipo de biopolímeros se comporta a manera de rodillos, que otorgan al disolvente un notable incremento en su viscosidad y experimentan durante su movimiento una gran resistencia friccional. El tercer tipo de modelos hace referencia al denominado «random coil», experimentado preferentemente con modelos sintéticos, sin las fuerzas de atracción, que otorgan a las proteínas globulares su naturaleza compacta, y sin la rigidez de los modelos anteriores, que se presenta bajo la forma de cadenas flexibles estadísticamente espiraladas.

A continuación figuran datos de viscosidad y tamaño molecular de ejemplos de biopolímeros que se comportan con arreglo a los tres mencionados tipos de modelos.

Proteínas globulares			Cadenas estadísticamente espiraladas			Biopolímeros en forma de rodillos		
	P. M.	cc/g		P. M.	cc/g		P. M.	cc/g
Ribonucleasa . . . . .	13.700	3.3	Poliestireno..	70.000	37	Fibrinógeno . . . . .	330.000	27
Lisozima . . . . .	14.400	3.0	Ovoalbúmina en urea.	44.000	34	Miosina . . . . .	620.000	230
Aldolasa . . . . .	142.000	3.8	RNA . . . . .	$1.5 \times 10^6$	100	DNA . . . . .	$5 \times 10^6$	5000
Alcohol deshidrogenasa . . . . .	83.000	4.0	DNA desnaturalizado (calor) . . . . .	$5 \times 10^6$	150	Virus del mosaico del tabaco . . . . .	$4 \times 10^7$	29

Por otro lado, las fuerzas de atracción no covalentes que representan una mayor contribución cuantitativa a la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria son los enlaces de hidrógeno y las interacciones apolares o hidrofóbicas, débiles desde una contemplación individual, pero que actúan de forma cooperativa en el mantenimiento estructural.

Los enlaces de hidrógeno pueden establecerse ya sea entre oxígeno carbonílico e hidrógeno amídico de diferentes agrupamientos peptídicos, ya sea entre grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos; no cabe duda de que son los primeros los que pueden presentarse en mayor número y con gran regularidad. Observaciones de Pauling, Corey y Branson (43) sugieren que todos dichos oxígenos e hidrógenos participan de enlaces de hidrógeno; sin embargo, las conclusiones referentes a la función de los puentes de hidrógeno en proteínas presentes en medios acuosos deben tomarse con cautela, a menos que sea tenido en cuenta el efecto del agua en la estimación de la fuerza intrínseca del enlace. Así, Pauling (cf. nota 43) estimó en 8 kcal/mol la energía del enlace  $N-H \cdots O = C$ ; sin embargo, Kauzmann (44) significa que la energía requerida para la rotura de un enlace de hidrógeno interpeptídico es muy inferior a dicho valor, porque el proceso en medio acuoso implica una reacción de intercambio en la que los enlaces de hidrógeno agua-agua tienen que ser asimismo rotos. Schellman (45), mediante un estudio de las propiedades termodinámicas de las soluciones de urea, establece el calor requerido para romper un enlace de hidrógeno en 1.5 kcal/mol.

Determinaciones haciendo uso de métodos más refinados han permitido obtener directamente el calor de formación de enlaces de hidrógeno peptídicos. Klotz y Franzen (46) estudian la agregación de

sistemas modelo y el desplazamiento en el espectro de absorción infrarroja debido a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares en función de la concentración y de la naturaleza de los disolventes; el valor de la variación de entalpía ( $\Delta H$ ) para la formación de un enlace de hidrógeno entre moléculas de N-metil-acetamida en medio acuoso es prácticamente cero.

Tampoco, a pesar de estos bajos valores para la fuerza intrínseca de los enlaces de hidrógeno interpeptídicos, sería correcto pensar en la ausencia de una cierta significación de estos enlaces en el mantenimiento de las estructuras de orden superior; ha de tenerse presente asimismo que el interior de las moléculas proteicas posee una elevada concentración de restos apolares que contribuyen a crear un medio que dista mucho, a su vez, del modelo en que se realizan las medidas en medio acuoso. La presencia de los grupos que comparten el hidrógeno en regiones de baja constante dieléctrica y relativamente libres de agua incrementaría la energía de los enlaces de hidrógeno interpeptídicos, a cuyo efecto total se uniría la alta concentración de enlaces peptídicos en el interior de la molécula.

Por lo que se refiere a los enlaces hidrofóbicos, hay que señalar que alrededor del 40 por 100 de los aminoácidos presentes en las proteínas poseen restos apolares, por lo que es de esperar una importante contribución de estas interacciones en el comportamiento de las cadenas polipeptídicas y en la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria. Las interacciones hidrofóbicas resultan de las fuerzas atractivas que exhiben los restos no polares al evitar su contacto con la fase acuosa, y adherirse así unas a otras bajo la forma de micelas intramoleculares.

La naturaleza precisa del enlace hidrofóbico ha sido objeto de múltiples formulaciones, entre las que merecen mencionarse las detalladas investigaciones teóricas de Némethy y Scheraga (47), quienes estudian la interacción entre dos cadenas laterales mediante tratamientos termodinámico-estadísticos de agua líquida pura y soluciones acuosas de hidrocarburos. En la estimación del cambio de energía libre que acompaña a la formación de un enlace hidrofóbico, determinaron dichos autores los cambios en la estructura del agua, las fuerzas intermoleculares entre los grupos y las restricciones en la rotación alrededor de los enlaces sencillos como consecuencia de la interacción, demostrando que la fuerza de estos enlaces proviene del cambio en la estructura del agua. Estas y otras consideraciones termodinámicas (48-49) han llevado

a la conclusión de la estabilidad térmica de los enlaces hidrofóbicos. Puesto que la transferencia de hidrocarburos desde el medio acuoso a un medio no polar (formación del enlace hidrofóbico) es un proceso endotérmico —variación de entalpía positiva—, tales procesos se favorecen por un incremento de la temperatura. Ello significa que, si las proteínas ven estabilizada su conformación por enlaces hidrofóbicos, la elevación de temperatura ha de conducir a un incremento en la estabilidad hasta una temperatura de unos 60° C, en que la variación de entalpía es cero. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de las proteínas se desnaturalizan a temperaturas superiores a los 50° C, indica que estos enlaces hidrofóbicos no pueden por sí mismos ser responsables de la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria. Si la estabilidad de la cadena polipeptídica en su conjunto fuera debida al comportamiento cooperativo de enlaces de hidrógeno interpeptídicos y enlaces hidrofóbicos, la temperatura de máxima estabilidad decrecería hacia temperaturas inferiores, y la macromolécula se desnaturalizaría rápidamente al elevarse la temperatura por encima de dichos puntos.

Muchas proteínas y enzimas son capaces de manifestarse bajo la forma de *equilibrios reversibles de asociación-disociación* a base de diferentes estados de agregación; ésta es la causa de grandes discordancias en muchos estados experimentales de pesos moleculares determinados bajo condiciones diferentes de agregación influenciadas por la temperatura, pH, concentración, presencia de factores diversos, etc. En presencia de agentes desnaturalizantes, dichas proteínas y enzimas se disocian hasta subunidades que puede poseer tamaños moleculares inferiores a los de los monómeros, subunidades privadas de actividad biológica que representan cadenas polipeptídicas individuales. Algunos autores han considerado dentro de la idea conceptual de subunidades las cadenas polipeptídicas que se unen entre sí mediante enlaces covalentes del tipo -S-S- en, por ejemplo, insulina e inmunoglobulinas; sin embargo, la consideración de subunidad en el seno de una estructura cuaternaria hace referencia tan sólo a las cadenas polipeptídicas asociadas mediante fuerzas no covalentes, y que darán lugar —conforme se verá más adelante— a monómeros activos o directamente a proteínas oligómeras. Esta asociación de subunidades para producir proteínas biológicamente activas se presenta de modo fundamental en proteínas globulares; pero no de forma exclusiva, ya que existen proteínas fibrosas, como la miosina, constituidas asimismo por subunidades.

La contribución de la microscopía electrónica al estudio de las

proteínas se hace asimismo patente en este caso (50), e incluso se ha llegado a la demostración de la estructura e interconversión de formas discretas de enzimas, como en el caso de los monómeros, dímeros y tetrameros de la glucosa-6-P deshidrogenasa de eritrocitos (51).

#### 4. CAMBIOS CONFORMACIONALES

La conformación de las macromoléculas en solución viene determinada de modo fundamental por las interacciones no covalentes que actúan entre fragmentos de la macromolécula, y de ésta con las moléculas de disolvente que la rodean. En su estado nativo, las estructuras polipeptídicas adoptan una forma definida y más o menos rígida; esta conformación se define en virtud de los ángulos de torsión de rotación interna alrededor de los enlaces sencillos de la molécula, de los que existen dos, y por residuo de aminoácido, ya que el tercer ángulo, correspondiente al enlace C-N, se supone fijo debido al carácter parcial de doble enlace que posee la unión peptídica. La conformación de las cadenas laterales de los aminoácidos se describen por los ángulos de torsión (fig. 9).

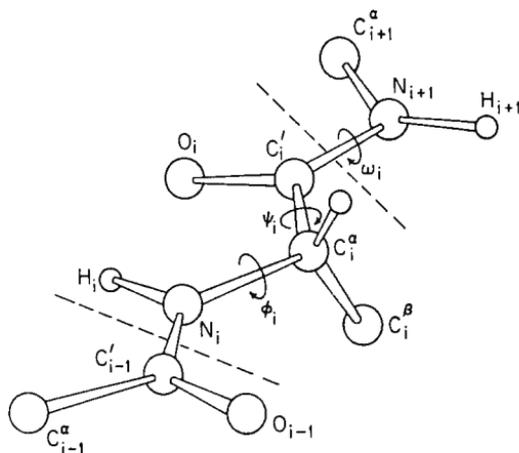


Figura 9

Cuando las moléculas de proteínas interactúan entre sí o con moléculas de ligandos, pueden ocurrir cambios en la conformación trascendentes a la actividad enzimática.

El cálculo de las conformaciones estables de estructuras polipeptídicas se basa en la hipótesis fundamental de que la secuencia es suficiente para determinar la única conformación más estable de la macromolécula (52-53). A la estabilidad conformacional de las proteínas contribuyen toda una serie de factores que pueden resumirse en la siguiente tabla (54).

#### I. Efectos intrínsecos de la macromolécula:

1. Rotación interna alrededor de los enlaces sencillos.
2. Distorsión de la geometría de los enlaces covalentes.
  - a) Modificación de los ángulos de enlace.
  - b) Torsión alrededor del enlace peptídico.
3. Interacciones de Van der Waals.
  - a) Repulsiones a corta distancia (efectos estéricos o de exclusión).
  - b) Fuerzas de London.

#### II. Efectos dependientes de interacciones con el solvente:

1. Enlaces de hidrógeno.
2. Interacciones hidrofóbicas en solución acuosa.
3. Dipolos intra e inter-moleculares.
4. Cargas electrostáticas.
5. Interacción preferencial con componentes del solvente.
6. Unión específica de moléculas de ligando.

Cambios en el estado conformacional de las proteínas constituyen la base de las denominadas *transiciones alostéricas*, íntimamente ligadas a la regulación de la actividad enzimática. Nos encontramos, pues, y de lleno, en la consideración de las proteínas alostéricas y de su significación física y biológica. Los cambios conformacionales que ocurren en las proteínas o enzimas alostéricas constituyen la base física del control simple de la actividad enzimática por *retroinhibición* (inhibición «feedback»), así como los ya mencionados mecanismos de control más complejo de la *represión de la síntesis* de enzimas de bacterias, y aun del control hormonal y del más especulativo sobre el sistema nervioso (55). Cambios conformacionales que van a participar, asimismo, de otros tipos de control ya mencionados, como la conversión molecular por cambios covalentes en la enzima.

A la vista de los planteamientos previos, podemos ya profundizar en el estudio de las enzimas alostéricas, para lo que han de conocerse en primer término sus características y propiedades generales, para describir después los mecanismos alostéricos de control enzimático con una idea teórica previa de la unión de ligandos a macromoléculas. La descripción de los modelos alostéricos ha de ir por fuerza íntimamente ligada a los tratamientos cinéticos y de unión de ligandos y de las formas de representación de los datos. La proyección biológica del fenómeno ha de requerir la exposición de ejemplos escogidos en los que aparezcan tipos diferentes de interacción y que, a la vez, subrayen la extensión y variedad del control del metabolismo a través de la modificación de la actividad enzimática.

En las enzimas que pudiéramos denominar «clásicas», cuando la velocidad de la reacción se lleva frente a la concentración de un efector («efector» puede considerarse cualquier sustancia que pueda afectar la velocidad de la reacción enzimática e incluye sustratos, activadores e inhibidores), se obtienen las habituales curvas hiperbólicas; en su misma virtud, cuando la representación se realiza de  $1/v$  frente a  $1/x$ , siendo  $x$  la concentración del sustrato, se obtiene una gráfica lineal. En las enzimas alostéricas, la representación de  $v$  frente a  $x$  es de naturaleza sigmoidea (fig. 8), de forma que, a pequeñas concentraciones de sustrato, la magnitud absoluta de las tangentes se incrementa hasta alcanzar un punto de inflexión; las representaciones recíprocas no son lineales.

La unión de un ligando  $Y$  por una macromolécula poseedora de múltiples localizaciones se representa convenientemente por una curva, en la que  $\bar{Y}$ , fracción de saturación de la macromolécula con  $Y$ , se lleva frente a  $\mu_y$ , potencial químico de  $Y$  (o, si se prefiere,  $\ln y$ , donde  $y$  es la actividad de  $Y$ ). Semejante gráfica se denomina curva de unión, cuyo ejemplo más sencillo es la vulgar curva de titulación, en donde el ácido o la base añadidos se representa en función del pH. Si todas las localizaciones en la macromolécula son iguales, la curva de unión será análoga a la curva de titulación de un ácido monobásico. Si la curva es más empinada que la de titulación sencilla (control), existirá una *interacción positiva* (cooperativa) entre las localizaciones, y si, por el contrario, la curva es más plana, la *interacción es negativa* (anticooperativa). Las curvas de titulación ácido-base de todas las proteínas muestran fenómenos anticooperativos, que han sido analizados en términos de interacciones electrostáticas.

Actualmente, la casi totalidad, o la totalidad misma, de las macro-

moléculas que exhiben *efectos alostéricos* son oligómeros constituidos por subunidades, cada una de las cuales contiene, al menos, una localización para cada ligando principal, y la interacción de estas subunidades —profundamente afectada por los cambios conformacionales— influencia la estructura cuaternaria de las proteínas y, en consecuencia, la maquinaria reguladora de las proteínas enzimáticas. Así, pues, el conocimiento de la interacción entre las subunidades es esencial a la comprensión de las bases del control alostérico.

En cada subunidad —protómero— puede existir más de un tipo de localizaciones: una localización para el sustrato y otra localización independiente para un ligando no-sustrato, conocida como localización alostérica (fig. 7), que une un inhibidor o un activador, cuya acción sobre la localización del sustrato será, pues, por completo indirecta. Por lo que se refiere a las clases de *efectos alostéricos*, debe mencionarse que mientras los *efectos heterotrópicos* —a base de interacciones entre ligandos diferentes— pueden ser positivos (cooperativos) o negativos (antagónicos), los *efectos homotrópicos* son generalmente cooperativos —a base de interacciones entre ligandos iguales—. Los efectos homotrópicos cooperativos se observan casi de modo invariable en los sistemas alostéricos con uno o varios ligandos del sistema, en tanto que es rara la presencia única de efectos heterotrópicos. Los cambios capaces de alterar las interacciones heterotrópicas modifican de modo simultáneo las interacciones homotrópicas.

A propósito de la terminología utilizada en las proteínas poliméricas se pueden concretar, siguiendo a Monod, las definiciones siguientes. Con el nombre de *oligómero* se conoce la proteína polimérica constituida por un corto número de componentes idénticos o *protómeros*; cuando estos protómeros se encuentran completamente disociados, se conocen como *monómeros*, designación asimismo utilizada para las unidades oligoméricas constituidas por subunidades diferentes. Bajo la denominación de subunidad se conoce a cualquier entidad submolecular de una proteína, idéntica o no a las demás componentes.

En cualquier tipo de sistema enzimático, el efecto de los activadores o de los inhibidores se mide en función de las variaciones producidas en las dos constantes cinéticas clásicas ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) por los cambios en la concentración de aquéllos; el efecto activador o inhibidor puede observarse, pues, en función de la concentración de los efectores ( $F$ ) o incluso del mismo sustrato ( $S$ ). Según el comportamiento de  $F$  y  $S$ , se distinguen dos tipos de sistemas alostéricos: *Sistemas «K»*, en los que,

siendo  $F$  y  $S$  ligandos alostéricos, poseen ambos afinidades diferentes hacia los distintos estados conformacionales de la enzima (la presencia de  $F$  modificará la afinidad de la proteína hacia  $S$ , y a la inversa). Sistemas « $V$ », en los que  $S$  tiene la misma afinidad hacia los distintos estados conformacionales de la enzima (no existe efecto de  $F$  sobre la unión de  $S$ , ni a la inversa);  $F$  podrá ejercer un efecto sobre la reacción solamente si los estados de la proteína difieren en su actividad catalítica. Los sistemas « $W$ » pueden ser positivos ( $F$  se comporta como activador al poseer máxima afinidad hacia el estado activo) o negativos ( $F$  se comporta como inhibidor al poseer máxima afinidad por el estado menos activo). Estas propiedades generales de los sistemas alostéricos, definidas por Monod, no vindican —sin embargo— la actuación de modelos mecanísticos particulares.

Una de las propiedades más singulares de los sistemas alostéricos consiste en la capacidad de *pérdida de sus propiedades reguladoras* sin disminución, o incluso con aumento, de la actividad catalítica. Esta desensibilización de la enzima se ha logrado por acción del calor, rayos X, etcétera, y fue primeramente observada en la treonina-desaminasa (56) y en la aspártico transcarbamilasa (57). El efecto de los mercuriales y de la urea es muy similar al producido por simple calefacción (58), fenómeno ligado a la *disociación* de los protómeros, la consiguiente alteración estructural de la proteína oligomérica, la pérdida de las interacciones y su manifestación en la disminución o pérdida de la capacidad reguladora de la enzima.

Establecida de modo inequívoco la conexión de la estructura cuaternaria de las proteínas oligoméricas con la regulación de la actividad enzimática a través de la interacción entre las subunidades, conviene subrayar que la unión entre estas subunidades se caracteriza por una gran especificidad y estabilidad a base de múltiples uniones de naturaleza no covalente. A este respecto, el conjunto de agrupamientos o residuos de dos protómeros a través de los que se establece la unión y, por tanto, surge la interacción, se conoce como *dominio de unión*. El dominio o la asociación se denomina *isóloga* cuando se establece entre conjuntos de agrupamientos o residuos iguales (no basta que sea entre protómeros iguales); y se conoce como *heteróloga* cuando está constituida por series de agrupamientos o residuos diferentes (aunque sea entre protómeros iguales).

Esta visión cualitativa de las transiciones alostéricas puede formularse analíticamente en términos de los potenciales de unión alostérica.

El cambio conformacional ( $A \rightarrow B$ ) de una proteína,  $P$ , por la unión de un ligando,  $S$ , corresponde a una distorsión de la energía potencial. Si la energía potencial de la macromolécula se representa como una superficie de energía sobre un espacio de todos los parámetros conformacionales (ángulos de torsión de rotación interna,  $\varphi$ ,  $\psi$  y  $\omega$  en la fig. 9), la conformación más estable debe corresponder al punto inferior de energía; sin embargo, la conformación más estable puede no corresponder al de mínima energía potencial, y así una gran función de partición vibracional puede estabilizar una conformación por encima de la que posee la mínima energía potencial, de forma que deba ser mínima la energía libre en su conjunto (59). Ello se ejemplifica en la figura 10, en la que se compara una conformación de mínima energía

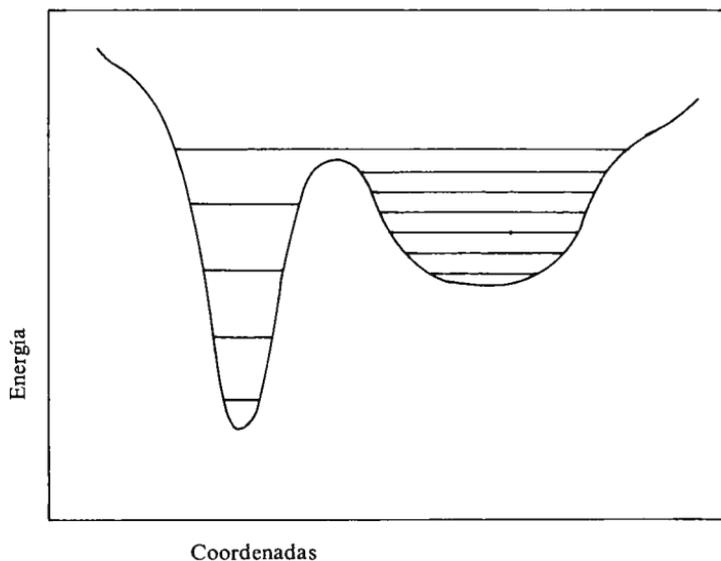


Figura 10

potencial, pero escasa libertad interna, con una conformación de energía potencial más elevada y alta libertad interna; la segunda conformación resulta más estable que la primera, por la gran función de partición vibracional.

Así, pues, la unión de un ligando lleva consigo la formación de una conformación de máxima estabilidad a partir de una previa conforma-

ción metaestable. Si  $G_A(P)$  y  $G_A(S)$  representan las energías libres de la proteína y el ligando en sus estados iniciales (sin interacción), y  $G_B(PS)$  la del complejo formado, el cambio neto de energía libre en el proceso de unión será:

$$\begin{aligned}\Delta G^o &= G_{final}^o - G_{inicial}^o = G_B(PS) - G_A(P) - G_A(S) = \\ &= \Delta G_{conf,(P)} + \Delta G_{conf,(S)} + \Delta G_{B,int,(PS)},\end{aligned}$$

donde  $\Delta G_{conf,(P)}$  y  $\Delta G_{conf,(S)}$  son, respectivamente, los cambios de energía libres para las transiciones conformacionales de la proteína y el ligando, indicando con ello que ambos,  $P$  y  $S$ , pueden experimentar con la unión un cambio conformacional;  $\Delta G_{B,int,(PS)}$  es la variación de energía libre de la unión proteína-ligando una vez que ambos han experimentado la transición conformacional.

El complejo  $PS$  será estable si  $\Delta G^o < 0$ . Si la conformación inicial antes de la unión fuera favorecida, tendrían que cumplirse las condiciones  $\Delta G_{conf,(P)} > 0$  y  $\Delta G_{conf,(S)} > 0$ , lo cual requiere que  $\Delta G_{B,int,(PS)}$  sea lo suficientemente negativo para que se satisfaga la condición general.

El equilibrio entre las dos conformaciones de la proteína viene determinado, respectivamente, por la magnitud  $\Delta G_{conf,(P)}$  o por  $\Delta G^o$  en ausencia o presencia de ligando. Si estos cambios de energía libre son suficientemente grandes, la proteína existirá prácticamente bajo una sola conformación, contribuyendo a los cambios las diferentes interacciones no covalentes mencionadas (60).

### III. Unión de ligandos. Métodos de representación

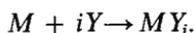
#### 1. TEORÍA DE LA UNIÓN DE LIGANDOS

La concentración de ligando,  $Y$ , unido a la macromolécula,  $M$ , poseedora de  $q$  localizaciones de unión será:

$$Y = M_0 \sum_{i=0}^q iK_i y^i,$$

siendo  $M_0$  la concentración de la macromolécula sin combinar e  $y$ ,

como se ha mencionado antes, la actividad del ligando;  $K_i$  es la constante de equilibrio aparente macroscópica de la reacción



La concentración total de la macromolécula es:

$$M = M_0 \sum_{i=0}^q K_i y^i;$$

y, por tanto, la cantidad de ligando unido por mol de macromolécula viene dado por la expresión

$$\bar{Y} = \sum_i i K_i y^i / \sum_i K_i y^i;$$

y suponiendo que las constantes de equilibrio,  $K_i$ , son independientes de  $y$ , la expresión de  $\bar{Y}$  adquiere la forma

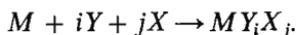
$$\bar{Y} = d \ln \Sigma K_i y^i / d \ln y$$

(la saturación de la macromolécula con el ligando, dividida por el número de localizaciones — $\bar{Y}/q$ — se conoce como saturación fraccionaria o parcial y se representa por  $\bar{v}$ ).

Cuando se trata de dos ligandos,  $Y$  y  $X$ , que se unen a la macromolécula a través de  $q$  y  $r$  localizaciones, respectivamente, la concentración total de macromoléculas en todas las formas es:

$$M = M_0 \sum_{i=0}^q \sum_{j=0}^r K_{ij} y^i x^j,$$

donde  $K_{ij}$  es la constante de equilibrio aparente de la reacción



En este caso, la cantidad de ligando unido por mol de macromolécula, suponiendo que la constante de equilibrio es independiente de la extensión total de la reacción, es

$$\bar{Y} = \frac{\partial \ln \Sigma \Sigma}{\partial \ln y}, \quad \bar{X} = \frac{\partial \ln \Sigma \Sigma}{\partial \ln x}$$

Puesto que  $d \ln \Sigma \Sigma$  es una diferencial perfecta, se tiene la ecuación fundamental:

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x} \right)_y = \left( \frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y} \right)_x$$

Expresión en la que se enfrentan cuatro variables  $\bar{Y}$ ,  $\bar{X}$ ,  $\ln y$ ,  $\ln x$ , de las cuales solamente dos son independientes, sin que desde un punto de vista matemático tenga que ver las que son elegidas como tales. En todo caso, el número de primeras derivadas parciales diferentes es 24, o solamente 12 si no se tiene en cuenta la distinción entre cualquier derivada y su recíproco, por ejemplo, entre

$$\left(\frac{\partial \ln x}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{Y}} \quad y \quad \left(\frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x}\right)_{\bar{Y}}$$

Además, solamente cuatro de dichas derivadas parciales son independientes; de modo que, si se toman  $\ln y$ ,  $\ln x$  como variables independientes, se tienen las ecuaciones lineales

$$d\bar{Y} = \left(\frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln y}\right)_x d \ln y + \left(\frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x}\right)_y d \ln x$$

$$d\bar{X} = \left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y}\right)_x d \ln y + \left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln x}\right)_y d \ln x,$$

con los cuatro infinitesimales  $d\bar{Y}$ ,  $d\bar{X}$ ,  $d \ln y$ ,  $d \ln x$ , e implicando cuatro coeficientes diferenciales parciales. Estas ecuaciones anteriores podrían igualmente haberse escrito en términos de  $\bar{Y}$  y  $\bar{X}$  como variables independientes.

Las dos ecuaciones anteriores, juntamente con la ecuación fundamental, constituyen la base para el establecimiento de numerosas relaciones entre las doce derivadas parciales que dan cuerpo a la teoría de la unión de ligandos; entre dichas relaciones se citan de particular interés:

$$\left(\frac{\partial \bar{Y}}{\partial \bar{X}}\right)_y = - \left(\frac{\partial \ln x}{\partial \ln y}\right)_{\bar{X}}$$

$$\left(\frac{\partial \ln y}{\partial \bar{X}}\right)_{\bar{Y}} = \left(\frac{\partial \ln x}{\partial \bar{Y}}\right)_{\bar{X}}$$

la segunda de las cuales coincide con la ecuación fundamental de unión de ligandos en la que se intercambian  $\ln y$  con  $\bar{Y}$  y  $\ln x$  con  $\bar{X}$ .

En el caso de que estén presentes tres ligandos  $Y$ ,  $X$ ,  $Z$ , se tienen las variables  $\bar{Y}$ ,  $\bar{X}$ ,  $\bar{Z}$ ,  $\ln y$ ,  $\ln x$ ,  $\ln z$ , de las que tres son variables inde-

pendientes. Siguiendo el mismo razonamiento anterior, se obtienen nueve coeficientes diferenciales parciales independientes:

$$d\bar{Y} = \left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln y} \right)_{xz} d \ln y + \left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x} \right)_{yz} d \ln x + \left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln z} \right)_{yx} d \ln z$$

$$d\bar{X} = \left( \frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y} \right)_{xz} d \ln y + \dots$$

$$d\bar{Z} = \dots$$

Siguiendo el mismo razonamiento que en el caso de dos ligandos, en el caso de tres ligandos se tienen las tres ecuaciones fundamentales de unión:

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x} \right)_{yz} = \left( \frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y} \right)_{xz}$$

$$\left( \frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln z} \right)_{yx} = \left( \frac{\partial \bar{Z}}{\partial \ln x} \right)_{yz}$$

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln z} \right)_{yx} = \left( \frac{\partial \bar{Z}}{\partial \ln y} \right)_{xz}$$

Haciendo uso de estas relaciones, el número de los coeficientes puede reducirse a seis, y de igual manera a los casos más sencillos pueden obtenerse una serie de relaciones entre las derivadas parciales; entre dichas relaciones se cuentan:

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x} \right)_{\bar{x}z} = \left( \frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y} \right)_{\bar{y}z}$$

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \bar{X}} \right)_{yz} = - \left( \frac{\partial \ln x}{\partial \ln y} \right)_{\bar{x}z}$$

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x} \right)_{y\bar{z}} = \left( \frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y} \right)_{x\bar{z}}$$

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln x} \right)_{\bar{y}\bar{z}} = \left( \frac{\partial \bar{X}}{\partial \ln y} \right)_{\bar{x}\bar{z}}$$

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \bar{X}} \right)_{y\bar{z}} = - \left( \frac{\partial \ln x}{\partial \ln y} \right)_{\bar{x}\bar{z}}$$

Una aproximación más general al problema de la unión de ligandos se obtiene del concepto de potencial químico; en un sistema en equilibrio a temperatura y presión constantes para cualquier sistema de dos componentes se tiene:

$$\left(\frac{\partial \mu_1}{\partial n_2}\right)_{n_1, n_3, \dots} = \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial n_1}\right)_{n_2, n_3, \dots};$$

donde  $\mu$  es el potencial químico, y  $n$  la cantidad total del componente correspondiente.

Si se altera la cantidad de ligando en el sistema, se alteran los potenciales químicos y, por consiguiente, las variaciones en la energía libre «standard» y la constante de equilibrio. En una reacción del tipo.



en donde  $M$  son las macromoléculas que se combinan con el ligando  $Y$ , la alteración de energía libre toma la forma

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial n_y}\right)_{n_1, n_2, n_3} = c \left(\frac{\partial \mu_3}{\partial n_y}\right)_{n_1, n_2, n_3} - a \left(\frac{\partial \mu_1}{\partial n_y}\right)_{n_1, n_2, n_3} - b \left(\frac{\partial \mu_2}{\partial n_y}\right)_{n_1, n_2, n_3}$$

a partir del cual, y teniendo en cuenta la relación anterior de los potenciales químicos,  $\mu_1$  y  $\mu_2$ , así como relaciones diversas, se puede obtener la conclusión completamente general

$$-\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial \mu_y}\right)_{n_1, n_2, n_3} = \Delta \bar{Y}$$

donde  $\Delta \bar{Y}$  representa el cambio en la cantidad de ligando unido que acompaña a la reacción bajo las condiciones definidas por  $n_y, n_1, n_2, n_3$ .

Teniendo en cuenta que  $\Delta G = -RT \ln K$  ( $K$ , constante de equilibrio de la reacción) y que  $\mu_y = RT \ln y$ , se tiene:

$$\Delta \bar{Y} = \frac{\partial \ln K}{\partial \ln y}.$$

Si se tiene presente la participación del segundo ligando,  $X$ , y puesto que a presión y temperatura constantes  $\Delta G$  viene únicamente determinado por  $y$  y por  $x$ , se obtiene

$$\left(\frac{\partial \Delta \bar{Y}}{\partial \ln x}\right)_y = \left(\frac{\partial \Delta \bar{X}}{\partial \ln y}\right)_x$$

Como la variación de energía libre de la reacción entre la macromolécula y el ligando en su estado «standard» viene dada por la diferencia entre el potencial químico del ligando en equilibrio con la macromolécula y el potencial químico en el estado «standard», se tiene:

$$\Delta G_Y = -RT \ln K_Y = \mu_y - \mu_0 = RT \ln y,$$

y teniendo presente que el potencial químico de la macromolécula se mantiene constante durante la reacción.

Por otro lado, si volvemos a la expresión de  $\bar{Y}$  que nos da la cantidad de ligando unido por mol de macromolécula, su variación lleva consigo la de  $\ln y$ . Esta variación será un reflejo de los valores de las constantes de equilibrio de los distintos grupos y de la forma de su interacción. Así, un valor de

$$\left( \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln y} \right) > \bar{Y}, \quad \text{o lo que es igual} \quad \frac{\partial \bar{Y}}{\partial \ln y} > 1$$

indica la existencia de interacciones positivas.

La derivación de dicha expresión de  $\bar{Y}$  con respecto a  $\ln y$ , rinde:

$$\frac{d\bar{Y}}{d \ln y} = \frac{\sum i^2 K_i y^i}{\sum K_i y^i} - \left( \frac{\sum i K_i y^i}{\sum K_i y^i} \right)^2 = \bar{Y}^2 - (\bar{Y})^2,$$

que indica que, en el caso sencillo de ausencia de interacciones y existiendo tan sólo una especie de macromoléculas, la tangente de la curva de  $\bar{Y}$  frente a  $\ln y$  viene dada por la diferencia entre el cuadrado medio de la cantidad de ligando  $Y$  unido por mol de macromolécula y el cuadrado de dicho valor medio; expresión que no puede aplicarse en presencia de interacciones.

El equilibrio entre la macromolécula y el ligando se expresa convenientemente mediante una representación de  $\bar{r}$  frente a  $\ln y$ ; esta curva de equilibrio de ligando aparece en la figura 11. Si la macromolécula contiene solamente una localización o un cierto número de localizaciones idénticas e independientes, la curva será una simple curva de titulación y en el punto medio  $y = y_{1/2}$  (donde  $\bar{r} = 1/2$ ) será igual a  $1/K_y$ , siendo  $K_y$  la constante de equilibrio de la reacción del ligando con una localización. Así,  $RT \ln y_{1/2}$  es la energía libre por localización de la saturación de la macromolécula con el ligando.

Si existen varias localizaciones, iguales o diferentes, que interaccionan, la curva de equilibrio no será una simple curva de titulación.

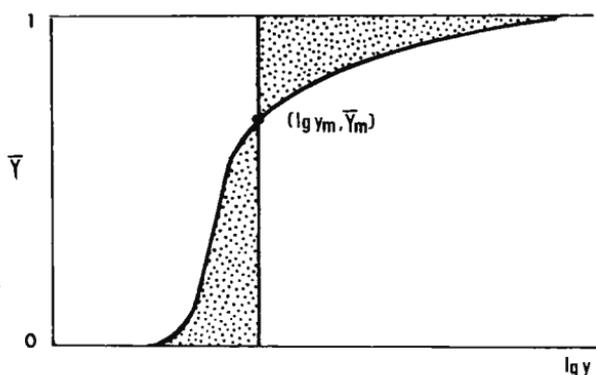


Figura 11

En general, la tangente a cualquier punto será diferente, y la curva puede definir la actividad de ligando media,  $y_m$ , como el valor de la actividad del ligando a la cual las dos áreas definidas por la curva (zonas sombreadas en la figura) son iguales; en estas condiciones, la energía libre por localización de la saturación de la macromolécula con el ligando es:  $\Delta G = RT \ln y_m$ . El valor de  $y_m$  representa el de  $y$  para el que se cumple

$$\int_{y=0}^y \bar{y} d \ln y = \int_y^{y=\infty} (1 - \bar{y}) d \ln y.$$

Si la curva de unión de ligando fuera simétrica  $y_m = y_{1/2}$  ( $\bar{y}_{1/2}$  es el valor de  $\bar{y}$  para el que  $\bar{Y}/q = \bar{y} = 1/2$ ).

Las curvas de unión de enzimas y proteínas respiratorias con sustratos y ligandos gaseosos exhiben comúnmente interacciones cooperativas que son el resultado de efectos conformacionales o alostéricos.

Cuando la macromolécula une dos o más ligandos diferentes, existe en general una influencia de un ligando sobre la unión de los demás; en este caso, los ligandos se encuentran conexionados de forma *heterotrópica*, pudiendo manifestarse la unión de forma positiva —cooperativa— o negativa —anticooperativa—. Esta conexión se puede referir tanto a los ligandos como a las localizaciones a las que se unen; en este segundo caso puede hablarse de interacciones *homotrópicas*, signifi-

cando con ello interacciones entre localizaciones que unen el mismo ligando.

Estas conexiones o interacciones, ya sean homotrópicas o heterotrópicas, pueden resultar de efectos puramente «locales». Un ejemplo de conexión heterotrópica «local» lo suministra el efecto Bohr de oxidación en hemoglobina y mioglobina, que resulta de la ionización de una molécula de agua directamente asociada al grupo hemo. Las interacciones negativas —anticooperativas— que exhiben las curvas de titulación de las proteínas son un ejemplo de conexiones homotrópicas de tipo «local». Sin embargo, las interacciones homotrópicas cooperativas, así como muchas de las interacciones heterotrópicas reguladoras que muestran las enzimas y proteínas respiratorias no pueden interpretarse como efectos «locales» y son de carácter diferente.

La racionalización de estos efectos «no locales», que son de importancia fundamental en el funcionamiento de los organismos, es que resultan de cambios conformacionales inducidos por ligandos con la participación de toda la macromolécula; hecho que se encuentra soportado por una gran variedad de experimentos con hemoglobina y proteínas diversas. Ello supone que la macromolécula es capaz de existir en una o más conformaciones diferentes caracterizadas por afinidades distintas para uno o más ligandos diferentes. Cuando se añade un ligando determinado, manteniendo constante la actividad de los demás ligandos, se incrementa la fracción de las moléculas en las conformaciones que posean la mayor afinidad por el ligando, con lo que se hace más fácil la introducción ulterior del mismo y se explica la *cooperatividad homotrópica*. En las *interacciones heterotrópicas*, las conformaciones que poseen la afinidad superior para un ligando pueden o no ser las que exhiben la afinidad más elevada para otro ligando; así resulta que las interacciones heterotrópicas alostéricas pueden ser positivas o negativas. En virtud de estas propiedades, las enzimas alostéricas —que median interacciones directas entre distintas localizaciones— están provistas de una potencialidad extraordinariamente versátil para la regulación de su actividad catalítica.

## 2. REPRESENTACIÓN DE HILL

La magnitud de la interacción cooperativa implicada en la unión de ligandos iguales puede evaluarse haciendo uso de la representación de Hill, en la que las curvas de equilibrio de ligandos expresan en tér-

menos de  $\ln [\bar{v}/(1 - \bar{v})]$  frente a  $\ln y$ , introduciendo el parámetro  $n$  definido por

$$n \equiv \frac{d \ln \left( \frac{\bar{v}}{1 - \bar{v}} \right)}{d \ln y} = \frac{1}{\bar{v}(1 - \bar{v})} \frac{d\bar{v}}{d \ln y}$$

Cuando todas las localizaciones son idénticas e independientes, la representación de Hill es una línea recta con  $n = 1$  (61). Teniendo presente la definición del parámetro  $n$ , así como la variación de energía libre implicada en la introducción de una molécula de ligando en el sistema, se deduce:

$$\frac{d\Delta G_Y}{d\bar{v}} = RT \frac{d \ln y}{d\bar{v}} = \frac{RT}{n\bar{v}(1 - \bar{v})} \equiv \Delta G'_Y.$$

Cuando  $n = 1$ , es decir, cuando todas las localizaciones son iguales e independientes y, por tanto, no existen interacciones, se tiene  $\Delta G'_Y = \Delta G'_Y^*$ ; en cuyo caso, la diferencia  $\Delta G'_Y^* - \Delta G'_Y \equiv \Delta G_{I(Y)}$  da la energía de estabilización por localización para el sistema en su conjunto (cuando  $n > 1$ , esto es, cuando la interacción es estabilizante, se da a  $\Delta G_{I(Y)}$  signo positivo). Entonces,

$$\Delta G_{I(Y)} = \frac{RT}{\bar{v}(1 - \bar{v})} \left( 1 - \frac{1}{n} \right)$$

expresión que establece valores límites para la energía de interacción por localización ( $G_I$ ). Así, cuando  $\bar{v}$  tiende a 0 ó a 1, la integral da

$$\int_0^1 \Delta G_I d\bar{v}$$

el valor mínimo de la energía de interacción total por localización cuando la macromolécula se encuentra completamente saturada; de esta forma se tiene:

$$RT \int_{\bar{v}=0}^1 \left( 1 - \frac{1}{n} \right) \frac{d\bar{v}}{\bar{v}(1 - \bar{v})} = RT \int_{y=0}^{\infty} (n - 1) d \ln y,$$

lo que significa que se hace infinito (a no ser que  $n = 1$ ).

La representación de Hill (representación de  $\ln[\bar{v}/(1 - \bar{v})]$  frente a  $\ln y$ ) suministra de modo gráfico la energía de interacción para pasar del grado de saturación significado por el punto 1 al correspondiente

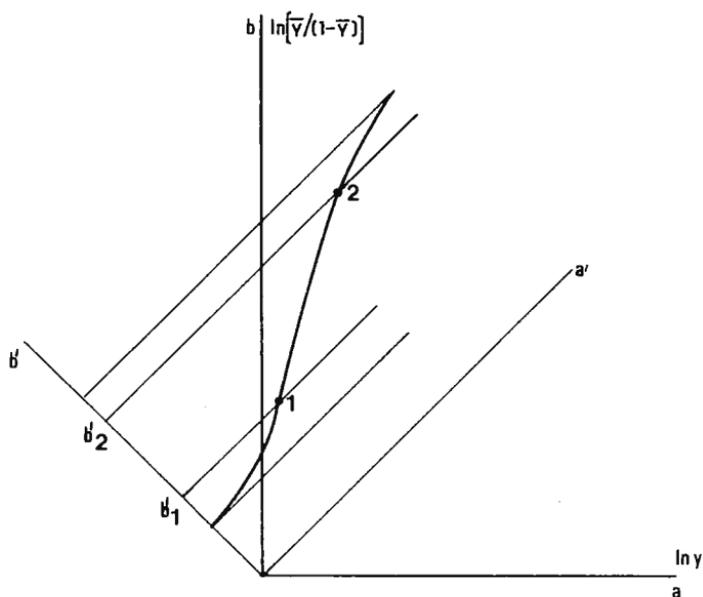


Figura 12

al punto 2 (fig. 12). Si el sistema de coordenadas mencionado se hace girar sobre el origen  $45^\circ$ , la energía de interacción correspondiente a dicho paso es simplemente el producto de  $RT\sqrt{2}$  por la diferencia entre las nuevas coordenadas de dichos puntos, según el eje  $b'$ . Su demostración es la siguiente:

$$\text{sen } 45^\circ = \text{cos } 45^\circ = 1/\sqrt{2}$$

$$a' = (1/\sqrt{2})(a + b), \quad b' = (1/\sqrt{2})(-a + b)$$

$$da' = (1/\sqrt{2}) \left( 1 + \frac{db}{da} \right) da = (1/\sqrt{2})(1 + n)da$$

$$db' = (1/\sqrt{2})(-1 + n)da$$

$$b_2 - b_1 = \int_1^2 \frac{db'}{da'} da' = \int_1^2 \frac{(-1 + n)}{(1 + n)} \frac{(1 + n)}{\sqrt{2}} da'$$

Teniendo presente la integral que da el valor mínimo de la energía de interacción

$$\int_1^2 dG_I d\bar{r} = RT\sqrt{2} (b'_2 - b'_1),$$

de donde se sigue que, si la representación de Hill tiene asíntotas de pendiente unidad, la energía de interacción total es finita e igual a la diferencia entre las coordenadas de las dos asíntotas, según el eje  $b'$ , multiplicada por  $RT\sqrt{2}$ .

De especial aplicación ha sido este tipo de representación a los estudios sobre hemoglobina. Así, en la figura 13 se observa una representa-

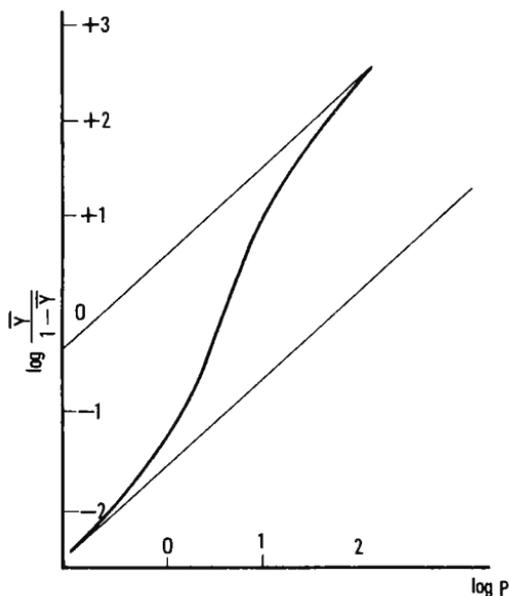


Figura 13

ción de Hill para la hemoglobina de cordero en equilibrio con oxígeno a pH 9,1, según datos de Roughton, Otis y Lyster (62). La energía de interacción por localización para pasar del grado de saturación  $\bar{r}_1$  a  $\bar{r}_2$ , viene dada por  $RT\sqrt{2}$  veces la proyección de  $\bar{r}_1 - \bar{r}_2$  sobre un eje que forma un ángulo de  $135^\circ$  con el eje de abscisas. La distancia entre las asíntotas representa el valor mínimo de la energía total de interacción

por localización, llevada a cabo en condiciones de saturación de la macromolécula con el ligando.

Si son dos los ligandos,  $X$  e  $Y$ , que se encuentran en equilibrio simultáneo con la macromolécula, una de las formas de expresar su conexión es, según ha quedado establecido:

$$\left(\frac{\partial \ln y}{\partial \ln x}\right)_{\bar{Y}} = -\frac{r}{q} \left(\frac{\partial \bar{X}}{\partial \bar{Y}}\right)_x$$

siendo  $r$  el número de localizaciones a las que se une  $X$ , y  $q$  el número de localizaciones a las que se une  $Y$  por macromolécula. Si en la ecuación anterior se introduce la idea de actividad de ligando media,  $y_m$ , resulta

$$\frac{d \ln y_m}{d \ln x} = -\frac{r}{q} \Delta \bar{X},$$

en donde  $r\Delta\bar{X}/q$  es la diferencia entre la cantidad total de ligando unida por la macromolécula cuando se encuentra saturada y cuando se encuentra completamente libre del ligando  $Y$ , dividido en cada caso por el número de localizaciones  $Y$  para un valor dado de  $x$ .

Un ejemplo clásico de interacción entre dos ligandos se ve en la figura 14, representación del ya mencionado efecto Bohr al llevar el

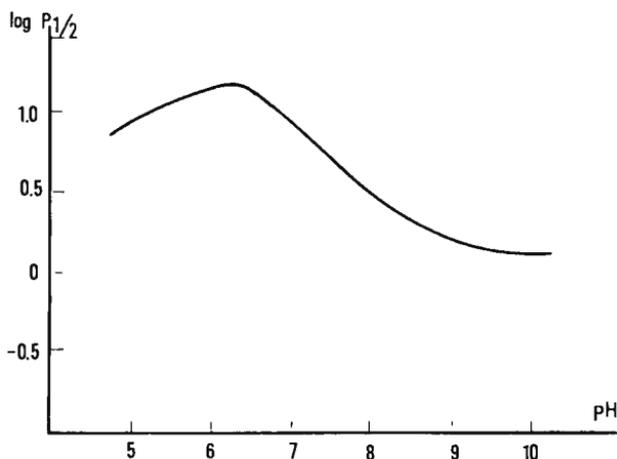


Figura 14

logaritmo de la actividad del oxígeno (esencialmente igual a  $y_{1/2}$ ) frente a la actividad del protón expresada en términos de pH.

El cambio de energía libre por localización en la saturación de la macromolécula con el ligando  $Y$  que resulta de la interacción con el ligando  $X$  entre  $x_1$  y  $x_2$  es  $RT(\ln y_{m_2} - \ln y_{m_1})$ .

La curva de  $\log p_{1/2}$  frente al pH para la hemoglobina humana ofrece un máximo a pH alrededor de 6, lo que significa que las localizaciones de unión de protones —al menos dos— tienen que interactuar con las cuatro localizaciones de unión del oxígeno.

Wyman y colaboradores (63-64), han llevado a cabo extensos estudios sobre titulación ácido-base de hemoglobina a diferentes temperaturas y fuerzas iónicas y atribuyen a grupos imidazol el efecto Bohr, en tanto que el análisis de los mismos resultados por Tanford y Nozaki (65) indica una participación en dicho efecto de grupos  $\alpha$ -amino.

### 3. REPRESENTACIÓN DE SCATCHARD

Scatchard realizó en 1949 (66) un interesante estudio sobre la unión de iones y pequeñas moléculas a proteínas. El razonamiento de Scatchard está basado en que, si los diversos agrupamientos de una molécula proteica actúan independientemente, se puede aplicar la ley de acción de masas como si cada grupo se tratara de una molécula aislada. El comportamiento independiente de los grupos significa que el cambio de energía libre de la reacción de la proteína con  $v$  pequeñas moléculas se compone de los términos de entropía estadística y de un término proporcional a  $v$ .

Si la probabilidad inicial de la reacción es la misma en cada uno de los  $n$  puntos, el cambio de energía libre  $(\Delta G)_v$  para la reacción

$$P_0 + vA = PA_v$$

viene dado por la expresión

$$\frac{(\Delta G)_v}{RT} = \ln C_v/C_0 C_A^v + \ln v!(n-v)!/n! - v \ln k + \omega v^2$$

( $C_0$ ,  $C_v$  y  $C_A$  son las concentraciones de  $P_0$ ,  $PA_v$  y  $A$ ;  $k$  es la constante intrínseca para la reacción en un simple grupo).

$$\text{La asociación media } \bar{v} = \frac{\sum_{v=0}^n C_v v}{\sum_{v=0}^n C_v}$$

tiene la forma

$$\bar{v} = \frac{\sum_{v=0}^n \frac{n!}{v!(n-v)!} (kC_A)^v e^{-\omega v^2}}{\sum_{v=0}^n \frac{n!}{v!(n-v)!} (kC_A)^v e^{-\omega v^2}}$$

El cálculo de  $\bar{v}$  por esta ecuación puede extenderse al caso de más de una constante por adición de los respectivos valores de  $\bar{v}$  y teniendo en cuenta la posibilidad de que el término  $\omega v^2$  sea más complejo. Este método se ha utilizado en la titulación de grupos diversos en la ovoalbúmina (66\*); si el número de grupos es grande, el método, lógicamente, se complica.

La relación de todas las especies con  $v$  moléculas de  $A$  combinadas con una molécula de proteína a la de aquellas con  $v - 1$  moléculas es

$$\frac{C_v}{C_{v-1}} = \frac{n+1-v}{v} kC_A e^{-\omega(2v-1)}$$

Si la titulación cubre sólo algunas potencias de 10,  $n^2\omega$  tiene que ser finito y moderadamente grande; cuando  $n$  es grande,  $\omega(2v-1)$  es muy pequeño.

Así,  $C_v/C_{v-1}$  será la unidad para el mismo valor de  $v$  que para una solución ideal en que  $\omega = 0$  y  $kC = \bar{v}/(n - \bar{v})$ , y  $v = \bar{v} + \bar{v}/n$ .

Sustituyendo este valor en la ecuación anterior de relación de concentraciones, se tiene:

$$ke^{\omega} C_A = \frac{\bar{v}}{n - \bar{v}} e^{2(1+1/n)\omega\bar{v}}$$

$$k' C_A = \frac{\bar{v}}{n - \bar{v}} e^{2\omega'\bar{v}};$$

$$\ln k' C = \ln \frac{\bar{v}}{n - \bar{v}} + 2\omega'\bar{v}$$

en donde:

$$k' = ke^{\omega} \quad \text{y} \quad \omega' = \left(1 + \frac{1}{n}\right)\omega$$

Esta es la expresión limitante para muy grandes valores de  $n$ , pero no se cumple para pequeños valores de  $n$ .

La solución de Scatchard es utilizar la ley de acción de masas resuelta para  $C$ ;

$$\bar{v}/(n - v) = kC$$

de modo que multiplicando por  $(n - \bar{v})/C$ , se obtiene:

$$\bar{v}/C = k(n - \bar{v}),$$

de modo que, si  $k$  es constante, se obtiene una línea recta al representar  $\bar{v}/C$  frente a  $\bar{v}$ ; dicha recta intercepta al eje  $\bar{v}/C$  a  $kn$  y al eje  $\bar{v}$  a la distancia  $n$ . La curvatura de la representación puede indicar diferentes constantes intrínsecas o la existencia de desviaciones de las probabilidades independientes. En este último caso, la ecuación de  $\ln k'C$  se puede transformar en

$$\bar{v}e^{2\omega\bar{v}/C} = k'(n - \bar{v})$$

y representar  $\bar{v}e^{2\omega\bar{v}/C}$  frente a  $\bar{v}$ .

Estas representaciones se han utilizado inicialmente en el estudio de moléculas tales como naranja de metilo, sulfamidas, etc., que se unen a proteínas tales como la seroalbúmina (67), y con posterioridad se han convertido en una forma muy general y de amplia utilización en el estudio de sistemas enzimáticos alostéricos.

Para ilustrar el empleo de esta representación se va a utilizar la glutámico deshidrogenasa de hígado, enzima que ofrece interesantes circunstancias en orden a su regulación; este sistema enzimático utiliza indistintamente como coenzimas NADH o NADPH, y su actividad se afecta claramente por nucleótidos de purina tipo GTP. La fracción de saturación de las localizaciones a las que se une GTP frente a la concentración del nucleótido muestra una dependencia de tipo sigmoideo, manifestación de interacción cooperativa del GTP. El efecto cooperativo depende de la concentración de enzima, la cual se manifiesta influenciando el equilibrio asociación-disociación de la enzima; estamos, pues, en presencia de una relación entre la unión del ligando —de naturaleza alostérica— y el equilibrio asociación-disociación, sistema, a su vez, de control de la actividad enzimática.

Haciendo uso de la representación de Scatchard, Frieden y Colman (68) demuestran que la extensión de la interacción cooperativa depende del grado de polimerización de la enzima (el grado de polime-

rización aumenta con la concentración de la enzima); con el grado de polimerización aumenta la desviación de la forma normal de representación (fig. 15). A su vez, cuando se utiliza una glutámico deshidrogenasa modificada químicamente, de forma que tiene impedida la capacidad

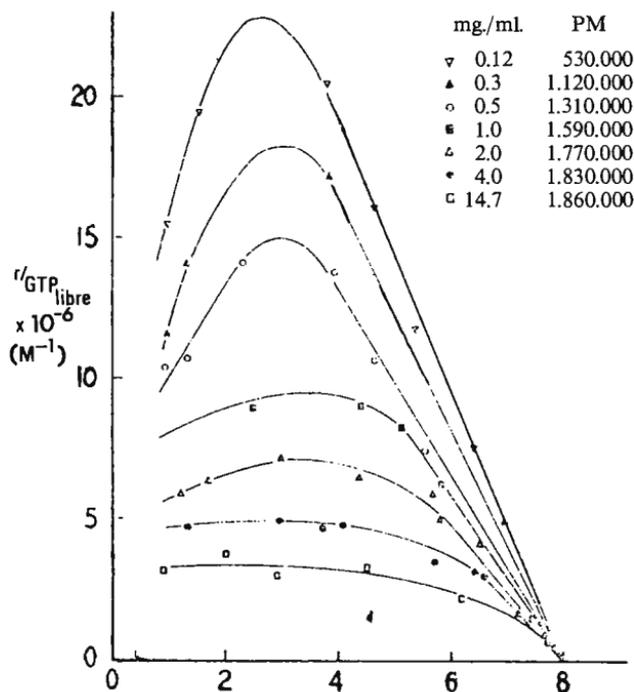


Figura 15

de asociación, pero que conserva íntegra su actividad catalítica, la unión de GTP no exhibe efecto cooperativo; cooperatividad, pues, debida al fenómeno de asociación y que surge a altos niveles de la enzima por la unión preferencial del ligando a formas de diferente peso molecular. Cuando la forma que une fuertemente el ligando —monómero— está presente en exceso, se presenta una unión normal; cuando la forma que está presente en exceso es la que une pobremente el ligando —polímero—, se aprecia la interacción cooperativa.

El estudio de la naturaleza de las interacciones entre proteínas y los distintos tipos de ligandos —que incluso pueden llegar a ser iones metálicos— es fundamental a la interpretación del modo de acción de las enzimas alostéricas. El actual conocimiento de la energética y las propiedades moleculares de los complejos proteína-ligandos, deriva en buena parte del empleo de los procedimientos de unión de ligandos y del análisis de los datos obtenidos. Los procedimientos que investigan cuantitativamente la unión de ligandos a las proteínas se centran en métodos de sedimentación, ultrafiltración y electroforesis, medidas espectrofotométricas, distribución entre fases y equilibrio de diálisis, a los que hay que añadir dispersión de luz, viscosidad, cuando la interacción conduce a cambios en el estado de agregación de la proteína; algunos de ellos de gran importancia técnica y que merecen ser tratados aparte en esta obra.

Quizás, entre ellos, el de más amplia difusión sea el que utiliza la diálisis del ligando —en función de la concentración de éste— hasta

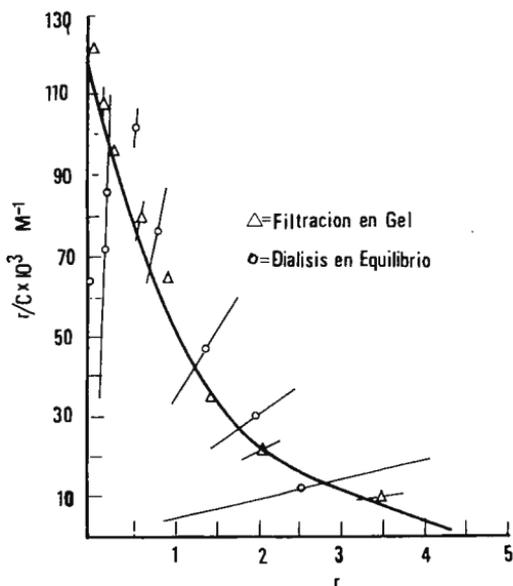


Figura 16

alcanzar el equilibrio a través de una membrana semipermeable. La utilización de ligandos isotópicamente marcados hace más rápido, sensible y riguroso el análisis.

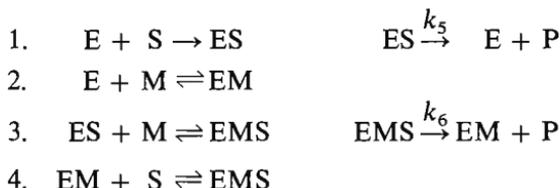
Aunque menos ampliamente, se han venido también utilizando en los últimos años las técnicas cromatográficas que usan Sephadex para el estudio de la unión de ligandos (69-71). Recientemente se ha comparado el equilibrio de diálisis y la cromatografía sobre Sephadex utilizando el procedimiento de análisis frontal en la unión de salicilato (72). Los resultados que dichos autores obtienen y su variabilidad aparecen representados en la figura 16 según el sistema desarrollado por Scatchard. En todos los casos, el intervalo de variabilidad es muy superior utilizando la técnica de diálisis que cuando se emplea la cromatografía sobre Sephadex. Inconveniente de esta segunda técnica es, sin embargo, la necesidad de relativamente grandes volúmenes de muestra para la saturación de la columna. Ventaja inherente a la técnica es que permite la medida del grado de unión en la solución original que se aplica a la columna en contraposición al equilibrio de diálisis en que precisamente el equilibrio original se distorsiona por efecto de la diálisis.

#### IV. Cinética de las reacciones alostéricas. Métodos de representación

Como ya se ha comentado previamente, las enzimas alostéricas se suelen considerar como tales en virtud de su cinética compleja «steady-state» (velocidad de cambio del intermedio *ES* es cero). Multitud de estudios llevados a cabo en los últimos años han venido a describir propiedades cinéticas tales como la dependencia sigmoidea de la velocidad en función de la concentración del sustrato; dependencia afectada por la presencia de modificadores. Estudios que, asimismo, han venido a subrayar la considerable importancia fisiológica del fenómeno en el control y regulación del metabolismo. Varios problemas se presentan, sin embargo, en el manejo de este tipo de información; el tratamiento de los datos cinéticos experimentales, la magnitud de la información que de ellos puede ser obtenida, el origen de los efectos cooperativos del sustrato y los modelos que a este respecto se proponen, son aspectos que se entremezclan y mutuamente se influyen en el logro, aún no alcanzado, de un cuerpo de doctrina en los mecanismos de cooperatividad en la unión de ligandos.

Friëden, en 1964 (73), discute ampliamente la interpretación de los datos cinéticos de sistemas enzimáticos que pueden ser específicamente activados o inhibidos por ligandos unidos a una localización distinta de la del centro activo y para los que la representación de la velocidad

con respecto a la concentración del sustrato (S) es hiperbólica en presencia y ausencia del modificador (M). Las reacciones enzimáticas que el autor estudia son, en principio, a base de un único sustrato y un solo modificador con la situación general,



La velocidad inicial de la reacción enzimática, suponiendo un equilibrio rápido de las diferentes formas de la enzima, tiene la forma

$$(E)_0 = \frac{k_5(1 + k_6M/k_5K_3)/(1 + M/K_3)}{1 + \frac{K_1}{S} \left\{ \frac{1 + M/K_2}{1 + M/K_3} \right\}},$$

en donde  $K_1$  a  $K_4$  son las constantes de disociación de las cuatro etapas antes descritas, y  $k_5$  y  $k_6$  son las constantes de velocidad de la desaparición de los complejos enzima-sustrato para formar los productos finales.

Esta ecuación de velocidad adquiere formas simplificadas en casos límites tales como en las condiciones  $k_5 = 0$  ó  $k_6 = 0$ .

En las situaciones no límites se pueden presentar los casos  $K_2/K_3 = k_5/k_6$ ,  $K_2/K_3 < k_5/k_6$ ,  $K_2/K_3 > k_5/k_6$ . En la primera de ellas, la relación de las constantes de unión para la formación de EM y EMS a partir de E y ES, respectivamente, es igual a la relación de las constantes de velocidad para la escisión de los complejos ES y EMS. En este caso, la ecuación de velocidad tiene la forma

$$(E)_0 = \frac{k_5(1 + k_6M/k_5K_3)/(1 + M/K_3)}{1 + \frac{K_1}{S} \left\{ \frac{1 + k_6M/k_5K_3}{1 + M/K_3} \right\}} = \frac{ak_5}{1 + \frac{aK_1}{S}}.$$

Puesto que se trata de un estudio en equilibrio rápido, las constantes de velocidad representan etapas limitantes de velocidad y pueden considerarse las velocidades máximas (V). De esta forma, la representación  $1/v$  frente a  $1/S$  en presencia de modificador será paralela a la correspondiente en ausencia del mismo, con independencia de si el

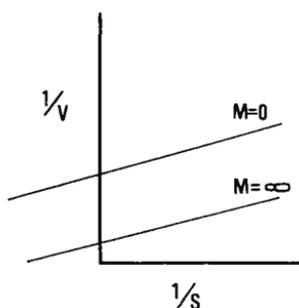
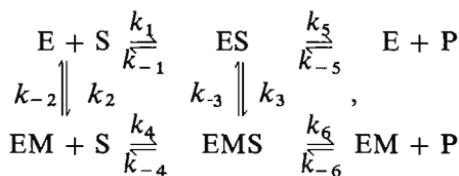


Figura 17

modificador activa o inhibe la reacción (fig. 17). Este tipo de conducta se conoce como «incompetitiva» y la exhibe, por ejemplo, la glutámico deshidrogenasa con  $\text{NADP}^+$  y GTP como inhibidor.

Cuando el tratamiento cinético se realiza en las condiciones de «steady-state», la ecuación de velocidad es notablemente compleja. La representación  $1/v$  frente a  $1/S$  en ausencia de modificador es siempre lineal, puesto que la ecuación correspondiente no contiene términos en  $S^2$  o de orden superior; en presencia de modificador es posible obtener representaciones recíprocas no lineales. Si la situación experimental se simplifica bajo la forma,



la ecuación de velocidad adquiere la forma,

$$v_0 = \frac{k_5 \left( 1 + \frac{k_6(\text{EMS})}{k_5(\text{ES})} \right)}{1 + \frac{(\text{E})}{(\text{ES})} + \frac{(\text{EM})}{(\text{ES})} + \frac{(\text{EMS})}{(\text{ES})}}$$

donde E, EM, ES y EMS representan la concentración de las diferentes formas de la enzima y pueden calcularse por el método de King y Altman (74).

Una serie de condiciones pueden darse que impongan la identidad

$(1 + k_6/k_{-4}) = (1 + k_5/k_{-1})$  y, entre ellas, cuando  $k_5 = k_6$  y  $k_{-4} = k_{-1}$  (el modificador no ejerce efecto sobre la escisión de ES para dar E y P y no influencia la velocidad máxima). La ecuación de velocidad toma la forma

$$\frac{v_0}{(E)_0} = \frac{k_5}{1 + \frac{K_1}{S} \left\{ \frac{1 + M/K_2}{1 + M/K_3} \right\}}$$

El resultado es similar a un efecto competitivo, y cuando  $K_2$  es superior a  $K_3$  ( $K_2$  y  $K_3$  describen respectivamente la unión del modificador a E y ES), se trata de un «activador competitivo» (fig. 18). Si  $k_1 = k_4$  en

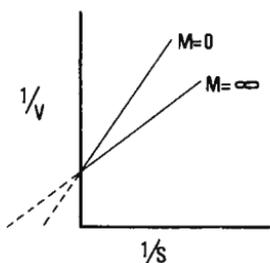


Figura 18

adición a las igualdades establecidas ( $k_5 = k_6$ ,  $k_{-4} = k_{-1}$ ), y teniendo presente la reversibilidad microscópica  $k_{-1}k_{-3}/k_1k_3 = k_{-2}k_{-4}/k_2k_4$ ,  $K_2$  será igual a  $K_3$ , y el modificador no tendrá efecto sobre la velocidad de la reacción enzimática. Este tipo de «activación competitiva» se presenta cuando  $K_1 = \infty$ , es decir, cuando no se forma el complejo ES y el mecanismo de la reacción es  $E + M \rightleftharpoons EM$ ,  $EM + S \rightleftharpoons EMS \rightarrow EM + P$ .

Frieden (cf. nota 73) señala de esta forma cómo dos muy diferentes mecanismos pueden originar una ecuación cinética similar.

Otra simplificación ocurre cuando  $k_3 = k_4 = 0$  (el complejo EMS no puede formarse por gran interacción entre M y S, por ejemplo), en cuyo caso la ecuación de velocidad es,

$$\frac{v_0}{(E)_0} = \frac{k_5}{1 + \frac{K_1}{S} \left( 1 + \frac{k_5}{k_{-1}} \right) (1 + M/K_2)},$$

y entonces M será siempre un inhibidor competitivo y no puede activar la enzima bajo circunstancia alguna.

En estas dos simplificaciones del tratamiento cinético bajo la condición de «steady-state», pueden obtenerse representaciones recíprocas lineales en presencia y ausencia de M.

Representaciones recíprocas lineales deben obtenerse siempre en el caso de sustratos únicos, a condición de que éste no actúe como modificador; en ausencia de modificador, una representación no lineal indica que el sustrato mismo está actuando como modificador. Sin embargo, varias otras causas pueden conducir a representaciones no lineales; entre ellas se mencionan: *a)* impurezas del sustrato; *b)* la presencia de dos diferentes enzimas con diferentes propiedades cinéticas; *c)* inhibición a elevados niveles de sustrato; *d)* la existencia de dos localizaciones diferentes para las moléculas de sustrato.

Existen, asimismo, casos en que la representación recíproca es lineal en ausencia de modificador, y no lineal en presencia de modificador. Además del descrito anteriormente, existen otras posibilidades, como la del modificador que potencia un efecto que resulta de la unión del sustrato a otra localización diferente de la del centro activo.

Cuando la representación recíproca es una curva en ausencia del modificador y es lineal o se ofrece menos curvada en presencia del mismo, surgen varias interpretaciones posibles. Nos encontramos, pues, con dificultades en la explicación de los datos cinéticos que obligan a ir en busca de nuevas formas de representación de estos datos y de nuevos métodos capaces de suplementar las observaciones cinéticas. En esta situación —1964— se discute a las curvas de saturación sigmoideas su necesaria vinculación a la interacción de múltiples localizaciones y se describen explicaciones alternativas como ciertos procesos en las reacciones a base de dos sustratos en 1966 (75) o mediante mecanismos de relajación en 1967, sin la necesidad de supuestos especiales sobre la estructura cuaternaria de la proteína (76). Y, mientras tanto, las experiencias de tipo cinético se suplementan con experiencias de unión de ligandos en el equilibrio, y los resultados describen las interacciones no covalentes entre sustratos, activadores e inhibidores, y las diferentes localizaciones de la enzima alostérica. Podemos decir que, casi también de modo simultáneo, toman cuerpo una serie de interpretaciones de los datos cinéticos y de unión de ligandos que se centran en ciertos modelos, de los que —como más adelante se comprobará— el más restrictivo es el de Monod, Wyman y Changeux, desarrollado en 1965.

En esta situación, Frieden (77) desarrolla nuevos métodos de representación de los datos alostéricos, haciendo uso de la ecuación de velocidad procedente, a su vez, de la ecuación que define la fracción de saturación de una proteína con un ligando según el modelo de Monod.

$$\frac{v_0}{nV_{\max}} = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n}$$

A este propósito se definirán más adelante las suposiciones básicas del modelo y las adicionales para aplicar la ecuación de unión a los datos cinéticos. En la anterior ecuación,  $L$  es una constante de equilibrio que describe el equilibrio entre dos estados conformacionales de la proteína;  $c$  es la diferencia en la capacidad de los dos estados para unir el ligando ( $c = K_S/K_T$ ), y  $n$  es el número de localizaciones de unión del ligando por mol de proteína;  $\alpha$  es la concentración de ligando libre dividida por una constante de unión para la conformación de la proteína que une más fuertemente el ligando (concentración de ligando reducida,  $\alpha = S/K_S$ ).

Frieden lleva a cabo una crítica comparativa de diversas formas de representación de los datos cinéticos de la ecuación anterior y concluye la conveniencia de la representación  $v/\alpha$  frente a  $v$ . En la figura 19 tene-

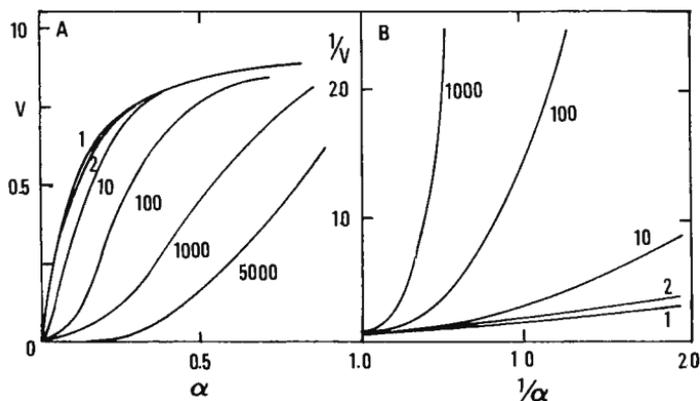


Figura 19

mos las representaciones de  $v$  frente a  $\alpha$  y la de sus valores recíprocos para diversos valores de  $L$  ( $c = 0$  y  $n = 4$ ). En la figura 20 tenemos la representación de Frieden,  $v/\alpha$  frente a  $v$ , a varios valores de  $L$  ( $n = 4$  y dos valores de  $c$ , 0 y 0,1). Bajo esta forma, la cinética hiperbólica viene

representada por una recta con una tangente negativa de  $1/K_1$  ( $K_1$  es la constante de disociación para la unión del sustrato a la forma conformacional de la enzima que une más fuertemente el sustrato).

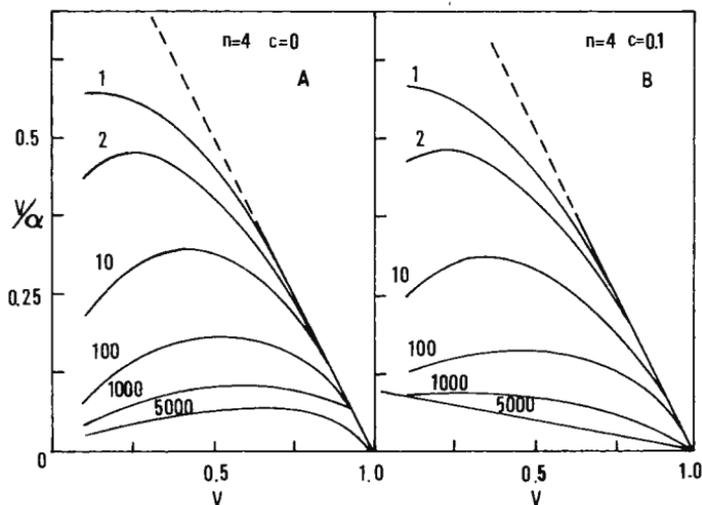


Figura 20

En la figura 20 se observa la existencia de pendientes límites a elevados valores de  $v$  y para la mayoría de los valores de  $L$ . Así, pues, en una representación  $v/S$  frente a  $v$ , esta pendiente límite puede suministrar  $K_1$  (unión de  $S$  a la conformación que une más fuertemente el sustrato). La extensión a la que esta pendiente límite puede observarse o a la que representa la constante de disociación  $K_1$  depende del valor de  $n$ . Esta dependencia se observa de forma muy clara en la figura 21, en la que se representa  $v/\alpha$  frente a  $v$  para diferentes valores de  $L$  y dos valores de  $n$ , 2 y 8; para  $n=2$  las curvas alcanzan la pendiente límite sólo a muy elevados valores de  $L$ , mientras que, para  $n=8$ , la pendiente límite se logra a bastante bajos niveles de  $L$ . Se está, pues, en presencia de un procedimiento para la determinación de  $n$ . Tomando la primera derivada de  $v/\alpha$  con relación a  $v$ , y haciendo  $v/\alpha = 0$ , la tangente límite a altos valores de  $v$  es,

$$-\frac{1}{K_1} \left\{ \frac{1 + Lc^n}{1 + Lc^{n-1}} \right\}$$

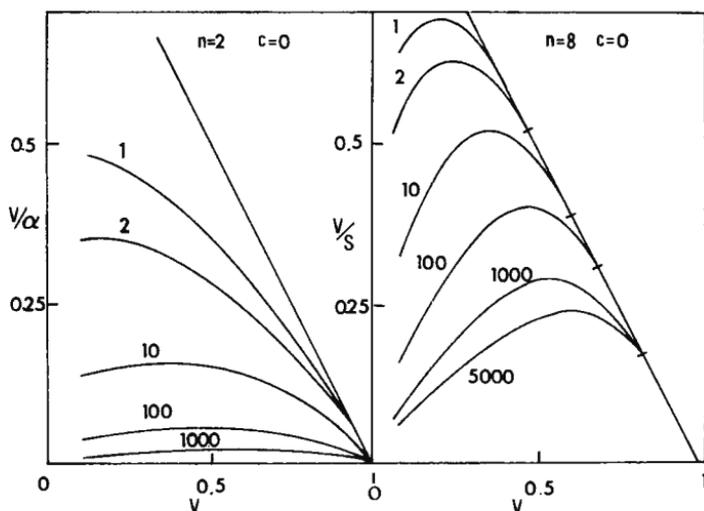


Figura 21

que se reduce a  $-1/K_1$  cuando  $c = 0$  ó 1, cuando  $L$  tiene un valor prácticamente nulo o cuando  $Lc^n$  y  $Lc^{n-1} \ll 1$ . Con esta forma de representación desarrollada por Frieden (cf. nota 73) se obtienen esquemas lineales en cualquiera de las condiciones: a)  $c = 1$ , es decir, no existe diferencia en las constantes de unión para los dos estados conformacionales de la enzima; b)  $L = 0$ , es decir, sólo existe un estado conformacional; c) a muy elevados valores de  $L$ , es decir, cuando la enzima existe prácticamente sólo en el estado que une pobremente el sustrato, a condición de que  $c$  no sea 0.

Para determinar, pues, los parámetros de la ecuación de velocidad anterior, debe procederse según el procedimiento siguiente: 1) Representación de los datos experimentales  $v/S$  frente a  $v$ . 2) Examinar la pendiente límite a elevados valores de  $v$  para obtener un valor aproximado de  $n$ . 3) Comparar los datos con las representaciones teóricas para obtener en primer lugar  $c$  y en segundo lugar  $L$  en función de la concentración del modificador. 4) Refinamiento de los datos obtenidos.

Otras formas de representación de los datos cinéticos han sido descritas para el análisis de los parámetros de las enzimas alostéricas. El procedimiento desarrollado por Horn y Börnig (78) utiliza asimismo el modelo de Monod y su función de saturación para el sustrato cuando  $c = 0$ . Una serie de transformaciones de dicha ecuación de unión

conduce a la representación de  $\log [\alpha/(v_0/V_{\max})] - \alpha - 1$  frente a  $\log(1 + \alpha)$ , en forma de una recta con una pendiente  $-(n - 1)$ .

## V. Modelos alostéricos

### 1. GENERALIDADES

Desde hace bastantes años se conoce cómo la unión del oxígeno a la hemoglobina sigue una curva de naturaleza sigmoidea que difiere notablemente de la ecuación de Michaelis-Menten. La ecuación de Hill diseñada en 1910 (cf. nota 61).

$$Y = k \cdot p^n$$

siendo  $n = 2.6$ , dio cierta aproximación a los datos experimentales.

En 1925, Adair (79) obtuvo un mayor ajuste a los datos experimentales haciendo uso de una ecuación con cuatro constantes, relacionadas con las sucesivas constantes de afinidad del oxígeno con los grupos hemo de la hemoglobina. La ecuación de Adair no explicaba, sin embargo, los cambios en las constantes de afinidad. Fue Pauling, en 1935 (80), quien llevó a cabo el primer intento para relacionar los cambios de dichas constantes con la geometría de la proteína, suponiendo una única constante de afinidad y un término de interacción dependiente de la geometría de las cuatro subunidades.

Con relación a las *enzimas alostéricas*, varios mecanismos formales han sido objeto de tratamientos teóricos detallados. Por lo general se acepta que la unión cooperativa resulta del acoplamiento de etapas de unión a cambios conformacionales discretos del protómero. Ello necesita ocurrir en el protómero aislado y, a su vez, transmitirse a los demás protómeros de la estructura cuaternaria. El acoplamiento de los cambios conformacionales puede conducir a una cooperatividad de la unión de ligandos, y los diversos mecanismos que han sido propuestos difieren —de modo fundamental— en condicionamientos acerca del número, grado de acoplamiento y afinidades relativas de los estados conformacionales del protómero hacia los diversos ligandos.

En los últimos años, gran parte de los estudios llevados a cabo sobre las enzimas alostéricas han ido encaminados a la consecución de un principio mecanístico unificador al que pudiera conformarse la especial manera de manifestar su actividad catalítica. Debe, sin embargo,

tenerse también presente que los detallados estudios de cada vez mayor número de enzimas individuales (glutamina sintetasa, aspartoquinasa-homoserina deshidrogenasa, CTP sintetasa, etc.) van ofreciendo sistemas de regulación que resisten un rígido encuadramiento.

Haciendo uso de diversas teorías y tratamientos físicos se han elaborado distintos modelos de interacciones alostéricas indirectas y —como ya ha quedado puntualizado— establecidas entre localizaciones de unión topográficamente distintas a través de cambios conformacionales. En este sentido, debe adelantarse ya cómo dichos estudios se han manifestado en la aparición de dos tendencias de pensamiento concretadas en la proposición de dos modelos moleculares para interpretar los mecanismos alostéricos de control; dos modelos que relacionan la cooperatividad con la estructura de la proteína y que parecen capaces de explicar los fenómenos observados y ser de amplia aplicabilidad. Uno de ellos debido a Monod, Wyman y Changeux (81) y otro desarrollado por Koshland, Némethy y Filmer (82), haciendo uso de principios previos establecidos por Adair (83) (cf. nota 79). Ambos modelos, basados en la estructura cuaternaria de las proteínas y en las alteraciones en la conformación provocadas por la unión de ligandos, y ambos modelos elaborados ya mediante un tipo «mecanístico» de tratamientos, o bien haciendo uso de una condición de equilibrio esencial a la comprensión de funciones tales como la unión de ligandos en equilibrio; además de este tipo de tratamientos existen otros de naturaleza termodinámica y descriptiva y de carácter más general y formal.

Estos modelos «mecanísticos» o «configuracionales» suponen una enzima constituida por  $q$  protómeros, siendo capaz cualquiera de ellos de existir en un cierto número de configuraciones (\*) poseedoras de diferentes afinidades por los ligandos, constantes catalíticas y otras propiedades.

---

(\*) Whitehead (84) insiste en el empleo del término «configuración», de carácter más operacional que el intuitivo de «conformación». La utilización de «configuración» hace no sujetarse en extremo a una idea exclusivamente estérica y se comprenden casos en que la adaptación inducida por ligandos no es debida a complementariedad estérica. Así, en la hemoglobina, aunque existe un cambio en la estructura cuaternaria durante la oxigenación, referente a la orientación relativa de las subunidades, no se observan variaciones en la estructura terciaria (85). Un proceso de asociación-disolución de cadenas polipeptídicas sería un ejemplo extremo de cambio «configuracional».

Así, en un tratamiento mecanístico generalizado, para una configuración dada,  $T$ , de un protómero, existen  $(q + 1)$  especies  $T_i$ , donde  $i$  protómeros se encuentran en la configuración  $T$ . En ausencia de ligandos, la concentración de cada especie  $T_i$  viene especificada por una constante de equilibrio  $L_i$ , de forma que

$$T_i = L_i T_0.$$

La unión de un ligando a una determinada conformación de una subunidad induce su estabilización, y ello influencia la conformación adoptada por otras subunidades de la misma molécula, lo que, a su vez, determina las interacciones entre aquellas subunidades y ligandos. La resultante será, pues, una interacción entre moléculas de ligando unidas a las diferentes subunidades.

## 2. MODELO DE MONOD, WYMAN Y CHANGEUX

El primer intento para explicar las interacciones homotrópicas y heterotrópicas haciendo uso de las causas físicas que subyacen al fenómeno, fue llevado a cabo por Monod, Wyman y Changeux (l.c.). El ligando  $\omega$  se une exclusivamente a una configuración,  $T$ , de un protómero, siendo la constante de asociación,  $B$ , idéntica para todos los protómeros; así se tiene

$$\frac{T\Omega_1}{T\Omega_0} = (B\omega),$$

siendo  $T\Omega_1$  y  $T\Omega_0$  las concentraciones de los protómeros con una y cero moléculas de  $\omega$  respectivamente;  $(B\omega)$  es la probabilidad de encuentro de  $\omega$  con el protómero  $T$ . En una serie de  $i$  protómeros en el estado  $T$ , la probabilidad de encuentro con  $r$  moléculas relativa al encuentro cuando no existe  $\omega$ , vendrá dado por

$$\frac{T_i\Omega_r}{T_i\Omega_0} = \frac{i!}{r!(i-r)!} (B\omega)^r \equiv \binom{i}{r} (B\omega)^r.$$

Las moléculas de  $\omega$  se distribuyen de modo binomial sobre las  $i$  localizaciones disponibles. La relación anterior permite calcular la concentración relativa total de  $T_i$  en función de  $\omega$

$$T_i = \sum_{r=0}^i T_i\Omega_r = T_i\Omega_0 \sum_{r=0}^i \binom{i}{r} (B\omega)^r = T_0 L_i (1 + B\omega)^i$$

de acuerdo con los razonamientos de Whitehead.

De esta forma, la fracción del número total de protómeros en el estado  $T$  será dado por la ecuación de estado

$$\bar{T} = \frac{\sum_{i=0}^q iT_i}{q \sum_{i=0}^q T_i} = \frac{\sum_{i=0}^q i Li(1 + B\omega)^i}{q \sum_{i=0}^q Li(1 + B\omega)^i}$$

La fracción de protómeros  $\bar{\Omega}$  capaz de unir  $\omega$  será igual a  $\bar{T}$  multiplicado por la saturación de tales protómeros, según la ecuación de unión:

$$\bar{\Omega} = \frac{B\omega}{1 + B\omega} \cdot \bar{T} = \frac{\sum_{i=0}^q iLiB\omega(1 + B\omega)^{i-1}}{q \sum_{i=0}^q Li(1 + B\omega)^i}$$

Monod, Wyman y Changeux modifican la expresión general de  $\bar{T}$  mediante la simplificación que supone  $L_i = 0$  (excepto  $i = q$  e  $i = 0$ ), o lo que es lo mismo,  $T_0$  y  $T_q$  son las únicas especies de la enzima que existen en concentración apreciable. De esta forma, las ecuaciones de estado y de unión, haciendo uso de la hipótesis configuracional que  $\omega$  se une exclusivamente a la configuración  $T$ , serán:

$$\bar{T} = \frac{L_q(1 + B\omega)^q}{1 + L_q(1 + B\omega)^q}$$

$$\bar{\Omega} = \frac{L_q B\omega(1 + B\omega)^{q-1}}{1 + L_q(1 + B\omega)^q}$$

La hipótesis significa, desde el punto de vista físico, la conservación de la simetría que poseen las moléculas de proteínas oligómeras, lo que conduce al corolario de que un cambio en la conformación de una subunidad produce un cambio equivalente en todas las subunidades idénticas.

Si el sistema puede exhibir dos configuraciones,  $T$  y  $R$ , de forma que sustrato y activador se unen solamente a una de ellas y el inhibidor a la otra, la ecuación de unión adquiere la forma:

$$\bar{X} = \frac{B_x x}{(1 + B_x x)} \cdot \frac{L_q (1 + B_x x)^q (1 + B_y y)^q / (1 + B_z z)^q}{1 + L_q (1 + B_x x)^q (1 + B_y y)^q / (1 + B_z z)^q}$$

siendo  $y$  el activador y  $z$  el inhibidor. Ligandos antagonistas (sustrato e inhibidor o activador e inhibidor) ocasionarán un incremento en la mutua cooperatividad, mientras que ligandos sinérgicos (activador y sustrato) originarán una disminución de la misma.

A las mismas funciones —función de estado,  $\bar{R}$  o  $\bar{T}$ , y función de saturación,  $\bar{Y}_F$ — se llega en el modelo de Monod, Wyman y Changeux, haciendo uso directo de las ecuaciones de equilibrio a base de los  $q$  protómeros

$$T_0 = LR_0$$

$$R_1 = R_0 q \frac{F}{K_R}$$

$$T_1 = T_0 q \frac{F}{K_T}$$

$$R_2 = R_1 \frac{q-1}{2} \frac{F}{K_R}$$

$$T_2 = T_1 \frac{q-1}{2} \frac{F}{K_T}$$

$$R_3 = R_2 \frac{q-2}{3} \frac{F}{K_R}$$

$$T_3 = T_2 \frac{q-2}{3} \frac{F}{K_T}$$

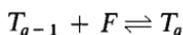
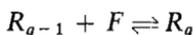
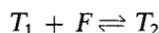
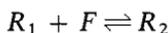
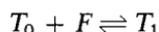
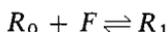
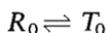
$$\dots\dots\dots$$

$$R_q = R_{(q-1)} \frac{1}{q} \frac{F}{K_R}$$

$$\dots\dots\dots$$

$$T_q = T_{(q-1)} \frac{1}{q} \frac{F}{K_T}$$

siendo  $L$  la constante de equilibrio de la transición  $R_0 \rightleftharpoons T_0$ , llamada asimismo «constante alostérica», y siendo  $K_R$  y  $K_T$  las constantes de disociación de un ligando  $F$  unido a una localización estereoespecífica en los estados  $R$  y  $T$ , respectivamente; estas constantes de disociación son las mismas para todas las localizaciones homólogas en cada uno de los dos estados, debido a la simetría y a que la unión de cada ligando se supone intrínsecamente independiente de la unión de cualquier otro. Los estados en equilibrio son:



La fracción de proteína en estado  $R$  es:

$$\begin{aligned}\bar{R}_0 &= 1 - \bar{T} = \\ &= \frac{R_0 + R_1 + R_2 + \dots + R_q}{(R_0 + R_1 + R_2 + \dots + R_q) + (T_0 + T_1 + T_2 + \dots + T_q)} = \\ &= \frac{(1 + \alpha)^q}{L(1 + c\alpha)^q + (1 + \alpha)^q}\end{aligned}$$

en donde  $L$  sigue siendo la constante de equilibrio para la transición  $R_0 \rightleftharpoons T_0$  y  $\alpha = F/K_R$ ,  $c = K_R/K_T$ .

La fracción de localizaciones unidas al ligando, fracción de saturación, es:

$$\begin{aligned}\bar{Y}_F &= \frac{(R_1 + 2R_2 + \dots + qR_q) + (T_1 + 2T_2 + \dots + qT_q)}{q[(R_0 + R_1 + R_2 + \dots + R_q) + (T_0 + T_1 + T_2 + \dots + T_q)]} = \\ &= \frac{Lc\alpha(1 + c\alpha)^{q-1} + \alpha(1 + \alpha)^{q-1}}{L(1 + c\alpha)^q + (1 + \alpha)^q}\end{aligned}$$

Dicha función,  $\bar{Y}_F$ , adquiere formas teóricas de representación según los valores de  $L$  y  $c$ , de quien depende la cooperatividad del ligando; efecto cooperativo que se expresa por la curvatura de la parte inferior de las curvas y aparece más intenso a valores elevados de  $L$  (equilibrio conformacional fuertemente desplazado hacia  $T_0$ ) y a bajos valores de  $c$  (figs. 22 y 23).

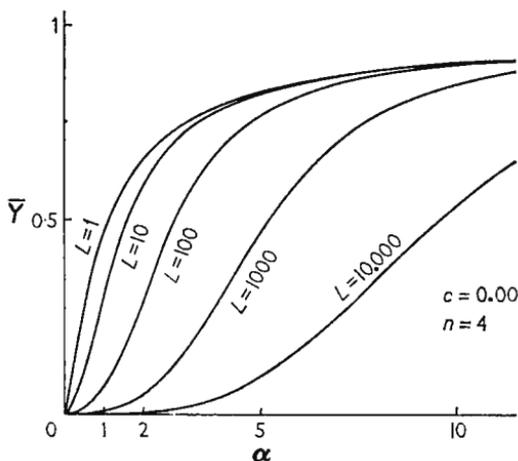


Figura 22

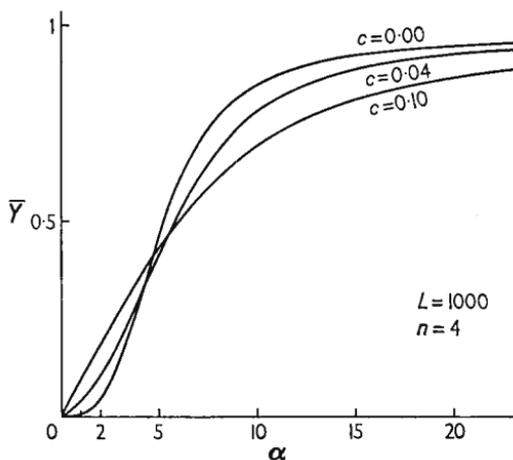


Figura 23

En estas condiciones, la función de saturación toma la forma:

$$\bar{Y}_F = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{q-1}}{L + (1 + \alpha)^q}$$

Cuando la afinidad del ligando es igual hacia los dos estados de la proteína ( $c = 1$ ) y, asimismo, cuando  $L$  es muy pequeña, dicha función puede simplificarse:

$$\bar{Y}_F = \frac{\alpha}{1 + \alpha}$$

El modelo da cuenta, pues, de los efectos homotrópicos de naturaleza cooperativa exhibidos de forma general por las proteínas alostéricas.

La interpretación de los efectos heterotrópicos según el modelo que se expone tiene que basarse únicamente en el equilibrio conformacional entre los estados  $R$  y  $T$  en que la proteína puede presentarse. La función de saturación que representa la fracción de localizaciones específicas ocupadas por el ligando de que se trate es:

$$\bar{Y} = \frac{L'c\alpha(1 + c\alpha)^{q-1} + \alpha(1 + \alpha)^{q-1}}{L'(1 + c\alpha)^q + (1 + \alpha)^q}$$

y la función de estado:

$$\bar{R} = 1 - \bar{T} = \frac{(1 + \alpha)^q}{L'(1 + c\alpha)^q + (1 + \alpha)^q}$$

en donde  $L'$  es la constante de equilibrio conformacional aparente entre los estados  $R$  y  $T$  y es una función de todos los efectores alostéricos, excepto el ligando  $F$ .  $L'$ , conocida asimismo como «constante alostérica aparente», viene definida por:

$$L' = \frac{\sum_0^q T_I}{\sum_0^q R_A},$$

donde  $\sum_0^q T_I$  y  $\sum_0^q R_A$  significan, respectivamente, la suma de los diferentes complejos del estado  $T$  con  $I$  (inhibidor) y de  $R$  con  $A$  (activador).

Si consideramos un sistema con tres ligandos estereoespecíficos, cada uno de ellos unido a una localización diferente, y suponemos que uno de dichos ligandos es el sustrato (el cual posee afinidad significativa sólo para uno de los dos estados de la proteína,  $R$ , por ejemplo) y que los otros dos ligandos se unen de forma selectiva a los estados  $R$  y  $T$  (inhibidor  $I$ , al estado  $T$ ; activador,  $A$ , al estado  $R$ ). En este caso la función de saturación para el sustrato en presencia de inhibidor y de activador es:

$$\bar{Y}_S = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{q-1}}{L' + (1 + \alpha)^q}$$

en donde  $\alpha = S/K_{R(S)}$ .

La constante de equilibrio conformacional aparente,  $L'$  entre los estados  $R$  y  $T$  es una función de todos los efectores alostéricos en ausencia de sustrato:

$$L' = \left( \frac{\bar{T}}{\bar{R}} \right)_{\alpha=0}$$

y su relación con  $L_0$ , constante alostérica ( $T/R$ ) en ausencia de cualquier tipo de ligando, es la siguiente:

$$\frac{1}{L'} = \frac{1}{L} \left[ \frac{(1 + d\beta)(1 + \gamma)}{(1 + \beta)(1 + e\gamma)} \right]^q$$

en que  $\beta = I/K_{T(I)}$ ,  $\gamma = A/K_{R(A)}$ ,  $d = K_{T(I)}/K_{R(I)}$ ,  $e = K_{R(A)}/K_{T(A)}$  relación que, de forma simplificada, de acuerdo con la anterior suposición, es:

$$L' = L \cdot \frac{(1 + \beta)^q}{(1 + \gamma)^q}$$

La sustitución del valor de  $L'$  en la expresión de  $\bar{Y}_s$  da lugar a la expresión:

$$\bar{Y}_s = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{q-1}}{L \frac{(1 + \beta)^q}{(1 + \gamma)^q} + (1 + \alpha)^q}$$

Ecuación que establece una nueva propiedad fundamental del modelo, esto es, que el efecto heterotrópico de un ligando alostérico sobre la función de saturación de otro ligando alostérico es capaz de modificar las interacciones homotrópicas del último. Cuando el sustrato mismo cae dentro del concepto de ligando alostérico, la presencia de los efectores origina un cambio en la forma de la curva de saturación del sustrato (fig 24); así, el inhibidor incrementa la cooperatividad de la curva

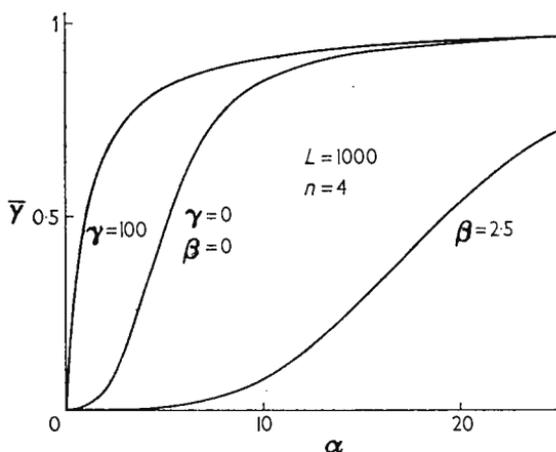


Figura 24

de saturación del sustrato, en tanto que el activador tiende a hacer desaparecer dicha cooperatividad. Los tres tipos de ligandos, sustrato, activador e inhibidor, exhiben efectos cooperativos homotrópicos.

El modelo de Monod, Wyman y Changeux viene definido por los siguientes principios:

1) Las proteínas alostéricas son oligómeros cuyos protómeros se asocian ocupando posiciones equivalentes. Ello implica que la molécula posee al menos un eje de simetría.

2) Cada protómero posee una localización capaz de formar con cada ligando un complejo estereoespecífico. Ello equivale a considerar que la simetría de cada serie de receptores estereoespecíficos es la misma que la simetría de la molécula.

3) La conformación de cada protómero viene constreñida por su asociación a los demás protómeros.

4) Los oligómeros alostéricos pueden presentarse en al menos dos estados reversibles; estados que difieren en la distribución y energía de los enlaces entre los protómeros y, por consiguiente, en las imposiciones conformacionales ejercidas sobre los protómeros.

5) En consecuencia, la afinidad de las localizaciones estereoespecíficas con los correspondientes ligandos se altera con motivo de la transición entre los estados conformacionales.

6) En la transición entre los estados conformacionales se conserva la simetría molecular.

Changeux y Rubin (86) mantienen la suposición de dos únicas configuraciones en el seno de la teoría de simetría, pero el ligando no puede forzar enteramente el equilibrio en favor de una configuración, sino que se une a ambas configuraciones (unión no exclusiva). Con ello pretenden explicar los autores la acción de ciertos inhibidores que alcanzan un valor límite de acción inferior al 100 por 100. Según Changeux y Rubin, el intervalo de valores de la función de estado  $\bar{R}$  viene determinado por la constante alostérica intrínseca,  $L$ , y por las relaciones de las constantes de disociación de los ligandos considerados por los dos estados ( $c$ ,  $d$ ,  $e$ ). En ausencia de inhibidores o activadores ( $\beta = \gamma = 0$ ), los límites de  $\bar{R}$  en función de la concentración de sustrato relativa  $\alpha = S/K_{R(S)}$  son:

$$\alpha = 0 \quad \alpha \rightarrow \infty$$

$$1/(L + 1) \leq \bar{R} \leq 1/(Lc^a + 1)$$

mientras que, en presencia de niveles saturantes de inhibidor ( $\beta \rightarrow \infty$ ,  $\gamma = 0$ ), los valores accesibles de  $\bar{R}$  vienen definidos por:

$$\alpha = 0 \quad \alpha \rightarrow \infty$$

$$1/(Ld^a + 1) \leq \bar{R} \leq 1/(Lc^a d^a + 1).$$

Con pocas excepciones, los límites de función de estado son diferentes de cero y la unidad, que son los valores limitantes de la función de saturación.

La relación de las dos conformaciones (función  $\bar{Q}$ ) en presencia de activador e inhibidor viene dada por:

$$Q = \frac{\bar{R}}{\bar{T}} = \frac{\bar{R}}{1 - \bar{R}} = \frac{(1 + \alpha)^q(1 + d\beta)^q(1 + \gamma)^q}{L(1 + c\alpha)^q(1 + \beta)^q(1 + e\gamma)^q}$$

siendo  $c$ ,  $d$  y  $e$  los coeficientes de unión no exclusiva de sustrato, inhibidor y activador, respectivamente. Cuando dichos coeficientes son muy pequeños, la expresión anterior adquiere la forma:

$$\bar{Q} = \frac{\bar{R}}{1 - \bar{R}} = \frac{(1 + \alpha)^q(1 + \gamma)^q}{L(1 + \beta)^q}$$

Por otro lado,

$$\frac{v}{V_{\max}} = \bar{Y} = \frac{\alpha}{1 + \alpha} \bar{R},$$

de donde:

$$\bar{R} = \frac{v}{V_{\max}} \cdot \frac{1 + \alpha}{\alpha} = \frac{v}{V'_{\max}},$$

siendo  $V'_{\max}$  la velocidad máxima que puede lograrse en presencia de una concentración dada de sustrato, si la proteína se encuentra totalmente en la conformación  $R$ .

La comparación de esta ecuación con el valor de  $\bar{Q}$  da lugar a:

$$\bar{Q} = \frac{\bar{R}}{1 - \bar{R}} = \frac{v}{V'_{\max} - v} = C \frac{(1 + \gamma)^q}{(1 + \beta)^q},$$

donde  $C = (1 + \alpha)^q/L$  (87).

Para facilitar la comparación de los estudios conformacionales y de unión de ligandos, Changeux y Rubín (87\*) introduce la «función de estado relativa» ( $\bar{R}r$ )

$$\bar{R}r = \frac{\bar{R}(\alpha) - \bar{R}(\alpha = 0)}{\bar{R}(\alpha \rightarrow \infty) - \bar{R}(\alpha = 0)} = \frac{(L'c^q + 1)[(1 + \alpha)^q - (1 + \alpha c)^q]}{(1 - c^q)[(1 + \alpha)^q + L'(1 + \alpha c)^q]}$$

expresión, ciertamente, más compleja que la simple de  $\bar{R}$ , pero tiene la ventaja de que corresponde a la variación de un parámetro de conformación de la proteína entre valores limitantes, medidos en ausencia de un ligando específico y a concentraciones de saturación del mismo.

Esta función de estado relativa varía entre 0 y 1, de la misma manera que la función de saturación. Las posiciones relativas de las representaciones de  $\bar{R}r$  e  $\bar{Y}$  depende de los valores particulares de  $L'$ ,  $c$  y  $q$ ; en el caso concreto de que  $L' = c^{-q/2}$ , ambas funciones se cruzan en el punto medio. En los casos en que  $L'$  sea mayor o menor que  $c^{-q/2}$ ,  $\bar{R}r$  intersecta la función  $\bar{Y}$  por encima o debajo del punto medio, respectivamente.

### 3. MODELO DE KOSHLAND, NÉMETHY Y FILMER

El modelo de Monod, Wyman y Changeux, para explicar los efectos alostéricos y cooperativos, está basado, pues, en el «principio de simetría», y establece que los protómeros están dispuestos de una forma simétrica, la cual se conserva durante los cambios conformacionales de la proteína, o, lo que es lo mismo, los cambios en la conformación de una subunidad van acompañados de cambios idénticos en todas las subunidades iguales. Este modelo no se limita exclusivamente a dos estados, pero, al postular que los ligandos tienden a desplazar el equilibrio hacia estados pre-existentes, queda implicada una especie de tácita suposición de la existencia de muy pocos estados.

Las mencionadas propiedades alostéricas y cooperativas de las proteínas han sido tratadas por Koshland y colaboradores (l.c.) desde el punto de vista del acoplamiento inducido, suponiendo la existencia de una interacción flexible entre ligando y proteína, con la aparición de una nueva conformación de la subunidad. Esta deformación puede, a su vez, afectar a la forma y estabilidad de las subunidades vecinas en grado variable. Si el cambio conformacional en una subunidad no se encuentra estrechamente relacionado con la conformación de las subunidades vecinas, éstas pueden no resultar afectadas y la resultante total sigue siendo del tipo Michaelis-Menten. Si, por el contrario, las interacciones entre las subunidades son muy estrechas, un cambio provocado en una subunidad dará lugar a cambios iguales o parciales en las subunidades adyacentes que ocurrirán de forma secuencial con la adición de ligandos, o, lo que es lo mismo, se observarán cambios conformacionales híbridos. En la figura 25 se representa el esquema de Koshland y Neet (90), en el que se ilustra la idea de flexibilidad enzimática y los cambios conformacionales de un monómero inducidos por el sustrato. En la parte superior puede observarse cómo el tránsito de la conformación circular a la conformación cuadrada puede tener lugar mediante tres tipos de procesos; en el proceso  $K_s K_i$ , el cambio de

conformación inicial va seguido de la unión del sustrato a la nueva conformación; en el proceso  $K'_s K'_t$ , la inicial unión del sustrato va seguida del cambio conformacional; el proceso  $K''_s K''_t$  supone la situación intermedia, según la cual, un cambio de conformación inicial y la unión de sustrato ocurren de modo simultáneo, lo que va seguido de un ulterior cambio conformacional  $K'''_t$  final.

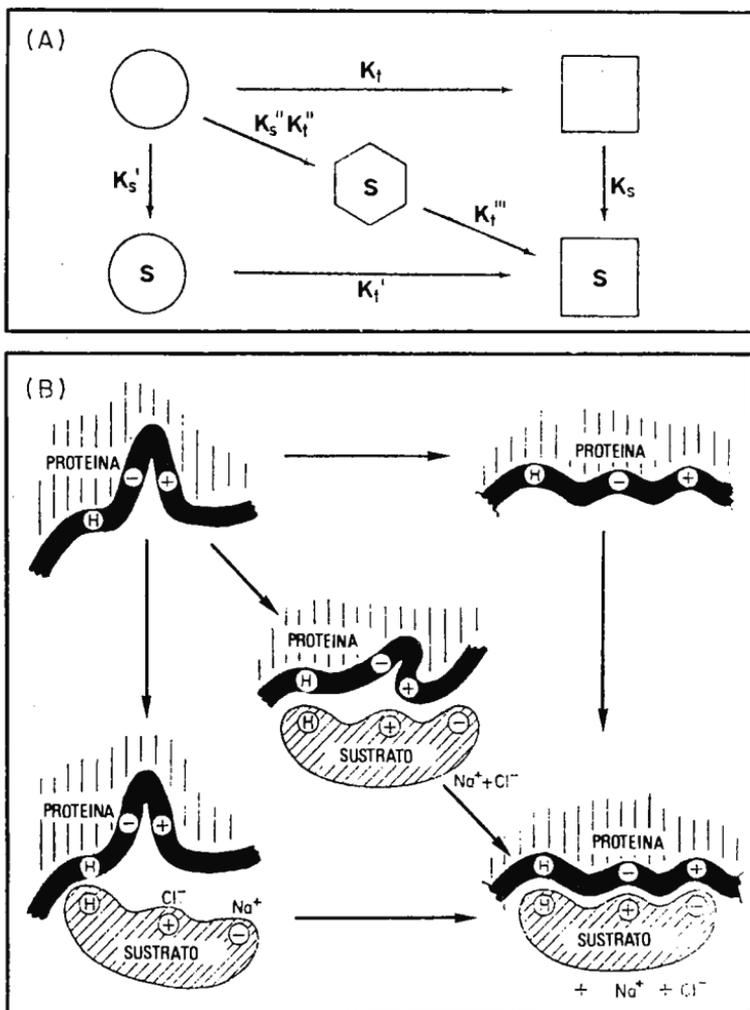


Figura 25

En la parte inferior de la figura 25 se ilustran los cambios anteriores a base de atracciones hidrofóbicas y electrostáticas de la proteína y el sustrato en presencia de los iones de la solución.

El *modelo alostérico de Koshland, Némethy y Filmer* —más general y, por ende, más complejo—, en contraste con el de Monod, Wyman y Changeux, está basado en el postulado fundamental de la existencia de estados conformacionales híbridos o, lo que es lo mismo, que cada subunidad puede cambiar de conformación sin que de modo necesario se produzca un cambio igual en las demás subunidades. Ello permite la existencia de todas las formas  $T_0, T_1, T_2, \dots, T_q$  y asigna un valor a las constantes  $L_i$ . La representación esquemática de ambos modelos aparece en la figura 26.

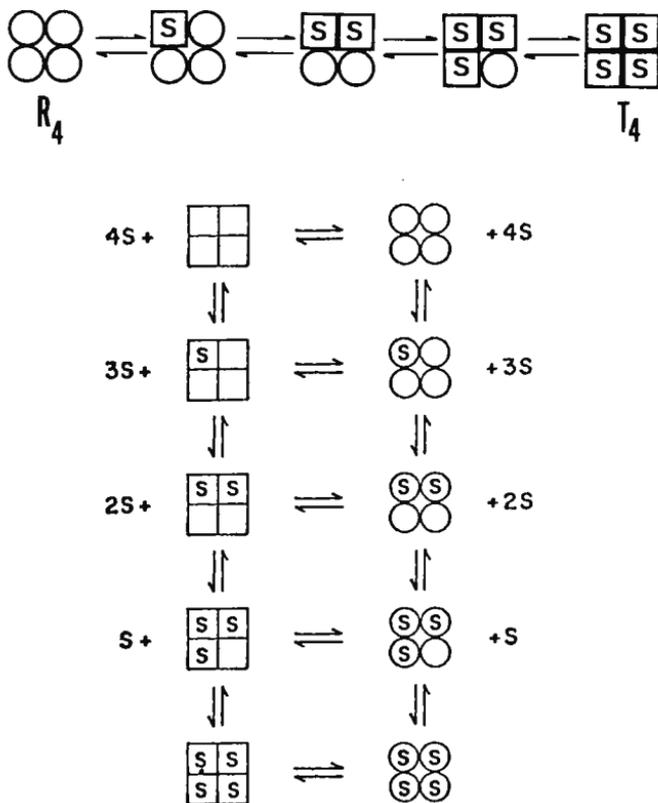


Figura 26

El modelo de Koshland predice los efectos homotrópicos y heterotrópicos tanto positivos como negativos. Este modelo, de naturaleza secuencial, no necesita definir el proceso operativo de los señalados anteriormente, pero tiende a favorecer los procesos  $K'_s K'_t$  y  $K''_s K''_t$ , en tanto que el modelo de simetría favorece el proceso  $K_s K_t$ . El modelo de Koshland sugiere la presencia de muchos estados conformacionales intermedios y finales, puesto que la estructura estabilizada implica una interacción complementaria de ligando y proteína más que la estabilización de una determinada estructura.

La variación de energía libre «standard» para la transformación de un protómero en estado  $R$  a la forma  $T$  es la suma de tres términos: (1) un término «intrínseco», considerado como la variación de energía libre «standard» para la transformación configuracional del protómero, sin tener en cuenta las interacciones con los demás protómeros del sistema; (2) un término debido a la interacción del protómero con los demás protómeros en el estado  $T$ ; (3) un término debido a la interacción con los demás protómeros en el estado  $R$ . La contribución de los sumandos (2) y (3) dependerá de la geometría del sistema. A base de un tetrámero, Koshland analiza cuatro disposiciones espaciales (fig. 27): modelo tetraédrico (cada subunidad interacciona con las otras tres), modelo cuadrangular (cada subunidad interacciona con las dos adyacentes), modelo lineal (las subunidades del interior pueden interaccionar con las dos vecinas, y las extremas tan sólo con una) y modelo concertado (no depende de la geometría de las interacciones, ya que las subunidades cambian simultáneamente de conformación; se diferencia del modelo de Monod en que los requerimientos de simetría no son esenciales y en que las subunidades no se presentan en la conformación  $R$  cuando la enzima carece absolutamente de ligando).

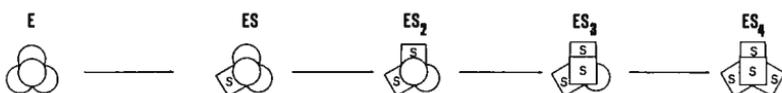
Whitehead (91) estudia la disposición tetraédrica del modelo de Koshland (las subunidades situadas en los vértices de un tetraedro regular) y de esta forma los términos (2) y (3) dependen simplemente de los contactos  $R-T$  y  $T-T$  existentes en la molécula.

De todas formas, cualquier disposición espacial de las subunidades tiene que acogerse a las características generales del modelo, que se centran en las principales siguientes:

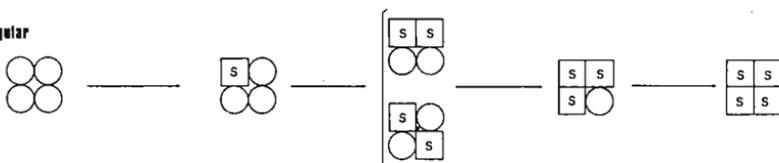
1. Las subunidades enzimáticas pueden presentarse en dos estados conformacionales,  $T$  y  $R$ . Una de las conformaciones, tal como

- $R$ , no posee afinidad apreciable por el ligando y se presenta cuando la subunidad está carente de ligando (cf. fig. 27).
- La otra conformación,  $T$ , posee gran afinidad por el ligando y se presenta cuando la subunidad está unida a una de tales moléculas de ligando.
  - La unión de una molécula de ligando a una de estas subunidades induce en ella tan sólo un cambio conformacional desde la forma  $T$  a la forma  $R$ .

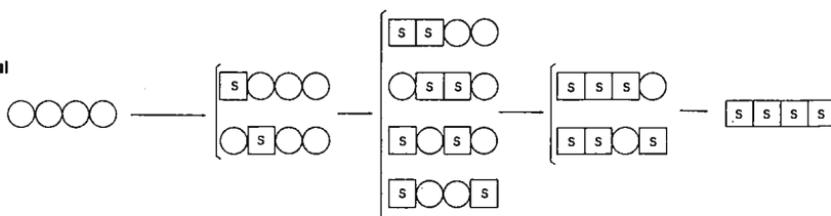
## Tetraédrico



## Cuadrangular



## Lineal



## Concertado



Figura 27

- Debido a la interacción positiva con las demás subunidades en el seno de la estructura cuaternaria, las subunidades vacías experimentan secuencialmente el cambio conformacional de la forma  $R$  a la forma  $T$  con una facilidad cada vez mayor, a medida que va teniendo lugar la unión sucesiva de los ligandos.

5. Por todo ello, el grado de unión del ligando y, en consecuencia, la magnitud de la transformación estructural de las subunidades son dependientes de la concentración del ligando.

Si en la referida disposición tetraédrica se considera la forma  $T_0$  en la que una subunidad  $R$  adopte la configuración  $T$ , el cambio de energía libre «standard» que tiene lugar en el proceso dispondrá de un término (1) «intrínseco»  $\Delta G_T$ , un término (3) que dará cuenta de los tres contactos  $R-T$ ,  $3\Delta G_{RT}$ , sin que exista contribución (2), al no existir interacción entre protómeros en el estado  $T$ ,

$$\Delta G_1^0 = 3\Delta G_{RT} + \Delta G_T$$

En la transición  $T_0$  a  $T_2$ , el término «intrínseco» será  $2\Delta G_T$ , al que deberán añadirse la contribución (2)  $\Delta G_{TT}$  debido a la interacción  $T-T$  y la contribución (3)  $4\Delta G_{RT}$  debido a las cuatro interacciones  $R-T$ , con lo que se tendrá:

$$\Delta G_2^0 = 4\Delta G_{RT} + \Delta G_{TT} + 2\Delta G_T.$$

Por análogos razonamientos se tendría:

$$\Delta G_3^0 = 3\Delta G_{RT} + 3\Delta G_{TT} + 3\Delta G_T$$

$$\Delta G_4^0 = 6\Delta G_{TT} + 4\Delta G_T.$$

Las constantes de equilibrio que aparecen en la descripción de estos modelos pueden correlacionarse con los términos de energía libre mediante la relación  $\Delta G^0 = -RT \ln K$ . Por otro lado, debe tenerse en cuenta (fig. 28) que la forma  $T_1$  representa en realidad cuatro moléculas con su correspondiente constante de equilibrio ( $L'_1$ ) con  $T_0$ . Así, pues, resulta:

$$L_1 = 4L'_1 = 4K_{RT}^3 K_T$$

$$L_2 = 6L'_2 = 6K_{RT}^4 K_{TT} K_T^2$$

$$L_3 = 4L'_3 = 4K_{RT}^3 K_{TT}^3 K_T^3$$

$$L_4 = L'_4 = K_{TT}^6 K_T^4$$

( $K_T$ ,  $K_{RT}$  y  $K_{TT}$  son las constantes de equilibrio correspondientes a  $\Delta G_T$ ,  $\Delta G_{RT}$  y  $\Delta G_{TT}$ ).

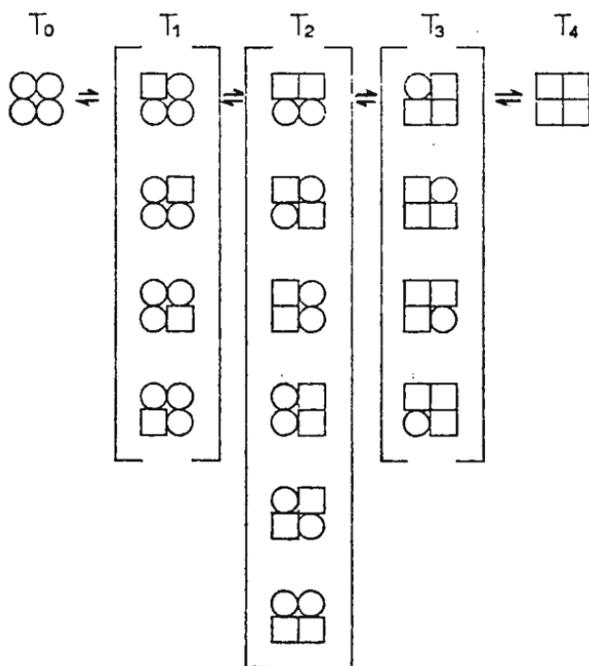


Figura 28

Una simplificación de estas relaciones puede obtenerse por definición de una nueva constante  $K = K_{TT}/K_{RT}^2$ , con lo que resulta:

$$L_1 = 4L'_1, \quad L_2 = 6KL'_1{}^2, \quad L_3 = 4K^3L'_1{}^3, \quad L_4 = K^6L'_1{}^4$$

Una suposición que es esencial al modelo de Koshland es que un ligando impone una configuración a los protómeros, que la adoptarían en su ausencia sólo en una proporción prácticamente nula. Ello se expresaría matemáticamente diciendo que, para valores de  $\omega$  a los que  $\Omega$  es una

cantidad medible,  $B\omega \gg 1$ . La ecuación de unión tomaría en este caso la forma:

$$\bar{\Omega} = \frac{\sum_{i=0}^q iL_i(B\omega)^i}{q \sum_{i=0}^q L_i(B\omega)^i} = \bar{T}$$

Si solamente existieran dos configuraciones,  $R$  y  $T$ , el estado de la proteína, la población y las interacciones  $R$ - $R$ ,  $R$ - $T$  y  $T$ - $T$  vienen por completo determinadas por  $\bar{T}$ . Pero, en las condiciones de inducción y, por definición,  $\bar{T} = 0$  cuando  $\omega = 0$ , de modo que la energía libre total de la interacción entre subunidades cuando se añade suficiente  $\omega$  para llevar  $\bar{T}$  a un valor dado, depende sólo del valor de  $\bar{T}$ , y no de las concentraciones de ligandos, puesto que se inicia y se termina a los mismos niveles de energía de interacción. Además, bajo las condiciones de inducción,  $\bar{\Omega} = \bar{T}$ , de modo que las interacciones entre subunidades son las mismas que entre moléculas  $\omega$  unidas y la energía libre total de la interacción es una función de  $\bar{\Omega}$  y no de las concentraciones de ligandos.

Si en los razonamientos de Koshland tiene lugar  $\Delta G_{TT} \ll \Delta G_{RT}$ , el modelo queda reducido al de simetría. No tiene nada de extraño, pues, que ambos modelos —concertado y secuencial— (fig. 29) sean interpretados como situaciones límites. En el primero (MWC) se conserva la simetría estructural, en tanto que en el segundo (AKNF) un ligando induce el cambio del estado conformacional de una subunidad, que afecta la unión del siguiente ligando o de un ligando diferente a través de un cambio en la interacción entre las subunidades.

Koshland estudia las diferentes *disposiciones espaciales* de su modelo para las que define  $N_s$ , número medio de moléculas de sustrato unidas por molécula de enzima

$$N_s = n\bar{Y} = \frac{\text{sustrato unido}}{\text{enzima total}} = \frac{\sum_{i=0}^q i(ES_i)}{\sum_{i=0}^q (ES_i)},$$

donde  $i$ , como es habitual, representa el número de moléculas de  $S$  unidas a una especie molecular individual y  $q$  el número de subunidades por especie molecular. Los valores de  $N_s$  pueden estar comprendidos entre 0 y  $q$ .

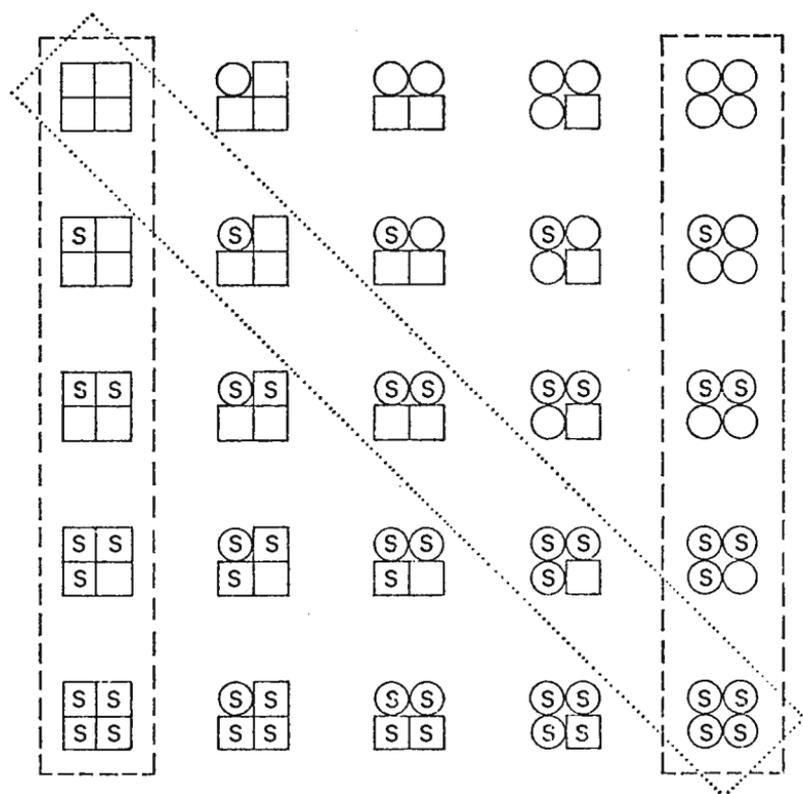


Figura 29

En la figura 30 aparecen las representaciones de  $N_s$  frente a  $(S)$  o  $\log(S)$  utilizadas por Koshland, así como la definición de dos constantes:  $(S_{0.5})$  o concentración de  $S$  cuando la mitad de las localizaciones se encuentran saturadas por el ligando, es decir, cuando  $\bar{Y} = 0.5$ ;  $R_s$  es la relación de la concentración de ligando para  $\bar{Y} = 0.9$  a la concentración para  $\bar{Y} = 0.1$ . Estas constantes son de gran valor en la comparación de las curvas sigmoideas con las clásicas de Michaelis-Menten.

Estas curvas de saturación son la representación de

$$N_s = \frac{4K_s K_t(S)}{1 + K_s K_t(S)}$$

para las que:

$$K_s \text{ (afinidad intrínseca del ligando para una subunidad)} = \frac{(TS)}{(T)(S)}$$

$$K_t \text{ (constante de equilibrio para el cambio de conformación)} = \frac{(T)}{(R)}$$

Veamos la forma que adquiere  $N_s$  en algunos ejemplos de disposiciones espaciales según el modelo de Koshland. En la disposición tetraédrica existirán cuatro formas equivalentes para unir una molécula de (S), seis formas para unir dos moléculas de (S), cuatro formas para unir tres

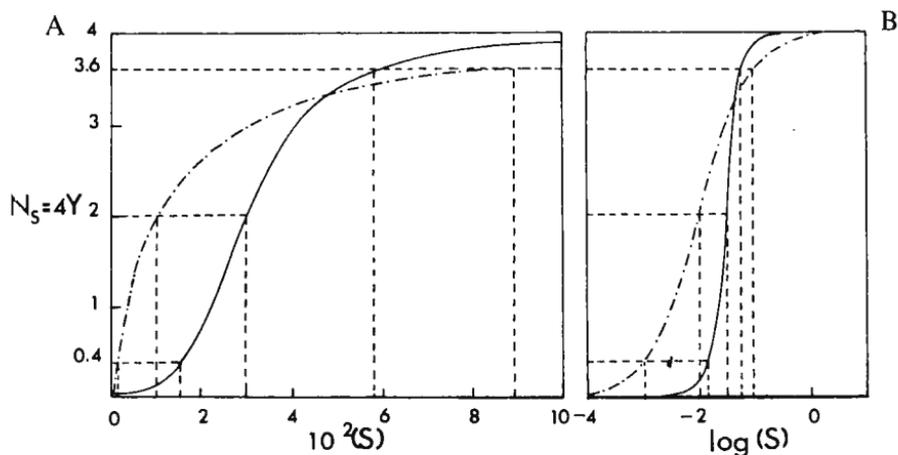


Figura 30

moléculas de (S) y una forma para unir cuatro moléculas de (S). Teniendo esto presente, las concentraciones de enzima que unen un número determinado de moléculas de (S) vienen dadas por las ecuaciones:

$$(ES) = (R_3 TS) = 4K_{RT}^3 [K_s K_t(S)](R_4)$$

$$(ES_2) = (R_2 T_2 S_2) = 6K_{RT}^4 K_{TT} [K_s K_t(S)]^2 (R_4)$$

$$(ES_3) = (RT_3 S_3) = 4K_{RT}^3 K_{TT}^3 [K_s K_t(S)]^3 (R_4)$$

$$(ES_4) = (T_4 S_4) = K_{TT}^6 [K_s K_t(S)]^4 (R_4)$$

y que sustituidos en la expresión de  $N_s$  dan:

$$N_s = \frac{4K_{RT}^3 K_s K_i(S) + 12K_{RT}^4 K_{TT} [K_s K_i(S)]^2 + 12K_{RT}^3 K_{TT}^3 [K_s K_i(S)]^3 + 4K_{TT}^6 [K_s K_i(S)]^4}{1 + 4K_{RT}^3 K_s K_i(S) + 6K_{RT}^4 K_{TT} [K_s K_i(S)]^2 + 4K_{RT}^3 K_{TT}^3 [K_s K_i(S)]^3 + K_{TT}^6 [K_s K_i(S)]^4},$$

en donde las constantes  $K_{RT}$  y  $K_{TT}$  vienen definidas por:

$$K_{RT} = \frac{(RT)(R)}{(RR)(T)}, \quad K_{TT} = \frac{(TT)(R)(R)}{(RR)(T)(T)}$$

Si  $K_{RT} > 1$  significa que la interacción de  $RT$  es más favorable que la interacción de  $RR$  y tiende a estabilizar el par  $RT$ , vecino, con respecto al par  $RR$ .  $K_{RR}$  se considera la unidad, ya que cualquier otro valor significaría un simple desplazamiento relativo en el estado «standard» y no un cambio en la relación de subunidades.

En el caso de la *variación denominada «concertada»* del modelo de Koshland, la conformación de las subunidades cambia simultáneamente en todas ellas (fig. 27) y se tendrá:

$$(T_4) = K_{ic}^4 (R_4)$$

en donde  $K_{ic}$  es la constante de equilibrio de la transición conformacional (la interacción de las subunidades cambia de modo concomitante con el cambio de conformación). Las concentraciones de  $ES_i$  tendrán en este caso las formas:

$$(T_4S) = 4K_s(S)(T_4)$$

$$(T_4S_2) = 6K_s^2(S)^2(T_4)$$

$$(T_4S_3) = 4K_s^3(S)^3(T_4)$$

$$(T_4S_4) = K_s^4(S)^4(T_4) = K_s^4 K_{ic}^4 (S)^4 (R_4)$$

que otorgan a  $N_s$  el valor:

$$N_s = \frac{4K_s(S)[1 + K_s(S)]^3}{K_{ic}^{-4} + [1 + K_s(S)]^4},$$

ecuación ésta de saturación, cuya diferencia de la resultante del modelo de Monod estriba en la distinta posibilidad de unión del ligando a las

formas de la enzima; la ecuación derivada del modelo de Monod se transforma en la anterior con la suposición de que sólo una de las dos formas es capaz de unir  $S$ .

Las *curvas de saturación* ( $N_s$  en función de  $\log S$ ) correspondientes a las diferentes geometrías de interacción antes reseñadas han sido calculadas por Koshland utilizando unidades de representación computarizadas, a la vez que comprueba la simetría alrededor del punto medio.

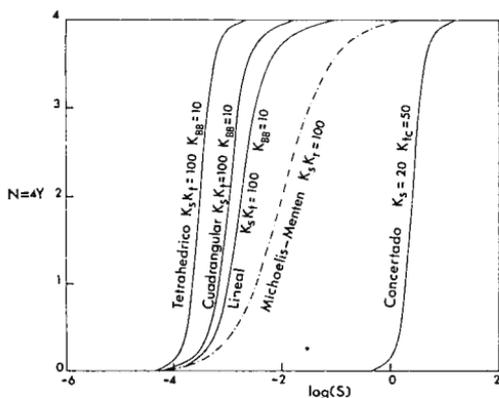


Figura 31

En la figura 31 aparecen las curvas correspondientes a las disposiciones espaciales tetraédrica, cuadrangular, lineal y concertada, comparadas con la curva de tipo Michaelis-Menten; todas las curvas están calculadas a base de las mismas constantes de unión y de transformación ( $K_s$  y  $K_t$ ) e interacciones moderadas entre las conformaciones ( $K_{TT} = 10$ ). En estas condiciones, la forma más empinada corresponde a la disposición tetraédrica, seguida de las disposiciones cuadrangular y lineal; sin embargo, el punto medio de las curvas se desplaza hacia concentraciones de sustrato más bajas, es decir, se requiere menos concentración de ligando para alcanzar la semi-saturación de la enzima (en el caso del mecanismo concertado, la elección de  $K_s$  y  $K_{lc}$  fueron hechas de forma que dieran la misma constante total del proceso  $R_4 + 4S = T_4 S_4$  que en el caso de la disposición cuadrangular). Las diferentes geometrías originan, pues, diferentes curvas de saturación

a base de las mismas constantes intrínsecas, las que, sin embargo, pueden hacerse coincidir mediante selección adecuada de las constantes de equilibrio.

La variación de  $K_s K_t$  o de  $K_{TT}$  (siendo  $K_{RT} = 1$ ) da lugar a variaciones en las curvas de saturación. Así, cuando  $K_{TT} > 1$ , se observa un desplazamiento de  $S_{0.5}$  hacia valores más bajos y una tendencia a exhibir una transición más aguda al aumentar  $K_{TT}$ . Cuando  $K_{TT} < 1$ , la curva tiende a hacerse plana para valores de  $N_s = 2$ . Es este un simple ejemplo de las variaciones que experimentan las curvas de saturación con la variación de las constantes; Koshland discute ampliamente estas variaciones al hacerlo además  $K_{RT}(K_{TT}$  y  $K_s K_t$  constantes) o ambas  $K_{RT}$  y  $K_{TT}$  simultáneamente. En la figura 32 se observan las representa-

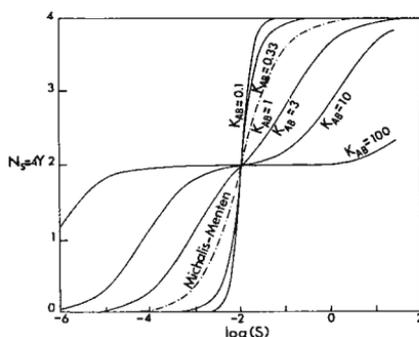


Figura 32

ciones de las curvas de saturación en el caso de la disposición cuadrangular en el caso de la variación de  $K_{RT}$ . (En la figura  $K_{AB}$ ).

El problema de índole práctica que se presenta ahora, así como en todos los casos en que se pretende investigar el ajuste de los datos experimentales a un modelo teórico, es obtener la curva teórica que más íntimamente se acerca a los datos experimentales y compararla con las curvas teóricas deducidas de los diferentes modelos. Este problema se plantea, pues, referido al procedimiento, más o menos preciso y cómodo, de ajuste de curvas. En este sentido se han desarrollado métodos de obtención de nomogramas que facilitan dicho ajuste; así, existe un

procedimiento para la obtención de nomogramas para la averiguación de  $n$  de la ecuación de Hill (92). Koshland, en el amplio estudio descriptivo de su modelo, desarrolla un método para la obtención de nomogramas que permiten muy buenos ajustes tan sólo a base de tres puntos de la curva sigmoidea:  $S_{0.5}$  y los dos puntos de saturación al 10 por 100 y 90 por 100 (o su relación  $R_s$ ).

A la vista de los resultados que Koshland discute acerca del ajuste de los datos experimentales a las descripciones teóricas de los modelos (Monod y Koshland) y sus supuestos fundamentales, es difícil distinguir con rigor dicho ajuste tan sólo haciendo uso de los datos suministrados por las curvas de saturación. Ante ello, Koshland (cf. nota 88) estudia profundamente un modelo de proteínas oligoméricas capaz de unir dos ligandos y las posibilidades —mediante mecanismos varios— de incidir sobre parámetros del tipo de la velocidad máxima ( $V_{\max}$ ), el punto medio de la curva de saturación ( $S_{0.5}$ ) y la extensión de la cooperatividad de dicha curva ( $R_s$ ).

Al existir, por lo pronto, dos ligandos ( $X$  y  $L$ ) que pueden funcionar como dos sustratos, sustrato y activador, sustrato e inhibidor, cada subunidad del oligómero podrá poseer una localización de unión para  $X$  y otra para  $L$ . Pero, a la vez, esta existencia de dos ligandos introduce una notoria complejidad ante la necesidad de tener presentes las posibles permutaciones.

Para la producción de efectos cooperativos es suficiente que uno de los ligandos sea capaz de inducir un cambio conformacional que afecte a la interacción de las subunidades, y supóngase que  $X$  produce invariablemente este cambio, en tanto que  $L$  puede o no ocasionar este cambio. De esta forma, para una subunidad determinada que pueda unir ambos ligandos, son posibles cuatro conformaciones: sin ligando alguno, con  $X$ , con  $L$  y en cuarto lugar con ambos  $X$  y  $L$ , con lo que se multiplica de forma notable la posibilidad de interacciones diferentes entre subunidades. En la figura 33 se representan ejemplos de especies moleculares que pueden resultar de la unión de un solo ligando  $X$  (figura A) y de dos ligandos  $X$  y  $L$  (figura B); la unión de  $X$  origina seis especies moleculares cuyo contenido en ligando puede variar de 0 a 4 y cuya presencia va siempre acompañada del cambio conformacional de la subunidad correspondiente a la que se une; este cambio conformacional puede afectar la interacción entre las subunidades ( $K_{RT} \neq 1$  ó  $K_{TT} \neq 1$ ) o puede no hacerlo ( $K_{RT} = K_{TT} = 1$ ). La presencia de  $X$  y  $L$  simultáneamente da lugar a gran número de especies moleculares

diferentes, algunas de las cuales aparecen en la figura B, en las que pueden aparecer variadas las proporciones de  $X$  y  $L$  así como la posibilidad de  $L$  de inducir o no al cambio conformacional. Por ejemplo, en las especies  $a$ ,  $b$  y  $c$ , el ligando  $L$  está unido al estado conformacional  $R$ , en tanto que en las especies  $d$ ,  $e$ ,  $f$  y  $g$  está unido al estado conformacional  $T$ ; la unión de  $X$  ha producido en todos los casos el cambio conformacional y dicho ligando aparece siempre en el estado  $T$ .

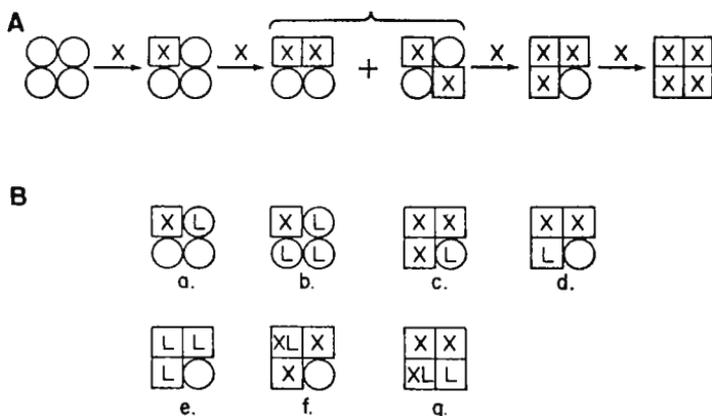


Figura 33

Por otro lado, la posibilidad de unión de dos ligandos a la misma subunidad hace que ello pueda realizarse de modos diferentes (Fig. 34); en una primera situación,  $X$  o  $L$  pueden unirse a la subunidad separadamente, con lo que se establece una competencia entre los ligandos y que, a su vez, se puede lograr mediante la unión de  $L$  al estado conformacional  $R$  o al  $T$ ; en una segunda situación, la unión de  $X$  y  $L$  puede ser independiente, y ambos ligandos pueden situarse en la misma subunidad, con la misma diferencia de formas antes apuntada por lo que se refiere a las dos posibilidades de unión de  $L$ ; la unión ordenada de los ligandos  $X$  y  $L$  permite la unión simultánea de ambos a través de sucesivas uniones que lógicamente pueden exhibirse alternadas.

Desde el punto de vista de las ecuaciones de saturación, la forma relativamente sencilla que hemos visto anteriormente tienen las ecua-

ciones de  $N_s$  en función de  $S$ , se complica por la presencia de los dos ligandos. En la exposición general del modelo de Koshland han quedado expuestos los valores de  $N_s$  en los casos de disposiciones espaciales

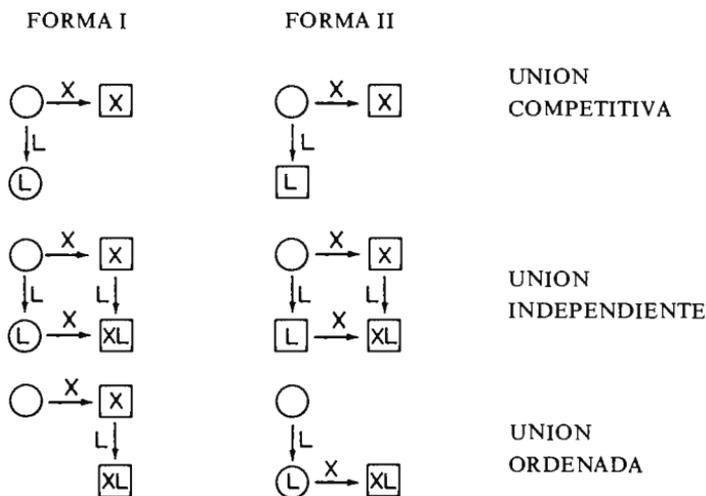


Figura 34

tetraédricas y concertada; la forma general de la ecuación de unión de un único ligando,  $X$ , al tetrámero es:

$$N_x = \frac{\theta_1(X) + 2\theta_2(X)^2 + 3\theta_3(X)^3 + 4\theta_4(X)^4}{\theta_0 + \theta_1(X) + \theta_2(X)^2 + \theta_3(X)^3 + \theta_4(X)^4},$$

en la que las funciones  $\theta$  están relacionadas con las especies  $R_4$ ,  $R_3TX$ ,  $R_2T_2X_2$ ,  $RT_3X_3$  y  $T_4X_4$  y son dependientes de las constantes de afinidad ( $K_X$ ), del cambio de conformación ( $K_i$ ) y del cambio en la interacción entre las subunidades ( $K_{RT}$  y  $K_{TT}$ ); funciones que varían con la disposición espacial utilizada para la discusión del modelo.

Dicha ecuación general aparece transformada en la expresión general

$$N = \frac{\psi'_1(\text{ligando}) + 2\psi'_2(\text{ligando})^2 + 3\psi'_3(\text{ligando})^3 + 4\psi'_4(\text{ligando})^4}{\psi_0 + \psi_1(\text{ligando}) + \psi_2(\text{ligando})^2 + \psi_3(\text{ligando})^3 + \psi_4(\text{ligando})^4} =$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^n i\psi'_i(\text{ligando})^i}{\sum_{i=0}^n \psi_i(\text{ligando})^i}$$

en la que  $N$  puede ser  $N_{Xt}$  (cantidad total de  $X$  unido por mol de proteína) y  $N_{Lt}$  (cantidad total de  $L$  unido por mol de proteína), en cuyos casos los términos  $\psi'_i$  son iguales a los  $\psi_i$ ; cosa que no ocurre cuando  $N$  sea  $N_X$  (cantidad total de  $X$  unido a las subunidades que no contienen  $L$ ),  $N_L$  (cantidad total de  $L$  unido a las subunidades que no contienen  $X$ ),  $N_{XL}$  (cantidad total de  $X$  unido a las subunidades que asimismo contienen,  $L$ ) y  $N_{LX}$  (cantidad total de  $L$  unido a las subunidades que asimismo contienen  $X$ ). Los términos  $\psi$  y  $\psi'$  para la unión de dos ligandos han sido obtenidos por Kirtley y Koshland a partir de los términos  $\theta_i$  de la ecuación general en presencia de un solo ligando; términos obtenidos para las diferentes situaciones y formas antes reseñadas de la unión de ambos ligandos a las subunidades constituyentes de una proteína tetramérica. Mediante este procedimiento se llega a las ecuaciones de  $N$  y al cálculo de las curvas correspondientes con la correspondiente observación de los parámetros apuntados  $V_{\max}$ ,  $S_{0,5}$  y  $R_s$ . La contemplación de las variaciones de estos parámetros en las situaciones y formas de unión de los ligandos permite discriminar en cierta medida entre los mecanismos operativos que puedan ofrecerse como posibilidades alternativas en sistemas enzimáticos particulares.

Hay que tener en cuenta que, para cualquier combinación de los parámetros observados, sólo necesita ser considerado un número muy limitado de diferentes modos de unión y, en ciertos casos, sólo uno de ellos es consistente con los resultados; las ambigüedades que, indudablemente, pueden existir se pueden eliminar en otras experiencias en que se cambien sistemáticamente los ligandos.

Koshland ha estudiado el comportamiento de dos sistemas enzimáticos, dCMP amino-hidrolasa e isocitrato deshidrogenasa a la vista de los planteamientos anteriores. Por ejemplo, la dCMP amino-hidrolasa

posee como sustrato dCMP y un activador (dCTP), así como un inhibidor (dTTP); al utilizar dCMP como ligando variable y dCTP o dTTP como ligandos fijos, se observan las variaciones en los parámetros cinéticos, las que son consistentes con la forma II de la unión independiente, siendo *L* activador, o con la forma I de unión ordenada, siendo *X* activador; la unión ordenada del activador seguida de la del sustrato quedó desechada, porque la enzima resulta activa en ausencia del activador y se estima, pues, como única alternativa la unión independiente de ambos ligandos —sustrato y activador— que provoca el cambio conformacional de la subunidad y el consiguiente incremento de las interacciones.

Más recientemente, el modelo secuencial de inducción por ligandos se ha visto refinado (93), con objeto de interpretar situaciones cinéticas supuestamente anormales. Este refinamiento supone que en una proteína compuesta de subunidades idénticas, el contacto de una subunidad con dos adyacentes ocurrirá a través de diferentes residuos de aminoácidos

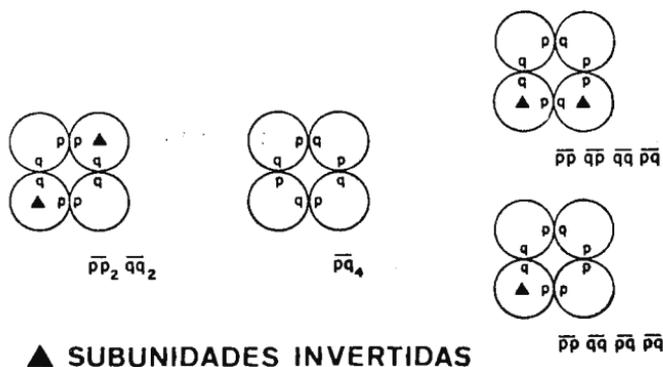


Figura 35

o, de forma más general, a través de diferentes dominios de unión (*p*, *q*, *r*, etc.). Ha quedado con anterioridad mencionado que una interacción *pp* será isóloga, en tanto que una interacción *pq* será heteróloga. La naturaleza de las interacciones —isólogas, heterólogas o mixtas— dependerá del número de subunidades y de su orientación; un ejemplo de estas interacciones en el seno de una proteína tetramérica aparece en la figura 35. Para distinguir las diversas interacciones entre subunidades

$R$  y  $T$ , se podrán definir como  $K_{RTqp}$ ,  $K_{RTpq}$ ,  $K_{RTpp}$ , tal y como se observa en la figura 36.  $K_{XT}$  es la constante de afinidad del ligando  $X$  —sustrato o modificador— que se une a la particular conformación  $T$ .  $K_{RT}$  es la constante de equilibrio del cambio conformacional correspondiente.

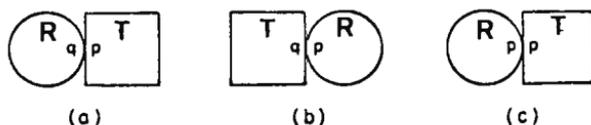


Figura 36

La figura 37 considera un tetrámero a base de subunidades  $R$  con dominios de unión  $\overline{pp}$ ,  $\overline{qq}$ ,  $\overline{pq}$  y  $\overline{qp}$  que unen dos moléculas de ligando  $X$  según:



$R_2T_2X_2$  puede presentarse bajo seis formas diferentes (fig. 37), y si se

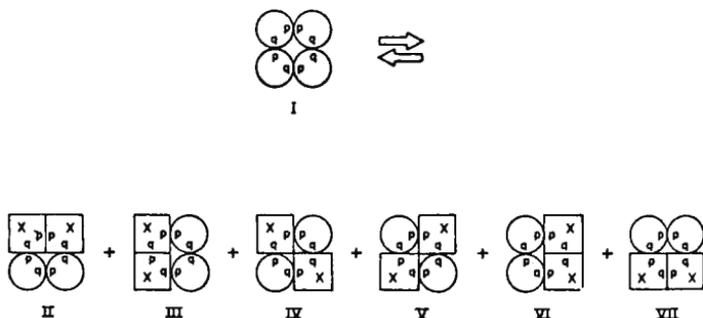


Figura 37

considera únicamente el equilibrio  $I \rightleftharpoons II$ , se requieren los siguientes términos:  $K_{RT}^2$ , en virtud de los cambios de  $2R$  en  $2T$ ;  $K_{XT}^2$ , responsable

de la unión de  $2X$  a la conformación  $2T$   $K_{RTqq}$ ,  $K_{RTpq}$  y  $K_{TTpp}$ , debido a los cambios en las interacciones de las subunidades; finalmente, un factor estadístico de  $R_4$ . De ello resulta,

$$\text{Especies tipo II} = (R_4)K_{RT}^2 K_{XT}^2 K_{RTqq} K_{RTpq} K_{TTpp} (X)^2$$

Si se tienen en cuenta las seis diferentes especies:

$$\psi_2 = \frac{R_2 T_2 X_2}{(R_4)(X)^2} = (K_{XT} K_{RT})^2 [K_{RTqq} K_{RTpq} K_{TTpp} + K_{RTpp} K_{RTqp} K_{TTqq} + K_{RTqp} K_{RTqq} K_{TTpq} + K_{RTpp} K_{RTpq} K_{TTpq} + 2K_{RTpp} K_{RTqq} K_{RTpq} K_{RTqp}]$$

Esta expresión no es sino la curva de saturación, definida por  $\psi_2$ , resultante de la combinación de toda la serie de parámetros moleculares mencionados. Los términos  $\psi(\psi_1, \psi_2, \psi_3, \psi_4)$  representan simplemente la constante de asociación de la formación de la proteína conteniendo  $i$  (1, 2, 3, 4) moléculas de ligando a partir de la proteína sin ligando y ligando libre. La ecuación de saturación seguirá teniendo la forma general

$$nY = \frac{\sum_{i=1}^n i\psi_i(X)^i}{1 + \sum_{i=1}^n \psi_i(X)^i}$$

pero con la complicación introducida por la significación de  $\psi_i$ . Si  $n = 4$  (número total de localizaciones de unión) y siendo  $Y$  la habitual fracción de saturación:

$$4\bar{Y} = \frac{\psi_1(X) + 2\psi_2(X)^2 + 3\psi_3(X)^3 + 4\psi_4(X)^4}{1 + \psi_1(X) + \psi_2(X)^2 + \psi_3(X)^3 + \psi_4(X)^4}$$

Cornis-Bowden y Koshland han calculado los términos  $\psi_i$  de las curvas de saturación para distintas disposiciones espaciales tetraméricas que comparan con las ecuaciones dadas por otros modelos. En la figura 38 se representa  $N_x$  (número medio de moléculas de ligando  $X$  unidas por molécula de proteína) frente a  $\log(X)$  para un tetrámero todo heterólogo

exhibiendo cooperatividad positiva (a), negativa (c) y no cooperatividad (b). La simetría o asimetría de las curvas de unión y el grado de cooperatividad que en cada caso se obtienen han sido utilizados para discriminar entre modelos diferentes según el razonamiento expuesto

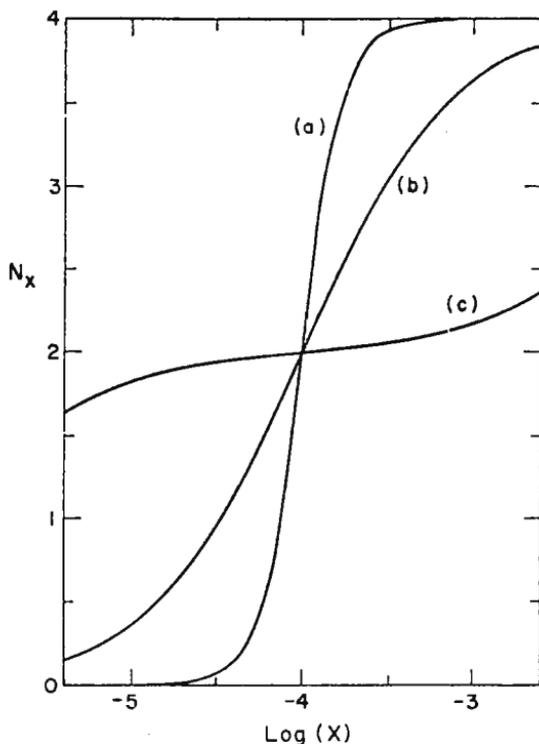


Figura 38

en el estudio de interacción con dos ligandos. El presente tratamiento, con la consideración de los dominios de unión, implica en la mayoría de los casos ciertos cambios en las ecuaciones de unión, lo que posibilita el estudio más detallado y profundo del comportamiento cinético de las proteínas reguladoras.

Se trata, pues, de intentos sucesivos de explicar la cooperatividad



de las proteínas alostéricas en términos de cambios conformacionales que ocurren en una subunidad, sin que de modo necesario tengan lugar cambios equivalentes en las demás subunidades; presencia ésta de los estados conformacionales híbridos que es sustancial al modelo de Koshland, Nemethy y Filmer, los que afectan en distinto grado al resto de las subunidades. El cambio en la estructura de la proteína oligómera puede ocurrir en este modelo antes o después de la unión del ligando, aunque se supone implícitamente que el ligando juega un papel fundamental en la consecución del estado conformacional final. Ofrece este modelo de Koshland como característica fundamental su generalidad frente a la simplicidad que representa el modelo de Monod, fundado en la simetría de la interacción.

#### 4. PROBLEMÁTICA DE LOS MODELOS ALOSTÉRICOS

En el momento de asignar el comportamiento enzimático particular a cualesquiera de estos modelos, hay que tener presente que las simples curvas de saturación no pueden llevar a cabo por sí solas dicha distinción, y es necesario acudir a criterios adicionales. Entre estas posibilidades cuentan la medida de las propiedades físicas de las proteínas e incluso la obtención de datos cinéticos clásicos, velocidad máxima ( $V_{\max}$ ), punto medio de saturación ( $S_{0.5}$ ) y alcance de cooperatividad de la curva de saturación ( $R_s$ ). Kirtley y Koshland (cf. nota 88) encuentran que la aplicación de estos parámetros puede por sí misma conducir a un cierto grado de discriminación.

La unión de ligandos y la cinética en «steady-state» suministran de hecho una importante información, pero muchas de las etapas de las reacciones enzimáticas ocurren a velocidades no accesibles a dichas técnicas. Con este objeto se han desarrollado los métodos basados en la espectrometría de relajación, y en particular el procedimiento denominado de salto de temperatura («T-jump»), que se estudia con detalle en otro lugar de esta obra.

Un punto, sin embargo, que ha sido objeto de discusión es si, para la interpretación de los datos cinéticos —relación sigmoidea entre velocidades y concentraciones de sustrato—, hay necesariamente que acudir a las interacciones alostéricas entre subunidades (modelos de Monod y de Koshland) o incluso a los modelos que hacen uso de proteínas con múltiples localizaciones, pero sin la intervención de la interacción entre subunidades (94-95). Algunos autores (96) discuten otras

alternativas diferentes de la cooperatividad para la interpretación de los datos sigmoideos con tal de que exista más de un proceso conducente a la unión de una molécula de sustrato a la única localización activa. Así, cualquier modelo que pueda conformarse con una ecuación de velocidad cuya forma recíproca posea términos en  $(S)$  elevados a potencias inferiores a  $-1$ , es capaz de explicar los resultados sigmoideos. Sweeny y Fisher (cf. nota 96) describen un grupo de modelos cuyas ecuaciones pueden reducirse a

$$\frac{1}{V} = a + b(S)^x,$$

siendo  $x$  igual o inferior a  $-2$ . Estos modelos no requieren cooperatividad o la unión de más de una molécula de sustrato a cada localización catalítica para exhibir sigmoicidad. En estos modelos, un cambio en una constante de velocidad puede inducir o eliminar dicha sigmoicidad, de forma que cambios en la conformación de una enzima pueden inducir variaciones en la magnitud relativa de las constantes de velocidad y de aquí provocar variaciones en las características cinéticas.

La existencia de este tipo de alternativas para la interpretación de los datos cinéticos sin hacer intervenir la interacción entre subunidades ha sido asimismo descrita por otros autores (97) (cf. nota 75).

Aun teniendo en cuenta la aceptación de esta posible situación cinética, debe hacerse notar que tampoco la derivación en perfecto «steady-state» es explicación primaria de las anomalías de dichos sistemas enzimáticos. Ya se ha visto con anterioridad (cf. nota 73) cómo existen gran número de condiciones —por ejemplo, la identidad de ciertas constantes de velocidad o de sus relaciones— que, impuestas a las más complejas ecuaciones de velocidad derivadas del «steady-state», dan lugar a formas similares a las derivadas por métodos de equilibrio rápido. La suposición de equilibrio entre sustrato y enzima conduce, asimismo, a semejante simplificación; cálculos sencillos muestran que, en las etapas de unión, se alcanza el equilibrio en menos de  $10^{-3}$  segundos.

A pesar, sin embargo, de estas restricciones, lo que se manifiesta conceptualmente como de gran interés y como una seria objeción a los tratamientos cinéticos del «steady-state», es que las curvas de saturación sigmoideas no son reflejo de modo necesario de la interacción de múltiples localizaciones. La información cinética obtenida a partir del «steady-state» es, por tanto, insuficiente para permitir de forma inequí-

voca asignaciones precisas de mecanismos formales. Dicha información se limita a la obtención de datos acerca de la velocidad de las etapas limitantes ( $V_{\max}$ ) y a las constantes de disociación aparentes de sustratos ( $K_m$ ) o efectores ( $K_i$ ) hacia la enzima. Sus ventajas se centran en la posibilidad de utilizar preparaciones enzimáticas no purificadas y en las pequeñas cantidades requeridas para el estudio.

Los datos que puedan obtenerse mediante el tratamiento cinético del «steady-state» acerca de los mecanismos de regulación alostérica son del mismo orden que los deducidos por estudios directos de unión de ligandos. Este tipo de experiencias necesita, sin embargo, el empleo de enzimas en forma pura y grandes cantidades; sus resultados describen las interacciones no covalentes entre sustratos y modificadores y las múltiples localizaciones de la enzima, así como permiten determinar el número de localizaciones de unión para cada ligando.

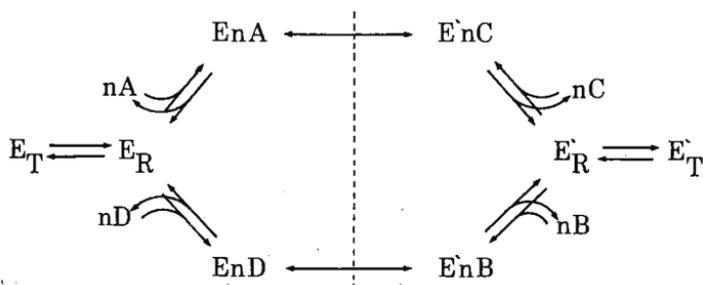
La limitación que, en su conjunto, ofrecen los métodos de obtención de datos en el equilibrio es que solamente ofrecen una visión global del comportamiento de los sistemas complejos.

En la excelente crítica de los métodos en general y de la evaluación de los métodos cinéticos en particular, Kirschner (98) establece que la validez de un modelo particular sólo puede instituirse cuando se excluyen necesariamente los demás. Si la información deducida de los estudios directos de unión de ligandos es tan insuficiente como el tratamiento cinético para la asignación del mecanismo operativo, se impone el enfrentamiento del problema con una metodología que obtenga parámetros relacionados con la conformación y estructura de la proteína o que mida las constantes de equilibrio individuales implicadas en los procesos de cooperatividad. La cristalografía de rayos X y el estudio de las reacciones rápidas son los tratamientos hoy más capaces para enfrentarse con la dualidad mencionada.

Una vez más debe insistirse en que uno de los métodos más útiles al establecimiento de mecanismos formales consiste en el estudio de las reacciones rápidas. Las condiciones experimentales propias de este tipo de técnicas permiten la detección de las especies presentes en los diferentes mecanismos a lo largo del tiempo, lo cual supone —a su vez— una notable ventaja sobre los procedimientos de unión en el equilibrio. En los casos favorables, ello permite la observación directa de cada una de las etapas a intervalos propios y característicos de los procesos particulares.

Quizá en el seno de esta problemática deba hacerse mención de que

si bien, efectivamente, los esquemas cinéticos complicados pueden surgir de las propiedades alostéricas, esto es, de los cambios conformacionales reversibles de la molécula de enzima inducidos por la unión de ligandos, y también del orden de la unión de sustratos y liberación de productos con que ocurre la reacción enzimática a base de dos o más sustratos y productos, en este segundo caso no se dan transiciones moleculares de la proteína enzimática. Ahora bien, el examen de las propiedades alostéricas de un sistema enzimático capaz de presentar un mecanismo «ping-pong» ofrece situaciones cinéticas complicadas por la oscilación de la enzima entre varias formas estables (99). Estas características cinéticas han sido estudiadas por Sumi y Ui (100), haciendo uso de la teoría de equilibrio parcial (101). En este tipo de supuesto, la enzima oligomérica —adaptable para simplificación al modelo de Monod— puede, por un lado, participar del equilibrio entre los estados  $R$  y  $T$ , y por otro, existir bajo las formas  $E$  y  $E'$  estables e igualmente responsables de la actividad enzimática, una de las representaciones de este tipo de esquemas cinéticos es:



en que  $A$  y  $B$  son los sustratos que unen, respectivamente, a  $E$  y  $E'$  a base de  $n$  subunidades;  $D$  y  $C$  son los productos de la reacción. El esquema exhibe dos zonas de equilibrio rápido, una relativa a la unión y disociación de  $E$ , y la otra a las de  $E'$ . Estas zonas se encuentran ligadas a través de etapas lentas limitantes de la velocidad de reacción total. La ecuación de velocidad derivada para el anterior esquema cinético es:

$$\frac{v}{\bar{n}} = \frac{k_1 k_2 A B E_0}{k_1 K_B A \left( 1 + \frac{B}{K_B} + \frac{L}{\left( 1 + \frac{B}{K_B} \right)^{n-1}} \right) + k_2 K_A B \left( 1 + \frac{A}{K_A} \right)},$$

siendo  $K_A$  y  $K_B$  las constantes de disociación de  $EA$  y  $E'B$ , respectivamente, y  $k_1$  y  $k_2$  las constantes de velocidad de las etapas limitantes de la velocidad de la reacción correspondientes a  $EA$  y  $E'B$ ;  $E_0$  es la concentración total de la enzima.

Ciertos autores (102) sugieren que, en algunos casos en que no se observan cambios en las conformaciones terciarias, no es necesario acudir a los cambios conformacionales descritos por los modelos anteriores para interpretar los efectos alostéricos y cooperativos, y desarrollan una teoría alternativa denominada de exclusión estérica de ligandos a través de interacciones entre ligandos multifuncionales que se unen a localizaciones comunes y topológicamente distintas. En la figura 39

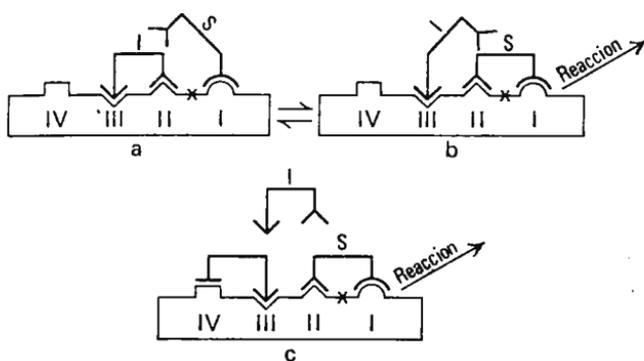


Figura 39

se representa la superficie de una enzima poseedora de cuatro localizaciones, cada una de ellas capaz de unir un grupo funcional de un ligando. La enzima puede unir tres tipos de ligandos, poseedores cada uno de ellos de dos grupos funcionales que son capaces de unirse independientemente a una localización. Cada ligando bifuncional puede unirse a la enzima a través de una o dos localizaciones, y el sustrato deberá unirse a ambas localizaciones (I y II) para que se manifieste la actividad catalítica.

En ausencia de activador, ambos, inhibidor y sustrato, pueden unirse a la enzima de modo simultáneo según (a) y (b), pero en un momento dado sólo un ligando puede unirse a través de dos localizaciones. La unión de un ligando activador a las localizaciones III y IV resulta (c) en que la inhibición resulta impedida. Así, una enzima poseedora de este

o similar comportamiento podría describirse como alostérica. De igual manera, el complejo activo de una reacción con dos sustratos, en que uno de ellos suministra una localización específica para la unión del segundo, da lugar necesariamente a una reacción ordenada de tipo secuencial en que cada uno de los sustratos incrementa la unión del otro de forma cooperativa. Si los dos sustratos son idénticos, la ecuación cinética es

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha S^2}{1 + \beta S + \alpha S^2},$$

que permite una dependencia sigmoidea de la velocidad con la concentración del sustrato.

Otro tipo de sistema propuesto por los mismos autores (fig. 40)

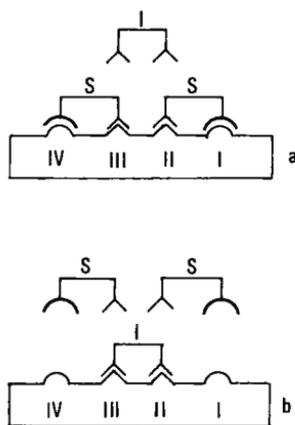


Figura 40

supone que la enzima puede unir el sustrato bajo dos formas diferentes e independientes, I-II y III-IV, de las que sólo una es activa; la enzima puede unir asimismo un inhibidor a la combinación de localizaciones II-III, cada una de las cuales forma parte de los respectivos sistemas de unión de los sustratos. Suponiendo que los ligandos se unan a la enzima tan sólo mediante la participación de su doble funcionalidad, resultan dos diferentes complejos (a) y (b); en el primero de ellos no hay posibilidad de unión para el inhibidor, mientras que, en el segundo caso, la

unión del inhibidor impide la de los sustratos. La ecuación resultante sería:

$$\frac{v}{V} = \frac{\alpha S + S^2}{(\alpha + \beta)S + S^2 + \alpha\beta(1 + \gamma I)}$$

y la velocidad de reacción tendrá una dependencia sigmoidea de la concentración del sustrato cuando exista una suficiente concentración de inhibidor; en ausencia de dicho inhibidor, la dependencia es por completo hiperbólica.

Si en este mismo sistema la enzima estuviera constituida por dos subunidades (fig. 41) disociables, la disociación habría de rendir las

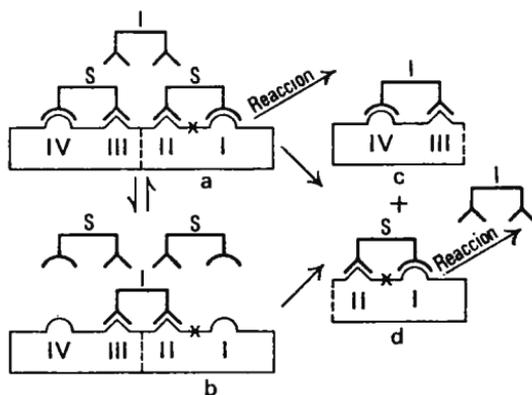


Figura 41

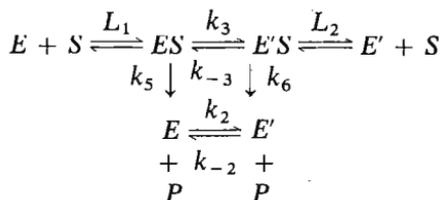
subunidades (c) y (d) y solamente la segunda sería catalíticamente activa; el sistema exhibiría una cinética hiperbólica normal aun en presencia de cualquier concentración de inhibidor. La disociación en subunidades en este tipo de sistemas conduce, pues, a una hiperbólica normalización de la primera cinética sigmoidea.

Las teorías conformacionales explican el efecto de un ligando sobre la capacidad de unión de otro, como resultado de una conexión sucesiva ligando-enzima-ligando, mientras que la presente teoría de exclusión de ligandos daría lugar al mismo efecto a través de una conexión directa ligando-ligando; las consecuencias cinéticas serían, sin embargo, del mismo tipo en ambos casos. Cross y Fisher (103) estudian la unión múltiple de varios ligandos a la glutámico deshidrogenasa y consideran la aplicabilidad de las situaciones antes mencionadas.

## VI. Histéresis enzimática

Las características cinéticas de las enzimas alostéricas vienen siendo sometidas a nuevas elaboraciones, como las que supone la presencia de procesos lentos al lado de los rápidos equilibrios de otras etapas de un conjunto metabólico. Ello ha conducido al establecimiento de la idea de histéresis y de enzimas histeréticas (104). Así, histéresis en las enzimas reguladoras es el tiempo que transcurre entre la inducción—cambio rápido en la concentración de ligandos— y la aparición de la respuesta bajo la forma de propiedades físicas o cinéticas. Enzimas histeréticas son las que responden de forma lenta a cambios rápidos en la concentración de ligandos. Etapa lenta que pueden ser los cambios conformacionales de las enzimas, lo que ofrece una notable repercusión sobre los mecanismos de regulación en su conjunto.

Estas etapas lentas pueden afectar de modo primario a diferentes tipos de procesos, isomerización, polimerización y desplazamiento de ligandos. Veamos, de acuerdo con Frieden (cf. nota 104) la forma de las ecuaciones cinéticas en un caso sencillo de isomerización en presencia de un solo sustrato. En este caso y teniendo presente la existencia de dos estados conformacionales de la enzima, el proceso en su conjunto podría considerarse,



(las constantes  $k_5$  y  $k_6$  representan la escisión de  $ES$  y  $E'S$ , complejos de los dos estados conformacionales de la enzima y el sustrato con afinidades diferentes). En este caso, la ecuación de saturación y la ecuación de velocidad adquieren la forma:

$$\bar{Y} = \frac{(S/L_1) + K_2(S/L_2)}{1 + (S/L_1) + K_2 \left(1 + \frac{S}{L_2}\right)}$$

$$\frac{v}{E_0} = \frac{k_5}{1 + \frac{L_1}{S} \left\{ \frac{1 + K_2}{1 + K_2 L_1/L_2} \right\}}$$

habiendo supuesto  $k_5 = k_6 = 0$  (se trata sólo de considerar la unión de ligandos) y que  $K_2 = k_2/k_{-2}$  en el equilibrio. La ecuación cinética se deriva de la ecuación de unión suponiendo que  $k_5$  y  $k_6$  son idénticas y que estas etapas son determinantes de la velocidad del proceso. El mismo mecanismo considerado en «steady-state» origina una expresión más compleja con términos en  $S^2$ .

Si se suponen las siguientes circunstancias: a) las etapas  $E + S \rightleftharpoons ES$ ,  $E' + S \rightleftharpoons E'S$  se encuentran en rápido equilibrio; b) la reacción en su conjunto es irreversible; c) la concentración de sustrato se mantiene constante, y d) no existe inhibición por productos, la velocidad obtenida es función del tiempo:

$$v_t = v_f + (v_0 - v_f)e^{-k't}$$

con tal de que las constantes de velocidad de isomerización ( $k_3, k_{-3}, k_2$  y  $k_{-2}$ ) sean suficientemente pequeñas.  $v_t$  es la velocidad a un tiempo  $t$  relativa al cambio en las condiciones de  $t = 0$ ,  $v_f$  es la velocidad a  $t = \infty$ ,  $v_0$  es la velocidad a  $t = 0$  y  $k'$  es una constante de velocidad muy compleja dependiente de  $S, L_1, L_2$  y las demás constantes de velocidad. Esta misma velocidad de cambio es aplicable en otras circunstancias, como cuando la enzima existe sólo bajo la forma  $E$  antes de la adición del sustrato y como cuando  $E$  y  $E'$  existen a tiempo cero.

El cambio de la concentración de producto en función del tiempo es,

$$\frac{dP}{dt} = v_f + (v_0 - v_f)e^{-k't} = v_f \left[ 1 - \left( \frac{v_f - v_0}{v_f} \right) e^{-k't} \right]$$

de donde,

$$P_t = v_f \left[ t - \frac{1}{k'}(1 - e^{-k't}) \right]$$

si  $v_0 = 0$ .

La formación de producto es función lineal del tiempo cuando  $e^{-k't} \ll 1$ .

La extensión de la fase de inducción (fase «lag») antes de alcanzar una velocidad constante de formación de producto depende de  $k'$ .

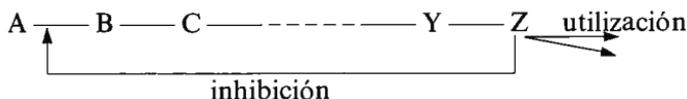
La situación es notablemente más compleja en presencia de sustrato y de modificador. En todos los casos estudiados por Frieden (cf. nota 104), las velocidades inicial y final manifiestan una dependencia del sustrato que puede calcularse suponiendo un equilibrio rápido de todas las especies enzimáticas implicadas. Si la velocidad de formación del pro-

ducto manifiesta una respuesta histerética después de la adición del sustrato, la velocidad final de la reacción enzimática es la que se obtiene cuando la formación del producto se hace lineal con el tiempo. Esta velocidad final puede exhibir una conducta alostérica en función de la concentración del sustrato, interpretable en término de los modelos propuestos por Monod o Koshland. Esta respuesta histerética no es, ciertamente, incompatible con los tratamientos cinéticos de dichos modelos; ello indica, tan sólo, una participación del factor tiempo en la transformación de los estados enzimáticos.

## VII. Esquemas generales de regulación enzimática

### 1. CONTROL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Uno de los más sencillos mecanismos de control biológico está basado en la auto-regulación de la concentración de un metabolito a través de la inhibición de una enzima esencial a su propia biosíntesis. Ello constituye un principio elemental de economía celular; la innecesaria presencia de un producto metabólico Z, ya sea debido a una síntesis elevada o a una falta de utilización, o a ambas cosas, obliga a la operación de un mecanismo que impida el incremento en la concentración de Z, y ello se logra por reducción de su propia biosíntesis al actuar Z como ligando de una enzima reguladora.



Estamos en presencia del más elemental mecanismo de «retroinhibición» (inhibición «feedback»), que opera generalmente sobre la primera enzima del proceso metabólico; enzima que ha de pertenecer al grupo de las denominadas «reguladoras» o «alostéricas», haciendo con ello mención a la función biológica o al mecanismo físico (no siempre coincidentes) operativos. Pero, en cualquier caso, lo que en el estado actual de la cuestión debe tenerse presente de modo fundamental es que las características cinéticas singulares que las enzimas reguladoras o alostéricas exhiben están fundadas en las interacciones entre subunidades constituyentes de la indispensable estructura cuaternaria de estas

enzimas. Toda una serie de resultados experimentales (105) llegan a la conclusión de que, aunque las subunidades parecen actuar como entidades independientes, es necesario cierto tipo de interacción subunidad-subunidad para la actividad catalítica, a lo que debe añadirse nuevas interacciones justificadoras de las características cinéticas anormales de estas enzimas.

El esquema acabado de exponer como ejemplo de este tipo de control enzimático por «retroinhibición» no es, ciertamente, único, sino que se presenta bajo diversas modificaciones con sus características propias en el orden regulador. El conjunto de mecanismos que han sido descubiertos y estudiados, merced preferentemente al metabolismo bacteriano de aminoácidos, pueden clasificarse siguiendo las líneas generales de Umbarger (106) en los siguientes apartados:

### I. *Inhibición*

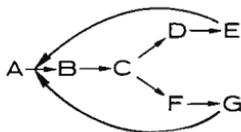
- A) Procesos conducentes a producto final único.
- B) Procesos conducentes a múltiples productos finales.
  - a) Acción de los productos finales sobre una enzima con múltiples localizaciones efectoras.
  - b) Inhibición secuencial.
  - c) Acción de los productos finales sobre enzimas múltiples con la misma especificidad catalítica y características reguladoras diferentes.

### II. *Activación*

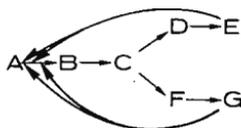
- A) Activación por precursores.
- B) Activación compensadora en procesos convergentes.

Los procesos conducentes a múltiples productos finales, secuencias metabólicas divergentes —preferentemente poseedoras de actividades biosintéticas— reúnen en primer lugar a una serie de mecanismos en que los diferentes productos finales ejercen su función reguladora sobre el mismo sistema enzimático, localizado en la primera etapa de la secuencia común a todos ellos. Las diferencias van a surgir en cuanto a las modalidades singulares bajo las que los productos finales ejercen su función

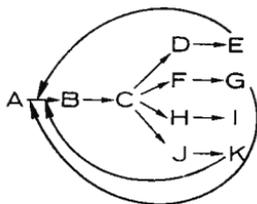
reguladora. En un primer caso, los productos finales ejercen su función reguladora de forma necesariamente *concertada*,



sin que ninguno de ellos pueda realizar dicha función de modo independiente. Ejemplo de este tipo de regulación la manifiestan las aspartoquinasas de *Bacillus polymyxa* y de *Rhodopseudomonas capsulatus* (cf. figs. 42 y 43). En un segundo esquema, los productos finales del proceso metabólico ramificado.

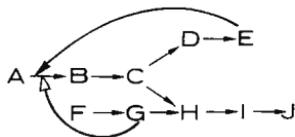


ejercen su inhibición de manera *cooperativa*, es decir, su acción conjunta supone un efecto inhibitor superior al que supondría la suma de los individualmente ejercidos. Como ejemplo se ha descrito una especial aspartoquinasa de *E. coli* (107). Una tercera forma de inhibición por productos finales múltiples supone la conseguida como simple consecuencia de la adición de las acciones inhibitoras parciales —sin cooperación y sin antagonismo—, denominada inhibición *cumulativa*.



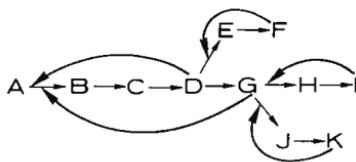
Se ha descrito como ejemplo de este tercer tipo la inhibición de la glutamina-sintetasa (108).

Los tres tipos de mecanismos anteriores representan casos particulares de función reguladora ejercida por múltiples productos finales al inhibir la misma enzima bajo formas diversas. Dentro de este mismo esquema general puede considerarse el caso de que la inhibición que sobre la enzima inicial ejerce uno de los productos finales de la reacción, sea contrarrestada por uno de los metabolitos de otra conexcionada secuencia metabólica,



Un ejemplo de este tipo de inhibición lo ofrece la acción de la valina al compensar la inhibición que sobre la treonina-desaminasa ejerce la isoleucina en *Bacillus subtilis*.

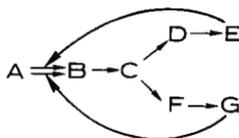
La denominada *inhibición secuencial* supone la existencia de un proceso metabólico multi-ramificado con una serie de productos finales que regulan su formación independiente inhibiendo la primera enzima después de la ramificación que a ellos conduce; inhibición que se continúa ejerciendo por los metabolitos en los que se establece la ramificación,



El proceso general de biosíntesis de compuestos aromáticos (cf. figs. 61 y 62) ofrece una regulación de este tipo con la presencia de metabolitos centrales sobre los que la ramificación enzimática se ejerce, ácidos corísmico y prefénico (109).

En ciertas ocasiones, una determinada etapa enzimática viene catalizada por enzimas que, si bien poseen la misma especificidad, gozan de características físicas distintas que posibilitan su separación bajo la forma de entidades diferentes (isoenzimas). La formación del ácido  $\beta$ -aspartil-fosfórico a partir del ácido aspártico (cf. figs. 42 y 43) viene catalizada por aspártico-quinazas diferentes, cada una de ellas sensible

en forma distinta a los productos finales, conforme a un esquema general del tipo siguiente:



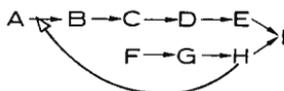
Sin embargo, el ejemplo particular de las varias aspártico-quinasas no tan sólo ofrece este esquema de inhibición enzimática, sino que sirve a la vez para poner de manifiesto la existencia de mecanismos de represión enzimática por productos finales; de la combinación de ambos mecanismos, inhibición y represión, resultan las diferencias de las diversas aspártico-quinasas, como más adelante se detallará.

Además de estos procesos mencionados en los que la regulación de la actividad enzimática se pone de manifiesto a través de mecanismos diversos de inhibición, existen procesos en los que el mecanismo regulador está basado en la *activación enzimática*.

Un sencillo proceso de activación lo constituye la activación por precursores en que una etapa enzimática de una secuencia viene activada por uno de los metabolitos precursores (110).



Otro proceso de activación enzimática es la denominada *activación compensadora*, que se presenta en procesos convergentes y, según la cual, un metabolito de una secuencia cumple la doble condición de utilizarse en conjunción con otro metabolito de otra secuencia y de activar la primera etapa enzimática de ésta. La activación por AMP de la treonina-desaminasa es un ejemplo de este mecanismo de control (111).



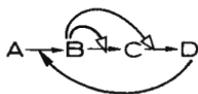
## 2. CONTROL DE LA SÍNTESIS DE ENZIMAS

De la misma forma que existen diversos sistemas de regulación de la actividad enzimática a base de inhibición o activación de la misma, pueden describirse variaciones en los sistemas de inducción y represión de los niveles de enzimas. En la regulación de los niveles de enzimas que participan en procesos biosintéticos, Umbarger agrupa aquellos que conducen a productos finales únicos y los que dan lugar a múltiples productos finales. El caso más sencillo agrupa los procesos en que el producto final origina la represión de todas las enzimas de la secuencia conducente a dicho producto:



Como ejemplo puede citarse la represión por leucina de las enzimas que conducen a su biosíntesis en *S. typhimurium* (112).

En procesos sencillos de este tipo pueden darse de modo simultáneo los mecanismos de inducción y de represión enzimáticos; ello ocurre, por ejemplo, en la biosíntesis de leucina en *N. crassa* (113); producto final que reprime la formación de la primera enzima del proceso, cuyo producto inmediato de la reacción (ácido  $\alpha$ -isopropil-málico) induce, a su vez, la formación de las enzimas subsiguientes de acuerdo con el esquema general:



En los procesos biosintéticos conducentes a múltiples productos finales pueden darse, asimismo, variaciones en las formas de actuar los mecanismos de represión de los niveles de enzimas. Se está en presencia de una represión *cumulativa* cuando los productos finales ejercen su función parcial de modo individual y la función total resulta de la adición de dichos efectos. Un ejemplo de este tipo lo ofrece la represión de carbamil-P-sintetasa por uracilo y arginina en *E. coli* (114). La represión de forma *concertada* es la que ejercen valina, leucina e isoleucina en la regulación de las enzimas biosintéticas del proceso conducente a valina-isoleucina (115).

### 3. REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS DE LA FAMILIA DEL ÁCIDO ASPÁRTICO

La represión de la síntesis de enzimas y la inhibición de la actividad enzimática son, como venimos conociendo, dos mecanismos básicos de control de las reacciones bioquímicas y que ofrecen la característica de no ser mutuamente excluyentes. De ello vamos a considerar uno de los ejemplos más estudiados, el esquema biosintético que utiliza el ácido aspártico para la elaboración de metabolitos esenciales, meso-diaminopimélico, lisina, metionina, treonina e isoleucina; proceso de biosíntesis en el que un precursor común origina varios productos finales (fig. 42) a través de una serie de reacciones enzimáticas con un complejo control de las primeras enzimas participantes.

La represión de la síntesis de una enzima inicial en el proceso de

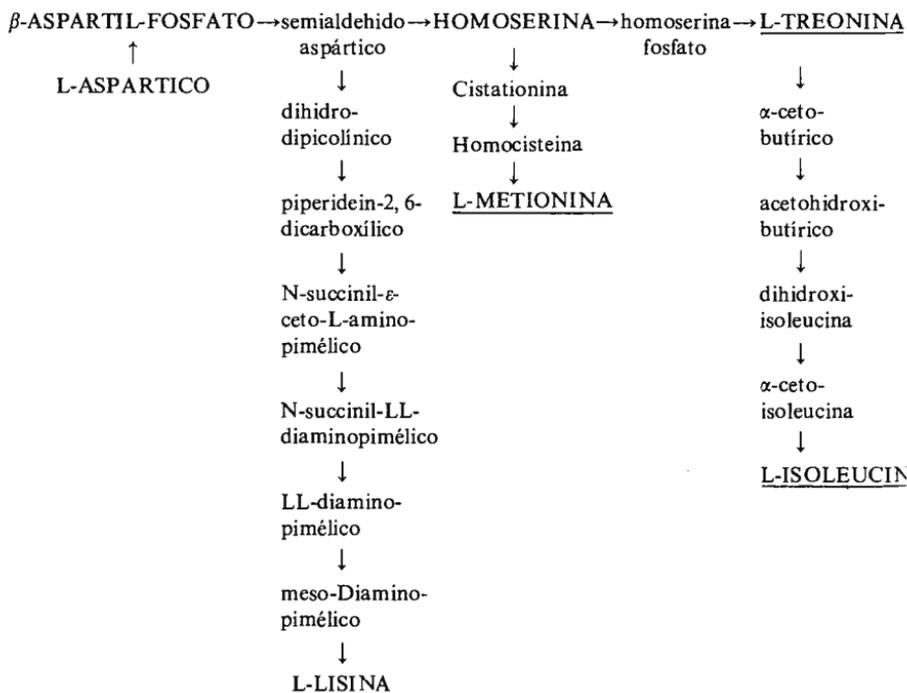


Figura 42

biosíntesis o una retroinhibición eficaz por cualquiera de los metabolitos esenciales finales, crearía dificultades insuperables a la célula, ya que ello limitaría la obtención y la utilización de los demás productos finales del proceso. El control de la biosíntesis de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico ofrece un ejemplo especialmente ilustrativo de cómo la célula resuelve este problema mediante combinaciones de influencias críticas sobre reacciones enzimáticas fundamentales.

La primera utilización del ácido aspártico en bacterias conducente a la síntesis de lisina, metionina, treonina e isoleucina (fig. 42) consiste en su fosforilación a  $\beta$ -aspartil-fosfato por la enzima *aspartoquinasa* en presencia de ATP y un catión divalente. Este producto es ulteriormente defosforilado y reducido de forma concomitante por la  *$\beta$ -semialdehído aspártico deshidrogenasa* en presencia de nucleótidos de piridina reducidos para formar el  $\beta$ -semialdehído aspártico; sobre este producto actúa la *homoserina deshidrogenasa* que rinde homoserina, posición singular que sirve para la ulterior elaboración de los tres aminoácidos metionina, treonina e isoleucina. El  $\beta$ -semialdehído aspártico sirve, asimismo, por condensación con pirúvico, para iniciar las etapas propias de la biosíntesis de lisina. La metionina se elabora a partir de la homoserina a través de una serie de reacciones que se inician en la succinilación de este aminoácido en presencia de succínico, ATP y coenzima A y catalizada por la *homoserina 0-transsuccinilasa*; el producto formado, 0-succinil-homoserina, reacciona con cisteína para originar cistationina, que, por ulterior hidrólisis del tioéter y metilación bioquímicas, rinde metionina (figs. 42 y 50).

Una brillante aportación al estudio de la regulación del anterior esquema de reacciones se ha llevado a cabo por Cohen y col. (116).

De la consideración del esquema general de la figura 42 se concluye la presencia crucial de dos metabolitos,  $\beta$ -semialdehído aspártico y homoserina, cuyos niveles han de ofrecerse en el organismo de acuerdo con sus precisas necesidades fisiológicas. Al nivel de las enzimas correspondientes puede hacerse una triple clasificación: 1) enzimas comunes a la síntesis de los cuatro aminoácidos finales, aspartoquinasa y  $\beta$ -semialdehído aspártico deshidrogenasa; 2) enzimas comunes a la síntesis de tres aminoácidos, solamente la homoserina deshidrogenasa; 3) todas las demás enzimas, que son propias para la síntesis de productos finales únicos.

Es importante destacar ahora que los esquemas de control metabólico no van a ser por completo uniformes a los diferentes organismos

estudiados y que, por otro lado, esta diversidad de esquemas reguladores y de las correspondientes implicaciones fisiológicas va a tener una gran significación en el contexto de las relaciones filogenéticas.

Las variadas formas de control definidas para el esquema de la figura 42 puede acogerse a una serie de mecanismos generales, tales como control por *isoenzimas*, *retroinhibición concertada*, *retroinhibición secuencial*, *retroinhibición compensadora*, *represión multivalente* y *control ligado a otros procesos metabólicos*.

El control por *isoenzimas* de la fosforilación del ácido aspártico, cada una de ellas bajo la influencia reguladora de un producto final diferente, inicia la resolución del problema que presentan las necesidades fisiológicas variables y distintas que puedan ofrecer los aminoácidos finales (fig. 43). En distintos tipos de organismos se han descrito varias aspár-

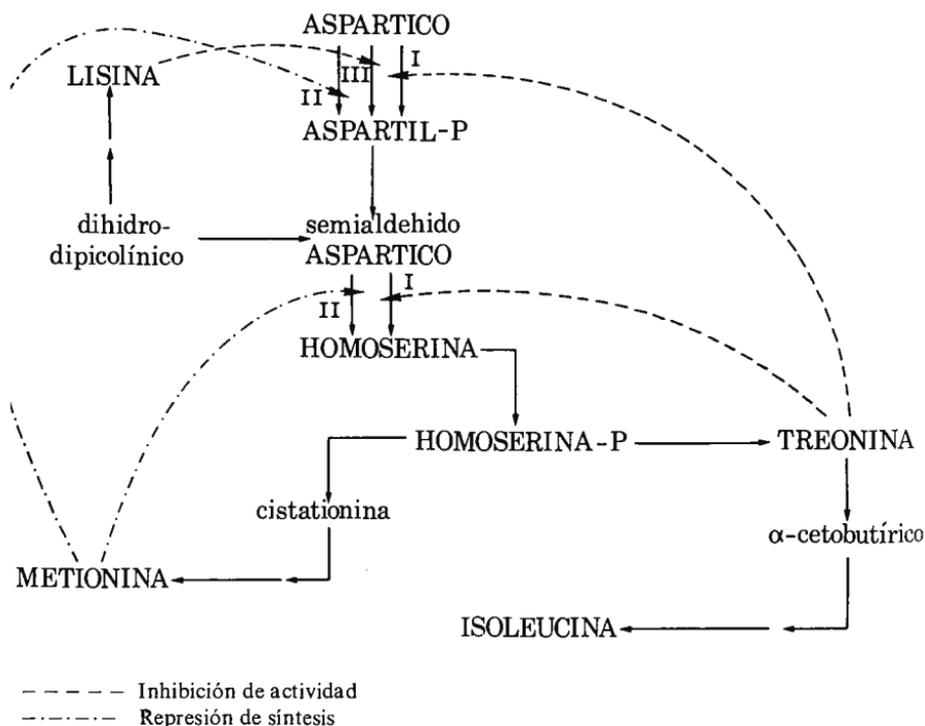


Figura 43

ticoquinasas diferentes en cuanto a su sensibilidad a los sistemas reguladores. En *E. coli* se han descrito las siguientes formas (117-124)

AK I. Sensible a la retroinhibición por TREONINA.

AK II. Reprimible por METIONINA.

AK III. Sensible a la retroinhibición por LISINA.

Así, pues, bajo la apariencia de una reacción común, la biosíntesis de los aminoácidos —lisina, metionina y treonina— y, desde el punto de vista de la regulación, ocurre como si se tratara de rutas independientes.

Cada una de dichas enzimas ha sido aislada, purificada y estudiada en sus características cinéticas, e incluso aislado mutantes carentes de alguna de las quinastas (125). Dicho aislamiento se consiguió mediante la utilización de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y el siguiente esquema de selección: la síntesis de la homoserina deshidrogenasa se reprime en presencia de treonina e isoleucina, y su actividad se inhibe por treonina; de esta forma en un medio sintético carente de metionina, el crecimiento quedará fuertemente inhibido y recuperará su crecimiento normal con la adición de dicho aminoácido; la pérdida de la actividad quinástica sensible a la lisina entre la población mutagenizada —dado que el resto de la actividad quinástica se encuentra reprimida e inactivada— irá acompañada de una incapacidad para sintetizar ácido diaminopimélico, de forma que no crecerá y la penicilina no ejercerá sobre el mismo su acción. De esta forma fue aislado el mutante GIF 54, carente de la aspártico-quinasa sensible a la lisina, que crece fácilmente en un medio mínimo y exhibe un requerimiento para el ácido diaminopimélico en presencia de treonina, metionina e isoleucina.

Ambas isoenzimas, aspártico-quinastas I y III, exhiben características de cooperatividad frente a los inhibidores correspondientes L-treonina y L-lisina, respectivamente; en cambio, aspártico y ATP —en ausencia de inhibidores— presentan la clásica cinética de saturación. En presencia del inhibidor, la unión del aspártico a la isoenzima sensible a la lisina permanece hiperbólica, mientras que la unión del aspártico a la isoenzima sensible a la treonina es de tipo sigmoideo; diferencias que son debidas al grado de antagonismo entre los efectores. Ambas enzimas pierden gradualmente su actividad por conservación en solución reguladora de fosfatos a pH 7.0; la isoenzima I lo hace más rápidamente que la III; esta pérdida de actividad se recupera por adición de los inhibidores a la solución enzimática parcialmente inactivada.

La actividad catalítica de la aspártico-quinasa III, sensible a lisina,

ha sido estudiada en relación a sus propiedades moleculares (126), poniendo de manifiesto la influencia del  $Mg^{2+}$  en la dimerización de la enzima mediada por lisina. Elevadas concentraciones de lisina o  $Mg^{2+}$  inducen una dimerización parcial de dicha isoenzima; la enzima nativa de peso molecular 75.300 y formada por dos subunidades, responde a mucho más bajas concentraciones de la mezcla lisina- $Mg^{2+}$  para dar lugar por dimerización a la molécula tetrámera de peso molecular 150.000. Esta acción sinérgica que presentan ambos ligandos, lisina y  $Mg^{2+}$ , sobre la modificación de la estructura cuaternaria, no es capaz de explicar la reversión competitiva por  $Mg^{2+}$  de la inhibición con lisina en las experiencias cinéticas.

Varios hechos experimentales ponen de manifiesto que la dimerización está relacionada con la inhibición de la actividad enzimática de la aspártico-quinasa III de *E. coli*. Una serie de condiciones bajo las que sucede una reconocida inhibición de la actividad (concentraciones adecuadas de sustrato y lisina, altas concentraciones de  $Mg^{2+}$ , o de ATP- $Mg^{2+}$ ), inducen una notoria dimerización. Por otro lado, ATP aislado no es capaz de producir la dimerización de la enzima, lo cual es consistente con el supuesto de que es ATP- $Mg^{2+}$  el verdadero sustrato que se une a la misma. El fallo del ácido aspártico para dar lugar a elevadas concentraciones una inhibición por sustrato, frente a su capacidad para llevar a cabo la modificación molecular en el sentido de la dimerización, puede ser indicación de que el dímero producido por la asociación ATP- $Mg^{2+}$  es diferente del producido por la presencia del aspártico.

Cuando *E. coli* B crece en presencia de elevadas concentraciones de metionina, la actividad específica de las aspártico-quinasas se eleva de modo notable; variación que afecta de modo principal a la aspártico quinasa III, sensible a lisina. Descartada la influencia de la metionina a nivel genético, y teniendo presente que la síntesis de la aspártico-quinasa III depende del nivel intracelular de lisina (127), se ha sugerido que la acción de la metionina pueda ejercerse a través de los niveles de lisina, que, a su vez, se verá reflejada en la velocidad de síntesis de la quinasa. Además de la inhibición específica que la lisina lleva a cabo sobre la aspártico-quinasa III, esta isoenzima está sujeta a la inhibición «no específica» por distintos efectores, metionina, leucina, isoleucina y fenilalanina (128). La inhibición causada por la presencia conjunta de lisina y cualquiera de los anteriores aminoácidos es muy superior a la de la suma de las inhibiciones producidas aisladamente por cada

inhibidor. Esta observación puede justificar la variación de la síntesis de la aspártico-quinasa III, aparentemente inducida por la presencia de metionina.

Otras bacterias presentan esquemas de aspártico-quinasas por completo diferentes del que acabamos de ver en *E. coli*, y muchas de ellas presentan una única aspártico-quinasa. En *Rhodopseudomonas spheroides*, la enzima se inhibe por el semialdehído aspártico (129), y, en *Rhodospirillum rubrum*, la enzima se inhibe por L-treonina y revierte específicamente por L-isoleucina (130). En diversas especies *Bacillus* (131), y en *Rhodopseudomonas capsulatus* (132), la aspártico-quinasa se inhibe mediante un mecanismo de *retroinhibición concertada* por L-treonina y L-lisina que más adelante se comentará.

Una situación singular la ofrece *Bacillus subtilis* (133), que contiene dos aspártico-quinasas que han sido separadas y examinadas sus diferentes propiedades. Una de ellas (AK I) se inhibe específicamente por el ácido meso-diaminopimélico, mientras que la otra (AK II) está sujeta a una inhibición concertada por L-treonina y L-lisina. Esta retroinhibición multivalente ofrece ciertas semejanzas con las aspártico-quinasas aisladas de otras especies del mismo género. Además, su peso molecular (125.000) es del mismo orden de los descritos para *B. polymyxa* (116.000) y *B. stearothermophilus* (110.000). La actividad de la aspártico-quinasa II es modulada por L-aminoácidos no polares de la misma forma que la enzima procedente de *B. Polymyxa* (134); adicionalmente, algunas de sus propiedades son compartidas por la enzima de *Brevibacterium flavum* (135), y la aspártico-quinasa sensible a la lisina de *E. coli* (136).

Por el contrario, las propiedades de la aspártico-quinasa I de *B. subtilis* son completamente diferentes de las enzimas de otras especies de *Bacillus*; su peso molecular es mucho más elevado y, a diferencia de la mayoría de las demás aspártico-quinasas, su actividad viene afectada sólo de forma muy ligera por iones  $K^+$  o  $NH_4^+$ . En el último aspecto, la aspártico-quinasa I se asemeja a la de *Rhodopseudomonas spheroides* (cf. nota 129), siendo interesante destacar que ambas enzimas no son reguladas por productos finales, sino por metabolitos intermedios del proceso de biosíntesis.

Otro aspecto singular que ofrecen las aspártico-quinasas de *B. subtilis*, es que los niveles relativos de las dos isoenzimas cambian durante el crecimiento del organismo. Así, mientras el nivel de la aspártico-quinasa I viene poco influido por las condiciones de crecimiento, la

actividad específica de la aspártico-quinasa II declina hacia el final del crecimiento exponencial. Estas observaciones, al lado de la naturaleza de la regulación por producto final, sugieren que la función fisiológica primaria de la aspártico-quinasa II es la de suministrar precursores de los aminoácidos requeridos en la biosíntesis de proteínas. Por otro lado, el nivel de aspártico-quinasa I no parece responder a los diferentes estados de crecimiento ni a la naturaleza del medio de crecimiento; la posible función de esta enzima pudiera radicar en asegurar la obtención del ácido diaminopimélico, componente esencial de la pared celular, cuando se deprimen la cantidad y la actividad de la aspártico-quinasa II, tal como ocurre en los medios ricos conteniendo un exceso de L-treonina y L-lisina. Hipótesis que es consistente con la retroinhibición observada de la aspártico-quinasa I por meso-diaminopimélico y con el hecho de que en *B. subtilis*, a diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, la dihidropicolínico-sintetasa no es objeto de inhibición por L-lisina (137-138).

La comparación esbozada entre las aspártico-quinasas de diferentes especies *Bacillus* sigue ofreciendo interesantes planteamientos; las posibilidades de interconversión entre enzimas y la reconsideración de la presencia de aspártico-quinasa I en otras especies diferentes de *B. subtilis* constituyen hoy puntos de investigación que necesitan nuevos esclarecimientos.

Otro sistema isoenzimático que participa en el esquema del metabolismo de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico es el de la homoserina deshidrogenasa, para el que se han descrito en *E. coli* K 12.

HSDH I. Sensible a la retroinhibición por TREONINA.

HSDH II. Reprimible por METIONINA.

El estudio cinético comparado de ambas actividades isoenzimáticas, aspártico-quinasa y homoserina deshidrogenasa sensibles a la acción de la treonina, puso de manifiesto los siguientes hechos: 1) la actividad de la homoserina deshidrogenasa se inhibe por ATP y ácido aspártico, sustratos ambos de la otra reacción; 2) la actividad de la aspártico-quinasa se inhibe por L-homoserina y NADP, sustratos de la reacción de deshidrogenación; 3) ambas actividades se protegen frente a la inactivación térmica por NADPH. Hechos todos que, aunque de manera indirecta, suscitaban la idea de la presencia de ambas actividades enzimáticas en la misma proteína y que posteriormente se ha visto confirmado de forma directa por Cohen y colaboradores (cf. notas 119 y 121) al observar que la relación de las dos actividades permanecía

constante a través de sucesivas y variadas purificaciones. El complejo *aspártico-quinasa I-homoserina deshidrogenasa I* va a poseer propiedades singularmente interesantes desde los puntos de vista funcional y estructural. En primer término debemos destacar que nos encontramos en presencia de un sistema funcionalmente multienzimático y que, como tal, encajaría en el seno de los complejos resultantes de la interacción de enzimas diversas; mas la naturaleza de su estructura permite su mejor consideración como enzima bifuncional alostérica.

Desde el punto de vista de su función catalítica, el complejo *aspártico-quinasa I —homoserina deshidrogenasa I* cataliza dos reacciones no directamente secuenciales del esquema de biosíntesis de aminoácidos de la familia del ácido aspártico:



Ambas enzimas requieren  $\text{K}^+$  y están sujetas a retroinhibición por L-treonina, uno de los productos finales del proceso; por otro lado, la síntesis del complejo está reprimida por una combinación de dos de los productos finales, L-isoleucina y L-treonina. Experiencias de unión de ligandos utilizando L-treonina- $^{14}\text{C}$  mediante técnicas de diálisis en equilibrio y filtración por gel muestran que tanto la unión de treonina a la proteína como la inhibición por treonina de las actividades de homoserina deshidrogenasa y aspártico-quinasa exhiben una fuerte cooperatividad. En la figura 44 aparecen los datos de unión de treonina a la proteína en representación de Scatchard (A) y de Hill (B) ( $n$  es el número de equivalentes molares unidos a la concentración  $u$  de treonina libre; en la primera representación  $n/u$  se lleva frente a  $n$  y en la segunda  $\log n/(n_M - n)$  frente a  $\log u$ , donde  $n_M$  es el valor de  $n$  a saturación).

El tratamiento con N-etil-maleimida desensibiliza la actividad de homoserina deshidrogenasa y la proteína modificada ha perdido la propiedad de unir treonina.

Por lo que al peso molecular se refiere existe general acuerdo acerca del valor 360.000; se trata de un complejo enzimático al que se ha venido atribuyendo una composición a base de seis subunidades de peso molecular 60.000 (139-141); dichas subunidades parecen mostrar pequeñas diferencias en las secuencias, lo cual estaría de acuerdo con

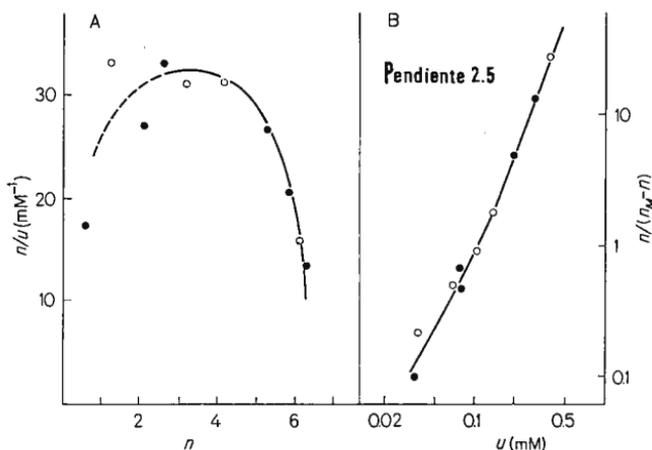


Figura 44

la unión de tres moléculas de nucleótidos de piridina y la existencia de tres centros activos para su actividad deshidrogenésica(\*).

(\*) Esta obra en pruebas, se publica (142) una revisión del peso molecular de las subunidades del sistema aspártico-quinasa I-homoserina deshidrogenasa I al que se atribuye un valor de  $86.000 \pm 4.000$ , lo que exige una modificación de la concepción oligomérica del complejo al que se atribuye ahora una naturaleza tetramérica. Los datos obtenidos acerca de la estructura primaria de las cadenas polipeptídicas constituyentes de las subunidades hablan en favor de una identidad de las mismas. Ello ha de obligar a la reconsideración de los datos de unión de ligandos para adecuarlos a la nueva situación oligomérica de la enzima.

En la misma fecha, Cohen y colaboradores (143) describen el aislamiento y caracterización de dos formas modificadas de la enzima que muestran una variación en su función y una modificación física de las subunidades. Una de dichas formas fue obtenida por proteólisis limitada de la proteína nativa y exhibe únicamente la actividad enzimática correspondiente a la homoserina deshidrogenasa; la otra forma, obtenida del mutante de *E. coli* conocido como Gif 108, exhibe tan sólo la actividad de aspártico-quinasa. La primera de dichas enzimas aparece bajo la forma de un dímero con subunidades de peso molecular 55.000; la segunda, se ha aislado como un tetrámero a base de subunidades de peso molecular 45-50.000.

Las dos actividades del conjunto aspártico-quinasa I-homoserina deshidrogenasa I se presentan secuencialmente distribuidas a lo largo de la cadena polipeptídica, de forma que la actividad aspártico-quinásica queda localizada en la porción amino-terminal, en tanto que la actividad de homoserina deshidrogenasa aparece en la porción carboxilo-terminal.

Las experiencias de unión de ligandos por diálisis en equilibrio con L-treonina isotópicamente marcada, además de la fuerte cooperatividad antes apuntada (coeficiente de Hill  $\bar{n} = 2.5$ ), establecen la existencia de seis localizaciones para la unión del aminoácido. La unión cooperativa de la treonina, en presencia de iones  $K^+$ , origina perturbaciones importantes en la absorción ultravioleta y en la fluorescencia de la proteína (144), relacionadas con cambios conformacionales consistentes, a su vez, con un modelo de dos estados. Los tres ligandos alostéricos, aspártico, iones potasio y treonina, pueden desplazar el equilibrio pre-existente en cualquier dirección por unión preferencial a una de las dos conformaciones de la proteína; aspártico y  $K^+$  se unen a una forma R catalíticamente activa, mientras que treonina se une a la forma inactiva T.

La intensidad de fluorescencia en presencia de concentraciones intermedias de ligandos es:

$$F = \frac{T \cdot F_T + R \cdot F_R}{T + R}$$

( $F_R$  y  $F_T$  son las intensidades de fluorescencia de la solución de proteína en las conformaciones R y T). Los valores de  $F_R$  y  $F_T$  pueden medirse a concentraciones de treonina variables y calcular las funciones  $R/(R + T)$  y  $T/(R + T)$  a partir de

$$T/R = \frac{F_R - F}{F - F_T}$$

Las figuras 45 representan las variaciones de  $T/(R + T)$  cuando se añade treonina a la solución de proteína conteniendo cantidades variables de los ligandos  $K^+$  (fig. 45 A) y aspártico (fig. 45 B). Los efectos homotrópicos positivos implican que el cambio configuracional en una subunidad de la proteína induce un cambio similar de diferente grado en las demás subunidades, y en un caso extremo, las  $n$  subunidades cambian su conformación de manera concertada. A la concentración A del ligando, la función  $T/R$  vale,

$$T/R = L \left( \frac{1 + A/K_T}{1 + A/K_R} \right)^n$$

(L es el valor de  $T/R$  en ausencia del ligando A;  $K_T$  y  $K_R$  son las constantes de disociación de AT y AR). En el caso de la treonina,  $K_T =$

= 40  $\mu\text{M}$  obtenido del estudio de la unión a la proteína a bajas concentraciones de  $\text{K}^+$ . Como se conoce que la unión de la treonina al estado  $R$  es prácticamente despreciable (cf. nota 123) la ecuación anterior toma la forma,

$$T/R = L(1 + A/K_T)^n$$

( $A$  es la concentración de treonina y  $K_T$  40  $\mu\text{M}$ ).

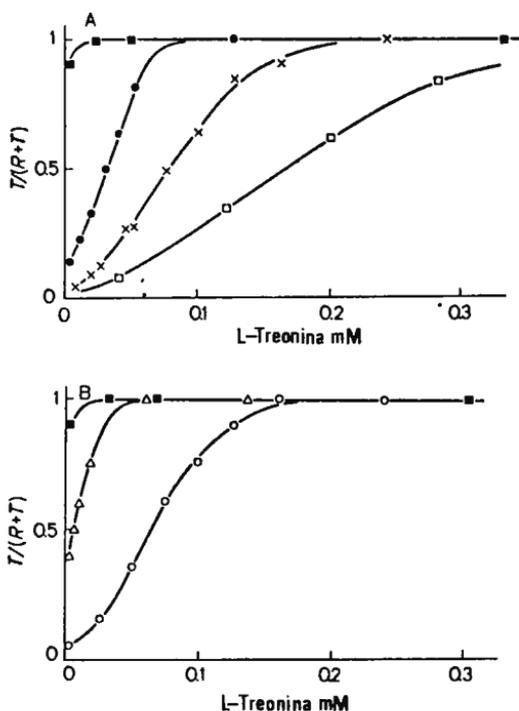


Figura 45

Una representación de Hill modificada ( $\log T/R$  frente a  $\log(1 + A/K_T)$ ) deberá originar una línea recta cuya tangente  $n$  es el número de subunidades que participan en el fenómeno de la cooperatividad. Efectivamente, Cohen y colaboradores obtienen una serie de rectas para describir el efecto de la treonina sobre el equilibrio  $R-T$  a diversas

concentraciones de los demás ligandos,  $K^+$  y aspártico. De esta representación se deduce para  $n$  un valor de 3, esto es, dentro del hexámero el trímero forma la unidad cooperativa (fig. 46).

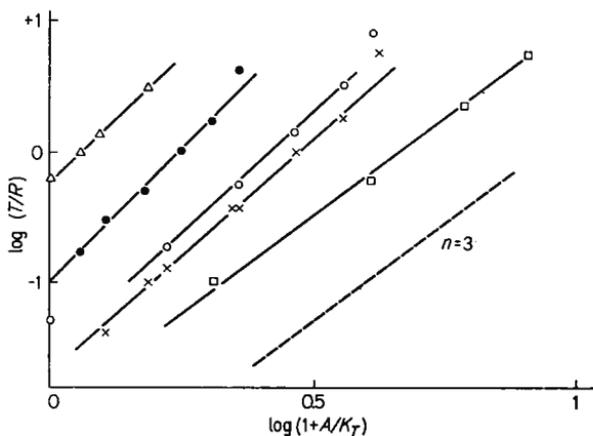


Figura 46

La representación de  $(T/R)^{1/3}$  frente a la concentración de treonina origina una serie de rectas que cortan al eje de abscisas a  $-K_T$ ; la convergencia de estas rectas derivadas de las curvas de la figura 47

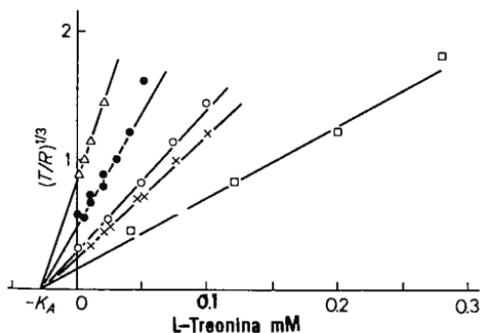


Figura 47

demuestra que la constante de disociación,  $K_T$ , de la treonina es independiente de la presencia o ausencia de los demás ligandos. Efectos

similares han sido obtenidos por Cohen utilizando ácido aspártico como ligando.

Los resultados obtenidos mediante absorción ultravioleta, fluorescencia y unión de treonina son perfectamente análogos y compatibles con la existencia de dos estados conformacionales. Asimismo, existe una correlación entre las propiedades reguladoras y catalíticas de la proteína. La inhibición competitiva de la actividad de la aspártico-quinasa por treonina y su activación por iones  $K^+$  puede explicarse por la unión preferencial del aspártico a la forma activa (*R*). Por el contrario, la inhibición de la deshidrogenasa y la análoga activación por  $K^+$  no se debe a un efecto sobre el cambio de conformación *R-T* sobre la unión de los sustratos, ya que se ha puesto de manifiesto una inhibición incompleta de naturaleza no competitiva.

El modelo secuencial de Koshland no puede admitirse, porque el signo contrario que acompaña a los cambios espectrales en la unión de treonina y ácido aspártico, indica la existencia previa de un equilibrio entre las conformaciones *R* y *T* en ausencia de ligandos.

El complejo aspártico-quinasa I—homoserina deshidrogenasa I ha sido objeto, asimismo, de interesantes estudios cinéticos del mencionado cambio de conformación, haciendo uso de sus efectos sobre la absorción ultravioleta y sobre la fluorescencia de la proteína. El desplazamiento del equilibrio alostérico de la conformación *T* a la *R* por rápida mezcla de la proteína con  $K^+$  o con aspártico y de la conformación *R* a la *T* por rápida mezcla de la proteína con treonina, ha sido analizado mediante técnicas de «stopped-flow» y «salto de temperatura» (145) Los experimentos de «stopped-flow» muestran en ambos casos sencillas curvas exponenciales ( $t_{1/2} = 0.03-1.00$  seg), y la naturaleza de la etapa determinante de la velocidad es una cuestión que ha de ser contestada mediante un estudio de los efectos de los parámetros físico-químicos del sistema. Los valores  $\Delta F/F$  incrementan hasta alcanzar claramente una zona máxima al aumentar las concentraciones de aspártico y treonina; por otro lado, la variación de la concentración de proteína no ejerce prácticamente efecto sobre las velocidades que se producirían, efectivamente, si intervinieran en el proceso la disociación o reasociación de subunidades. Así, pues, los datos experimentales no hablan en favor de la unión de ligandos como determinantes de la velocidad, ya que, caso de producirse, daría lugar a una reacción bimolecular o aun de orden superior, cuya velocidad incrementaría con la concentración del ligando; las constantes de velocidad observadas aumentan, en realidad,

con la concentración del ligando añadido, pero se saturan a valores inferiores a  $30 \text{ seg}^{-1}$  a  $25^\circ$ . Las energías de activación de las relajaciones observadas tampoco pueden atribuirse a la unión de pequeñas moléculas a la proteína.

Todo este conjunto de observaciones ha permitido a Janin e Iwatsubo (cf. nota 145) definir la existencia de una etapa monomolecular con una gran energía de activación como determinante del cambio conformacional de la proteína.

Aunque las medidas previas de equilibrio podían anticipar la existencia de una reacción de isomerización, los resultados cinéticos no pueden describirse en términos del equilibrio  $R_i \rightleftharpoons T_i$  propugnado por el mecanismo concertado de Monod. Mayor información para la definición de un modelo más adecuado ha sido obtenida mediante experimentos de «salto de temperatura». En ausencia de ligandos la respuesta dinámica de la fluorescencia muestra la existencia de dos procesos de relajación cuyas velocidades son  $1.000 \text{ seg}^{-1}$  y  $14 \text{ seg}^{-1}$  a  $28^\circ$ , el más lento de los cuales se identifica con el proceso observado en los experimentos de «stopped-flow». Estos y otros resultados experimentales han permitido concluir varias propiedades interesantes de este sistema enzimático; en primer término exhibe una concertación parcial entre las subunidades constituyentes de las moléculas proteicas, esto es, pueden dividirse en dos tripletes que en el equilibrio pueden ser por completo  $R$  o  $T$  capacitando de este modo a la molécula a presentarse bajo las formas  $R_6$ ,  $T_6$  y  $R_3T_3$ . En segundo lugar, el sistema se presenta bajo la forma de un intermediario en la relajación entre las formas  $R$  y  $T$ , cuyas propiedades cinéticas hipotéticas podrían estar de acuerdo con híbridos del tipo  $R_1T_5$ ,  $R_2T_4$  o cualquiera de las estructuras del modelo generalizado de Koshland. La posibilidad parece existir, sin embargo, de un mecanismo concertado ampliado en que el estado intermedio  $S$  participa de dos transiciones concertadas



El mismo tipo de complejo enzimático aspártico-quinasa I—homoserina deshidrogenasa I ha sido aislado y purificado a partir de *E. coli* 9723 (146) y se ha definido como tetrámero con subunidades de peso molecular 80.000.

Ha quedado previamente mencionada la existencia de una aspártico-quinasa cuya síntesis queda bajo el control del nivel de metionina (aspártico-quinasa II) y de una homoserina deshidrogenasa II sometida

al mismo tipo de represión. De la misma forma que las actividades reguladas por los niveles de treonina quedaban bajo la forma estructural de una única proteína, así el complejo aspártico-quinasa II—homoserina deshidrogenasa II, portador de las dos actividades reprimibles por metionina, ha sido obtenido en forma homogénea a partir de extractos de un mutante de *E. coli* K12. Este microorganismo posee muy bajos niveles del complejo enzimático reprimible por metionina, lo que impide, prácticamente, su estudio a no ser en mutantes desprovistos de las actividades enzimáticas sensibles a treonina.

Este sistema enzimático, aspártico-quinasa II—homoserina deshidrogenasa II, tiene un peso molecular de 169.000 y se disocia —en presencia de guanidina y mercaptoetanol— en cuatro subunidades de idéntico tamaño.

Si, como veremos más adelante, la evolución de los mecanismos reguladores de un mismo proceso metabólico es sustancial al establecimiento de conexiones filogenéticas entre los diversos organismos, la comparación de las propiedades físicas y químicas de las proteínas multifuncionales del tipo de las que se han venido considerando —cortas en número y de interés singular— ha de permitir hipotetizar sobre su origen. Dos hipótesis principales se han señalado acerca del origen de estas proteínas multifuncionales; una de ellas basada en la existencia de un gen ancestral común que por duplicación, seguida de traslocación y evolución divergente daría lugar a las dos proteínas actuales. La segunda posibilidad se basa en una evolución por completo independiente con una fuerte presión selectiva para el logro de las dos moléculas provistas con la misma asociación de actividades catalíticas, pero diferentes en su esquema regulador. Son éstas, de todas formas, hipótesis generales con las que se especula habitualmente acerca del origen de proteínas distintas, pero conexionadas en su funcionalidad; la elección necesita, en cualquier caso, el conocimiento total de la secuencia de las subunidades constitutivas que aún no se ha logrado en los sistemas enzimáticos que consideramos. Un dato indicativo en este sentido es que los antisueros preparados frente a ambas proteínas no exhiben reactividad cruzada en las pruebas de precipitación.

Hasta aquí se ha considerado la participación del control por isoenzimas en la regulación de la síntesis de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico. Veamos algunos otros mecanismos de control. La *retroinhibición concertada* requiere de modo simultáneo la presencia de dos productos finales para la regulación de la actividad enzimática

de una enzima anterior. Así, la actividad de la aspártico-quinasa de *Rhodopseudomonas capsulata* no viene influenciada por producto final alguno actuando de modo independiente, pero la presencia simultánea de lisina y treonina (fig. 48) inhibe fuertemente la actividad enzi-

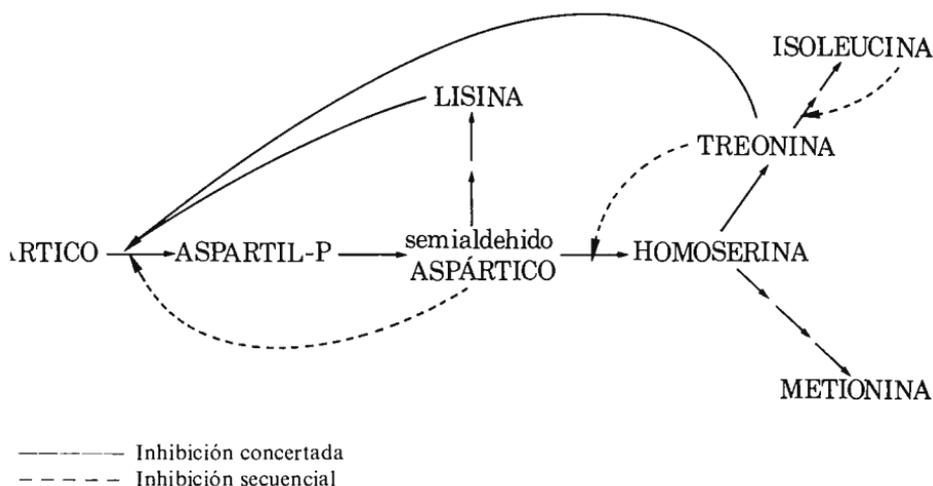


Figura 48

mática. Este sistema de inhibición multivalente o concertada opera asimismo «in vivo», ya que el crecimiento del microorganismo se inhibe de modo eficaz cuando ambos aminoácidos están presentes en el medio de cultivo (147).

Inhibición similar por la acción concertada de lisina y treonina la presentan diversas especies del género *Bacillus* (148-149).

El mecanismo de *retroinhibición secuencial* lo presenta la actividad de la aspártico-quinasa de *Rhodopseudomonas spheroides*. El efecto regulador se establece bajo la forma de una inhibición en cascada que parte del producto final isoleucina, cuyos altos niveles inhiben la actividad de la treonina-desaminasa que provoca la elevación de treonina, el cual —a su vez— reduce la velocidad de la síntesis del aminoácido homoserina por disminución de la actividad de la homoserina deshidrogenasa; ello conduce a la acumulación de  $\beta$ -semialdehido aspártico, cuya acción reguladora se ejerce en el sentido de la inhibición de la aspártico-quinasa (150). Un aspecto de interés que surge de este tipo de regulación es la influencia que en su conjunto pueda ejercer sobre los

niveles de los demás aminoácidos que no intervienen de forma directa en la retroinhibición en cascada, es decir, lisina y metionina; los niveles de estos aminoácidos quedan protegidos de una disminución excesiva, porque treonina y semialdehído aspártico son inhibidores competitivos con relación a los sustratos, semialdehído aspártico y aspártico y ATP, respectivamente. De esta forma, los niveles de semialdehído aspártico no pueden quedar en condiciones insuficientes a las necesarias para la síntesis de lisina y metionina.

El control que sobre la regulación ejercen los productos finales puede ser de naturaleza opuesta o *retroinhibición compensadora* como ocurre en *Rhodospirillum rubrum* (fig. 49). En este organismo, la ac-

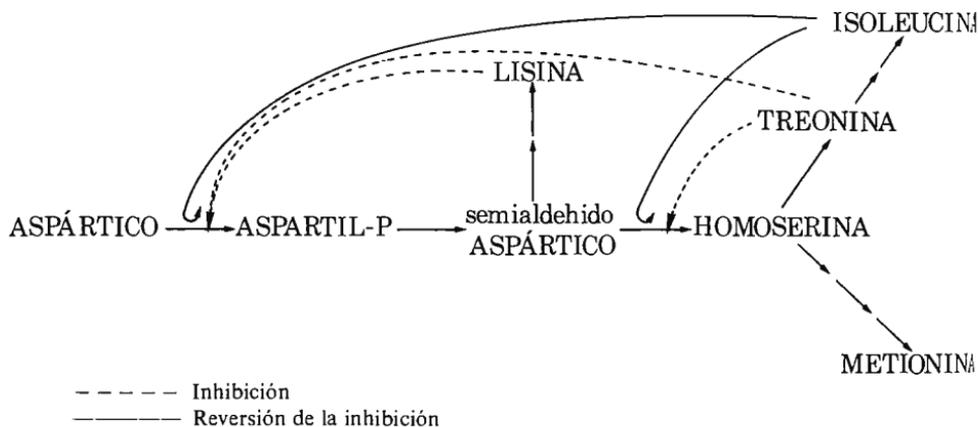


Figura 49

tividad de la homoserina deshidrogenasa se inhibe por treonina; inhibición que resulta contrarrestada por isoleucina. La actividad de la aspártico-quinasa resulta regulada en una forma similar a la anterior; dicha actividad es objeto de una retroinhibición concertada por lisina y treonina, que es, a su vez, contrarrestada por la acción de la isoleucina (cf. nota 130). Esta reversión de una inhibición concertada no se ha encontrado, al parecer, en otras bacterias, incluso en *Rhodopseudomonas capsulata* (cf. nota 132).

En los diversos mecanismos que hasta ahora se han considerado acerca de la regulación del metabolismo del ácido aspártico, los niveles de aspártico-quinasa y homoserina deshidrogenasa en *E. coli* podían venir conjuntamente reprimidos por metionina. La represión enzimá-

tica se presenta también bajo el simultáneo control de varios productos finales, concretamente treonina e isoleucina, actuando sobre aspártico-quinasa I, homoserina deshidrogenasa I y treonina sintetasa (151). Dicho control no se ejerce de forma coordinada, ya que la limitación de uno de los dos aminoácidos (treonina o isoleucina) acarrea una desigual desrepresión de las tres enzimas.

Este tipo de control por *represión multivalente* asegura la innecesaria producción de metabolitos reduciendo la velocidad de síntesis de las enzimas.

Todo este conjunto de mecanismos que intervienen en el control general del proceso metabólico que se viene considerando, se ven además completados por influencias particulares en cada uno de los sistemas ramificantes. En la figura 50 se detallan los sistemas de retroinhibición operativos en las ramificaciones individuales.

Este proceso, finalmente, se encuentra conexionado en su regulación con otro con él relacionado, como la biosíntesis de la metionina a partir de sulfatos (fig. 50), atravesando por la posición intermedia de la

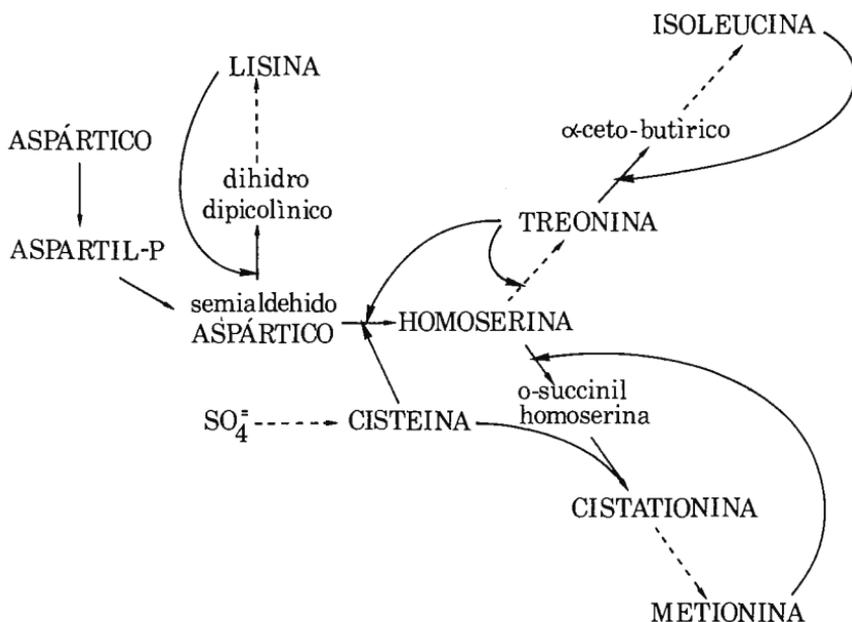


Figura 50

cisteína; este aminoácido es un enérgico inhibidor de la homoserina deshidrogenasa de *E. coli* y de algunas bacterias fotosintéticas (152). De esta forma, el incremento de los niveles de cisteína pueden provocar el aumento de cistationina y metionina, si se dispone de cantidad suficiente de homoserina. Por otro lado, la sobreproducción de metionina puede impedirse por la acción controladora del aminoácido sobre su propia ramificación. Asimismo, la sobreproducción de treonina queda controlada por análogo mecanismo de retroinhibición sobre la homoserina deshidrogenasa y la homoserina quinasa (153).

A lo largo del estudio del complejo proceso regulador de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico, se ha podido claramente observar la inclusión de sistemas ramificantes e intermediarios comunes con la participación de enzimas poseedoras de singulares características cinéticas. Dentro de estas características, la regulación de dicho complejo ofrece aún adicionales particularidades, como la respuesta histerética de la homoserina deshidrogenasa, respuesta lenta, pues, a un rápido cambio en la concentración de ligandos.

El control por retroinhibición de la homoserina deshidrogenasa por parte de la treonina es, en realidad, desventajoso para la producción de metionina en *E. coli*, y este aminoácido se requiere para su crecimiento normal cuando lo hace en presencia de un exceso de treonina. Al ser este efecto de la treonina dependiente del tiempo (154) o, lo que es lo mismo, al ser la homoserina deshidrogenasa una enzima histerética, el cambio en la velocidad de formación de metionina se encontrará taponado frente a las variaciones del nivel de treonina; con ello, los niveles de metionina se mantienen, al menos durante un cierto tiempo, y la biosíntesis de proteínas puede tener lugar en presencia de un exceso de treonina.

En *Bacillus subtilis*, la treonina desaminasa ofrece, de igual manera, un comportamiento histerético frente a un rápido incremento en los niveles del inhibidor, isoleucina; de esta manera, las concentraciones de lisina, metionina y treonina quedan taponadas frente al cambio en los niveles de isoleucina.

El contenido bioquímico de los mecanismos reguladores adquiere una significación especial en la contemplación de los esquemas evolutivos. En la analogía de composición química, en la semejanza de los procesos bioquímicos y, en tercer término, en la comparación de los mecanismos reguladores, se basan los criterios moleculares para establecer las relaciones filogenéticas en el contexto de la evolución bioló-

gica. El proceso aspártico  $\rightarrow$  aspartil-P  $\rightarrow$  semialdehído aspártico  $\rightarrow$  homoserina, presente en diferentes tipos de bacterias, puede significar un origen evolutivo común; por otro lado, sistemas de control divergentes, especialmente la aspártico-quinasa, pueden tomarse como evidencia de orígenes evolutivos separados. A la luz de estos criterios, dos especies del mismo género, *Rhodopseudomonas capsulata* y *Rhodopseudomonas spheroides*, morfológica y fisiológicamente relacionadas, exhiben diferentes sistemas de control, retroinhibición concertada y secuencial, respectivamente. Frente a ello, diversas especies *Bacillus* y *Rhodopseudomonas capsulata* poseen en común el mecanismo concertado de control por retroinhibición, por lo que podrían considerarse con arreglo a un origen común. El examen comparativo de la aspártico-quinasa de ambos, *Rhodopseudomonas capsulata* y *Rhodopseudomonas spheroides*, muestra que se trata de proteínas similares con relación a las localizaciones de unión del modificador; la primera se inhibe en su actividad por la mezcla lisina-treonina, y la segunda por semialdehído aspártico, si bien posee localizaciones que reconocen a ambos lisina y treonina. Ello puede sugerir (155) que el primitivo control concertado dio origen a la pérdida de los efectos reguladores y al nacimiento de un nuevo modificador, semialdehído aspártico, por un cambio mutacional sencillo.

## VIII. Control del metabolismo por modificación química de enzimas

### 1. INTRODUCCIÓN

A los ya estudiados sistemas de regulación basados en modificaciones de la actividad enzimática o en los niveles de las enzimas pueden añadirse otros mecanismos de control consistentes en la *modificación química* de las enzimas o de las proteínas en general.

Una característica general de este tipo de control es la interconversión de formas estables de la enzima regulada. Este hecho es de notable importancia en el orden regulador y constituye una diferencia esencial con los sistemas basados exclusivamente en modificaciones físicas (unión de efectores a proteínas mediante enlaces no covalentes, hidrofóbicos, electrostáticos, de hidrógeno); las modificaciones químicas de las proteínas con cambios en su estructura primaria, constituyen formas estables aun desaparecidos los efectores causantes de la transformación

y rápidamente efectivas; frente a ello, las modificaciones físicas son asimismo caracterizadas por una inmediata respuesta, pero ésta desaparece al hacerlo los efectores específicos.

Bajo la idea estricta de modificaciones químicas de enzimas y proteínas se comprenden los equilibrios entre formas estables con la participación, a su vez, de enzimas diferentes encargadas de dotar al proceso de una reversibilidad metabólica. No quedan comprendidos en esta idea los casos de modificaciones químicas con rotura irreversible de aminoácidos y péptidos, como la activación de zimógenos o de proteínas participantes en el proceso de coagulación de la sangre; tampoco guardan relación con este concepto regulador las modificaciones químicas que ocurren con motivo de la formación de intermedios covalentes en el proceso catalítico de las enzimas.

Las modificaciones químicas consisten de modo fundamental en reacciones de *fosforilación*, *adenilación* y *oxidación* de grupos tiólicos; a ellas pueden añadirse *ADP-ribosilación*, *acetilación* y *metilación*.

Las más importantes enzimas y proteínas cuya actividad está regulada por modificación química aparecen en la Tabla 1, y entre ellas

TABLA 1

## REGULACION METABOLICA POR MODIFICACION QUIMICA DE ENZIMAS

ENZIMA	MODIFICACION QUIMICA
Glucógeno fosforilasa	fosforilación
Fosforilasa b quinasa	fosforilación
Glucógeno sintetasa	fosforilación
Pirúvico deshidrogenasa	fosforilación
RNA polimerasa ( $\sigma$ ) (E. coli)	fosforilación
Lipasa	fosforilación
Fructosa-1,6-difosfatasa	fosforilación
Glutamina sintetasa	adenilación
RNA polimerasa ( $\alpha$ ) E. coli	adenilación
Aminoaciltransferasa II	ADP-ribosilación
Pirúvico liasa	oxidación -SH $\rightarrow$ SS-
Xantin oxidasa	oxidación -SH $\rightarrow$ SS-

debemos destacar las que deben su transformación a la acción de las denominadas proteína-quinasas, es decir *glucógeno-fosforilasa*, *fosforilasa b-quinasa*, *glucógeno-sintetasa* y otras varias enzimas y proteínas, entre las que se encuentran las *histonas*, *protaminas*, *lipasa* sensible a hor-

monas, proteínas de microtúbulos, factor  $\sigma$  de RNA-polimerasa de *E. coli*, etcétera. Las proteína-quinasas correspondientes, que utilizan como sustratos las anteriores proteínas, ven modulada su actividad y sirven como receptores del AMP-cíclico.

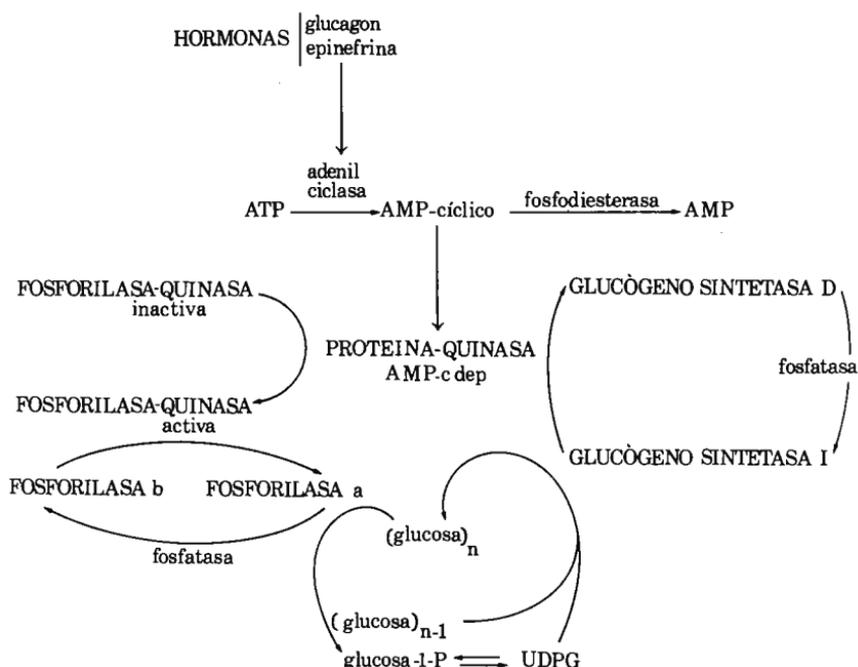
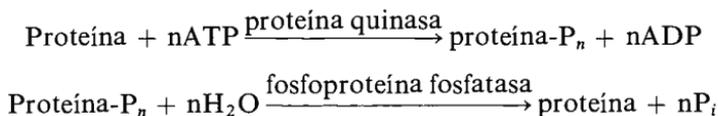


Figura 51

## 2. GLUCÓGENO FOSFORILASA Y GLUCÓGENO SINTETASA

Veamos la influencia de tales modificaciones químicas sobre la regulación del metabolismo del glucógeno. La síntesis y la degradación del glucógeno se realiza merced a la intervención de glucógeno-sintetasa y glucógeno-fosforilasa, respectivamente, conforme indica el esquema de la figura 51, enzimas ambas que pueden presentarse bajo dos formas

moleculares diferentes interconvertibles por fosforilación y defosforilación. En términos generales, esta interconversión tiene lugar conforme a las reacciones siguientes:



Ambos tipos de reacciones se presentan, pues, utilizando como proteínas las enzimas fosforilasa y sintetasa del glucógeno; la reacción de fosforilación viene catalizada por la quinasa específica en cada caso, fosforilasa-quinasa y sintetasa-quinasa, respectivamente. La fosforilasa b quinasa se presenta, a su vez, bajo dos formas diferentes, con diferentes actividades catalíticas, y cuya forma activa se debe a la acción enzimática de una nueva proteína-quinasa (con actividad de fosforilasa-quinasa-quinasa), dependiente para su actividad de la presencia de AMP-cíclico. Estas proteína-quinasa constituyen, pues, un punto central en el esquema de regulación (fig. 51) del metabolismo del glucógeno, ya que, aunque bajo formas distintas, son responsables de la activación de las dos enzimas; por otro lado, estas proteína-quinasa ejercen su actitud catalítica mediante la modulación ejercida por los niveles de AMP-cíclico (156-168).

Con estos antecedentes veamos algunos detalles en conexión con los siguientes apartados: a) proteína-quinasa y AMP-cíclico; b) fosforilasa-quinasa y glucógeno-sintetasa, y c) fosforilasas.

El AMP-cíclico y la adenil-ciclasa, enzima responsable de su formación a partir del ATP, están presentes en casi todas las células animales examinadas, y sus niveles resultan elevados por la acción de diversas hormonas polipeptídicas (Tabla 2). La hormona circulante activa la adenil-ciclasa en el membrana plasmática, y el AMP-cíclico formado se difunde a través de la célula y realiza la función fisiológica específica.

El AMP-cíclico así formado estimula, pues, la proteína-quinasa del músculo, dotada de una amplia especificidad; así cataliza la fosforilación y activación de la fosforilasa b quinasa por ATP, pero también lo hace a la glucógeno sintetasa (169), de modo que el AMP-cíclico controla los procesos de síntesis y degradación del glucógeno. El nucleótido cíclico no es por completo esencial para la actividad, puesto que su efecto desaparece sobre la enzima envejecida y es restaurado con la adición de mercaptoetanol; ello sugiere que la oxidación de la proteína-quinasa ocasiona un cambio estructural similar al que se induce

TABLA 2  
INFLUENCIA HORMONAL SOBRE LOS NIVELES DE AMP-CICLICO

<i>Hormona</i>	<i>Tejido</i>	<i>Respuesta</i>
Epinefrina	Hígado Músculo T. adiposo Corazón	Glucogenolisis Glucogenolisis Lipolisis Efecto inotópico
Glucagon	Hígado T. adiposo	Glucogenolisis Lipolisis
ACTH	T. adiposo T. adrenal	Lipolisis Esteroidogénesis
TTH	Tiroides	Iodación, oxidación de glucosa
Hormona paratiroidea	Corteza renal Hueso	Fosfatúria Resorción de Ca
Vasopresina	Medula renal	Reabsorción de agua
Tiroxina	Corazón	Taquicardia

por la unión a la enzima del AMP-cíclico. Por otro lado, los requerimientos de la enzima hacia el nucleótido cíclico disminuyen al disminuir la concentración de la enzima; una explicación de este fenómeno (cf. nota 169) es que tanto el AMP-cíclico como la dilución promueven la disociación y la activación simultánea de la proteína-quinasa.

Otros datos cinéticos acerca de la actuación del AMP-cíclico señalan el hecho del incremento de  $V_{\max}$ , sin efecto aparente sobre la afinidad de la enzima hacia los sustratos —ATP y proteínas—. De este conjunto de observaciones se ha concluido que la enzima está constituida por subunidades reguladora (R) y catalítica (C) que se disocian en presencia del AMP-cíclico.



siendo R la subunidad que une el AMP-cíclico.

La existencia de este equilibrio se ha visto confirmada por experiencias de naturaleza más directa. Así, por ejemplo, de extractos de corteza suprarrenal se ha conseguido aislar una proteína que une el AMP-cíclico, separable de la actividad de proteína-quinasa (170); la adición de la primera proteína a la fracción de proteína-quinasa, inhibe su actividad en ausencia de AMP-cíclico. Otro ejemplo lo constituye la disociación de una proteína-quinasa de reticulocitos de conejo por

acción del AMP-cíclico en las subunidades catalítica y reguladora —susceptible de unión al nucleótido (171). Resultados análogos se han obtenido a partir de hígado y músculo (172-173).

La subunidad C ocasiona un desplazamiento del AMP-cíclico unido a la subunidad R, en una reacción facilitada por iones  $Mg^{2+}$  y ATP; la sensibilidad de la proteína-quinasa reconstruida hacia el AMP-cíclico depende de la relación R/C. A partir de estos datos (174) se ha propuesto la existencia de un equilibrio dinámico entre dichos componentes:



del que se sigue que una elevación hormonal de la concentración intracelular de AMP-cíclico desplazaría el equilibrio hacia la formación de la proteína-quinasa en su estado activo C; inversamente, la depresión de la concentración intracelular de AMP-cíclico conduciría a la formación de la enzima RC en estado inactivo.

Recientemente (175) se han analizado las formas moleculares y composición en subunidades de una proteína-quinasa, dependiente de AMP-cíclico, aislada de corazón de buey. Dicha proteína-quinasa se presenta bajo una sola forma molecular, a diferencia de la heterogeneidad molecular observada en la proteína aislada de otros orígenes (176), constituida por dos subunidades desiguales; la subunidad que une el AMP-cíclico posee un peso molecular 55.000, y la subunidad catalítica, 42.000. La mencionada heterogeneidad parece ser consecuencia de la existencia de equilibrios de asociación-disociación que darían lugar a múltiples formas moleculares por combinaciones varias de las anteriores subunidades. Ello está de acuerdo con la disociación espontánea que ocurre con la variación de pH o fuerza iónica del medio, o simplemente por conservación.

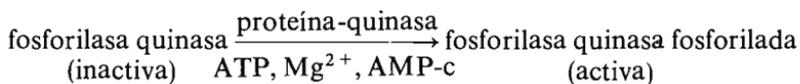
Profundizando en la naturaleza de la heterogeneidad de las proteína-quinásas dependientes de AMP-cíclico, se han obtenido a partir de hígado de rata una serie de fracciones con las siguientes características (177).

Fracción	Dependencia de AMP-cíclico	Heterogeneidad	Peso molecular
B <sub>0</sub>	Independiente	Homogénea	$3 \times 10^4$
B <sub>1</sub>	Dependiente	Heterogénea	$1.8 \times 10^5$
B <sub>2</sub>	Dependiente	Heterogénea	$1.2 \times 10^5$

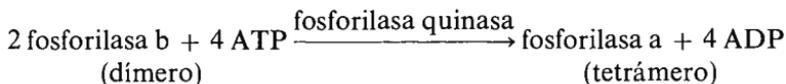
La fracción  $B_1$  da lugar a dos especies de proteína-quinasa dependientes de AMP-cíclico, la más pequeña de las cuales (peso molecular  $1.2 \times 10^5$ ) parece corresponde a un artefacto de la proteólisis ocurrida durante el método de aislamiento. Todas las fracciones AMP-cíclico dependientes obtenidas representan formas inactivas de proteína-quinasa, viniendo la actividad inhibida por asociación con la proteína reguladora R; como ha quedado reseñado con anterioridad, el AMP-cíclico activa las formas inactivas por unión alostérica a la proteína R y liberación consiguiente de la forma activa de la proteína-quinasa. Cuando las formas  $B_1$  y  $B_2$  —dependientes— liberan las correspondientes formas activas, son éstas indistinguibles entre sí e idénticas a la forma  $B_0$  con un peso molecular  $3 \times 10^4$  —independiente.

En la actualidad se especula con la posible función de las diferentes formas moleculares de la proteína-quinasa dependiente de AMP-cíclico, bien como poseedoras de diferentes especificidades de sustrato o sujetas a distinta regulación.

La proteína-quinasa dependiente de los niveles de AMP-cíclico (fig. 51) cataliza la activación de la fosforilasa quinasa.



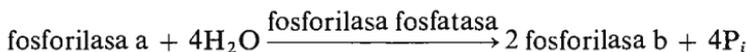
La *fosforilasa quinasa* fue la primera proteína-quinasa específica descubierta (178-179), y la gran mayor parte de los datos obtenidos lo han sido a partir de la enzima aislada de músculo de conejo. Esta quinasa cataliza la reacción,



Las dos formas de fosforilasa quinasa difieren en su afinidad hacia la fosforilasa b; diferencia que es más notable por debajo de pH 7, al que la enzima es virtualmente inactiva.

La activación puede ocurrir por el mecanismo de fosforilación antes mencionado y también por digestión triptica limitada o la acción de una proteasa  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente. El fosfato que se incorpora a la fosforilasa quinasa se une de forma covalente, álcali-lábil, a restos de serina.

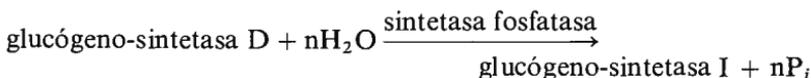
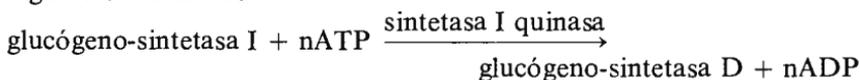
La reversibilidad del proceso se consigue mediante la enzima fosforilasa fosfatasa,



Las propiedades de la fosforilasa quinasa que contribuyen a la regulación de su actividad son, además de la mencionada existencia bajo dos formas de activación diferentes, los requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  y su interacción con el glucógeno. Los requerimientos de iones  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la fosforilasa quinasa muscular se han relacionado con la contracción muscular (180-182). Cuando el calcio se desprende por el retículo sarcoplásmico, se produce un incremento en la actividad de la fosforilasa quinasa, a la vez que induce la contracción de las miofibrillas; ello conduce, pues, a la activación de la fosforilasa y de la glucogenolisis, siendo de destacar que la misma señal es capaz de poner en marcha procesos que requieren o liberan ATP (183).

De otro lado, el glucógeno interacciona con la fosforilasa quinasa incrementando su actividad (184).

La *glucógeno sintetasa* se presenta bajo dos formas diferentes e interconvertibles por fosforilación y defosforilación enzimáticas (185), según las reacciones:



La forma fosforilada de la glucógeno-sintetasa se conoce como forma D y hace referencia a la forma de la enzima que es dependiente de la glucosa-6-P, mientras que la forma no fosforilada —forma I— es independiente de la misma y constituye el estado activo fisiológicamente de la enzima. La enzima está formada por subunidades varias de peso molecular 90.000-100.000 (186-187), existiendo discrepancias acerca de la estequiometría de la unión del fosfato.

Puede ya observarse que la forma activa de la enzima que regula la biosíntesis del glucógeno es la «defosfo», mientras que la forma fosforilada de la fosforilasa —fosforilasa a— es la forma activa de la enzima que regula la glucogenolisis.

La *glucógeno-fosforilasa* existe, pues, bajo dos formas —a y b—, cuya interconversión resulta de reacciones de fosforilación y defosfo-

rilación enzimáticas y son diferentes en cuanto se refiere a peso molecular y actividad catalítica. Ambas fosforilasas, *b* y *a*, se disocian en monómeros cuando se tratan con un exceso de p-cloromercuribenzoato; monómeros no fosforilados en el caso de la forma *b* y monómeros fosforilados en el caso de la forma *a*. Un extremo importante en el estudio de las fosforilasas ha sido el establecimiento de las relaciones peso molecular-fosforilación-actividad enzimática, acerca de lo que se han obtenido muy variados datos, con frecuencia difícilmente reconciliables. La propuesta más razonable (188) asigna los valores de 370.000 y 185.000, respectivamente, a las fosforilasas *a* y *b*, siendo 92.500 el peso molecular del monómero de la fosforilasa *b*.

La fosforilasa *a* participa de un equilibrio asociación-disociación, siendo destacable a este respecto que la disminución de la concentración de proteína va acompañada de un incremento en la actividad específica (189). Ello se debe a la formación de un dímero de fosforilasa *a* (distinguido de la fosforilasa *b*, dímero sin residuos de aminoácidos fosforilados), con actividad catalítica superior a la de la forma tetrámera. Ambas formas de fosforilasa *a* —dímera y tetrámera— son catalíticamente activas, exhibiendo el dímero una mayor afinidad por el glucógeno que el tetrámero. Este equilibrio de asociación-disociación de la fosforilasa *a* puede servir asimismo como mecanismo de regulación del metabolismo del glucógeno; la agregación de la fosforilasa *a* constituye un sistema rápido de reducir la velocidad de degradación del glucógeno, si bien no son conocidos los efectores que puedan ser responsables de esta transformación «in vivo».

La regulación de la actividad enzimática por transformación química se ve, por tanto, estrechamente conexas con la existencia de formas moleculares resultantes de diferente grado de polimerización.

La transformación de fosforilasa *a* en fosforilasa *b*, según los estudios de sedimentación de Fischer y colaboradores (cf. nota 188), ocurre de una forma gradual y fundada sobre la existencia del equilibrio dímero-tetrámero, cuya posición dependerá de las condiciones ambientales, efectores, concentración de proteína, etc. Como puede observarse en la figura 52 (cf. nota 188), a medida que la defosforilación procede por la acción de la fosfatasa sobre la fosforilasa *a* (tetrámero fosforilado), se favorece la disociación en los dímeros (con distinto grado de fosforilación), hasta llegar a la fosforilasa *b*, sólo presente como dímero no fosforilado. Las formas moleculares dimeras se va a poder presentar en dos conformaciones diferentes (redonda y cuadrada) bajo la influen-

cia del grado de fosforilación; así, las especies «defosfo» y «monofosfo» pueden presentarse en una conformación activa (cuadrada) que tiende a tetramerizarse, y en otra conformación inactiva (redonda), sólo presente bajo la forma dímera, mientras que las especies «difosfo» sólo se han reconocido bajo la forma conformacional activa (cuadrada).

Los efectores, glucosa-1-P y AMP, favorecen la conformación activa, mientras que la glucosa-6-P desplaza el equilibrio hacia la conformación inactiva en el sentido de la dimerización.

El esquema de la figura 52 plantea la influencia del AMP como

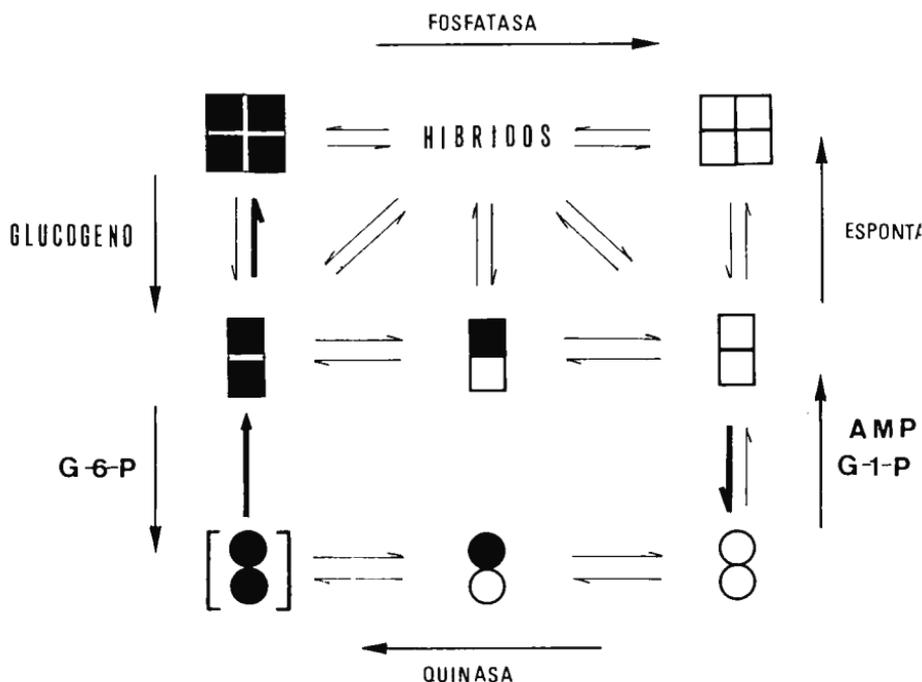


Figura 52

efector alostérico de la fosforilasa *b*, una de las primeras enzimas en las que se demostró este tipo de influencias. La fosforilasa *b* experimenta una transición intramolecular reversible inducida por AMP y, en menor grado, por el fosfato; las especies dímeras favorecidas por AMP o fosfato se asocian a baja temperatura dando lugar a un tetrámero, cuya conformación es similar a la de la fosforilasa *a*.

Numerosos estudios se han realizado sobre las características alostéricas de la fosforilasa *b* (190-191) y, salvo algunas diferencias de detalle los tratamientos cinéticos y la medida de las funciones de unión son consistentes con la idea de un cambio conformacional concertado entre dos estados de la enzima.

El razonamiento cinético de Buc se basa en

$$\frac{v_a}{v_s} = \frac{B_x x}{1 + B_x x}$$

si el activador se une solamente a la misma configuración (T) que el sustrato ( $v_a$  es la velocidad cuando el activador está presente en exceso, puesto que entonces  $\bar{T} = 1$ ).

De la ecuación de  $\Omega$  (pág. 328), se deduce que  $\bar{T} = v/v_a$ .

Aplicando la teoría de Monod a esta hipótesis configuracional,

$$\bar{T} = \frac{L_q [(1 + B_x x)(1 + B_y y)]^q}{1 + L_q [(1 + B_x x)(1 + B_y y)]^q}$$

y las adecuadas transformaciones matemáticas dan:

$$(1 + B_x x)(1 + B_y y) = \frac{1}{L_q^{1/q}} \left( \frac{v}{v_a - v} \right)^{1/q}$$

de donde se ve fácilmente que, al llevar en un sistema de coordenadas la raíz  $q$  de  $v/(v_a - v)$  frente a  $y$  a diferentes concentraciones de  $x$ , se debe obtener una familia de líneas rectas que se encuentran en un punto del eje de abscisas. La figura 53 ofrece la representación de Buc para un sistema

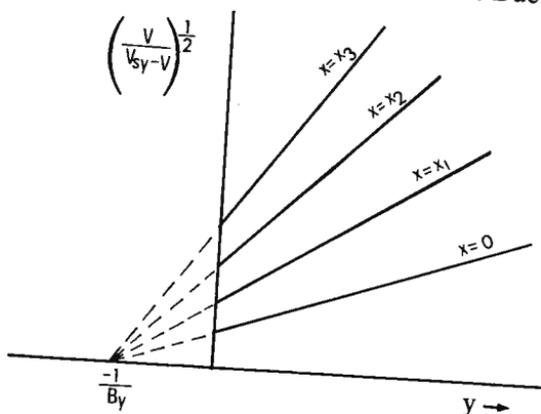


Figura 53

que obedezca el principio de simetría, donde activador ( $y$ ) y sustrato ( $x$ ) se unen a una sola configuración.

La intersección de las rectas con el eje de ordenadas es igual a

$$(L_q)^{1/q}(1 + B_x x.)$$

Haciendo  $q = 2$ , los datos obtenidos con fosfato, como sustrato, y AMP como activador de la fosforilasa b, se conforman perfectamente a la anterior relación lineal.

La regulación de la actividad enzimática de la fosforilasa ha quedado centrada en su modificación covalente por fosforilación-defosforilación, así como en su modificación alostérica por AMP; esta regulación de la actividad enzimática de la fosforilasa incide, pues, sobre la degradación del glucógeno, fenómeno que contribuye —a su vez— al gobierno energético de la contracción muscular. La degradación del glucógeno se activa en sincronización con la contracción muscular suministrando parte de la energía necesaria para este proceso. La mediación fisiológica de los impulsos nerviosos provoca la liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  de las vesículas del retículo endoplásmico, los que inician la interacción de la actinmiosina, así como la conversión fosforilasa b  $\rightarrow$  fosforilasa a mediada por la fosforilasa quinasa (193). En este orden de ideas es interesante conocer la participación del AMP en la regulación de la actividad de la fosforilasa durante la contracción muscular y respecto a lo cual han sido señaladas varias discrepancias en relación al efecto producido en la célula muscular y en estado purificado. En una simulación de las condiciones intracelulares por lo que se refiere a la presencia de sustratos y efectores, la enzima muestra unas cien veces superior actividad a la de el músculo en reposo, aunque la presencia de ATP contrarresta la activación por AMP de la fosforilasa b. Por otro lado, la relación AMP/ATP en la célula muscular no varía suficientemente durante la contracción para explicar el incremento (unas sesenta veces) de la actividad de la fosforilasa (194). Un segundo efecto del AMP es la inhibición de la actividad de la fosforilasa fosfatasa que resulta de la unión del nucleotido al sustrato —fosforilasa a— y no a la enzima misma; la constante de unión de la fosforilasa a y el AMP es unas cien veces inferior a la que corresponde a la concentración intracelular del nucleotido en el músculo en reposo; por consiguiente, la reacción de defosforilación propia del reposo debería estar bloqueada.

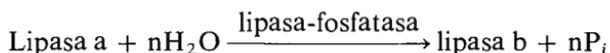
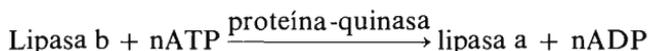
Heilmeyer y colaboradores (195) estudian la importancia de la activación alostérica de la fosforilasa b en relación con la modificación

covalente haciendo uso de una fracción muscular a base del complejo proteína-glucógeno y elementos del retículo sarcoplásmico (196); dicho complejo contiene las enzimas del metabolismo del glucógeno, las que de esta forma integradas exhiben propiedades que se correlacionan mejor con las observaciones «in vivo» de lo que lo hacen las mezclas de enzimas purificadas. La escisión del glucógeno en esta fracción puede seguirse por medida del flujo de intermediarios del proceso glicolítico, y, puesto que la fosforilasa a es la enzima limitante de la velocidad, dicho método puede utilizarse para estimar su actividad. Con objeto de evitar la degradación del AMP por la AMP-desaminasa que contamina el complejo, los autores han empleado AMP-N-óxido. La velocidad máxima de la fosforilasa b, ligada al complejo, es unas tres veces inferior que la de la enzima cristalizada, mientras que la  $K_m$  no presenta variación. La integración de la fosforilasa en el complejo no impide la unión del nucleótido, puesto que tanto la forma purificada como la unida al complejo reaccionan a la misma velocidad con el 6-purina-5'-ribonucleótido 5-(2-nitrobenzoico) tioéter que une de forma covalente el AMP a la enzima. Por otro lado, la actividad específica de la fosforilasa a en el complejo es la misma que bajo la forma de enzima purificada. La separación de los elementos del retículo endoplásmico y la digestión por amilasa del glucógeno no logran incrementar la activación de la fosforilasa b por el AMP-N-óxido.

De estas observaciones se ha concluido que algún componente del complejo impide solamente el cambio conformacional que induce la actividad enzimática; componente con una posible estructura proteica, ya que no se pierde mediante diálisis y no está presente en los ultrafiltrados de bajo peso molecular. Los elementos del retículo sarcoplásmico no participan aparentemente en la supresión de la actividad, ya que la fosforilasa b continúa manifestando una actividad específica disminuida en las preparaciones de las que se han separado. La dilución del complejo (unas veinte veces) origina un incremento de la actividad específica (unas seis veces), ocasionado por labilización de las interacciones proteína-proteína, disociación del complejo y liberación de la enzima. Así, pues, la activación de la fosforilasa b por el nucleótido se suprime debido a las interacciones con otras proteínas, manifestadas en el seno del complejo proteína-glucógeno.

Veamos algunos casos adicionales de regulación metabólica con la participación de enzimas químicamente modificadas y, en particular, nuevos ejemplos de participación de proteína-quinasa.

La velocidad de liberación de ácidos grasos libres en el tejido adiposo viene controlada por la actividad de la triglicérido-lipasa hormonalmente sensible. Las hormonas que activan de forma aguda esta lipasa (catecolaminas, ACTH, glucagón, etc.), estimulan la actividad de la adenilciclase e incrementan los niveles en el tejido adiposo de AMP cíclico. En analogía a la regulación de la glucógeno-fosforilasa y glucógeno-sintetasa, se ha sugerido que dicha lipasa esté regulada por una fosforilación dependiente de AMP cíclico (197-198). En los últimos años se han descrito preparaciones de proteína-quinasa (199-200) (cf. nota 164), capaces de incrementar la actividad lipolítica del tejido adiposo en preparaciones libres de células. Los resultados experimentales parecen probar la existencia de dos formas de lipasa relacionadas entre sí,



Otro ejemplo interesante lo constituyen las modificaciones estructurales de proteínas nucleares, especialmente histonas (201-202), proteínas básicas componentes fundamentales de los cromosomas de los organismos eucarióticos. Los mecanismos bioquímicos implicados en estas transformaciones son análogos a los de las modificaciones enzimáticas apuntadas con anterioridad, aunque la significación biológica de los mismos necesita de profundos esclarecimientos. No obstante, la introducción enzimática de grupos acetilo, metilo y fosforilo en las diferentes especies de histonas puede ser de notable significación biológica, puesto que cambios en las cargas de estas proteínas —que se unen al DNA principalmente mediante fuerzas electrostáticas— pueden modificar la interacción histonas-DNA. Con respecto a la fosforilación de histonas, Langan (203) fue el primero en describir una proteína-quinasa poseedora de una cierta especificidad frente a dichas proteínas, demostrando con posterioridad su estimulación por AMP-cíclico (204) y justificando de esta manera el mecanismo por el que ciertas hormonas pueden promover la síntesis de m-RNA (cf. nota 159). Asimismo, se ha descrito otra proteína-quinasa que fosforila a proteínas no-histonas y es independiente del AMP-cíclico (205). Del músculo de langosta se ha aislado una proteína-quinasa estimulada por GMP-cíclico (206).

A partir de hígado de rata han sido purificadas parcialmente dos proteína-quinatas, estimuladas por AMP cíclico, que catalizan la fosfo-

rilación de proteínas ribosomales; dichas enzimas fosforilan tres proteínas presentes en la subunidad 40S, y nueve proteínas de la subunidad 60S (207).

La regulación de proteína-quinasas por AMP-cíclico se conoce, asimismo, en el sistema nervioso (208) (cf. nota 160), jugando un importante papel en ciertos tipos de transmisión sináptica (209). Las fracciones celulares del cerebro, ricas en membranas sinápticas, contienen proteína-quinasas dependientes de AMP cíclico, así como proteína-fosfatasa capaces de separar fosfórico de las proteínas de membrana fosforiladas. Recientemente se ha observado la fosforilación endógena de una proteína de peso molecular 100.000, componente de la membrana sináptica (210).

### 3. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE HISTONAS

La acetilación «in vivo» de histonas representa un mecanismo de alteración de las actividades biosintéticas del núcleo celular (211-214), habiéndose demostrado en diversos tipos de células eucarióticas la existencia de sistemas transferásicos acetilantes con elevada especificidad hacia el sustrato (215-217). Asimismo, existen sistemas enzimáticos capaces de catalizar la desacetilación de histonas acetiladas. De esta manera, se postulan mecanismo de acetilación y desacetilación diferencial de histonas como requerimientos esenciales a la regulación genética en eucariotes. La acetilación de histonas exhibe características de especificidad hacia el sustrato y frente al tiempo; así, utilizando células sincronizadas de mamíferos, la acetilación de histonas comprueba que la fracción *F-1* se acetila de modo reversible en el período biosintético (S) inicial del DNA, mientras que las fracciones *F-2a*, *F-2b* y *F-3* se acetilan reversiblemente con posterioridad (218). Es interesante hacer notar que estos esquemas de comportamiento enzimático en función del tiempo son diferentes para otras modificaciones covalentes de las histonas, como metilación y fosforilación. Estudios realizados tratando de correlacionar los esquemas de acetilación de histonas en función del tiempo con los niveles de acetiltransferasa, no han podido definir conclusiones en este sentido, por lo que el control de la acetilación de histonas tiene que radicar en otra área aún indeterminada de la actividad celular.

Las modificaciones covalentes de las histonas afectan a distintos grupos funcionales de los aminoácidos. Así, la acetilación ocurre en los

grupos  $\varepsilon$ -amino de los residuos de lisina presentes en las histonas ricas en arginina y precede o acompaña a los incrementos de actividad de la RNA-polimerasa y de la síntesis de RNA. La metilación tiene lugar en los restos de lisina, histidina o arginina; la metilación de la lisina parece guarda cierta relación con los cambios que tienen lugar en el núcleo previamente a la mitosis cuando la cromatina se condensa y el núcleo se hace menos activo en las reacciones de síntesis (219). La fosforilación se lleva a cabo en los residuos de serina, y la función que esta modificación estructural realiza puede ser específica de órgano (220).

Otras modificaciones estructurales que pueden exhibir las histonas son fosforribosilación, oxidación de tioles, reducción de grupos disulfuro (221).

La especificidad celular de la fosforilación y acetilación de histonas ha sido estudiada en células de testículos de trucha a diferentes estados de espermatogénesis: células espermatogoniales, espermátocitos primarios y secundarios y espermátidas. Estas células pueden separarse por centrifugación en gradientes de albúmina y utilizarse en experiencias de fosforilación y acetilación de histonas y otras proteínas básicas (222). La definición correcta de las relaciones entre síntesis de DNA, síntesis de histonas y fosforilación de histonas ha sido muy discutida; al lado de una diversidad de velocidades metabólicas de síntesis de DNA y de síntesis y fosforilación de histonas (cf. nota 222) se ha reconocido asimismo un paralelismo entre los tres fenómenos (223-224). La incidencia experimental de la resolución molecular de las histonas y la resolución celular antes mencionada ofrece detalles adicionales de las relaciones temporales entre dichos fenómenos (225). Así, la fosforilación parece tener lugar inmediatamente después de la síntesis de ciertas histonas ( $2a_2$ ) y con cierta distancia de la del resto. Siendo alrededor de siete días el tiempo total para la división de las células testiculares de trucha inducida hormonalmente, el contenido en histonas de dichas células se duplicará cada siete días o, de otra forma, una séptima parte del contenido total de histonas se sintetiza diariamente. Si estos datos se conjugan con la observación de que seis-ocho horas constituyen la vida media de los restos fosfato que esterifican las histonas, se deduce que el 5 por 100 de las histonas totales de los testículos de trucha se están fosforilando en cada instante. Efectivamente, ciertas especies de histonas exhiben una gran variación de especies fosforiladas ( $2b$  y  $3$ ), lo que indica una fosforilación más extensa o un tiempo mayor para la actividad metabólica del fosfato, mientras que otras histonas presentan una fosforilación

menor en su conjunto, manifestación —a su vez— de una fosforilación más restringida o de una actividad metabólica del fosfato más corta.

Los diferentes tipos de células presentan diferentes velocidades de síntesis y de fosforilación de histonas, si bien las relaciones de síntesis a fosforilación son en cada caso muy semejantes a la unidad; por otro lado, la correlación positiva entre estos fenómenos y la síntesis de DNA sugiere la fosforilación de histonas como exigencias para su correcta unión al DNA (cf. nota 225), hecho que había sido relacionado con la sustitución de histonas por protaminas durante la transformación de la cromatina.

La síntesis de protaminas comienza en las espermátidas mediada la espermiogénesis, y las protaminas recién sintetizadas se fosforilan extensamente. La especificidad celular de la fosforilación de histonas sugiere que este proceso no se requiere para la progresiva pérdida de histonas durante la transformación de las espermátidas (de las que sedimentan a 1.5 mm/hora a las que lo hacen a 1.0 mm/hora).

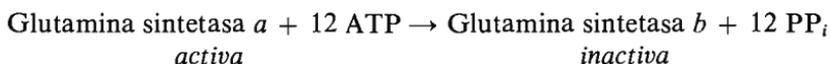
La acetilación de histonas se ha estudiado asimismo en los distintos tipos de células antes mencionados; la acetilación de histonas se ha observado a lo largo de la espermatogénesis. En la iniciación del desarrollo celular tiene lugar tanto la síntesis intensa de histonas como su acetilación, mientras que en las espermátidas ocurre una muy escasa síntesis de histonas; así, en las experiencias de doble marcaje con acetato- $^{14}\text{C}$  y lisina- $^3\text{H}$ , la relación isotópica  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$  es veintisiete veces superior en las espermátidas que en las células precedentes. Estos resultados (226) han sugerido que la acetilación de histonas en las células espermátidas puede estar implicada en la separación de estas proteínas del DNA, mientras que, en las células anteriores, en las que la síntesis de histonas acompaña a la acetilación, las mismas modificaciones pueden conexionarse con la asociación correcta del DNA a las histonas recién formadas.

Las interacciones entre constituyentes de la cromatina, así como entre DNA e histonas, se detallan en otros lugares de esta obra; la participación, sin embargo, de las histonas modificadas ofrece aún numerosas incógnitas. El estudio de las interacciones con modelos del tipo DNA de fago  $\lambda$ /histonas de timo (227) ha permitido poner de manifiesto fenómenos cooperativos en la unión cuya ulterior extensión a clases de histonas específicas y a histonas modificadas covalentemente abrirá nuevas perspectivas a la naturaleza dinámica de la cromatina.

## 4. GLUTAMINA SINTETASA

Todos los ejemplos estudiados acerca de la *regulación de la actividad enzimática por modificación covalente* de la enzima han hecho referencia a la introducción de grupos fosforilo (excepción hecha de los comentarios sobre modificación de histonas). Un caso singular de regulación lo va a ofrecer la *glutamina sintetasa*, y ello por una doble circunstancia; en primer lugar, porque esta enzima ofrece múltiples modalidades de regulación, y así se deja reprimir en su síntesis (228-229), y su actividad catalítica se modifica por retro-inhibición de tipo cumulativo (230), y, en segundo lugar, porque se modifica de forma covalente mediante reacciones de adenilación.

La glutamina sintetasa cataliza la formación de glutamina a partir de ácido glutámico y  $\text{NH}_4^+$  en una reacción dependiente del ATP; es capaz, además, esta enzima de transferir el  $\gamma$ -glutamilo de la glutamina a un aceptor adecuado, como hidroxilamina. La enzima obtenida de *E. coli* se presenta bajo dos formas diferentes en dependencia de la forma de crecimiento del organismo (231) y designadas como sintetetas *a* y *b* (o también como I y II); una preparación enzimática a base, de modo fundamental, de sinteteta *a* se obtiene a partir de células crecidas en glucosa y cloruro amónico y recogidas en fase logarítmica, mientras que la forma *b* se logra aislar de células crecidas en glicerina y glutámico y recogidas en fase estacionaria. Ambas formas de la glutamina sintetasa poseen la misma composición en aminoácidos y exhiben el mismo comportamiento en la sedimentación (232), pero la forma *b* contiene unido AMP de forma covalente, de lo que carece la forma *a*. Por lo que a la actividad catalítica se refiere, la glutamina sinteteta *b* (II) posee menos del 5 por 100 de la actividad que exhibe la forma *a*, ensayada en presencia de magnesio. La transformación de la forma *a* en su correspondiente *b* se lleva a cabo de forma enzimática merced a la acción catalítica de la ATP: glutamina sinteteta adenil-transferasa; dicha transferasa logra introducir hasta 12 restos de AMP y de forma covalente por mol de enzima, lo que sugiere que cada una de las subunidades de que consta la enzima nativa acepta un resto adenílico (233).



Inversamente, la reactivación de la enzima se logra en sistemas celulares carentes en el medio de iones amonio (234) y en sistemas libres de células.

La reactivación, que va acompañada de una escisión fosforolítica del AMP de la glutamina sintetasa *b*, se lleva a cabo mediante la participación de dos proteínas diferentes; una de estas proteínas parece ser la misma adeniltransferasa que se modifica por una segunda proteína, de forma que la acción catalítica resultante está basada en la transferencia de los restos adenílicos de la glutamina sintetasa *b* al ortofosfato (235-236).

La transformación mutua de las sintetasas *a* y *b* se encuentra modificada por glutamina (favorece la adenilación e inhibe la desadenilación) y  $\alpha$ -ceto-glutárico, que produce el efecto contrario.

El cambio estructural que la adenilación supone en la estructura proteica produce toda una serie de efectos sobre las propiedades biosintéticas de la enzima que han sido estudiados en función del grado de adenilación (237). De esta forma han sido estudiadas preparaciones de glutamina sintetasa conteniendo 0.8-12 equivalentes de grupos adenilo por mol de enzima.

La adición o eliminación de grupos adenilo ( $\bar{n} = 0.8-3$ ,  $\bar{n} = 8.5-12$ ) produce cambios muy profundos en la dependencia de las actividades de los iones  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ; en estados intermedios de adenilación ( $\bar{n} = 3-8$ ), la influencia ejercida por los cationes anteriores resulta menos afectada por la presencia del AMP unido de forma covalente a la enzima. Las formas sin adenilar parecen estar específicamente activadas por  $Mg^{2+}$ , mientras que las subunidades adeniladas exhiben requerimientos absolutos hacia el  $Mn^{2+}$ . Los iones  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  activan específicamente tan sólo las subunidades adeniladas o no adeniladas, respectivamente, de forma que, en conjunción con los sustratos, son capaces de determinar si se forman o no complejos activos.

Estudios cinéticos y de unión de ligandos (238) sugieren que cada subunidad del dodecámero de la glutamina sintetasa posee localizaciones catalíticas para ATP y L-glutámico y que, entre las formas adeniladas y sin adenilar, existen interacciones heterólogas implicadas en la expresión de  $V_{max}$  y  $K_m$  de cada tipo de subunidad. Las experiencias de unión sugieren la presencia de una segunda localización de L-glutámico por subunidad, que puede funcionar como localización alostérica. Por otro lado, los equilibrios de unión que muestran los inhibidores, AMP o L-triptofano, en ausencia de sustratos, son independientes de la extensión de la adenilación.

Recientemente, Wedler y Boyer (239), miden velocidades de equilibrio por intercambio isotópico, con objeto de esclarecer el efecto de los

modificadores sobre la catálisis de la glutamina sintetasa; los equilibrios estudiados fueron  $^{14}\text{C}$ -glutámico  $\rightleftharpoons$  glutamina y  $^{32}\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ . Los efectos de los modificadores sobre los anteriores equilibrios expresados simplemente en forma cualitativa aparecen en la Tabla 3.

TABLA 3

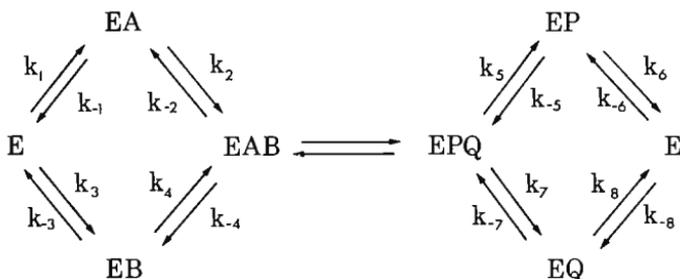
Modificador	Inhibición de	
	$\text{P}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$	$\text{Glu} \rightleftharpoons \text{Gln}$
AMP	Fuerte, completa	Débil, parcial
GDP	Fuerte, completa	Débil, parcial
L-alanina	Fuerte, completa	Fuerte, completa
CTP	Fuerte, completa	Fuerte, completa
Glicocola	Fuerte, completa	Fuerte, completa
L-histidina	Modorada, parcial	Débil, parcial
L-triptofano	Débil, variable	Débil, parcial
Glucosamina-6-P	Débil, parcial	Débil, variable
Carbamoil-P	Fuerte, completa	Fuerte, parcial

Datos de Wedler y Boyer (J. Biol. Chem. 247,993 (1972)).

La interpretación del efecto de los modificadores depende del mecanismo catalítico, es decir, si tiene lugar una unión ordenada o casual, si suceden reacciones parciales y si se forman intermedios covalentes con la enzima. En la forma adenilada de la glutamina sintetasa, la unión del sustrato no es ordenada, no se detectan intermedios covalentes o reacciones parciales, y cualquier intercambio dependerá de la presencia de todos los sustratos; ello significa que, si la unión de algún sustrato a su localización catalítica se bloquea por un modificador, quedan inhibidos todos los intercambios. Semejante esquema de inhibición se cumple cuando las relaciones velocidad-concentración de sustrato siguen las relaciones sencillas —Michaelis-Menten— o más complejas —efectos cooperativos.

El presente tratamiento implica la comparación del efecto experimental de los modificadores con el que resultaría de la consideración de esquemas teóricos supuestos, como, por ejemplo, la secuencia de dos

reactivos y dos productos en una combinación no ordenada con interconversión de los complejos ternarios.



Este esquema representa un sistema «random Bi Bi» con las adecuadas constantes de velocidad, y el efecto de los modificadores puede comprobarse haciendo uso de las ecuaciones generales que definen la velocidad de los intercambios  $A \rightleftharpoons P$  y  $B \rightleftharpoons Q$ .

Los resultados obtenidos mediante este tipo de tratamientos ofrecen una singular característica en el caso del GDP. Este modificador bloquea completamente el intercambio  $P_i \rightleftharpoons \text{ATP}$  sin ejercer efecto alguno prácticamente sobre el intercambio glutámico  $\rightleftharpoons$  glutamina; resultados experimentales que se ajustan al esquema en que un modificador retrasa la disociación o ambas, asociación y disociación, de un par de sustratos. El ligero incremento inicial del intercambio glutamina  $\rightleftharpoons$  glutámico puede ser indicativo del retraso preferencial de la reacción de disociación para  $P_i$  o ATP, o para ADP y ATP. Este nuevo tipo de acción modificadora por parte del GDP se interpreta como una catálisis «críptica», en que el modificador impide la disociación del ATP, pero permite la rápida interconversión química de los sustratos ligados y el rápido intercambio  $\text{NH}_3$ -glutamina y glutámico-glutamina, así como  $^{18}\text{O}$  entre glutámico y  $P_i$ .

Ya ha quedado mencionado cómo ciertos productos del metabolismo de la glutamina, e incluso la glutamina misma, ejercen un control sobre la adenilación enzimática de la glutamina sintetasa, cuya actividad resulta de esta forma modulada. A este propósito hay que tener presente que la reacción de adenilación tiene como sustrato, ya en sí mismo, una proteína alostérica, lo que conduce a la consideración de la posibilidad de que dicho control se ejerza sobre la enzima inactivante —ATP:glutamina sintetasa adeniltransferasa— cuya actividad puede incrementarse

por la unión de glutamina o sobre la glutamina sintetasa misma, cuya vulnerabilidad a la acción de la adeniltransferasa pudiera elevarse por la unión de glutamina. Un hecho trascendente en este sentido es que los efectores positivos de la reacción de transferencia —iones magnesio y glutamina— incrementan el número de grupos -SH de la adeniltransferasa, en tanto que los inhibidores de dicha reacción —3-fosfoglicérico y  $\alpha$ -cetoglutárico— disminuyen el número de dichos grupos titulables con ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico). Ello ha permitido concluir que el control de la reacción de adenilación se ejerce a nivel de la adeniltransferasa (240), y que los mismos sustratos de la reacción como Mg, ATP y glutamina sintetasa no adenilada, son capaces de exponer adicionales grupos -SH a la reacción de titulación, mientras que los sustratos de la reacción inversa (fosforólisis de la AMP-glutamina sintetasa) son capaces de disminuir dicha potencialidad de titulación.

Wolf y Ebner (cf. nota 240), haciendo uso de los anteriores resultados, sugieren la existencia de dos conformaciones límites, abierta y cerrada. La conformación abierta sería catalíticamente más efectiva para la transferencia de adenilo a la glutamina sintetasa; la conformación cerrada sería más apta al objeto de la desadenilación pirofosforolítica de la adeniltransferasa. Esta idea se encuentra soportada por los cambios conformacionales inducidos por  $Mg^{2+}$ . A bajas concentraciones de magnesio se favorece la reacción de desadenilación, a la vez que se observa la presencia de una conformación cerrada para la adeniltransferasa, mientras que las concentraciones óptimas de magnesio para que tenga lugar la reacción adeniltransferásica promueven, a su vez, la conformación abierta.

La *glutamina sintetasa* de mamíferos ha sido también estudiada desde los puntos de vista de su comportamiento catalítico y regulador. Los órganos de los que se ha aislado y purificado son fundamentalmente cerebro (241-242) e hígado (243-245). La enzima de mamíferos exhibe una serie de analogías con la de *E. coli*, por ejemplo, la inactivación por glicocola, L-alanina y L-serina, así como por carbamoil-fosfato y la acción que sobre ella ejercen los iones  $Mn^{2+}$ ; se presentan, sin embargo, diferencias en los órdenes estructural y regulador y que guardan relación con las diferentes funciones que en cada caso esta enzima ha de cumplir. Ciertas diferencias que, por otro lado, también se presentan entre la glutamina sintetasa de cerebro y la procedente de hígado.

La glutamina sintetasa de ambos órganos, hígado y cerebro, tiene

el mismo número de subunidades y con la misma disposición, la misma movilidad electroforética y la misma composición en aminoácidos. El número de subunidades es 8, y, en el caso de la enzima de hígado de rata, la inhibición es completa por la unión de tan sólo cuatro restos de metionina-sulfoximina; la enzima de cerebro requiere mayor número de restos del mismo inhibidor para provocar el mismo grado de inhibición. En la misma línea se encuentra la unión de ATP a la enzima; el número máximo de restos de ATP que la enzima de hígado es capaz de unir asciende a cinco, en tanto que la enzima de cerebro llega a unir hasta ocho restos de ATP, uno por cada subunidad. Esta unión de menor número de ligandos que el que corresponde al número de subunidades ha sido interpretado en virtud de ciertos hechos (246); dejando a un lado la siempre posible inactivación parcial de la enzima, se ha sugerido que la mitad de las subunidades cumplen la misión de unir los aminoácidos inhibidores a las localizaciones alostéricas correspondientes, y que esta unión produzca la inhibición de la actividad catalítica. En este sentido, la problemática está aún abierta acerca de la conexión que este hecho tendría con la diferenciación posible entre las subunidades del oligómero.

La glutamina sintetasa de hígado es más sensible a la activación por  $\alpha$ -cetoglutarico y a la inhibición por aminoácidos que lo es la enzima de cerebro. Esta mayor inhibición por los aminoácidos está en juego con el metabolismo general de la glutamina (247); así, la inhibición de la glutamina sintetasa hepática puede controlar, a su vez, su donación de grupos amino que, captados por diferentes cetoácidos —pirúvico, hidroxipirúvico, etc.—, viene catalizada por la glutamina transaminasa (248). De modo similar, la inhibición de la glutamina sintetasa por carbamoil-fosfato constituye un mecanismo regulador de la cantidad de glutamina disponible para la biosíntesis de pirimidinas.

## **IX. Control del metabolismo por sistemas enzimáticos autoasociantes**

### **1. INTRODUCCIÓN**

La estructura cuaternaria de las enzimas se considera una condición intrínseca a su comportamiento alostérico en el orden regulador; ello equivale, ciertamente, a considerar la existencia de interacciones proteína-proteína entre las subunidades constituyentes. Ahora bien,

desde un punto de vista físico, dichas interacciones pueden tener un tratamiento general, ya que similares tipos de fuerzas han de estar implicadas en todas ellas; sin embargo, desde un punto de vista funcional, cabe distinguir las interacciones entre subunidades en el seno de una enzima activa de las interacciones que resultan de la polimerización de esta forma activa a formas superiores de peso molecular. Son, precisamente, estos *sistemas enzimáticos auto-asociantes* los que vamos a considerar a continuación; sistemas que experimentan reacciones asociación-disociación en dependencia, ya sea de simples variaciones de concentración, o bajo la influencia de ligandos, pero —en todo caso— consistentes con la idea de que dicho fenómeno confiere un mayor grado de control sobre la regulación de la actividad enzimática. Lógicamente, tampoco caen bajo la idea que acabamos de exponer los complejos multienzimáticos (con interacciones proteína-proteína entre enzimas poseedoras de actividades diferentes) ni las enzimas multifuncionales.

En la Tabla 4 figura una serie de enzimas que participan del concepto antes mencionado de enzimas auto-asociantes y de las que pueden destacarse por su posición clave en los procesos metabólicos la *glucógeno-fosforilasa*, *fosfofructo-quinasa* y *acetil-CoA carboxilasa*. Entre ellas, la glucógeno fosforilasa ha sido considerada anteriormente como enzima capaz de dejarse modificar químicamente, hecho que influye en las posibilidades de asociación-disociación, y con lo que se ejemplifica la existencia de mecanismos de regulación de la actividad enzimática, que pueden presentarse en coexistencia sobre el mismo sistema enzimático.

Para investigar el efecto de la asociación sobre la cinética y unión de ligandos de una enzima determinada, hay que evaluar una serie de características, como extensión de la polimerización, constantes de equilibrio y de velocidad, etc.; ello requiere una metodología singular que hace uso de procedimientos de dispersión de luz, electroforéticos, cromatográficos, de ultracentrifugación, filtración por geles, de fluorescencia, viscosimétricos, etc. La variación de las propiedades espectrales que la polimerización induce sobre derivados de las proteínas con grupos cromóforos se utiliza para la medida de las velocidades de polimerización.

Las velocidades de polimerización varían notablemente de unos casos a otros. La polimerización de la acetil-CoA carboxilasa inducida por la presencia de citrato es muy lenta, si bien la medida de la actividad enzimática no distingue la causa de tal velocidad, que puede ser muy

bien una lenta polimerización de la enzima o un lento cambio conformacional inducido por el ligando —etapa determinante de la velocidad—. A este mismo tipo de equilibrio lento de asociación-disociación pertenecen fosfofructoquinasa y fosforilasa *a*; la actividad enzimática de ambas está relacionada con el peso molecular. A elevadas concentraciones de proteínas, la fosforilasa *a* existe bajo la forma de un tetrámero —forma inactiva de la enzima— que se disocia lentamente a la forma activa dímera (sin embargo, teniendo en cuenta las ideas mencionadas sobre auto-asociación y de acuerdo con Frieden (cf. nota 105), las anteriores formas de fosforilasa *a* deben ser mencionadas respectivamente como dímero y monómero).

La glutámico deshidrogenasa de hígado es uno de los representantes mejor estudiados de enzimas que experimentan una asociación-disociación reversible extraordinariamente rápida. Experiencias de Frieden (cf. nota 68) acerca de la dependencia de los efectos cooperativos sobre la concentración enzimática, demuestran que la magnitud de la interacción cooperativa es dependiente de la concentración.

La figura 54 ofrece una representación de Scatchard de la unión de GTP a la glutámico-deshidrogenasa en función de la concentración de enzima ( $r$  es la relación de moles de GTP unido por mol de enzima de peso molecular 400.000). Al aumentar la concentración de enzima, lo hace el grado de polimerización, y asimismo se incrementa la desviación de la forma normal de representación. Los mismos autores estudian la unión de GTP a la glutámico-deshidrogenasa nativa y a una forma químicamente modificada, cuyo comportamiento cinético es normal a bajas concentraciones, pero que no es capaz de experimentar asociación a elevados niveles; de esta forma, la unión del GTP a la enzima activa, no asociada, es completamente normal. Estas experiencias demuestran que la responsabilidad de los efectos cooperativos se debe a la asociación de la enzima bajo formas de elevado peso molecular. La extensión de la cooperatividad depende de la relación de especies de diferente peso molecular y de la relación de las constantes de unión del ligando a las diferentes formas.

Las consecuencias de la rápida asociación-disociación entre formas que poseen la misma actividad intrínseca, pero diferentes afinidades para ciertos ligandos, estriba en el hecho de que tal interacción produce un mayor grado de sensibilidad de la actividad enzimática a la concentración del ligando. Pequeños cambios, pues, en la concentración de ligandos se traducen en grandes cambios de velocidad, con lo que la

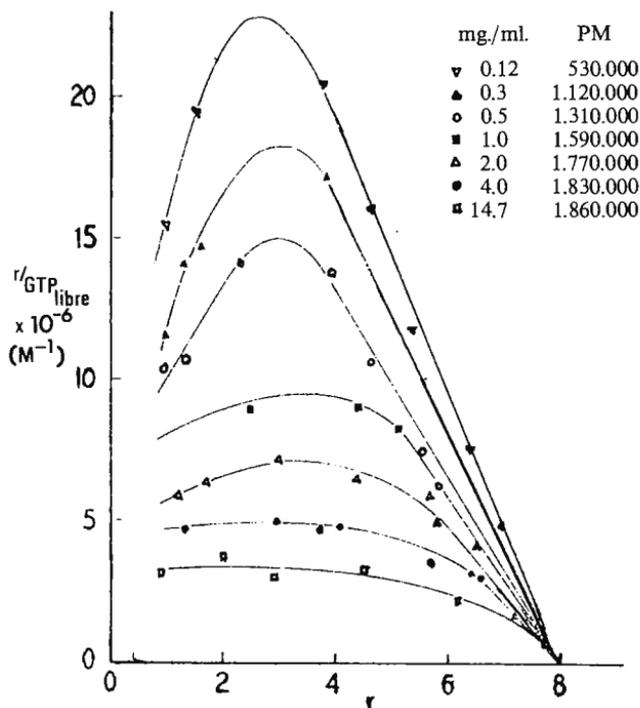


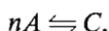
Figura 54

regulación metabólica de las reacciones catalizadas por tales enzimas se hace mucho más sensible.

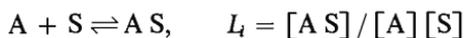
El caso es notoriamente distinto con las enzimas sujetas a reacciones lentas de asociación-disociación; el equilibrio se establece entre formas activas e inactivas, de modo que los factores que lo influyen repercuten sobre el nivel de actividad enzimática sin que resulte afectado su comportamiento cinético. Así, pues —según señala Frieden (249)—, estas transiciones lentas pueden servir para tamponar ciertas alteraciones metabólicas producidas bajo condiciones violentas. El ejemplo que señala Frieden (cf. nota 249) es el de la lenta conversión de la forma inactiva de fosforilasa *a* en su correspondiente estado activo, que puede impedir la desaparición de glucógeno bajo las condiciones extremas de excesiva contracción muscular.

El estudio teórico de las consecuencias cinéticas de la unión de

pequeñas moléculas a sistemas autoasociantes puede tener una cierta similitud al tratamiento de las enzimas alostéricas de Monod; en este caso, sin embargo, es mayor el número de variables implicadas. El modelo de Monod postula la existencia de varios estados conformacionales interconvertibles, con idéntico número de localizaciones de unión que difieren en su afinidad por el ligando; en el equilibrio asociación-disociación, la constante de equilibrio depende de la concentración enzimática en ausencia y en presencia de ligandos que se unirán a diferente número de localizaciones según se trate de monómero o polímero. Uno de los tratamientos más completos sobre la unión de ligandos a diferentes especies poliméricas coexistentes en equilibrio es el de Nichol y colaboradores (250), quienes suministran una base plausible para los efectos alostéricos. Dichos autores derivan una ecuaciones que relaciona la concentración de un soluto (S) libre en mezclas en equilibrio de (A) —monómero— con (C) —polímero—



con una función de unión (denominada  $r$  en la terminología de Nichol), definida como la concentración de (S) unido dividida por la concentración inicial de proteína. El soluto (S) añadido se une a (A) y (C) según reacciones gobernadas por las correspondientes constantes de equilibrio ( $L_i, M_j$ ) y a través de  $p$  localizaciones de unión por mol de (A) ( $i = 1, 2, \dots, p$ ) y  $q$  localizaciones de unión por mol de (C) ( $j = 1, 2, \dots, q$ )



Las constantes de equilibrio,  $L_i$  y  $M_j$ , junto con una constante relacionada con el equilibrio entre (A) y (C), son suficientes para definir cualquier mezcla en equilibrio.

Siendo  $M_S$  el peso molecular de (S) y  $M_A$  el peso molecular del monómero, la función de unión ( $r$ ) viene dada por la expresión

$$r = \frac{M \{ [AS] + 2[AS_2] + \dots + i[AS_i] + \dots + p[AS_p] + [CS] + 2[CS_2] + \dots + j[CS_j] + \dots + q[CS_q] \}}{M \{ [A] + [AS] + \dots + [AS_i] + \dots + [AS_p] \} + nM \{ [C] + [CS] + \dots + [CS_j] + \dots + [CS_q] \}}$$

en la que la sustitución de las expresiones anteriores origina:

$$r = \frac{M_S [A] [S] f'_1 + M_S [C] [S] f'_2}{M_A [A] f_1 + nM_A [C] f_2}$$

donde

$$f_1 = 1 + L_1[S] + \dots + L_1 L_2 \dots L_i [S]^i + \dots + L_1 L_2 \dots L_p [S]^p$$

$$f_2 = 1 + M_1[S] + \dots + M_1 M_2 \dots M_j [S]^j + \dots + M_1 M_2 \dots M_q [S]^q$$

$$f'_1 = df_1/d[S]$$

$$f'_2 = df_2/d[S]$$

Suponiendo que todas las localizaciones de unión son equivalentes,

$$L_i = \frac{\{p - (i - 1)\} K_A}{i}$$

$$M_j = \frac{\{q - (j - 1)\} K_C}{j}$$

$K_A$  y  $K_C$  son las constantes de unión intrínsecas.

La sustitución de estas ecuaciones en las expresiones de  $f_1$  y  $f_2$  resulta

$$f_1 = (1 + K_A [S])^p$$

$$f_2 = (1 + K_C [S])^q$$

que, a su vez, dan para la función de unión

$$r = \frac{\{M_S [A] [S] p K_A (1 + K_A [S])^{p-1} + M_S [C] [S] q K_C (1 + K_C [S])^{q-1}\}}{M_A [A] (1 + K_A [S])^p + n M_A [C] (1 + K_C [S])^q}$$

Frieden (cf. nota 77) compara varios modelos para discutir el comportamiento cinético de las enzimas alostéricas y presenta un mecanismo basado en la polimerización reversible de una enzima, cuyas formas monómera y polímera difieran con respecto a los parámetros cinéticos.

Utiliza como ejemplos los antes mencionados de glutámico-deshidrogenasa de hígado y fosforilasa *a* de músculo. En el primer caso, las especies polímeras unen el ligando inhibidor GTP menos fuertemente que lo hacen las especies de peso molecular 400.000 (monómero). De manera similar, la fosforilasa *a*, de peso molecular 380.000, une muy escasamente glucógeno en comparación con la enzima disociada de peso molecular 190.000. Tales situaciones pueden describirse, efectivamente, de una forma análoga a la propuesta por Monod, en la que los estados conformacionales diferentes se sustituyen por el equilibrio entre monómero y polímero. Según dicho modelo, la fracción de saturación,  $\bar{Y}$ , de una proteína con el ligando es

$$\bar{Y} = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n}$$

donde  $L$  es la constante de equilibrio entre los dos estados conformacionales;  $c$  la diferencia en la capacidad de los dos estados para unir el ligando;  $n$  es el número de localizaciones para la unión de ligandos por mol de proteína y  $\alpha$  es la concentración de ligando reducida, esto es, la concentración de ligando no unido dividida por una constante de unión ( $K_1$ ) para la conformación de proteína que une más fuertemente el ligando.

Una de las suposiciones de este modelo, que es esencial al razonamiento de Frieden (cf. nota 77) es que la unión de una molécula de ligando a un estado conformacional particular no afecte en modo alguno a la constante de unión intrínseca de otra molécula de ligando que se une a una diferente localización del mismo estado conformacional. Frieden convierte la ecuación de unión en una ecuación cinética, sustituyendo  $\bar{Y}$  por la fracción  $v_0/nV_{\max}$ , donde  $v_0$  es la velocidad inicial,

$$\frac{v_0}{nV_{\max}} = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n}$$

La aplicación de la ecuación de unión a los datos cinéticos requiere supuestos adicionales como: *a*) que exista un rápido equilibrio entre todas las especies moleculares en las que participa la enzima bajo todas las formas conformacionales y que la etapa limitante de la velocidad de la acción catalítica en su conjunto no se localiza en alguna de estas etapas; *b*) que el modificador afecta solamente a la relación de los dos estados conformacionales y no a la unión del sustrato; *c*) que  $\alpha$  se refiere exclusivamente a la unión del sustrato. Si un modificador afectara la

velocidad inicial máxima, la ecuación anterior tendría que ofrecer otra relación entre los parámetros cinéticos y la concentración del modificador.

En la reacción catalizada por la glutámico-deshidrogenasa, la velocidad de asociación o disociación es rápida, mientras que la velocidad de disociación de la fosforilasa *a* es muy lenta comparada con la velocidad total de la reacción enzimática. Para la glutámico-deshidrogenasa, el término *L* de la ecuación anterior ha de incluir la concentración de enzima libre y la constante de equilibrio de la polimerización. Así, suponiendo que un monómero posee *n* localizaciones (el dímero con *2n* localizaciones) y que existe un rápido equilibrio de todas las especies enzimáticas, puede demostrarse que

$$\frac{v}{nV_{\max}} = \frac{k_1\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + 2k_2K_{eq}(E_n)d\alpha(1 + d\alpha)^{2n-1}}{(1 + \alpha)^n + 2K_{eq}(E_n)(1 + d\alpha)^{2n}}$$

siendo  $k_1$  y  $k_2$  las constantes de velocidad para la escisión del complejo enzima-sustrato en el que participan, respectivamente, monómero y dímero;  $K_{eq}$  es la constante de equilibrio para la dimerización  $(E_{2n})/(E_n)^2$  y  $(E_n)$  es la concentración del monómero libre; *d* es la relación de constantes de disociación de sustrato a monómero y dímero. En este caso la concentración de enzima libre es

$$E_n = \frac{-(1 + \alpha)^n + \sqrt{(1 + \alpha)^{2n} + 4E_0 K_{eq}(1 + d\alpha)^{2n}}}{2K_{eq}(1 + d\alpha)^{2n}}$$

que puede sustituirse en la ecuación cinética anterior.

Un sistema enzimático que sigue este tipo de mecanismo puede exhibir una cinética normal a bajas concentraciones de enzima (esto es, en ausencia de interacción), una dependencia anormal de la velocidad inicial en función de la concentración de ligando a concentraciones enzimáticas medias y una dependencia normal a elevadas concentraciones; situación que ha sido observada asimismo por Frieden (cf. nota 68) en el caso de la glutámico-deshidrogenasa, en el que la forma monómera une el ligando GTP más fuertemente que cualquier forma de peso molecular más elevado, dando lugar a una interacción cooperativa aparente entre localizaciones de GTP a niveles enzimáticos en los que se presenta cierto grado de asociación; a los bajos niveles enzimáticos a los que se llevan a cabo por lo general las experiencias cinéticas, tal efecto cooperativo no se presenta.

TABLA 4

## SISTEMAS ENZIMATICOS AUTO-ASOCIANTES

Acetil-CoA carboxilasa	P. R. VAGELOS, A. W. ALBERTS y D. B. MARTIN: <i>J. Biol. Chem.</i> 238, 533 (1963). S. NUMA, E. RINGELMAN y B. RIEDEL: <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 24, 750 (1966). C. GREGOLIN, E. RYDER, A. K. KLEINSCHMIDT, R. C. WARNER y M. D. LANE: <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 56, 148 (1966). G. HENNIGER y S. NUMA: <i>Z. physiol. Chem.</i> 353, 459 (1972).
D-aminoácido oxidasa	P. A. CHARLWOOD, G. PALMER y R. BENNETT: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 50, 17 (1961). K. YAGI: <i>J. Biochem.</i> 61, 580 (1967).
Arginina descarboxilasa ( <i>E. coli</i> )	E. A. BOEKER y E. E. SNELL: <i>J. Biol. Chem.</i> 243, 1678 (1968).
Aspártico-descarboxilasa ( <i>A. faecalis</i> )	S. S. TATE y A. MEISTER: <i>Biochemistry</i> 7, 3240 (1968). W. F. BOWERS, V. B. CZUBAROFF y R. H. HAS- CHEMEYER: <i>Biochemistry</i> 9, 2620 (1970).
Aspártico-quinasa III ( <i>E. coli</i> )	P. J. VON DIPPE, A. ABRAHAM, C. A. NELSON y W. G. SMITH: <i>J. Biol. Chem.</i> 247, 2433 (1972).
Glutámico-descarboxilasa ( <i>E. coli</i> )	P. H. STRAUSBAUCH y E. H. FISCHER: <i>Biochem- istry</i> 9, 226 (1970).
Glutámico-deshidrogenasa	E. REISLER y H. EISENBERG: <i>Biopolymers</i> 9, 877 (1970).
Glutaminasa	E. KVAMME, B. RREIT y G. SVENNEBY: <i>J. Biol. Chem.</i> 245, 1871 (1970). B. R. OLSEN, G. SVENNEBY, E. KVAMME, B. TREIT y T. ESKELAND: <i>J. Mol. Biol.</i> 52, 239 (1970).
Homoserina deshidrogenasa	R. MANKOVITZ y H. L. SEGAL: <i>Biochemistry</i> 8, 3757 (1969).
Treonina desaminasa ( <i>E. coli</i> )	P. D. WHANGER: <i>J. Biol. Chem.</i> 243, 167 (1968). M. HIRATA, M. TOKUSHIGE, A. INAGAKI y O. HAYAISHI: <i>J. Biol. Chem.</i> 240, 1711 (1965).
Triptofano-sintetasa (B) ( <i>E. coli</i> )	G. M. HATHAWAY y I. P. CRAWFORD: <i>Biochem- istry</i> 9, 1801 (1970).
Triptofanasa ( <i>E. coli</i> )	K. P. GOPINATHAN y R. D. DEMOSS: <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 56, 1223 (1966). Y. MORINO y E. E. SNELL: <i>J. Biol. Chem.</i> 242, 5591 (1967).
Tirosinasa	R. L. JOLLEY, D. A. ROBB y H. S. MASON: <i>J. Biol. Chem.</i> 244, 1593 (1969).
Fosfoenolpirúvico carboxilasa ( <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> )	P. MAEBA y B. D. SANWAL: <i>J. Biol. Chem.</i> 244, 2549 (1969). T. E. SMITH: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> 137, 512 (1970).

Fosfofructo-quinasa	A. PARMEGGIANI, J. H. LUFT, D. S. LOVE y E. G. KREBS: <i>J. Biol. Chem.</i> <b>241</b> , 4625 (1966).
	R. ODEIDE, A. SAVANY, M. PUYHARDIE, J. C. PETIT, L. JOHNSON y A. J. ROSENBERG: <i>C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. (D)</i> <b>270</b> , 2495 (1970).
Glucógeno-fosforilasa	B. METZGER, E. HELMREICH y L. GLASER: <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> <b>57</b> , 994 (1967).
	C. Y. HUANG y D. J. GRAVES: <i>Biochemistry</i> <b>9</b> , 660 (1970).
Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa	V. HOAGLAND y D. C. TELLER: <i>Biochemistry</i> <b>8</b> , 594 (1969).
Carbamilfosfato-sintetasa ( <i>E. coli</i> )	P. M. ANDERSON y S. B. MARVIN: <i>Biochemistry</i> <b>9</b> , 171 (1970).
Isopropilmálico-sintetasa ( <i>S. typhimurium</i> )	T. R. LEARY y G. KOHLHAW: <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> <b>39</b> , 494 (1970).
Citidinatrifosfato-sintetasa	C. W. LONG, A. LEVITZKI y D. E. KOSHLAND: <i>J. Biol. Chem.</i> <b>245</b> , 80 (1970).
Citidina desaminasa	G. F. MALEY y F. MALEY: <i>J. Biol. Chem.</i> <b>243</b> , 4506 (1968).
Desoxitimidina quinasa	N. IWATSUKI y R. OKAZAKI: <i>J. Mol. Biol.</i> <b>29</b> , 139 (1967).
Isocítrico-deshidrogenasa	N. A. GIORGIO, A. T. YIP, J. FLEMING y G. W. E. PLAUT: <i>J. Biol. Chem.</i> <b>245</b> , 5469 (1970).
Fosfatasa alcalina ( <i>E. coli</i> )	J. A. REYNOLDS y M. J. SCHLESINGER: <i>Biochemistry</i> <b>8</b> , 4278 (1969).
	D. J. WINZOR: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> <b>200</b> , 423 (1970).

La mayor parte de estos datos han sido tomados de la recopilación de Frieden (*Ann. Rev. Biochem.* **40**, 653, 1971).

Vamos a continuación a destacar la importancia de algunas enzimas autoasociantes en el orden regulador.

## 2. ACETIL-COÁ CARBOXILASA

La *acetil-CoA carboxilasa* cataliza la primera etapa de la biosíntesis de ácidos grasos y pertenece al grupo de las denominadas biotin-enzimas (251-252); grupo al que asimismo pertenecen propionil-CoA carboxilasa, pirúvico-carboxilasa, metilmalonil-CoA oxalacético transcarboxilasa y  $\beta$ -metilcrotonil-CoA carboxilasa. Todas ellas vienen caracterizadas por la propiedad de unir anhídrido carbónico según la reacción general:



con la formación de una carboxibiotin-enzima, que cede en ulterior etapa el  $\text{CO}_2$  al aceptor específico del sistema enzimático y que, en el caso de la acetil-CoA carboxilasa, ocurre según



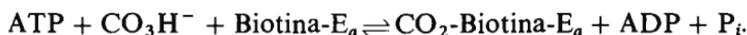
La carboxibiotin enzima ha sido aislada y caracterizada (253).

La acetil-CoA carboxilasa de hígado, de tejido adiposo y de otros diversos orígenes, requiere para su actividad citrato, isocitrato o algún otro ácido di- o tri-carboxílico (254-257), siendo Vagelos y colaboradores los primeros en señalar que dicho efecto del citrato está asociado con la conversión reversible de la forma protómera inactiva en una forma polímera activa. Los estudios más extensos sobre esta enzima se han llevado a cabo con hígado de pollo, cuya forma inactiva posee un peso molecular de 410.000 y se agrega para originar formas activas de peso molecular 4-8.000.000, con estructura filamentososa de 80-100 Å de anchura y 0.2-0.5  $\mu$  de longitud. Estas formas polímeras están constituidas por 10-20 protómeros unidos linealmente.

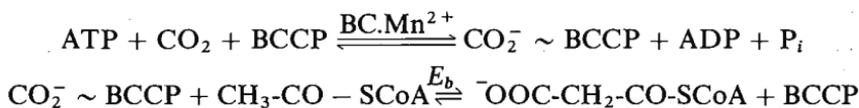
La mencionada acción del citrato favorece dicha agregación de la misma forma que isocitrato, malonato, fosfato y un débil pH ácido (6.15-7). De otro lado, ATP (o ATP-Mg), malonil-CoA o elevadas concentraciones de sales favorecen la desagregación e inactivación de la enzima (258). La disociación de la forma polímera se produce asimismo a valores de pH superiores a 7.5 y por la carboxilación de la enzima con formación de carboxi-biotin enzima.

El equilibrio asociación-disociación es muy lento, lo que sugiere un cambio conformacional asimismo lento, inducido por la presencia del ligando, y que induce formas que polimerizan en diferente medida.

En acetil-CoA carboxilasa de *E. coli* se han descubierto varias subunidades funcionales (259-260); se trata, pues, de un sistema multi-enzimático que, de la misma manera que el complejo ácido graso sintetasa, incluye una proteína portadora («carrier protein»). Vagelos y colaboradores han aislado dos subunidades activas,  $E_a$  y  $E_b$ , cuya presencia conjunta es esencial a la acción enzimática carboxilante de la acetil-CoA, requiriendo asimismo la presencia de ATP y  $\text{Mn}^{2+}$ . La subunidad  $E_a$  contiene 2.3 nmoles de biotina por miligramo de proteína, mientras que  $E_b$  no contiene biotina. La acción de  $E_a$  consiste en su participación en la reacción,



Los ensayos de  $E_a$  están basados en la medida de la carboxilación, según el esquema anterior, en la incorporación de biotina- $^{14}\text{C}$  por auxótrofos de biotina o en la copulación con la acción de  $E_b$  en la carboxilación de acetil-CoA. La funcionalidad de  $E_b$  ha sido estudiada utilizando como sustrato carboxibiotina- $E_a$ - $^{14}\text{C}$  (261), que transporta el  $\text{CO}_2$  a la acetil-CoA para originar malonil-CoA. La fracción  $E_a$  se disocia a pH 9, dando lugar a dos proteínas diferentes; una es la biotina-carboxilasa (BC), y la otra es la biotina-proteína transportadora del carboxilo (BCCP). La fracción  $E_b$  posee la función de transcarboxilasa. A continuación figura la participación de dichas tres proteínas,



de forma que la biotina carboxilasa cataliza la carboxilación de BCCP, dependiente de ATP y  $\text{Mn}^{2+}$ , que contiene unida biotina de forma covalente. La fracción  $E_b$  cataliza la transcarboxilación desde  $\text{CO}_2^-$  BCCP a la acetil-CoA. La biotina-proteína se ha obtenido en forma pura y homogénea a partir de *E. coli* (cf. nota 260). Una proteína similar ha sido aislada a partir de metilmalonil-CoA-oxalacético transcarboxilasa de *P. shermanii* (262). Las preparaciones de BCCP obtenidas de *E. coli* se presentan en varias formas de diferente tamaño; sus pesos moleculares son 40.000, 10.267 y 9.100. Los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{max}}$  para las dos formas inferiores de BCCP son exactamente iguales, mientras que la forma de mayor tamaño posee valores superiores de  $V_{\text{max}}$  e inferiores de  $K_m$  en la reacción de carboxilación de acetil-CoA. La forma de mayor tamaño de BCCP se disocia espontáneamente en formas de tamaño inferior, sin que sus relaciones sean bien conocidas en la actualidad.

La proteína-biotina, BCCP, posee ciertas semejanzas con la proteína transportadora de acilo (ACP), presente en el complejo multienzimático de la ácido graso sintetasa. Ambas proteínas son componentes de un complejo firmemente asociado en organismos diferentes de *E. coli*, que rinde complejos fácilmente dissociables; ambas proteínas poseen grupos prostéticos covalentemente unidos, biotina en BCCP y 4'-fosfopaneteína en ACP, a los que se unen los respectivos sustratos. A partir de germen de trigo se ha aislado una forma intermedia de acetil-CoA carboxilasa, que puede disociarse en dos proteínas activas que corresponden a las consideradas  $E_a$  y  $E_b$  en *Coli*, pero sin que haya sido posible su ulterior resolución.

La regulación de la síntesis de ácidos grasos tiene en la actuación de la acetil-CoA carboxilasa una etapa limitante de la velocidad de síntesis «in vitro». La acetil-CoA carboxilasa viene regulada tanto en su actividad como en sus niveles; la actividad enzimática viene alostéricamente regulada por la acción de distintos tipos de efectores. La definida acción activadora que ejercen entre otros ácidos orgánicos citrato e isocitrato, está asociada con la polimerización de protómeros inactivos en filamentos poliméricos activos. Estudios cinéticos llevados a cabo con las reacciones parciales que la enzima en su conjunto cataliza, han demostrado que ambas vienen estimuladas por el citrato; análisis cinéticos realizados con la enzima de diferentes orígenes (hígado de rata, hígado de ave, tejido adiposo) han concluido que el efecto fundamental del citrato se ejerce sobre la velocidad máxima de la enzima más que sobre los valores de  $K_m$  para los sustratos. Teniendo presente que un ingrediente común de ambas reacciones es la biotina, Lane (263) ha demostrado que el citrato origina cambios conformacionales en la zona de proteína próxima a la unión con la biotina; demostración evidenciada por la disminución de la reactividad del grupo prostético con avidina y por el incremento de la reactividad de la carboxibiotin-enzima en presencia de citrato.

Un hecho que merece destacarse en este punto es que los efectos alostéricos que ejerce el citrato no han podido ponerse de manifiesto en la enzima de origen bacteriano (264) (cf. nota 261).

La significación fisiológica del citrato como regulador de la acetil-CoA carboxilasa no está suficientemente clara; una interpretación lógica a primera vista es que los altos niveles de los intermediarios del ciclo de Krebs —incluido citrato— como consecuencia de una elevada ingestión alimenticia, estimularían la síntesis de los ácidos grasos a través de la acetil-CoA carboxilasa. Una dificultad importante que se opone a esta interpretación es que la activación de la carboxilasa requiere concentraciones de citrato relativamente elevadas ( $10^{-3}$ - $10^{-2}M$ ), lo que es difícil de concebir, dado que el 70 por 100 del citrato es intramitocondrial (células de hígado de mamíferos), y la enzima es extramitocondrial; también puede ocurrir que los niveles necesarios para la activación «in vivo» sean inferiores a los requeridos «in vitro».

La relación antes apuntada de la acción del citrato con el comportamiento de la avidina y los cambios conformacionales de la proteína ha sido objeto de más profundos estudios al observarse que la acetil-CoA carboxilasa tratada con avidina descarboxila, aunque lentamente,



término, el que la subunidad  $E_b$  de la acetil-CoA carboxilasa de *E. coli*, con función de transcarboxilasa, cataliza la descarboxilación de malonil-CoA a pesar de que no contiene biotina covalentemente unida (267).

El comportamiento del citrato es diferente en dependencia de la naturaleza del proceso de descarboxilación; si la descarboxilación transcurre con dependencia de la biotina, se incrementa en presencia del sustrato aceptor —acetil-CoA— y del citrato o isocitrato, en tanto que el proceso independiente de biotina no se afecta por avidina ni por citrato y se inhibe ligeramente por acetil-CoA. Además, el hecho de que el citrato sea activador de las reacciones 1 y 2, en las que es también común la participación de la biotina, habla en favor de que sea ésta el blanco de la acción del citrato. A ello se une la evidencia de los cambios conformacionales promovidos por el citrato en el entorno polipeptídico de la biotina que la hacen inaccesible a la avidina.

Dentro del mismo esquema de modulación de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa, Bortz y Lynen (268) han demostrado que concentraciones fisiológicas de acil-CoA de cadena larga inhiben la actividad de la acetil-CoA carboxilasa; esta inhibición es competitiva con relación al citrato, y no competitiva con relación a los sustratos, acetil-CoA, biocarbonato o ATP, estando por otro lado asociada a la despolimerización de la enzima. La regulación de la síntesis de ácidos grasos por los niveles de acil-CoA de cadena larga supone un interesante mecanismo de control; como la concentración hepática de los derivados acilados de CoA de cadena larga se incrementa (durante el ayuno y dieta grasa) de modo secundario a la lipólisis del tejido adiposo, se puede suponer que las condiciones fisiológicas asociadas a lipólisis incrementada y disminución de la síntesis de ácidos grasos admitan una explicación en la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa en el hígado por los acil-derivados de CoA de cadena larga. La unión inespecífica de acil-CoA a diversas proteínas y enzimas y su inhibición de diversas enzimas, la activación que produce sobre algunas enzimas —fosfoenolpirúvico carboxilasa— análoga a la producida por alcoholes de cadena larga, dificultan la interpretación fisiológica del comportamiento mencionado de los acil-derivados de coenzima A.

Veamos a continuación qué factores son capaces de influenciar los niveles de acetil-CoA carboxilasa. Los niveles de la enzima, en cualesquiera de sus formas —protómero, polímero en presencia de citrato y desagregada en presencia de palmitoil-CoA— son precipitados por los anticuerpos obtenidos con acetil-CoA carboxilasa de hígado de ave, los

que, por otro lado, dan reacción cruzada con la enzima de hígado de rata. Nakanishi y Numa (269) demuestran que las variaciones producidas en la actividad de la acetil-CoA carboxilasa por influencias dietéticas y en estados diabéticos, se explican a base de diferencias en la cantidad de enzima; diferencias que se producen por alteración en ambos fenómenos, síntesis y degradación de la enzima. Así, por ejemplo, en los estados diabéticos, la velocidad de degradación es normal, en tanto que la velocidad de síntesis está disminuida; la disminución que se produce en los niveles de enzima en animales en ayuno se debe a ambos: disminución de la síntesis e incremento en la degradación de la misma.

A diferencia de los resultados obtenidos en hígado acerca de las modificaciones en los niveles de acetil-CoA carboxilasa inducidos por variaciones dietéticas, en hepatomas de ratas no se producen estas modificaciones, si bien ambas enzimas aisladas presentan el mismo comportamiento «in vitro» en la activación por citrato e inhibición por palmitoil-CoA. Es claro, pues, que los factores que influyen en las modificaciones en los niveles en hígado no son capaces de hacerlo en hepatomas.

Los niveles de acetil-CoA carboxilasa se han visto regulados por represión en *L. plantarum* (270-274), debida a ácidos grasos insaturados; control enzimático que no se ha demostrado en *E. coli*.

La acetil-CoA carboxilasa se ha obtenido también en forma pura a partir de hígado de rata (272-273), mediante combinación alternada de precipitaciones con sulfato amónico y cromatografías sobre DEAE-celulosa, gel de fosfato cálcico y Sepharosa 2B. Este tipo de preparaciones, por completo homogéneas, exhiben un peso molecular de 215.000 y, mediante electroforesis, en presencia de dodecilsulfato sódico, se logra su disociación en subunidades diferentes de pesos moleculares 118.000 y 125.000. El dímero es bastante estable, resiste en cierto grado la acción del dodecil-sulfato sódico a la temperatura ambiente y contiene 0.91 mol de biotina y 2.1 moles de fosfato por 215.000 daltons; ello significa, por un lado, que sólo una de las subunidades contiene biotina y, por otro, que el fosfato puede estar localizado en una de las subunidades o en ambas.

Por lo que a la presencia de biotina se refiere, estas preparaciones de acetil-CoA carboxilasa de hígado de rata presentan características semejantes a las exhibidas por la enzima de *E. coli*, tales que de las subunidades en que el dímero se escinde tan sólo una de ellas posee dicho cofactor. La comparación resulta difícil, sin embargo, con los preparados

enzimáticos procedentes de hígado de pollo, en los que resulta un mol de biotina por 410.000 daltons de protómero (cf. nota 259), prácticamente la mitad que en el caso de hígado de rata.

En cuanto a la presencia de fosfato ligado en las preparaciones enzimáticas de hígado de rata, se ha señalado —y la idea no deja de ser tentadora— la posibilidad de que la acetil-CoA carboxilasa participe en los mecanismos reguladores a través de los sistemas de asociación-disociación y, a la vez, a través de cambios covalentes de la enzima.

Las preparaciones enzimáticas de hígado de rata guardan, sin embargo, diversas analogías con las correspondientes de hígado de pollo; así, son similares la composición respecto de algunos aminoácidos y la estabilidad que presentan a 5° y 20°.

A propósito de la acetil-CoA carboxilasa debe recordarse, finalmente, cómo se trata de uno de los pocos casos de «configuraciones abiertas» de tipo oligomérico con funciones catalíticas y reguladoras; ello contrasta en cierta manera con que la mayoría de las proteínas de este tipo —colágeno, miosina, proteínas capsulares de virus, etc.—, poseen fundamentalmente propiedades de naturaleza estructural. Ambos hechos se han pretendido conjugar atribuyendo a los filamentos de acetil-CoA carboxilasa una adicional finalidad estructural, que, para Lane (274), servirían de matrices sobre las que construir complejos supra-moleculares lábiles en los que estarían presentes enzimas de la síntesis de ácidos grasos y de la lipogénesis.

## X. Complejos multienzimáticos

### 1. INTRODUCCIÓN

Los *complejos multienzimáticos* son capaces también de manifestar interacciones proteína-proteína con idénticos tratamientos y características desde el punto de vista físico que las interacciones entre subunidades de una enzima o las mostradas por los sistemas enzimáticos auto-asociantes. Desde el punto de vista funcional, los complejos multienzimáticos se caracterizan por la presencia de actividades catalíticas diferentes en el seno de niveles cuaternarios de estructura.

La consideración de estos complejos multienzimáticos, desde el punto de vista de la multiplicidad de funciones, lleva a una distinción

primera atendiendo a la fuerza de la unión entre las proteínas. Así, se tienen a modo de ejemplo:

- A) Complejos enzimáticos en los que la unión de proteínas poseedoras de actividades diferentes es muy sólida y no se distorsiona con facilidad.

*Acido graso sintetasa* (levadura, mamíferos, aves).

*α-Cetoácido-deshidrogenasa* (mamíferos)

*Antranílico-sintetasa* (bacterias)

*Acetil-CoA carboxilasa* (*E. coli*)

- B) Complejos enzimáticos en los que la unión de proteínas poseedoras de actividades catalíticas diferentes es más débil y con frecuencia la especificidad de alguna de las enzimas se altera por las demás.

*Lactosa sintetasa*

*Triptófano-sintetasa y complejo aromático*

*Cisteína sintetasa*

*Nitrato-reductasa*

Al lado de los anteriores complejos enzimáticos constituidos por niveles cuaternarios de estructura a base de la interacción de múltiples proteínas portadoras de actividades catalíticas diferentes, existen sistemas enzimáticos multifuncionales radicados en una proteína única.

- C) ENZIMAS MULTIFUNCIONALES.

*Aspártico-quinasa I-Homoserina deshidrogenasa I* (*E. coli*)

*Aspártico-quinasa II-Homoserina deshidrogenasa II* (*E. coli*)

*PRAMP ciclohidrolasa* (1-N-(5'-fosforribosil)-ATP pirofosfohidrolasa, 1-N-(5'-fosforribosil)-AMP ciclohidrolasa, histidinol deshidrogenasa)

*DNA polimerasa.*

La posibilidad existe, por último, de que la multifuncionalidad presente en el complejo enzimático sea catalítica y reguladora, localizada en subunidades diferentes.

- D) *Aspártico-transcarbomilasa*

Conviene tener presente que algunos de los anteriores complejos enzimáticos participan en equilibrios disociación-reasociación, gobernados por las condiciones del entorno, como en ciertos complejos de ácido graso sintetasa. El origen de los complejos enzimáticos es, con

frecuencia, causa de comportamiento distinto en el orden estructural y funcional; así, la acetil-CoA carboxilasa de *E. coli* se comporta como complejo enzimático fuertemente ligado, en tanto que la procedente de tejido adiposo e hígado es una enzima auto-asociante. Otro ejemplo de interés lo constituye el complejo de ácido graso sintetasa; el complejo de levadura, aves y mamíferos, es muy estable, y como tal se aísla, si bien su conducta ante la disociación-reasociación ofrece características diferenciales; el complejo enzimático no se logra aislar como tal en *E. coli* aunque se identifican la totalidad de las reacciones enzimáticas constituyentes aisladas, que pueden separarse por los procedimientos convencionales de fraccionamiento de proteínas.

Los complejos multienzimáticos representan un nivel de organización superior al de las enzimas monofuncionales solubles, que, al asociarse bajo sistemas específicos, suministran modelos funcionales altamente eficaces. La diversidad de estos modelos y la naturaleza diferente de los complejos multienzimáticos otorga a éstos particularidades señaladas en orden a los mecanismos de control para la regulación de procesos específicos.

A continuación se describen ejemplos representativos de los mencionados grupos.

## 2. ACIDO GRASO SINTETASA

El sistema enzimático conocido como *ácido graso sintetasa* se descubrió en la levadura por Lynen bajo la forma de complejo multienzimático (275-276), y extendido más tarde a otros diversos orígenes tales como hígado de ave (277), hígado de rata (278), glándula mamaria de rata (279), *Mycobacterium phlei* (280) y plantas superiores (281-283). Este tipo de complejos enzimáticos, con sus diversas procedencias, cataliza reacciones químicas de la misma naturaleza, si bien ofrecen ciertas diferencias en sus propiedades moleculares, y en particular por lo que se refiere a su organización estructural. Se trata de entidades de elevado peso molecular que reúnen una colección de actividades enzimáticas bajo la forma de complejos fuertemente asociados, estables en condiciones fisiológicas. Una comparación de estas propiedades se resume en la Tabla 5.

La naturaleza y el detalle de las reacciones catalizadas por dichos complejos enzimáticos han sido aclarados por Lynen merced a la utilización de sustratos modelo, la identificación de acil-derivados de

TABLA 5  
 PROPIEDADES DEL COMPLEJO DE ACIDO GRASO SINTETASA DE DIFERENTES ORIGENES

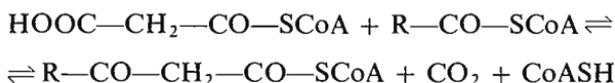
Origen Propiedades	Levadura	E. coli	Plantas	Hígado de pichón	Hígado de rata	Glándula mamaria (rata)	Glándula mamaria (conejo)
Complejo enzimático...	Fuerte	Lábil	Lábil	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Fuerte
Peso molecular.....	$2.3 \times 10^6$	—	—	$4.5 \times 10^5$	$5.4 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$9.1 \times 10^5$
$S_{20,0}$ .....	40.6	—	—	14.5	12.2	12.9	16.2
Unidades.....	3-5	—	—	1	1	1	—
Proteínas/unidad.....	7	—	—	5-8	—	—	—
4'-fosfopanteteína/ unidad enzimática....	3	ACP	ACP	1	1	—	—
FMN/unidad enzimática.....	4	0	0	0	0	—	—

Figuran (—) en las características que no son de aplicación a casos particulares o en los que no han sido determinadas.

la proteína enzimática y, sobre todo, al estudio de sistemas bacterianos. En contraste con los complejos multienzimáticos de ácido graso sintetasa de los orígenes antes mencionados —fuertemente asociados—, el sistema responsable de la biosíntesis de los ácidos grasos en bacterias, *Clostridium kluyveri* y *E. coli* (248-285), se presenta bajo una forma fuertemente disociada en las proteínas individuales. Un problema se presenta, pues, lleno de interés acerca del grado de interacción «in vivo» de los componentes enzimáticos que conducen en bacterias a la obtención de los ácidos grasos de cadena larga y de las posibilidades de su obtención y aislamiento sin provocar su disociación.

Una singular forma de tratamiento para el estudio de estos complejos enzimáticos consiste en averiguar las características moleculares y catalíticas de los sistemas procedentes de células con cierta particular significación. En este sentido, Bloch (286) ha estudiado el sistema enzimático de *Euglena gracilis* —dotada de características potenciales animales y vegetales—, encontrando en dichas células dos tipos diferentes de ácido graso sintetasa.

El estudio de los sistemas bacterianos —obtenidos bajo la forma de componentes individuales— permitió inicialmente (287-288) el esclarecimiento de la reacción de intercambio:



dependiente de malonil-CoA. Esta reacción permitió dilucidar el intercambio malonil-CoA—CO<sub>2</sub> y su participación en la síntesis total de ácidos grasos, pero no pudo, en su iniciación, aclarar la cuestión de la naturaleza de los productos de condensación.

La naturaleza de dichos intermediarios quedó esclarecida por Lynen en experiencias de estimulación por tioles y de inhibición por agentes de bloqueo de dichos grupos —SH, así como por Vagelos al aislar —utilizando el sistema enzimático de *E. coli*— acil-S-proteína y definir la participación metabólica y características estructurales de esta proteína (289-292). De acuerdo con los resultados de dichas experiencias, Lynen (cf. nota 276) ha postulado el ciclo de reacciones catalizadas por el complejo enzimático de ácido graso sintetasa, a base de siete diferentes etapas enzimáticas, que figura en la página siguiente. En este conjunto de reacciones catalizadas por el complejo enzimático, el —SH superior se refiere al procedente de la proteína transportadora



de acilo (ACP), y el —SH inferior a una localización presente en la enzima condensante.

En la reacción inicial, la acil-transferasa cataliza la transferencia de un resto acetilo de la acetil-CoA al grupo tiólico de la proteína condensante o también de un resto acilo, en general, desde el —SH de la proteína transportadora al —SH de la enzima condensante. Ello va seguido de la transferencia de un resto de malonilo de su derivado de coenzima A al —SH de la proteína transportadora; de esta forma quedan bloqueados en el complejo enzimático, el grupo —SH de la proteína transportadora por el malonilo y el grupo —SH de la enzima condensante por un acilo (acetilo en el primer ciclo de reacciones, butirilo en el segundo, etc.). El malonil-acil-complejo así formado experimenta una reacción de condensación en la que el resto acilo (acetilo en el caso del primer ciclo) ataca el grupo metileno nucleofílico del malonil-tioéster con el desprendimiento acoplado de  $CO_2$  con lo que se favorece termodinámicamente la reacción de condensación que rinde  $\beta$ -cetoacilenzima. A partir de este momento tienen lugar una serie de reacciones enzimáticas en el resto acilo que permanece unido al —SH de la proteína transportadora; son estas reacciones de reducción, deshidratación y ulterior reducción, después de lo que se obtiene un acil-complejo. Este acil-complejo puede ser sustrato de varios tipos de reacciones en dependencia de la longitud de la cadena carbonada del ácido graso. Si el resto acilo no ha alcanzado aún la longitud suficiente para su separación, continúa el alargamiento de la cadena mediante una previa transferencia a la posición —SH de la enzima condensante, con lo que queda el conjunto apto para la nueva entrada y condensación con otra molécula de malónico; si, por el contrario, la longitud de la cadena del ácido graso es adecuada, se transfiere a la coenzima A y como tal acil-CoA se libera en el complejo enzimático de levadura (293), siendo ácidos grasos libres los productos finales en los casos de los complejos enzimáticos de hígado de aves y mamíferos y tejido adiposo.

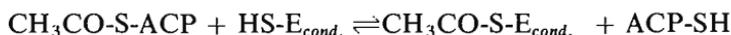
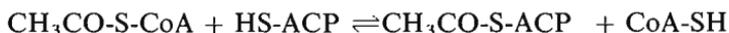
La naturaleza del producto final, así como ciertas características de la iniciación de las reacciones en *E. coli*, tienen ciertas propiedades de acuerdo con la naturaleza disociable del complejo y con la bien definida naturaleza de la proteína transportadora de acilo. Un resumen de la naturaleza de los sustratos iniciales y productos finales de la reacción según el origen del complejo aparece en la Tabla 6. Así, la reacción inicial de transferencia de acilo tiene lugar desde la acetil-CoA

TABLA 6

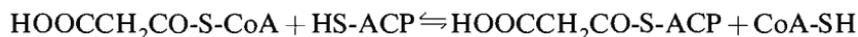
CARACTERISTICAS DE LA REACCION CATALIZADA POR EL COMPLEJO ACIDO GRASO SINTETASA

ORIGEN DEL COMPLEJO	sustratos iniciales	productos finales	cofactores
Levadura	acetil-CoA y malonil-CoA	palmitoil-CoA y estearoil-CoA	NADPH, FMN
E. coli	acetil-ACP y malonil-ACP	vaccenico y esteárico	NADPH - NADH
Plantas	acetil-ACP y malonil-ACP	palmitico y esteárico	NADPH - NADH
Hígado pichón	acetil-CoA y malonil-CoA	palmitico	NADPH
Hígado rata	acetil-CoA y malonil-CoA	palmitico	NADPH
Glándula mamaria (rata)	acetil-CoA y malonil-CoA	palmitico	NADPH

a la proteína ACP, para ser luego transferido al grupo —SH de la enzima condensante.



De igual manera, la malonil-CoA—ACP transacilasa cataliza la transferencia del resto de malonilo a la proteína ACP.



De esta forma se tienen acetil-enzima y malonil-ACP, entre los que tiene lugar la reacción de condensación originando acetoacetil-ACP. Las etapas que a continuación ocurren son las mismas descritas para el complejo enzimático de levadura, es decir, reducción, deshidratación y ulterior reducción. La reducción inicial de acetoacetil-ACP por NADPH tiene lugar de manera estereoespecífica con formación de D-(—)- $\beta$ -hidroxibutiril-ACP; la deshidratación de éste conduce al trans-tioéster no saturado, crotonil-ACP, que a su vez, se reduce por NADPH para originar la forma saturada, butiril-ACP.

Las investigaciones de Dugan, Slakey y Porter (294) han establecido inequívocamente que las dos etapas reductivas de la síntesis de ácidos grasos transcurren de forma estereoespecífica. La ulterior elongación vuelve a tener como etapa inicial la transacilación a la enzima condensante y repetición de las reacciones anteriores. El producto final es, en su mayor proporción, palmitoil-ACP que al menos «in vitro» se hidroliza específicamente a ácido graso libre (295). De otro lado, los acil-ACP pueden reaccionar de modo directo con glicerina-3-P y originar productos intermedios en la biosíntesis de fosfolípidos (296-298). En este sentido, Vagelos ha sugerido que la localización de la ACP en la superficie interna de la membrana puede tener una cierta significación en la transferencia de acilos a los fosfolípidos integrantes de la membrana (299).

Las características moleculares de los complejos multienzimáticos han sido estudiadas en los sistemas obtenidos de levadura, hígado, glándula mamaria y *Mycobacterium phlei*. Entre los tipos de tratamientos efectuados han de subrayarse los estudios de *disociación-reasociación*, la identificación de *localizaciones de unión* y el *control de su síntesis y actividad*.

El complejo *ácido graso sintetasa de levadura* se ha obtenido en forma cristalina (300-301), con un peso molecular de 2.300.000 y compuesto de tres series de subagregados de peso molecular 700.000. Estos subagregados son conjuntos funcionales de las siete enzimas de la ácido graso sintetasa. Del complejo ácido graso sintetasa de levadura se ha aislado la correspondiente ACP por desnaturalización con cloruro de guanidinio del complejo -panteteína-  $^{14}\text{C}$  (302); es éste el único caso en que se ha podido aislar ACP a partir del complejo multienzimático.

La distinción entre los grupos tiólicos de la proteína transportadora de acilo y los de la enzima condensante se ha realizado haciendo uso del comportamiento selectivo de la iodoacetamida en la diferenciación de péptidos resultantes de las localizaciones activas de ambas proteínas. Hagen (303) demostró en 1963 que la inactivación de la ácido graso sintetasa por iodoacetamida era debida a su única reacción con la enzima condensante, ya que no era posible obtener carboximetilcisteamina en los hidrolizados de la enzima; de estas experiencias y otras similares se estableció que la iodoacetamida reacciona con la enzima condensante, pero no con el grupo tiólico de la ACP. Este tipo de tratamiento se ha llevado a cabo conjuntamente con la acilación (acetilo, malonilo, palmitoilo, etc.) del complejo e hidrólisis del acil-derivado- $^{14}\text{C}$  con la averiguación consiguiente de los péptidos resultantes.



misma transacilasa que incorpora malonilo, la incorporación del resto de malonilo se vería circunstancialmente bloqueada, dando tiempo a los restos acetilo a llevar a cabo su unión a la enzima condensante por intermedio de la ACP.

Otra posibilidad alternativa a los resultados experimentales sería la coincidencia en la estructura primaria de la zona peptídica alrededor del centro activo en dos transacilasas diferentes, malonil- y palmitoil-transacilasa. Otros hechos experimentales insisten, sin embargo, en la bifuncionalidad de la misma enzima, malonil-transacilasa y palmitoil-transacilasa.

Entre estos hechos experimentales que apoyan la idea de una única enzima se encuentran en primer lugar los datos de competencia entre acil-CoA (12-18C) y malonil-CoA (cf. nota 305) (307). La existencia de una única transacilasa explicaría, asimismo, la influencia de la relación acetil-CoA/malonil-CoA sobre la longitud de la cadena carbonada de los ácidos grasos sintetizados, en el sentido de que el aumento de dicha relación induce una mayor proporción de los ácidos grasos de cadena corta; al no existir competencia o estar muy disminuida por parte de la malonil-CoA, la transacilasa puede efectuar más fácilmente su función terminadora de la cadena.

El complejo enzimático de ácido graso sintetasa de levaduras se ha estudiado asimismo mediante tratamientos genéticos. Estudios genéticos de *E. coli* han probado la existencia bajo la forma de operones del conjunto de genes estructurales correspondientes a las enzimas integrantes de diversos complejos enzimáticos tales como pirúvico-deshidrogenasa (308) y triptofano-sintetasa (309). En este sentido, Schweizer y Bolling (310) aíslan un mutante de *Saccaromyces cerevisiae*, defectivo en el complejo ácido graso sintetasa; el complejo enzimático exhibe una constante de sedimentación idéntica al de la cepa de origen y en su aspecto bioquímico muestra la ausencia de actividad enzimática correspondiente a la condensación de acético y malónico para formar acetilacético. El resto de las actividades enzimáticas del complejo son exhibidas por mutante y cepa de origen con idénticas actividades específicas, concluyéndose que este mutante (X 2180 $\rho^-$  fas 15) es portador de una mutación sin sentido en los genes estructurales de la enzima condensante o ACP. Ulteriores estudios (311) sugieren la unión y transcripción coordinada de dichos genes.

El complejo enzimático de *ácido graso sintetasa de hígado de pichón* ha sido asimismo aislado en forma homogénea (312) con un peso mole-

cular de 450.000 y un mol de 4'-fosfopanteteína. Por lo que a la disociación de este complejo se refiere, no ha sido posible obtener subunidades enzimáticamente activas por tratamiento con cloruro de guanidinio; el complejo se disocia, sin embargo, en subunidades de peso molecular mitad simplemente por envejecimiento (313) o por tratamiento del complejo con maleato potásico, disulfuro de carboximetilo o palmitoil-CoA (314), con pérdida completa de la total actividad enzimática. Una disociación completa del complejo se logra por tratamiento con mercaptoetanol en presencia de un medio de baja fuerza iónica (315-316); disociación que va acompañada de la pérdida de la actividad enzimática condensante, manteniéndose las demás actividades parciales a la vez que ocurre la oxidación de cinco-seis grupos —SH por mol de enzima. Las subunidades pueden reconstruir la enzima activa por reasociación en medio de elevada fuerza iónica y alta concentración de ditiotreitól; la existencia de esta reasociación es dependiente de la concentración de subunidades y en condiciones óptimas puede llegar a ser completa. Debido a estos resultados, Porter y colaboradores sugieren que los cambios conformacionales en el complejo —bajo condiciones de baja fuerza iónica— modifican la geometría y reactividad de los grupos —SH que, a su vez, pueden promover cambios configuracionales locales en el complejo, dando lugar a la disociación; alternatively, la disociación del complejo podría tener lugar por interacciones electrostáticas intramoleculares en presencia de la baja fuerza iónica del medio, con lo que la pérdida de los grupos —SH sería consecuencia secundaria de la disociación. En cualquier caso queda por resolver la significación del ditiotreitól en la reconversión a la forma activa.

Porter y colaboradores (317) han profundizado en el estudio de esta disociación del complejo de ácido graso sintetasa de hígado de pichón que ha sido estudiada en un gran margen de condiciones experimentales de fuerza iónica, pH y temperatura. Bajo estas condiciones se ha definido la actividad enzimática y correlacionado con los cambios en las características de sedimentación de la enzima y con los cambios conformacionales en el complejo antes de la disociación. El complejo inicial (14.0 S) se inactiva y disocia en subunidades de peso molecular mitad (9.0 S) en presencia de soluciones reguladoras de baja fuerza iónica, siendo las velocidades de pérdida de actividad catalítica y de disociación dependientes de la fuerza iónica y pH del medio, así como de la temperatura. A modo de ejemplo se representa en la figura 55 la variación de

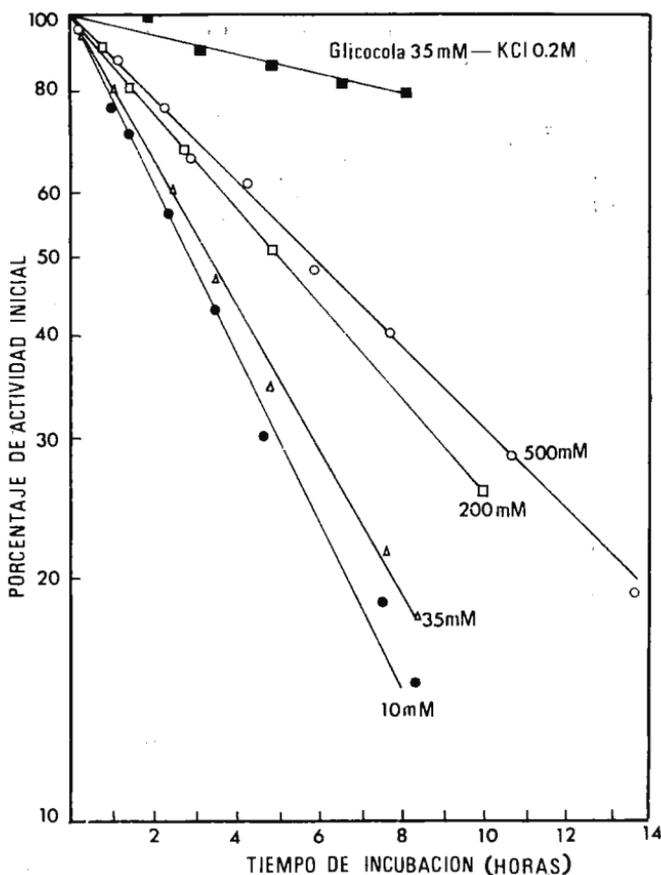


Figura 55

la actividad inicial en función de la concentración de Tris-glicocola, y en la figura 56 aparece dicha variación en función del pH. La inactivación del complejo de ácido graso sintetasa en un medio de Tris-glicocola (glicocola variable) con EDTA (1 mM) y mercaptoetanol (1 mM) y a pH 8.35 (fig. 55) es máxima a una concentración de glicocola 10 mM y decrece al aumentar las concentraciones del aminoácido. En medios de baja fuerza iónica (0.01) y pH débilmente alcalino (8.35) son coincidentes las velocidades de inactivación y de disociación del complejo en subunidades; en medios de elevada fuerza iónica y en presencia de mercaptoetanol se encuentran complejo activo, complejo inactivo y

subunidades inactivas. Por lo que se refiere a la influencia que ejerce la variación del pH (fig. 56), hay que señalar que la máxima actividad,

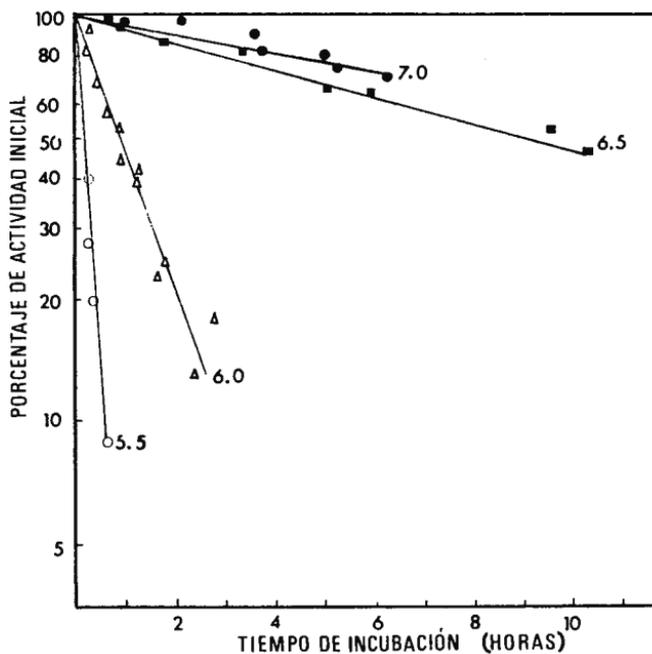


Figura 56

coincidente con la máxima estabilidad del complejo, se presenta a pH neutro, y que desviaciones en ambos sentidos incrementan la velocidad de inactivación, así como la disociación del complejo; cuando la variación es por encima de siete, la inactivación y disociación son simultáneas, en tanto que, cuando la variación es por debajo de siete, la inactivación es rápida, pero la disociación del complejo es muy lenta y la enzima existe principalmente bajo la forma de complejo inactivo.

Por lo que al efecto de la temperatura se refiere, la velocidad de inactivación y disociación a pH 8.35 es unas diez veces superior a 0° que a temperatura ambiente; la velocidad más baja de inactivación se encuentra a 18-25°.

Además, la inactivación y disociación del complejo en subunidades no requieren la oxidación de los grupos sulfhidrilo de la enzima; de

aquí que la oxidación de estos grupos no es un requisito esencial a la disociación del complejo. Sin embargo, las subunidades resultantes no transfieren los restos acetilo desde la 4'-fosfopanteteína a la cisteína, por lo que carecen de la actividad catalítica de la síntesis de los ácidos grasos. Queda resaltada con estos resultados la importancia de las condiciones experimentales, ya que su variación puede inducir resultados opuestos referidos a la oxidación o no oxidación de los grupos —SH de la enzima, así como a otros parámetros físicos o actividades catalíticas o reguladoras.

Estos resultados obtenidos con ácido graso sintetasa de hígado de pichón ponen de manifiesto la significativa contribución de las interacciones hidrofóbicas en el mantenimiento de la integridad estructural del complejo. Por otro lado, la estabilización del complejo no es lógico resulte de atracciones electrostáticas entre las cadenas polipeptídicas, ya que tales uniones se debilitarían por elevadas concentraciones de electrolitos, cuando la realidad es que el complejo es más estable en estas condiciones.

La disociación y pérdida consecuente de la actividad enzimática de la ácido graso sintetasa de hígado de pichón se impide por la adición al medio de KCl (0.2 M) o NADPH (20  $\mu$ M). El coeficiente de sedimentación del complejo, y como consecuencia de este tratamiento, pasa de 11.8S a 12.9S, lo que se atribuye a una alteración parcial de la estructura de dicho complejo (318). Por el contrario, la coenzima A aumenta la velocidad de inactivación del complejo, posiblemente como resultado de la formación de disulfuros mixtos con grupos —SH de la enzima.

Mediante el empleo de técnicas análogas a las antes mencionadas para el caso del complejo enzimático de levadura, se han identificado las localizaciones de unión de acetilo y malonilo al complejo de hígado de pichón, definiendo asimismo la naturaleza de los intermediarios y de los mecanismos de síntesis (319-321). La digestión péptica de la  $^{14}$ C-acetil- y  $^{14}$ C-malonil-enzima conduce a varios grupos de péptidos- $^{14}$ C que han sido analizados en su estructura primaria; la acilación tiene lugar en tres localizaciones diferentes para el acetilo y en dos localizaciones para el malonilo, deducidas del análisis de los péptidos- $^{14}$ C en combinación con el empleo de la reactividad de la iodoacetamida, la susceptibilidad a la oxidación con ácido per fórmico y con las condiciones requeridas para la escisión de los grupos acetilo y malonilo con hidroxilamina. Las tres localizaciones a las que se une el resto acetilo son: —SH de 4'-fosfopanteteína, —SH de cisteína y —OH de

serina; las dos localizaciones a las que se une el resto malonilo son: —SH de 4'-fosfopanteteína y —OH de serina. Los resultados obtenidos no permiten, sin embargo, dilucidar de forma inequívoca si acetilo y malonilo se unen al mismo agrupamiento no tiólico (322-323). En todo caso, las localizaciones activas son análogas a las del complejo de levadura, así como el esquema de los mecanismos que ocurren en el proceso de síntesis de los ácidos grasos. En la figura 57 (cf. nota 321) se

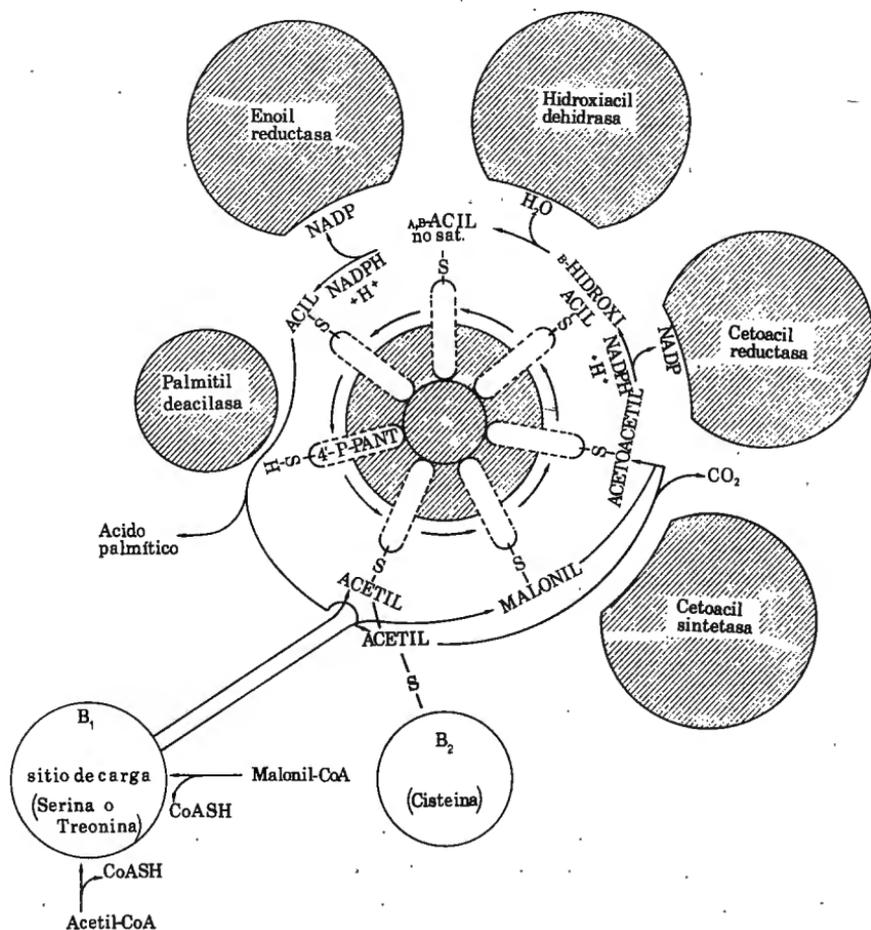


Figura 57.

describe dicho mecanismo, en el que cada uno de los ciclos operativos se inicia por la transferencia de un grupo acilo desde la 4'-fosfopanteteína a un resto de cisteína; simultáneamente, un resto malonilo sería transferido desde la malonil-CoA a la localización denominada B<sub>1</sub> y con posterioridad a la 4'-fosfopanteteína. La reacción de condensación tiene lugar cada vez que se produce la elongación de la cadena de ácidos grasos en dos átomos de carbono, cuyo transporte tiene lugar unida al —SH de la 4'-fosfopanteteína y ocurriendo así las reacciones de reducción y deshidratación. La reacción terminal en el complejo de hígado de pichón es diferente de la de levadura, siendo los ácidos grasos libres los productos de la reacción.

El complejo ácido graso sintetasa de varios orígenes muestra diferente comportamiento inmunológico; experiencias de doble difusión exhiben una identidad parcial entre las enzimas de hígado de pichón y de pollo, pero el antisuero de conejo frente a la segunda no da reacción cruzada con las enzimas de rata o hamster.

La disociación reversible del complejo de ácido graso sintetasa se ha estudiado asimismo en el sistema procedente de hígado de pollo (324) con un peso molecular de 500.800 y coeficiente de sedimentación 12S; la disociación del complejo en tris-glicocola a baja fuerza iónica, pH 8.3, origina dos subcomplejos de peso molecular 253.000 y coeficiente de sedimentación 8S, del mismo tamaño y diferente carga neta. El detalle de los resultados obtenidos con este complejo muestran la existencia de varias formas moleculares interconvertibles por alteraciones de pH, fuerza iónica y grupos tiólicos. La disociación del complejo puede llevarse a cabo mediante dos rutas alternativas; el complejo activo 12S (A) (fig. 58) se disocia directamente en una forma reducida de subcompejos (S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) en presencia de tris-glicocola conteniendo ditiotreitol,

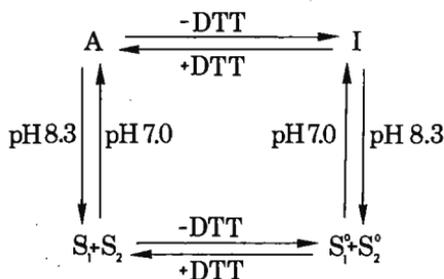


Figura 58

en cuya ausencia la oxidación tiene lugar. La disociación puede llevarse a cabo por otra secuencia cuya primera etapa es la formación del intermediario inactivo (I) 12S; los subcomplejos resultantes ( $S_1^0$  y  $S_2^0$ ) tienen alterados por oxidación los grupos tiólicos. El envejecimiento del complejo activo en ausencia de ditiotreitól o la incubación de los subcomplejos oxidados en solución de fosfatos neutra dan lugar al complejo inactivo 12S, que se activa rápidamente con ditiotreitól. La reactivación, pues, de los subcomplejos oxidados exige ambos tiol reducido y solución neutra de fosfatos, mientras que la reactivación de los subcomplejos reducidos ocurre en ausencia del tiol.

La disociación del complejo tiene lugar bajo condiciones de elevado pH y baja fuerza iónica (favorecedoras de la repulsión en la molécula negativamente cargada); ello implica que las interacciones iónicas juegan un importante papel en la unión de los subcomplejos y que la repulsión de cargas es primariamente responsable de la disociación, sin que por ello se excluyan interacciones hidrofóbicas y otras uniones no covalentes. La oxidación de los grupos tiólicos puede originar cambios conformacionales responsables de la disminución de la capacidad de los subcomplejos oxidados para la reconstrucción del complejo y de la reactivación del complejo inactivo, después de un período de envejecimiento.

Estos fenómenos, que consideramos de disociación-reasociación, presentan en el complejo enzimático de glándula mamaria ciertas particularidades. El peso molecular de la enzima de rata es 478.000, en tanto que la de conejo llega a ser 910.000 (325-326). La ácido graso sintetasa de glándula mamaria de rata lactante 13S es un complejo multienzimático lábil al frío, propiedad que exhibe también el complejo de hígado de rata.

A este propósito debe mencionarse la existencia de un grupo de enzimas, que de forma reversible pierden su actividad a 0° debido a la disociación en subunidades y cuya subsiguiente reasociación a temperaturas superiores implica la reactivación enzimática. Pirúvico-carboxilasa, argino-succinasa, ATP-asa mitocondrial, figuran entre los sistemas enzimáticos que exhiben referido comportamiento. Otros sistemas enzimáticos experimentan agregación en frío como la glucógeno-fosforilasa de músculo, mientras que, en algunas enzimas, la inactivación por el frío, más que a procesos de disociación o agregación, está ligada a cambios conformacionales como la 17- $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa.

La forma nativa del complejo ácido graso sintetasa, 13S, se disocia lentamente en subunidades de peso molecular mitad, 9S, por envejecimiento en frío; la actividad enzimática perdida en las subunidades 9S se recupera por calefacción del medio a 20-30°, lo que va acompañado de una rápida reasociación a la forma 13S (327). El proceso de disociación-reasociación exhibe características comunes con el antes mencionado en el complejo enzimático procedente de hígado. La forma nativa 13S\* participa de un doble equilibrio con la forma inactiva correspondiente de un lado, y con las subunidades 9S, de otro; equilibrio que viene influenciado por las condiciones de temperatura y por la presencia o ausencia de tioles. Dicha forma nativa 13S\*, a 21° y en ausencia de tioles se convierte lentamente en la forma 13S inactiva, proceso que se invierte por la adición de tioles; a su vez, dicha forma 13S\* por almacenamiento en frío, en presencia de tioles, se disocia en las especies 9S\* de peso molecular mitad; la actividad que estas especies son capaces de manifestar es debida a su rápida reasociación a la forma activa original 13S\*. Cuando el almacenamiento antes mencionado

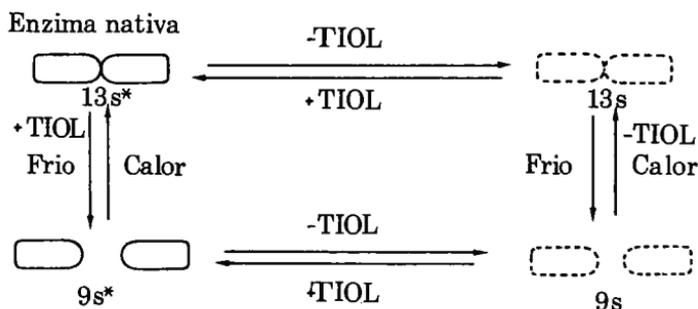


Figura 59

se lleva a cabo con las formas 13S —en frío y ausencia de tioles—, la disociación rinde subunidades 9S, las que por adición al medio de ensayo no recuperan actividad enzimática, si bien la reasociación ocurre.

El equilibrio de disociación-reasociación se presenta, pues, tanto en las formas activas como inactivas y viene influenciado principalmente por las condiciones de temperatura; la interconversión de formas activas e inactivas, por otro lado, se afecta por la presencia o ausencia de tioles. La configuración activa de la enzima se presenta tanto en el dímero como en las subunidades debido a la presencia de tioles.

En estos complejos ácido graso sintetasa de glándula mamaria de rata, la disociación no implica oxidación de grupos —SH de la proteína, ya que el número total de grupos tiólicos titulables con 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato), en presencia de urea 6M, es el mismo en ambos, enzima nativa y subunidades. Ahora bien, el bloqueo de más de dos del total de 28 —SH presentes en las subunidades restringe la capacidad de reasociación de éstas por acción de la temperatura; resulta difícil, sin embargo, valorar debidamente la participación de los grupos tiólicos como tales en el proceso de reasociación, ya que el bloqueo con p-CMB puede por sí mismo inducir cambios conformacionales en la proteína que repercutan en la interacción entre las subunidades.

De gran interés resulta, por otro lado, la correlación del efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima y las interacciones responsables del mantenimiento de la estructura cuaternaria. Sherga (328) ha estudiado la dependencia de la temperatura de las posibles interacciones responsables del mantenimiento de este nivel estructural y encuentra un reforzamiento de las uniones de hidrógeno, así como una debilitación de las uniones hidrofóbicas al pasar de 60 a 0°. Smith y Abraham (cf. nota 327) discuten la labilidad al frío de estos complejos enzimáticos —ácido graso sintetasa de glándula mamaria y de hígado de rata— a la luz de los hechos anteriores y de que, por tanto, la disminución de la estabilidad que la mayoría de las proteínas manifiestan ante la elevación de temperatura es señal de la preponderancia de las uniones de hidrógeno en el mantenimiento de sus estructuras secundarias.

La presencia simultánea de uniones hidrofóbicas y de hidrógeno en una proteína puede originar modificaciones de la estabilidad de la  $\alpha$ -hélice respecto a la temperatura; de esta forma, las proteínas con una elevada proporción de uniones hidrofóbicas experimentarán una inversión de la estabilidad de la  $\alpha$ -hélice frente a la temperatura, presentando, por tanto, condiciones de labilidad al frío.

Esta descripción de las propiedades del complejo multienzimático de ácido graso sintetasa va a dejar paso al control que en el orden regulador ejerce sobre el metabolismo de los ácidos grasos; en este sentido debe mencionarse la influencia mencionada que, sobre la actividad enzimática, ejerce el fenómeno de disociación-reasociación por medio de cambios físicos y químicos en el ambiente celular.

La regulación del complejo ácido graso sintetasa viene, además, influenciada por modificadores alostéricos, por condiciones nutritivas,

hormonales y de desarrollo, así como por represión de su síntesis en diversos microorganismos.

En una consideración completa de la biosíntesis de ácidos grasos no puede olvidarse el control que sobre ella puede ejercer la actividad de la acetil-CoA carboxilasa y, a su vez, la serie de factores que rigen el estado de agregación de la enzima como causa fundamental de sus propiedades reguladoras. Recuérdese en este sentido el comportamiento del citrato y de los acil-derivados de coenzima A de cadena larga.

Los dos sistemas enzimáticos, acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa, responden en sus niveles a diversas influencias nutritivas y condiciones metabólicas como ayuno prolongado (329), dieta (330), ayuno y reinstauración de dieta rica en hidratos de carbono (331), deficiencia de biotina (332). Las dietas ricas en grasa disminuyen la incorporación de acetato en ácidos grasos (333), lo que ha sido atribuido al bloqueo de la etapa de actuación de la acetil-CoA carboxilasa (334). La administración a ratas ayunadas de dietas libres de grasas producen una marcada elevación en las actividades de acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa hepáticas (335); resultados similares han sido obtenidos en deficiencias experimentales de linoléico (336). Por el contrario, los ácidos linoléico, linolénico y araquidónico, incluso en muy pequeñas proporciones, hacen descender la actividad de la ácido graso sintetasa (337). Estas variaciones en la actividad de las dos enzimas, acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa, dependen de la composición en ácidos grasos de la dieta, y la influencia es dependiente del órgano estudiado (338); así, el efecto depresivo originado sobre ambas enzimas por ácido linoléico es más pronunciado en tejido adiposo que en hígado.

La forma precisa bajo la cual los lípidos de la dieta regulan las actividades de las enzimas lipogénicas no está suficientemente clara. Acerca de ello se ha señalado que la velocidad de síntesis de acetil-CoA carboxilasa es de cinco a diez veces mayor en animales sometidos a dieta libre de grasa que en ratas en ayuno (339). De otro lado, la concentración de ácido graso sintetasa se encuentra disminuida en hígados de ratas en ayuno o aloxanizadas (340-341); el tratamiento con insulina de las ratas diabéticas da lugar a una recuperación de los niveles enzimáticos normales. Esta elevación e incluso la que ocurre por encima de los niveles normales al administrar dietas libres de grasa a ratas en ayuno se atribuye a la síntesis adaptativa de la enzima.

La influencia de factores nutritivos y hormonales sobre la ácido

graso sintetasa de cerebro e hígado se ha estudiado en relación al desarrollo animal (342). La actividad sintetásica del cerebro es considerablemente mayor en los períodos fetal y de lactancia que en el organismo de más edad; la actividad en el hígado es baja, excepto una elevación transitoria en el período perinatal, hasta la terminación de la lactancia en que ocurre una aguda y notable elevación. La actividad de dicha sintetasa en el cerebro experimenta variaciones como consecuencia de modificaciones dietéticas tan sólo después de largos períodos, en tanto que la actividad en el hígado se ve rápidamente alterada.

La ácido graso sintetasa de diversos orígenes, hígado de pichón y de rata, cerebro de rata, levadura, se encuentra modulada en su actividad por palmitoil-CoA y otros derivados de coenzima A de cadena larga (343-346). Grandes discrepancias existen acerca del mecanismo de actuación de estos tioésteres; Lynen (346) propone que su intervención radica en una retroinhibición, en tanto que Porter (347) la atribuye a su inespecífica y marcada acción detergente, que por otro lado, es extensible a gran número de sistemas enzimáticos.

En relación con la modulación enzimática del complejo ácido graso sintetasa, constituye un hecho importante la estimulación producida por los azúcar-fosfato entre los que la fructosa-1,6-P es el que da lugar a más notables efectos (348). Estudios cinéticos posteriores (349) con sintetasa de hígado de pichón, han demostrado que la enzima es sensible a la inhibición por malonil-CoA; inhibición que es de naturaleza competitiva con relación a NADPH, y mixta con relación a acetyl-CoA. La malonil-CoA afecta marcadamente la  $K_m$  para NADPH, que experimenta un aumento de diecinueve veces en un amplio intervalo de concentración de sustrato. Esta inhibición por malonil-CoA se revierte por fructosa-1,6-P, lo que se refleja en la progresiva disminución de la  $K_m$  (NADPH) al aumentar las concentraciones del azúcar-P; la fructosa-1,6-P no altera de manera sustancial los valores de  $K_m$  con relación a acetyl-CoA o malonil-CoA. Algunas de las representaciones logradas por Wakil y colaboradores (cf. nota 349) —representaciones recíprocas de la velocidad de síntesis frente a la concentración de malonil-CoA— conducen a esquemas no lineales y se sugiere la posibilidad de la unión del sustrato a localizaciones reguladoras como el mecanismo de inhibición en lugar de la clásica interacción de las moléculas de sustrato en las localizaciones activas.

La represión de la síntesis de la enzima en bacterias se ha sugerido como factor importante en la regulación de la biosíntesis de ácidos

grasos, si bien se insinúan diferencias notables en organismos diferentes. En *E. coli*, la presencia de ácidos grasos de cadena larga, tanto saturados como no saturados, no es capaz de influir sobre la síntesis (350-351), en tanto que en *Lactobacillus plantarum* resulta disminuida en presencia de ácidos grasos no saturados y ciclopropánicos (352-353). El hecho de que extractos de células crecidas en presencia de ácido oléico no exhiban actividad en orden a la biosíntesis de ácidos grasos se atribuye a la participación de un mecanismo de represión enzimática, posteriormente confirmado por Wakil en dicho organismo y, para los dos sistemas enzimáticos lipogénicos (354).

### 3. SISTEMAS ENZIMÁTICOS IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS

La *triptófano-sintetasa*, que cataliza la etapa final de la biosíntesis del aminoácido en su forma nativa, está compuesta de cuatro cadenas polipeptídicas,  $\alpha_2\beta_2$ , que se disocian en subunidades  $\alpha$  y  $\beta_2$ . Este complejo enzimático ha sido estudiado de modo preferente en *E. coli* (355-359) y *Pseudomonas putida* (360-362).

Dichas subunidades ejercen la máxima actividad enzimática cuando se encuentran integradas en el complejo, si bien, como tales subunidades, son capaces de exhibir débiles actividades catalíticas particulares; así, la subunidad  $\alpha$  cataliza la aldolisis reversible del indol-3-glicerol-P a gliceraldehído-3-P e indol, mientras que la subunidad  $\beta_2$  cataliza la condensación de indol y L-serina para dar lugar al triptófano.

Desde el punto de vista de la estructura primaria, se conoce la de la cadena  $\alpha$  (363) y cierto número de detalles de la subunidad  $\beta_2$  de diferentes orígenes (cf. notas 357 y 362).

El empleo de reactivos bifuncionales sobre la subunidad  $\alpha$ , como el bis(maleimidometil)-éter, ha establecido la proximidad (10-13 Å) de las cisteínas que ocupan las posiciones 80 y 117 (364). El formaldehído establece puentes metilénicos entre los residuos asparagina (156)-serina (214) y glutamina (218)-serina (232). En ninguno de estos casos, la formación de dichas uniones guarda relación con modificación de la actividad. El tratamiento con 1,5-difluor-2,4-dinitrobenceno introduce un puente intramolecular entre los residuos cisteína (80) y lisina (108), con una pérdida de su actividad aldolásica sobre indol-glicerol-P.

La subunidad  $\beta_2$  contiene dos moléculas de piridoxal-5-P fuertemente unidas a la proteína de cuya presencia es dependiente la actividad

enzimática. Los pesos moleculares y propiedades químicas generales de las subunidades  $\beta_2$  de las dos especies estudiadas son muy semejantes, habiéndose podido detectar tan sólo una ligera reacción inmunológica cruzada.

Esta unión del piridoxal-P a la enzima hace que las soluciones del componente  $\beta_2$  se conviertan en monodispersas en la ultracentrífuga, que no lo eran antes del tratamiento; la unión específica del cofactor suministra a la molécula una resistencia a la disociación superior a la exhibida en su ausencia. La formación de la base de Schiff con el piridoxal-P, que ocurre de modo subsiguiente a la formación del dímero, incrementa la unión entre las subunidades (365).

El buen conocimiento de la secuencia de la cadena  $\alpha$  ha dado origen a la localización de muchas sustituciones de aminoácidos mutacionalmente derivadas (366); asimismo se han clasificado y localizado ciertas mutaciones que afectan a la cadena  $\beta$  (367) y entre ellas la trpB244 (368), que da lugar a un cambio de lisina por asparagina, cuyo estudio constituye un excelente ejemplo del tratamiento conjunto del análisis genético en su estructura fina y el análisis de la secuencia de aminoácidos.

La triptófano-sintetasa de bacterias y algas poseen la estructura mencionada a base de dos componentes protéicos diferentes, producto de dos genes contiguos e independientes. Sin embargo, la triptófano-sintetasa de hongos tales como *Neurospora crassa* (369) y *Saccharomyces cerevisiae* (370) consta de una sola cadena peptídica, controlada por un locus genético único, en la que existen dos regiones funcionales análogas a las subunidades de bacterias y algas.

Esta misma idea de la fusión de genes contiguos, codificadores de proteínas distintas, originando cadenas polipeptídicas multifuncionales se ha descrito a propósito del complejo antranílico sintetasa (AS)—antranílico PRPP fosforribosil transferasa (PRT), que cataliza las primeras etapas en la biosíntesis del triptófano en *Salmonella typhimurium* (Fig. 60). Dicho complejo consta de dos subunidades codificadas por distintos genes, la denominada CoI y la conocida como CoII, ambas de análogo tamaño molecular (371-372). El complejo CoI-CoII cataliza ambas etapas enzimáticas y se requiere de modo necesario para la reacción AS, en tanto que la reacción PRT puede venir catalizada por la subunidad CoII con la misma eficacia que lo hace el complejo en su conjunto. La subunidad CoII ejerce, pues, una doble función: sobre la reacción PRT y sobre la reacción AS. La función que CoII realiza sobre la etapa AS es de naturaleza catalítica, puesto que la unión de la glutamina en la

reacción catalizada por el complejo tiene lugar en la subunidad CoII (373); a dicha reacción catalítica se ha asignado el papel de glutamina-amido-transferasa suministrando el grupo amido de la glutamina para la reacción catalizada por CoI. De esta forma, CoII aparece como po-

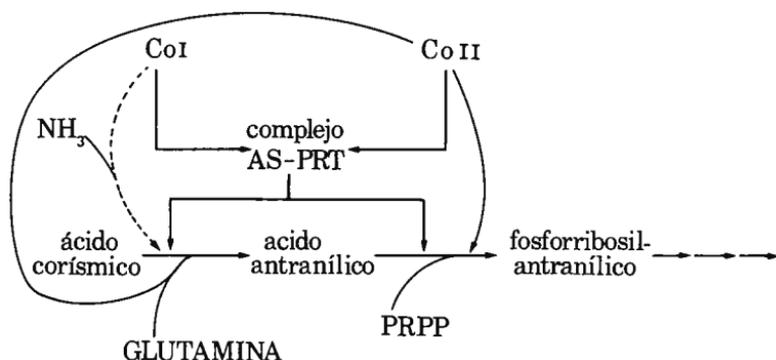
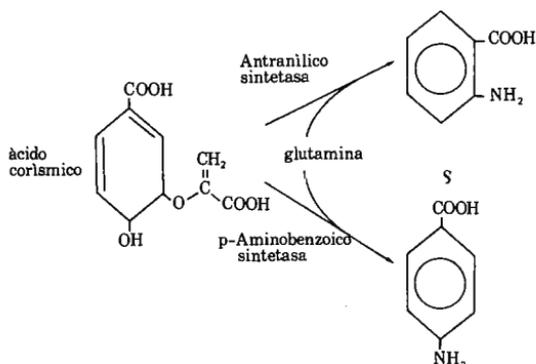


Figura 60

seedor de una doble funcionalidad, antranílico-fosforribosil transferasa y glutamina amido-transferasa doble funcionalidad que ha emergido de la fusión de dos genes precursores independientes (374) que antes de la fusión codificaron proteínas catalizadoras por separado de dichas funciones independientes.

Merece mencionarse que la antranílico-sintetasa (AS) —procedente de *B. subtilis*— exhibe una estructura compleja a base de dos subunidades diferentes (375) denominadas E y X. La subunidad X es una cadena polipeptídica de pequeño tamaño, alrededor de 16.000, cuya síntesis se reprime por triptófano. Ambas subunidades son productos respectivos de los genes *trpE* y *trpX*, de forma que extractos crudos de cultivos de mutantes de *trpE* y *trpX* son capaces de presentar actividad de antranílico sintetasa. Recientemente se ha reconocido una mutación *trpX* con lo que se ha podido reconocer la participación del producto genético correspondiente —subunidad X— tanto de la antranílico sintetasa

como de la p-aminobenzoico sintetasa, que catalizan los dos procesos siguientes:



Procesos ambos que utilizan corísmico y glutamina como sustratos y rinden productos —ácido antranílico y ácido p-aminobenzoico— muy similares.

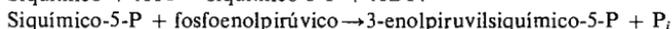
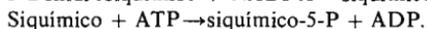
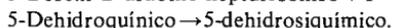
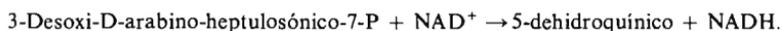
Los mutantes *trpX* no poseen actividad de p-aminobenzoico sintetasa, siendo probable que alguna subunidad constituyente de dicha sintetasa compita con la subunidad E en su asociación con la subunidad X para formar, respectivamente, p-aminobenzoico sintetasa o antranílico sintetasa (376). Estos hechos parecen indicar una función para la subunidad X del tipo de las denominadas proteínas «especificadoras», como los factores  $\sigma$  interaccionan con la RNA polimerasa para especificar las localizaciones iniciadoras de la transcripción o como la  $\alpha$ -lactalbúmina, al asociarse con la galactosil transferasa, convierte a ésta en lactosa sintetasa (377).

La mutación *trpX* no aparece localizada en el operón triptófano, aunque, sin embargo, la síntesis de la subunidad X aparece controlada por el aminoácido y varía de forma coordinada con relación a las demás enzimas del operón triptófano durante un cierto intervalo de la derrepresión. La síntesis tiene lugar de forma no coordinada a bajos y a altos niveles de la enzima, constituyendo un ejemplo de represión semi-coordinada.

En orden a la biosíntesis de aminoácidos aromáticos se ha considerado el complejo enzimático *triptófano-sintetasa* (constituido por dos actividades enzimáticas) que cataliza las etapas finales de la biosíntesis del aminoácido y la *antranílico sintetasa*, enzima poseedora de estruc-

tura cuaternaria y catalizadora de la transformación del ácido corísmico en ácido antranílico. Ahora bien, en el conjunto de etapas metabólicas conducentes a la síntesis de los compuestos aromáticos, en general, y del triptófano en particular, se conocen otros dos complejos enzimáticos; el denominado *complejo aromático* reúne cinco enzimas que inician su actuación en el ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico-7-P y terminan con la formación del 3-enolpiruvil-siquímico-5-P; el denominado *complejo antranílico sintetasa* reúne dos actividades enzimáticas, ya en la ruta particular de biosíntesis del triptófano, que son N-(5'-fosforribosil)-antranílico isomerasa e indol-3-glicerolfosfato sintetasa. Situación de estos complejos en el conjunto biosintético de compuestos aromáticos que se detalla en el esquema de la figura 61.

El complejo aromático cataliza las reacciones:



cuyos sistemas enzimáticos individuales se encuentran unidos de forma no covalente originando un agregado de tamaño aproximado de 200.000, aislado de *Neurospora crassa* (378). La disrupción del agregado con detergentes (379) origina subunidades de peso molecular 100.000, o incluso de tamaño inferior, con cloruro de guanidinio 6 M, lo que ocasiona la pérdida de las cinco actividades enzimáticas. Las mismas actividades enzimáticas y las mismas propiedades físicas han sido observadas en los complejos multienzimáticos aislados de seis especies diferentes de hongos (380). Sin embargo, propiedades diferentes se atribuyen al complejo aromático aislado de *N. crassa*, asimismo por Gaertner (381); su peso molecular, 290.000, es notoriamente distinto de las anteriores preparaciones, así como lo es el coeficiente de sedimentación 10.6S —frente a 11.4S—. El procedimiento de aislamiento del complejo aromático de Gaertner permite el aislamiento simultáneo del complejo antranílico-sintetasa.

Los sistemas enzimáticos que participan de la biosíntesis de compuestos aromáticos son capaces además, y de un lado, de reunirse en complejos parciales y, de otro, de dejarse regular mediante múltiples mecanismos.

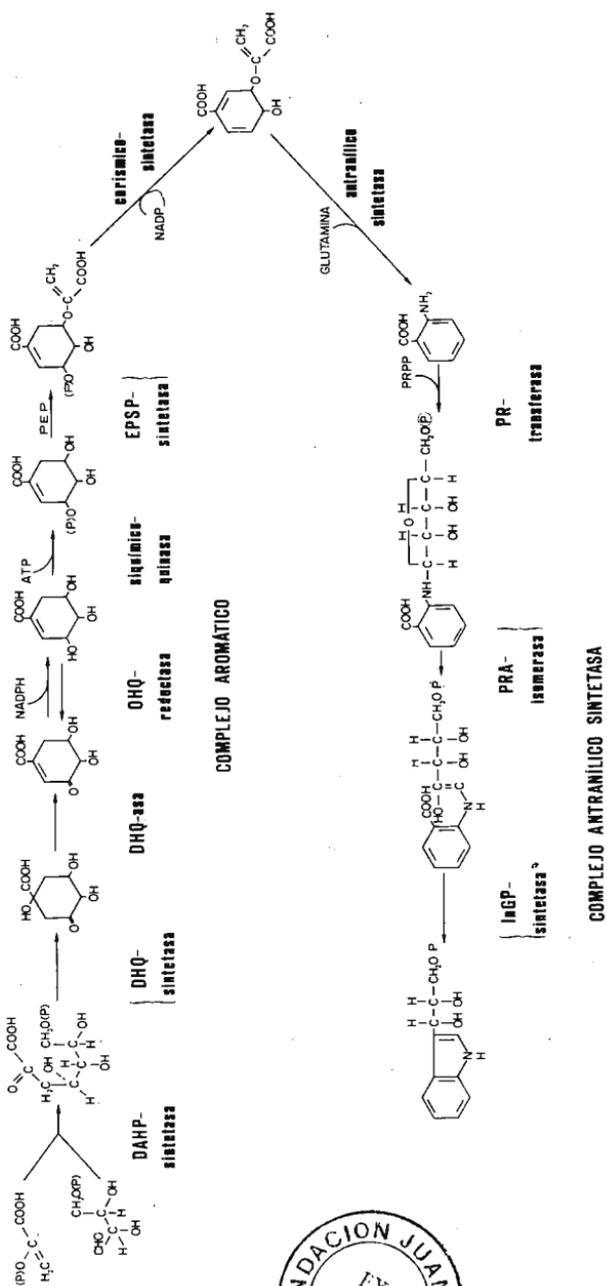
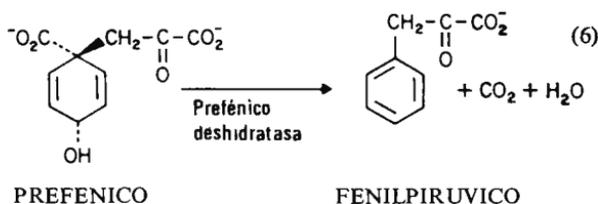
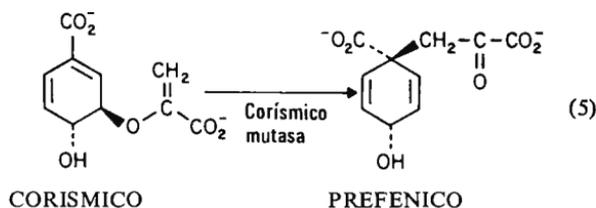


Figura 61



En *E. coli*, *S. typhimurium* y *A. aerogenes* se han descrito tres complejos sencillos que funcionan en la utilización de ácido corísmico en la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano. Uno de ellos cataliza las dos primeras reacciones de la síntesis del triptófano, y está constituido por antranílico sintetasa y antranílico PRPP fosforribosil transferasa, complejo que ha sido mencionado anteriormente; el segundo, contiene corísmico-mutasa y prefénico-deshidrogenasa, y cataliza la conversión total de corísmico a 4-hidroxifenilpirúvico, precursor de la tirosina; en tercer lugar se ha descrito el complejo constituido por corísmico-mutasa y prefénico-dehidratasa, que cataliza la conversión total de corísmico en fenilpirúvico, precursor de la fenilalanina, de acuerdo con las reacciones siguientes:



En *B. subtilis* se ha obtenido evidencia genética y física de la presencia de un complejo a base de 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico-7-P sintetasa y corísmico mutasa (382); durante el proceso de purificación de este complejo dichos autores han observado la unión adicional de siquímico-quinasa. A esta unión se han atribuido interesantes funciones reguladoras, ya que, al estar la primera y tercera de las mencionadas enzimas reguladas por retroinhibición por corísmico y prefénico, respectivamente, se sugiere que la segunda —corísmico-mutasa— posea una localización que pueda actuar como catalítica para la actividad de la enzima misma y como reguladora para las otras dos enzimas del complejo.

En el conjunto de las etapas de biosíntesis de compuestos aromáticos se presentan muy diversos tipos de regulación, y así se han descrito sistemas de inhibición cumulativa, inhibición concertada, retroinhibición secuencial y retroinhibición por isoenzimas.

Por lo que se refiere a la regulación por isoenzimas se han descrito varios tipos de regulación de 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico-7-P (DAHP) sintetasa, algunas de las cuales figuran a continuación:

*E. coli* K<sub>12</sub> Inhibe tirosina. Inhibe fenilalanina. Reprime triptófano.

*E. coli* W Reprime tirosina. Reprime fenilalanina. Reprime triptófano.

*N. crassa* Inhibe tirosina. Inhibe fenilalanina. Inhibe triptófano.

La corísmico-mutasa se ha descrito también bajo formas isoenzimáticas distintas en de *E. coli* y *A. aerogenes* (383) separables en cromatografía de DEAE-celulosa; una de ellas está implicada en la biosíntesis de tirosina (CMT), y la otra en la de fenilalanina (CMP). La primera de estas isoenzimas, CMT, cromatografía juntamente con la prefénico-deshidrogenasa, actividad enzimática subsiguiente a la corísmico-mutasa en el esquema de biosíntesis de la tirosina; en tanto que la CMP, es inseparable de la prefénico-deshidratasa, actividad enzimática subsiguiente a la corísmico-mutasa en el esquema de la biosíntesis de la fenilalanina. La mutación conjunta de ambas actividades, en cada caso, habla en favor de una cierta relación entre ellas, bien bajo la forma de un complejo enzimático del tipo de los que venimos considerando en este capítulo, bien bajo la forma de actividades diferentes presentes en una única cadena polipeptídica. Dado que las actividades de la corísmico-mutasa en *E. coli* K<sub>12</sub> vienen especificadas por los genes estructurales responsables de las actividades de la prefénico-deshidrogenasa y prefénico-deshidratasa, se ha sugerido que la forma actuante sea la representada por la segunda de dichas alternativas.

La existencia de isoenzimas y la regulación por retroinhibición en *E. coli* por parte de los aminoácidos aromáticos, triptófano, fenilalanina y tirosina se esquematizan en la figura 62.

En otras especies bacterianas existen modalidades reguladoras diferentes. En *B. subtilis* se presenta un esquema de retroinhibición de tipo secuencial; así, los puntos finales de la biosíntesis, triptófano, fenilalanina y tirosina regulan la primera etapa después de la ramifica-

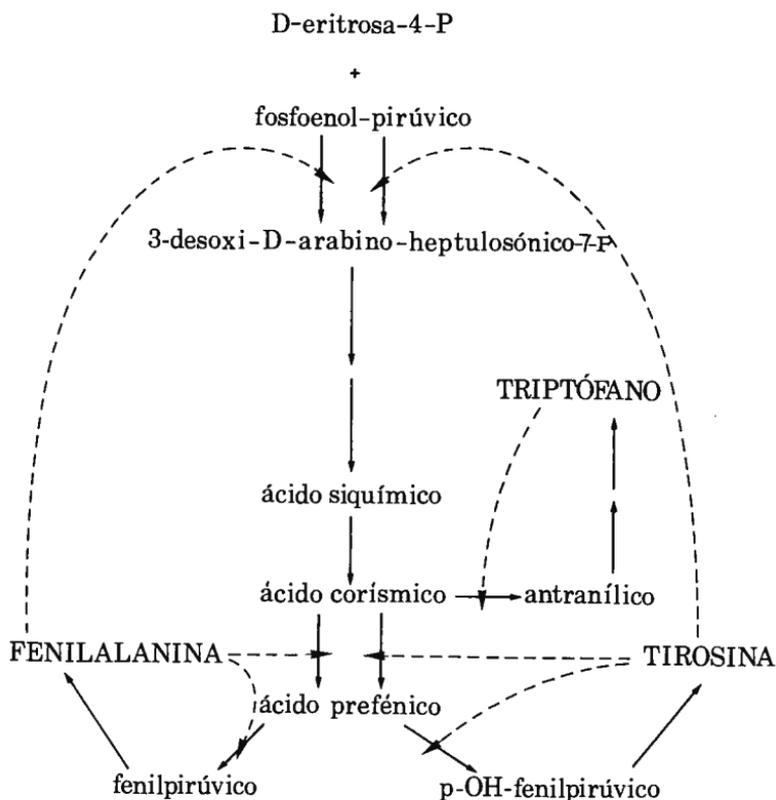


Figura 62

ción que parte del ácido corísmico, que son, respectivamente, antranílico-sintetasa, prefénico-deshidratasa y prefénico-deshidrogenasa. A su vez, el ácido corísmico y el ácido prefénico, que constituyen los sustratos de las anteriores tres enzimas alostéricas, son efectores alostéricos del primer sistema enzimático de la secuencia común, la DAHP-sintetasa.

#### 4. DNA-POLIMERASA

Dentro del grupo de enzimas que son capaces de exhibir diferentes actividades catalíticas en una cadena polipeptídica, se puede considerar la *DNA polimerasa* de *E. coli*, descubierta por Kornberg; esta múltiple funcionalidad que se asigna a la *DNA polimerasa* encierra el notorio

interés de que se va a poder observar la replicación del DNA al lado del papel reparador del DNA. En fechas recientes se había venido observando cómo la proteólisis limitada de la DNA polimerasa de *E. coli* (peso molecular 109.000) origina dos cadenas polipeptídicas poseedoras de diferentes actividades catalíticas (384-388) que han sido con detalle reconocidas por Kornberg y colaboradores. Uno de estos fragmentos —fragmento largo— posee un peso molecular de 76.000, y su función se centra en la capacidad de síntesis de DNA a partir de los desoxirribonucleótidos (polimerasa) y en la actividad hidrolítica del DNA en la dirección  $3' \rightarrow 5'$  ( $3' \rightarrow 5'$  exonucleasa) (389); el fragmento pequeño de peso molecular 36.000, posee como única funcionalidad enzimática la de hidrolizar exonucleóticamente la doble cadena del DNA en la dirección  $5' \rightarrow 3'$  ( $3' \rightarrow 5'$ ) exonucleasa (389). Este fragmento pequeño no posee actividad de polimerasa ni actividad exonucleolítica sobre DNA monocatenario.

La pérdida del fragmento pequeño capacita a la enzima restante a sintetizar DNA en la dirección usual  $5' \rightarrow 3'$  sin la degradación simultánea en esta dirección, actividad que, sin embargo, es propia de la enzima nativa; ello implica que la síntesis de DNA no depende de la actividad exonucleolítica  $5' \rightarrow 3'$ . Sin embargo, cuando se utiliza DNA polimerasa intacta para replicar poli(dA)·poli(dT), la reacción es autocatalítica; posiblemente a causa de la acción exonucleolítica ( $5' \rightarrow 3'$ ), crea oligonucleótidos suficientemente largos para ser utilizados como iniciadores, con lo que aparecen nuevas localizaciones de la acción enzimática.

Ambos fragmentos, obtenidos por acción de subtilisina, pueden unirse de forma adyacente al DNA a través de un enlace diester; unión que permite la acción concomitante de las actividades de polimerasa y  $5' \rightarrow 3'$  exonucleasa. La acción simultánea de los dos fragmentos restaura propiedades de la enzima intacta (propiedades catalíticas influenciadas por la acción concomitante de la  $5' \rightarrow 3'$  exonucleasa y polimerasa) que se centran en las siguientes tres reacciones: 1) estimulación de la actividad exonucleolítica en la dirección  $5' \rightarrow 3'$  por la síntesis concurrente de DNA (390); 2) la formación de oligonucleotidos de más de tres residuos; 3) cinética autocatalítica en la síntesis de poli[d(A-T)]. Por lo que a este tercer punto se refiere, hay que hacer notar que la sola presencia del fragmento largo, a partir de dATP y dTTP, produce el copolímero poli[d(A-T)] con arreglo a una velocidad prácticamente lineal; la mezcla de ambos fragmentos ocasiona una mucho más rápida síntesis de tipo autocatalítico.

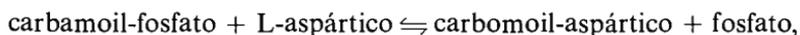
Según Kornberg, una posible explicación de este efecto autocatalítico con la enzima intacta (o la mezcla de fragmentos) habría de estar basada en que la síntesis de poli[d(A-T)] se lleva a cabo sobre el extremo 3'-OH del iniciador (con un exceso de polimerasa) y en que la acción de la exonucleasa según  $5' \rightarrow 3'$  origina oligonucleotidos d(A-T); estos oligonucleotidos podrían actuar como nuevas cadenas iniciadoras utilizables para la síntesis de poli[d(A-T)]. Tal mecanismo no sería lógicamente posible con el fragmento largo debido a la carencia de la actividad  $5' \rightarrow 3'$  exonucleolítica.

Es importante señalar que si, en general, el acoplamiento de funciones enzimáticas ofrece notorias ventajas a la luz de la recombinación genética, en este caso, con el acoplamiento de la actividad de la polimerasa y de la actividad lítica en una misma enzima, la significación aumenta al poderse utilizar como instrumento de la reparación «in vivo» de las lesiones en el DNA, tales como los dímeros de timina. Cuando un dímero de timina se separa por la acción lítica, el hueco se rellena por la acción de la polimerasa.

## 5. ASPÁRTICO TRANSCARBAMILASA

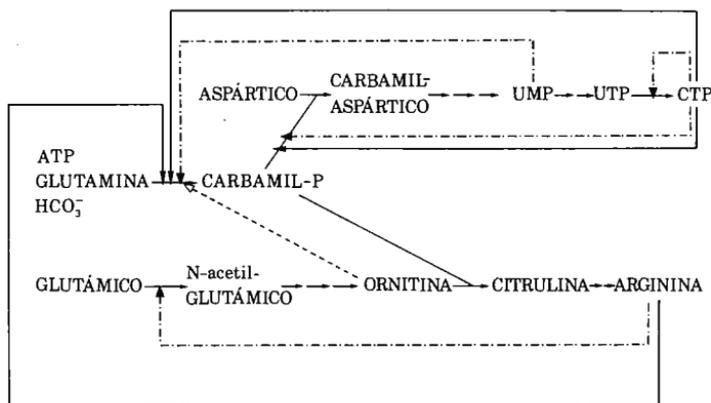
En la descripción inicial de los complejos enzimáticos ha quedado hecha mención del caso singular de la *aspártico-transcarbamilasa*, complejo caracterizado por la presencia de la función catalítica y la función reguladora en subunidades diferentes y que ha jugado un papel esencial en el desarrollo de las ideas acerca de las enzimas alostéricas. Además, la *aspártico-transcarbamilasa* participa de modo fundamental en la regulación del metabolismo de pirimidinas en microorganismos, ha dado origen a brillantes estudios sobre la interacción entre las subunidades y los cambios conformacionales, ha servido como uno de los primeros sistemas modelo para la comprobación de las teorías concernientes a los mecanismos alostéricos y ha dado lugar a diversos tipos de disposiciones estructurales de las subunidades.

La *aspártico-transcarbamilasa* cataliza la primera reacción propia de la biosíntesis de pirimidinas:



la cual está sujeta a una inhibición por productos finales, fenómeno ya descrito en 1956 (cf. nota 2).

La situación de la aspártico-transcarbamilasa en el conjunto de la regulación del metabolismo de pirimidinas en *E. coli* aparece a continuación. En este esquema aparece la posición destacada de las dos enzimas más reguladas; carbamoil-fosfato-sintetasa y la objeto de nuestro estudio, aspártico-transcarbamilasa (ATC).



El producto final CTP ejerce su función reguladora sobre ambos sistemas enzimáticos tanto como inhibidor de la actividad como represor de su síntesis. La aspártico-transcarbamilasa de *E. coli* se inhibe por los derivados de citosina según el orden CTP, CDP, CMP, citidina, siendo la base —citosina— un requisito esencial a la inhibición; la base misma no inhibe, y tampoco lo hacen los derivados de uridina. Sin embargo, los derivados de desoxicitidina son tan efectivos como los de citidina misma, hasta el punto de que dCTP es el mejor inhibidor natural descrito (cf. nota 57). El ATP es capaz de invertir la inhibición, y, en ausencia de CTP, llega a exhibir un débil efecto activador; de otro lado, mientras el CTP es capaz de aumentar la cooperatividad del aspártico, el ATP la hace desaparecer. Gerhart y Pardee han encontrado asimismo que los efectos ejercidos por CTP y ATP se eliminan por simple calefacción de la enzima o por tratamiento con urea, mercuriales o iones mercurio, pero se mantiene —o incluso se incrementa— la actividad catalítica de la enzima.

Situada como queda la aspártico-transcarbamilasa en el conjunto del metabolismo de las pirimidinas y su relación con el producto final,

CTP, veamos sus propiedades en el orden estructural y en la diversidad de aspectos funcionales.

La enzima nativa ha sido purificada de *E. coli* (391-393), *S. typhimurium* (394), *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* (395-396) de modo principal. Los estudios más numerosos se han realizado con la enzima de *E. coli* procedente de una cepa diploide para la región del cromosoma que contiene los cistrones de la aspártico-transcarbamilasa (*pyrB*), de forma que el 80 por 100 de la proteína total biosintetizada por las bacterias es dicha enzima. Se trata de una enzima muy estable y ha sido cristalizada en varias formas (397) (cf. nota 393).

Los estudios realizados con la aspártico-transcarbamilasa se pueden centrar en la consideración de las propiedades cinéticas y alostéricas de la enzima nativa, así como en el empleo de agentes desensibilizantes, ya sea con acción disociante o proteolítica; la acción de estos agentes conduce a enzimas modificadas o a subunidades en las que averiguar su comportamiento frente a sustratos, sustratos modificados, ligandos, etcétera, o sus propiedades estructurales.

Las propiedades cinéticas de la enzima nativa han sido estudiadas con gran detalle. La enzima exhibe una dependencia sigmoidea al representar la velocidad de reacción frente a la concentración de aspártico ( $K_m$  para el aspártico es 5.5 mM); el comportamiento de la enzima frente al carbamoil-fosfato es, asimismo, sigmoideo (398) a concentraciones adecuadas del sustrato; así, pues, ambos sustratos, aspártico y carbamoil-fosfato, alteran la interacción entre las subunidades y crean efectos cooperativos, con la consiguiente cinética de saturación sigmoidea (fig. 63). Los coeficientes de Hill a saturación media son 1.6 (saturación de enzima con aspártico) y 3.0 (saturación de enzima con carbamoil-fosfato) cuando el respectivo sustrato está presente a elevada concentración.

En la figura 63 puede apreciarse asimismo cómo CTP incrementa la sigmoicidad de la velocidad de reacción (mmoles de carbamoil-aspártico/hr/mgproteína) frente a la concentración de aspártico.

A altas concentraciones de carbamoil-fosfato, el CTP disminuye la afinidad de la enzima hacia el aspártico, en tanto que, a elevadas concentraciones de aspártico, el CTP disminuye la afinidad de la enzima hacia el carbamoil-fosfato. Cuando ambos sustratos se encuentran presentes a elevadas concentraciones, el efecto del CTP es prácticamente nulo; la inhibición se determina, pues, de modo conjunto por la concentración de ambos sustratos alostéricos.

Además de los resultados cinéticos, sugeridores de la unión coopera-

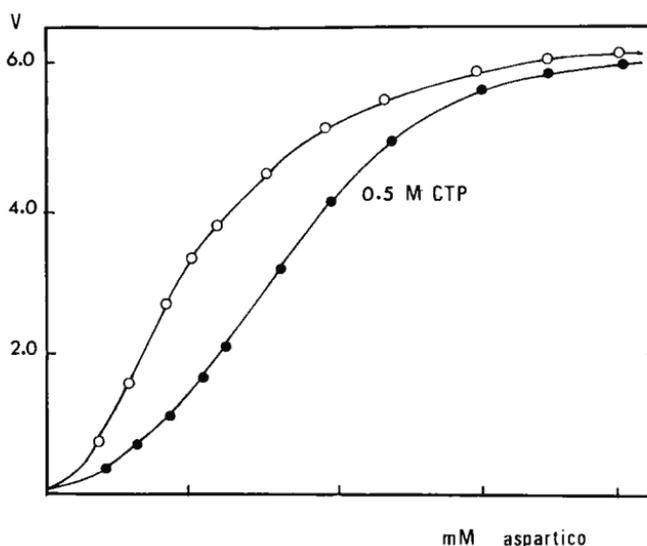


Figura 63

tiva de los ligandos, hay que añadir los más definitivos, siempre resultantes de las experiencias de diálisis en equilibrio utilizando succínico —como análogo del aspártico que se une perfectamente a la enzima— en presencia de altas concentraciones de carbamoil-fosfato (399). Del conjunto de los resultados puede deducirse la existencia de efectos homotrópicos positivos en la unión de ligandos y efectos heterotrópicos asociados con la unión del nucleotido.

El tratamiento de la enzima nativa de *E. coli* con urea 1.0 M o a elevado pH (10.2) conduce a una pérdida de la cinética sigmoidea, si bien no desaparece la sensibilidad a la inhibición por CTP (400). Sin embargo, el tratamiento de la enzima nativa con p-hidroximercuribenzoato la hace insensible al CTP; desensibilización de la enzima que va acompañada de su disociación en dos tipos de subunidades, denominadas *catalíticas* y *reguladoras*. Tras esta disociación, las subunidades se han podido separar por cromatografía sobre DEAE-Sephadex y estudiar en sus características fundamentales, que figuran en la Tabla 7. La mayor de estas subunidades posee toda la actividad catalítica presente en la enzima nativa y debe poseer, pues, la totalidad de localizaciones de unión de carbamoil-fosfato y aspártico; es insensible a la acción de los nucleotidos CTP y ATP. De los datos obtenidos acerca del peso

molecular de las subunidades y de las proporciones en masa en las que se obtienen dichas subunidades a partir de la enzima nativa, Gerhardt y Schachman sugirieron inicialmente la fórmula (reguladoras)<sub>4</sub> (catalíticas)<sub>2</sub> para la estructura cuaternaria de la enzima. Incipiente estructura atribuida a la aspártico transcarbamilasa que había de irse modificando a la luz de nuevos procedimientos de disociación, del número de localizaciones de unión para sustratos y efectores, de la determinación de grupos terminales, etc.

TABLA 7

Método	PESOS MOLECULARES		
	Enzima nativa	Subunidades	
		Catalítica	Reguladora
Equilibrio sedimentación	300.000	100.000	
Filtración por Sephadex G-200	305.000	96-110.000	28 - 30.000
Gradiente en sacarosa	300.000	100.000	28 - 35.000

La determinación de grupos terminales en las subunidades catalíticas obtenidas por disociación con urea 8 M (401) demostró que las subunidades catalíticas anteriormente mencionadas poseían una subestructura. El análisis mediante equilibrio de sedimentación dio un peso molecular de 42.000 para las subunidades catalíticas y de 25.000 para las subunidades reguladoras, de acuerdo con los pesos equivalentes obtenidos de la determinación de restos N-terminales (47.500 y 25.000 respectivamente). Por otro lado, Changeux, Gerhart y Schachman (cf. nota 399), encontraron cuatro localizaciones por molécula de enzima en estudios de unión de succinato a enzima nativa y subunidades catalíticas y de unión de CTP y BrCTP a la enzima y las subunidades reguladoras. Experiencias que concluyeron —provisionalmente también— la naturaleza tetramérica de la enzima (reguladoras)<sub>4</sub> (catalíticas)<sub>4</sub>, a base de cuatro cadenas polipeptídicas reguladoras y cuatro con función catalítica.

Cuando Weber (403) estableció la estructura primaria de la cadena

polipeptídica con función reguladora, quedó claro que el peso molecular era 17.000 en lugar de 27.000, valor que se había utilizado en los cálculos anteriores. Dicho peso molecular de 17.000 se confirmó por electroforesis en gel de poliacrilamida, método que dio para las cadenas catalíticas un peso de 33.000; estos pesos moleculares resultaron incompatibles con la estructura tetramérica que venía estando en vigor; habida cuenta de la composición y peso molecular de la enzima intacta (404), se propugnó por una estructura cuaternaria hexamérica (reguladoras)<sub>6</sub> (catalíticas)<sub>6</sub>.

Una serie de experiencias hablan en favor de una disposición estructural en forma de trímeros de las seis cadenas polipeptídicas catalíticas (405-407). Así, la disociación de la subunidad catalítica en cloruro de guanidinio 4-8 M da cadenas de peso molecular de  $3.4 \times 10^4$  daltons en medidas de equilibrio de sedimentación; datos similares a los obtenidos por electroforesis en gel en presencia de dodecilsulfato sódico (Tabla 8).

TABLA 8

Método	PESOS MOLECULARES	
	Cadena polipeptídica catalítica	Cadena polipeptídica reguladora
Cloruro de guanidinio:		
Equilibrio sedimentación.	34.000	17.200
Filtración por gel.....	33-35.000	17-18.000
Dodecilsulfato sódico:		
Sephadex G-200.....	31-34.000	16-19.000
Poliacrilamida.....	32-34.000	16-18.000
Resultados químicos:		
Carboxilo-terminales...	33.000	17.000
Secuencia de aminoácidos.	33.000	17.000

Experiencias de hibridación de la subunidad catalítica y su derivado succinilado, que han sido mezcladas y después disociadas y reconstituidas, han conducido a cuatro formas de subunidades separables por electroforesis o DEAE-Sephadex; hecho explicado a base de tres cadenas catalíticas idénticas, cada una de ellas succinilada o no, y que, al reaso-

ciarse estadísticamente, conducen a subunidades a base de 0, 1, 2 ó 3 cadenas succiniladas respectivamente. Además, la actividad catalítica de dichas cuatro subunidades responde a la actividad total sus dos tercios, un tercio o ausente por completo.

El tratamiento con carboxipeptidasa de la subunidad catalítica en presencia de dodecilsulfato sódico origina tres restos de leucina por cada  $10^5$  daltons de proteína, hecho acorde con la presencia de tres cadenas idénticas por subunidad catalítica.

El número de localizaciones de unión para el succínico presentes en la subunidad catalítica ha sido determinado por el procedimiento de Colowick y Womack (408), haciendo uso de las indicaciones de Porter, Modebe y Stark (409), relativas al incremento en la constante de unión para el succínico con la disminución del pH. Las subunidades catalíticas se disponen en la célula de diálisis junto con carbamoil-fosfato ( $4.8 \times 10^{-3}M$ ) y succínico- $^{14}C$  ( $3 \times 10^{-5}M$ ), midiéndose asimismo a través del tiempo la conversión enzimática de carbamoil-fosfato en carbamoil-aspártico; mediante este procedimiento, se demuestra la unión de tres restos de succínico en cada subunidad catalítica (cf. nota 407). Independientemente, Hammes, Porter y Wu (410) han probado que la subunidad catalítica une, asimismo, tres equivalentes de carbamoil-fosfato. De esta forma se ha comprobado que los dos ligandos complementarios tienen el mismo número de localizaciones en la subunidad catalítica aislada. Debe notarse que hasta las mencionadas investigaciones de Rosenbusch y Weber se venían atribuyendo valores inferiores para el número de localizaciones de unión (cf. nota 399) del succínico, tal vez por deficiencias experimentales —inactivación de la enzima, descomposición de ligandos, etc.— o por minusvaloración del efecto Donnan. El hecho cierto es que los resultados de Rosenbusch y Weber acerca del número de localizaciones de unión contribuyen a soportar la estructura hexamérica de la aspártico-transcarbamilasa.

Posterior evidencia en este sentido ha sido obtenida mediante estudios del contenido en elementos metálicos. Así, el contenido en Zn de la enzima nativa oscila entre 5.3 y 6.4 átomos-gramo de Zn por mol de proteína; unión de los iones metálicos a la enzima que aparece como muy sólida, pero que no es necesaria para la actividad catalítica, ya que las subunidades catalíticas —preparadas por disociación y eliminación cromatográfica de los iones metálicos— son perfectamente activas. El Zn puede sustituirse por Cd, dando lugar a una enzima con idénticas propiedades cinéticas.

La titulación de la enzima nativa con ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) en cloruro de guanidinio 6 M está de acuerdo con la presencia de 29-31 restos de cisteína por mol de enzima; por otro lado, la oxidación de la enzima nativa con perfórmico y análisis de los restos de ácido cisteico resultantes arrojan valores similares a los anteriores, con lo que resulta excluida la presencia en la enzima de azufre bajo la forma de puentes disulfuro y, por tanto, excluida la presencia de estos enlaces covalentes en la interacción entre las subunidades de la aspártico-transcarbamilasa. Idénticas experiencias de titulación con ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), por un lado, y de análisis de restos de ácido cisteico, por otro, llevadas a cabo con las subunidades catalíticas y reguladoras, han dado como resultado la presencia de 1 residuo de cisteína por cadena polipeptídica catalítica (peso molecular 33.500) y de cuatro residuos de cisteína por cadena polipeptídica reguladora (peso molecular 17.000). La concordancia entre los resultados logrados con la enzima nativa y los obtenidos con las subunidades es perfecta a base de la estructura hexamérica (catalíticas-reguladoras)<sub>6</sub>.

Rosenbusch y Weber, en elegantes experiencias de renaturación de la enzima a partir de sus productos de disociación —en presencia de cloruro de guanidinio 6 M o dodecilsulfato sódico al 5 por 100 añadidos de  $\beta$ -mercaptoetanol—, han logrado caracterizar las propiedades cinéticas y moleculares propias del estado nativo, así como el comportamiento cooperativo y la inhibición por CTP. Además, la proteína renaturada da lugar a cristales con simetría trigonal.

Toda una serie de datos abundan en favor de una estructura trimérica como ingrediente de la enzima nativa. Así, por ejemplo, la reconstitución de una mezcla de subunidades catalíticas intactas y parcialmente succiniladas, en presencia de subunidades reguladoras inalteradas, da lugar a tres especies de aspártico-transcarbamilasas que pueden separarse por electroforesis (cf. nota 405). A partir de esta conclusión al parecer evidente, de la estructura trimérica para las cadenas polipeptídicas catalíticas en el seno de la subunidad catalítica, se ha propuesto la disposición espacial que aparece en la figura 64. En ella aparecen los dos trímeros, constituyentes respectivos de las subunidades catalíticas, dispuestos alrededor de un eje de simetría trigonal y tres ejes de simetría binaria. Las seis unidades reguladoras aparecen intercaladas como dímeros entre los dos trímeros catalíticos.

En este modelo estructural, la disposición de las cadenas polipeptídicas reguladoras no está suficientemente soportada por datos expe-

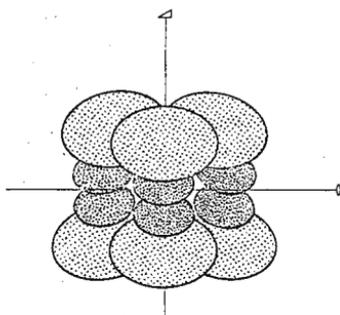


Figura 64

rimentales. Estudios más profundos sobre la naturaleza física de las subunidades reguladoras han sido realizados por Schachman y colaboradores (411), quienes aíslan diversos derivados de dichas subunidades y someten a una refinada experimentación física (412).

Una de las preparaciones estudiadas por Schachman ha sido la Zn-subunidad reguladora, obtenida por tratamiento con  $\text{ZnCl}_2$  de las subunidades reguladoras aisladas según Gerhart y Holoubek (413), y que contienen cantidades variables de mercurio residual. Dichas preparaciones Zn-subunidad reguladora contienen un ion cinc por cadena polipeptídica y exhiben una absoluta competencia para reconstituir la enzima con las subunidades catalíticas. El cinc puede sustituirse por mercurio, y ambos eliminarse, para dar lugar a la denominada apo-subunidad reguladora; estas apo-subunidades reguladoras no se combinan con las subunidades catalíticas para formar la enzima total a menos que se añadan iones cinc. La presencia o ausencia de iones metálicos afecta al equilibrio monómero-dímero de las subunidades reguladoras; así, la Zn-subunidad reguladora se presenta como un dímero homogéneo, con una constante de asociación de  $3.4 \times 10^4$ , y la separación de los iones metálicos por tratamiento con EDTA da lugar a un equilibrio monómero-dímero para la apo-subunidad reguladora con una formación favorecida del monómero. La adición de CTP origina un aumento en la dimerización de la proteína; la adición de CTP conduce en todos los casos a un incremento en la constante de asociación de las subunidades reguladoras.

Las experiencias de unión de CTP a las subunidades reguladoras en presencia y en ausencia de iones cinc muestran que el nucleótido se une más fuertemente a la Zn-subunidad reguladora (constante de

disociación,  $K$ , definida como  $(CTP)(P)/(P-CTP)$ , oscila entre  $0.3-1.2 \times 10^{-4}$  M) que a la aposubunidad reguladora ( $K$  oscila entre  $6-11 \times 10^{-4}$  M); cuando la apo-subunidad reguladora se convierte en Zn-subunidad reguladora, se restaura la capacidad de unión del CTP.

El problema quedaba centrado en la significación que los dímeros de cadenas polipeptídicas reguladoras antes señalados pudieran tener en el seno de las moléculas de enzima nativas. Para obtener resultados concluyentes en este sentido, Schachman y colaboradores (cf. nota 411) obtienen dímeros covalentemente unidos a través de cadenas carbonadas (414), que, al estar isotópicamente marcadas, permiten la averiguación de su contenido en los conjuntos de reconstitución. Estos dímeros artificiales, convenientemente purificados a través de Sephadex G-100, fueron mezclados con un exceso de subunidades catalíticas en experiencias de reconstitución, obteniéndose alrededor de un 60 por 100 de moléculas con la misma movilidad electroforética y el mismo coeficiente de sedimentación, 12S, que la enzima nativa; en estas enzimas reconstituidas, las cadenas polipeptídicas reguladoras existen bajo la forma predominante (alrededor del 89 por 100) de dímeros covalentemente unidos.

Los espectros de dicroísmo circular de las Zn- y apo-subunidades reguladoras revelan contribuciones de cromóforos en la región ultravioleta cercana del espectro. En la figura 65 aparecen los espectros de dicroísmo circular de Zn-subunidades reguladoras y apo-subunidades reguladoras en dos condiciones experimentales diferentes (0.04 M de fosfato-0.2 mM  $ZnCl_2$  para las primeras y en presencia de EDTA 1 mM para las segundas), y puede observarse la presencia de tres bandas de elipticidad negativa que solapan entre sí comprendidas entre 265 y 285 nm, así como un gran pico a 252 nm en el espectro de la Zn-subunidad reguladora. La eliminación del Zn con el EDTA va acompañada de la presencia de la apo-subunidad reguladora y de la desaparición total del máximo positivo y de una fuerte atenuación de las bandas negativas.

En la figura 66 aparecen los espectros de dicroísmo circular, debidos asimismo a Schachman y colaboradores, de las subunidades catalíticas (bandas de elipticidad positiva entre 257 y 295 nm), enzima nativa (fuerte banda positiva a 255 nm) y enzima reconstituida a base de una mezcla de subunidades catalíticas y Zn-subunidades reguladoras. De los datos arrojados por estos espectros se concluye una influencia del Zn sobre la conformación de las cadenas polipeptídicas reguladoras

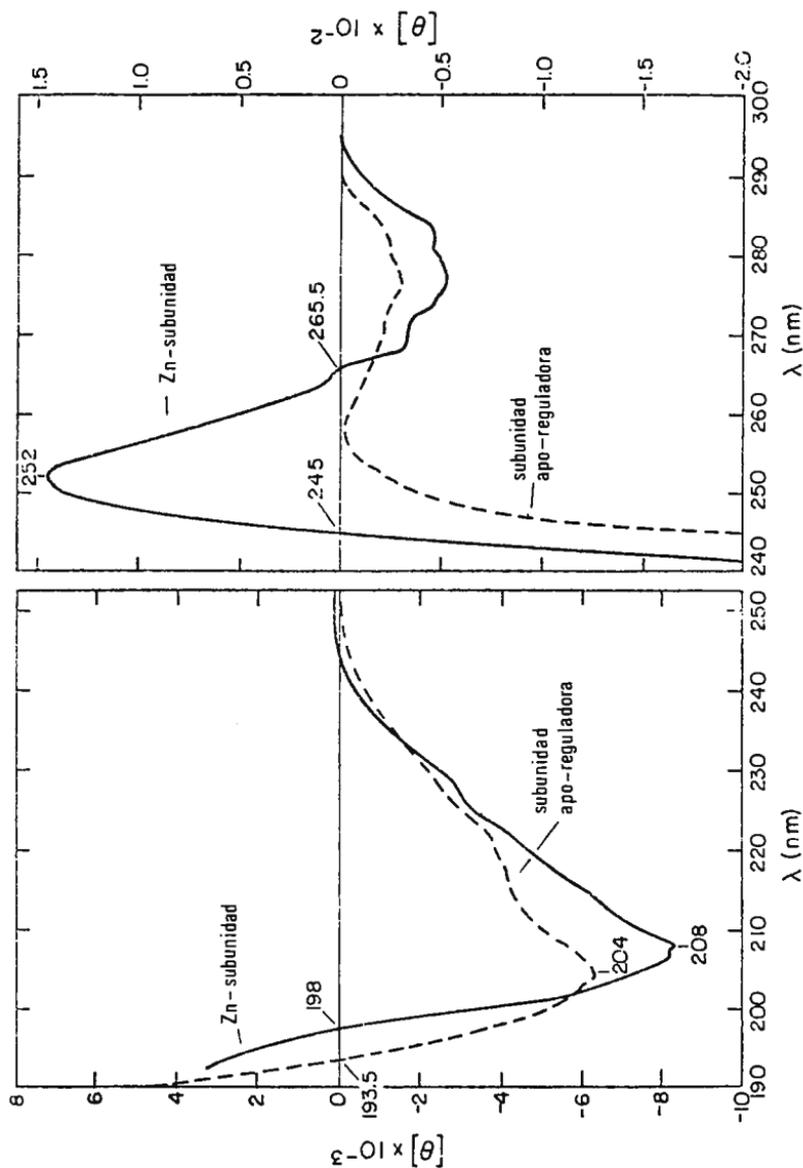


Figura 65

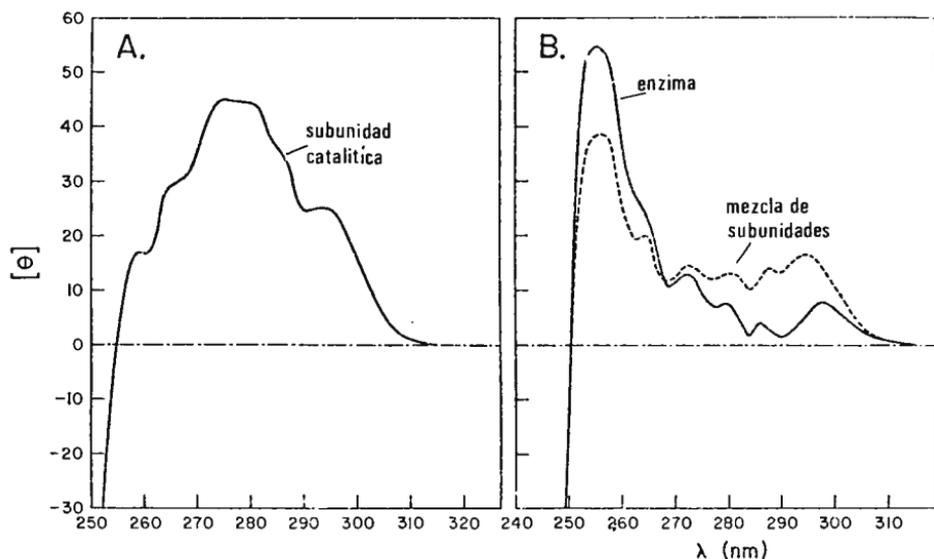


Figura 66

y cómo la reconstitución del complejo enzimático a partir de las subunidades va acompañada de cambios conformacionales.

A la vista de estos y otros datos espectroscópicos, se ha concluido la presencia en la enzima intacta, y en las subunidades catalíticas, de una cierta estructura organizada, que prácticamente no existe en las subunidades reguladoras.

Teniendo en cuenta que las subunidades catalíticas son trímeros estables que no manifiestan tendencia alguna a disociarse en cadenas polipeptídicas individuales, ni tampoco a asociarse bajo la forma de especies de mayor tamaño (415); teniendo presente, asimismo, la existencia en la enzima de las entidades formadas por dímeros estables de cadenas polipeptídicas reguladoras, y a la vista de una serie de datos fundamentales de naturaleza cristalográfica (416) y de microscopía electrónica (417), Schachman ha propuesto el modelo de la figura 67. La disposición estructural de este modelo satisface todos los requerimientos encontrados, comenzando por la existencia de seis cadenas polipeptídicas catalíticas y seis reguladoras dispuestas en forma de dos trímeros —catalíticos— y tres dímeros —reguladores—. Cada subunidad catalítica tiene una disposición triangular y ligeramente plana; la dis-

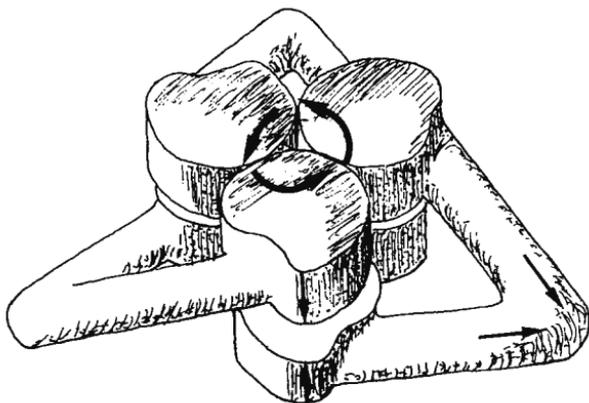


Figura 67

posición asimétrica de las cadenas polipeptídicas constituyentes de las subunidades catalíticas da lugar a la interacción heteróloga de los dominios de unión C:C; los trímeros catalíticos manifiestan, asimismo, interacciones isólogas capaces de originar estructuras con ejes binarios de simetría. Las subunidades reguladoras se manifiestan bajo la forma de largos cilindros dirigidos uno hacia el otro, formando un ángulo agudo y originando tres dimeros —con las correspondientes interacciones isólogas R:R— que conectan los dos trímeros catalíticos. La interpretación de las micrografías electrónicas de Richards y Williams parecen indicar que las localizaciones catalíticas que resultan unidas por los dimeros reguladores se encuentran desplazados unos  $120^\circ$ ; son asimismo hechos característicos de este modelo el que los trímeros catalíticos no exhiben interacción alguna entre sí y el que los dimeros reguladores se encuentran asimismo separados espacialmente, de forma que no son capaces de exhibir dominios de unión entre cadenas polipeptídicas reguladoras de diferentes dimeros. En ambos casos, cualquier manifestación de interacción se hubiera traducido en la presencia de agregados específicos de las subunidades correspondientes.

Sobre la estabilización que los iones cinc producen en la enzima nativa, hay que señalar que la estructura cuaternaria y los dominios de unión C:C, R:R o C:R, han de resultar influidos de alguna manera; Schachman y colaboradores (411) discuten ampliamente las diferentes posibilidades de influencia, y concluyen que la estabilización de la

estructura cuaternaria por los iones cinc resulta de la potenciación de las interacciones en los dominios  $R:R$ .

No cabe duda que, a la vista de la estructura de las subunidades integrantes de la aspártico-transcarbamilasa y de su disposición espacial, representada principalmente por el modelo de Rosenbusch y Weber y por el más refinado de Schachman, se impone una revisión de las ideas sobre el mecanismo de los efectos alostéricos y de las propiedades alostéricas de la enzima sobre el efecto conformacional de los ligandos y la contribución de los diferentes dominios de unión.

Por lo que hace referencia a los dominios de unión  $C:C$ , cada cadena polipeptídica de subunidad catalítica posee dos componentes de un dominio heterólogo, que en número de tres, idénticos, existen por subunidad. En estos dominios de unión no aparecen implicados restos de cisteína, ya que solamente existen tres por subunidad catalítica—uno por cada cadena— y pueden titularse directamente con p-hidroximercuribenzoato o 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) sin originar disociación de la subunidad. Estas interacciones desaparecen por tratamiento con cloruro de guanidinio, que origina disociación y aparición de las cadenas polipeptídicas aisladas; la diálisis o dilución ulteriores reconstituyen la subunidad indistinguible de la originaria. Los dominios de unión  $R:R$  entre cadenas polipeptídicas reguladoras para formar la subunidad correspondiente están constituidos por interacciones débiles, ya que, a diferencia de los  $C:C$ , es posible que manifiesten una disociación a sus monómeros en las experiencias de equilibrio de sedimentación; cada cadena polipeptídica reguladora posee cuatro residuos de cisteína sin implicación alguna en el dominio  $R:R$ , ya que son titulables íntegramente sin disociación de la subunidad. Los dominios de unión  $C:R$  poseen una mayor significación e interés, ya que las subunidades catalíticas no son capaces de exhibir propiedades cooperativas en la unión de ligandos; dado que estas propiedades, y también la sensibilidad a los efectores nucleotídicos, aparecen en la reconstitución de la enzima a partir de las subunidades, queda destacada la importancia de los dominios de unión  $C:R$ .

En relación a la implicación de los residuos de cisteína en los dominios de unión  $C:R$ , hay que señalar en primer lugar que las cadenas polipeptídicas reguladoras poseen cuatro de dichos restos en las posiciones 109, 114, 137 y 140, en tanto que las cadenas catalíticas poseen un solo residuo de cisteína; en segundo término hay que hacer notar que los dominios de unión  $C:R$  se distorsionan con mercuriales y la

conclusión de la participación en ellos de los residuos de cisteína. Además de la participación antes mencionada, de los iones Zn en el mantenimiento de los dominios de unión R:R, se ha señalado la posibilidad de su participación en los dominios C:R; así, los medios de cultivo de *E. coli* carentes de cinc ocasionan mayores cantidades de las subunidades catalíticas libres que de la enzima completa, mientras que, en presencia de cinc, la presencia de las subunidades libres es muy escasa; asimismo, el hecho de que el cinc no pueda eliminarse de la enzima total por diálisis prolongada frente a agentes quelantes, y que, por el contrario, se separe con gran facilidad una vez la enzima ha sido tratada con mercuriales, abundan en el sentido de esta participación en los dominios de unión establecidos entre las subunidades catalíticas y reguladoras.

Las interacciones entre las subunidades, establecidas a través de los diferentes dominios de unión, son responsables de la mediación de los efectos cooperativos en las enzimas alostéricas; los efectos específicos de los ligandos inducen variaciones en la magnitud de las fuerzas operativas en dichas interacciones. En el caso de la aspártico-transcarbamilasa, ya se ha hecho mención de la ausencia de disociación, lo que no resta para que, en presencia de ligandos, la conformación que prevalece esté menos fuertemente organizada que en su ausencia, manifestándose esta presencia en una relajación de la estructura cuaternaria. La existencia de tal relajación fue ya postulada en 1964 por Gerhart y Pardee (418) Planteada, pues, la significación funcional de los cambios conformacionales, diversos autores han hecho uso para su averiguación de técnicas experimentales basadas en distintos principios; hay que hacer notar a este propósito que la observación de ciertos parámetros, como la simple absorción o rotación óptica, puede dar señal de cambios debidos a efectos locales entre la proteína y los ligandos y no ser reflejo de variaciones conformacionales.

Schachman y colaboradores han desarrollado y utilizado métodos hidrodinámicos para el estudio conformacional de proteínas, que, al estar basados en el volumen y la forma de las moléculas, no otorgan ambigüedad en la interpretación de las variaciones. Así, Gerhart y Schachman (cf. nota 404) determinan los coeficientes de sedimentación de la enzima nativa en función de la concentración de succínico; Kirschner y Schachman (cf. nota 415) llevan a cabo experiencias de sedimentación diferencial simultáneas de acuerdo con los procedimientos previamente desarrollados (419-420), y obtienen datos de las diferencias de los coeficientes de sedimentación de las subunidades catalíticas

en función asimismo de la concentración de succínico. Los resultados obtenidos con la enzima nativa indican la existencia de un cambio conformacional motivado por la unión del succínico en presencia de carbamoil-fosfato; aumenta la reactividad de los residuos de cisteína a la vez que disminuye en un 3.6 por 100 el coeficiente de sedimentación. Por el contrario, la presencia de CTP contrarresta ambos efectos. Ahora bien, los cambios conformacionales que se producen en la subunidad catalítica aislada son consistentes con un incremento en el coeficiente de sedimentación del 1.05 por 100 (presencia simultánea de succínico y carbamoil-fosfato a concentraciones de 2 mM). La comparación de ambas experiencias, que aparece en la figura 68, deja constancia

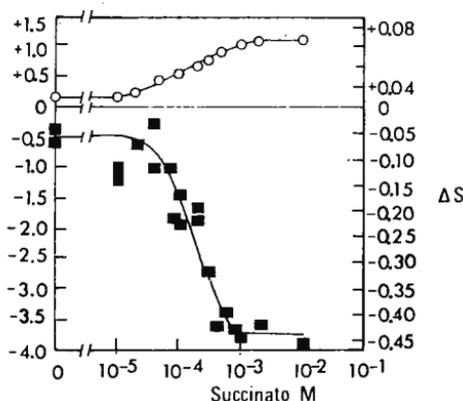


Figura 68

clara de que los cambios conformacionales en la enzima nativa y en la subunidad catalítica tienen lugar a la misma concentración de succínico ( $2 \times 10^{-4}$  M), si bien es contrario al sentido de la variación. En las subunidades catalíticas aisladas, los sustratos originan variaciones en la conformación, que dan como resultados formas más isométricas, en tanto que los cambios producidos en la enzima total tienden a formas más anisométricas.

Colman y Markus (421) estudian los efectos de sustratos y otros ligandos sobre la enzima nativa en presencia de bajas concentraciones de dodecilsulfato sódico; el detergente se utiliza con objeto de amplificar la tendencia de los ligandos a producir el relajamiento de la estructura cuaternaria; en otras palabras, con objeto de transformar dicha tenden-

cia en una disociación actual en subunidades, que se mide cromatográficamente con Sephadex G-200; los ocupantes de las localizaciones activas promueven la disociación en la medida que ocasionan un mayor predominio de las subunidades catalíticas en los esquemas de fraccionamiento cromatográfico (figura 69).

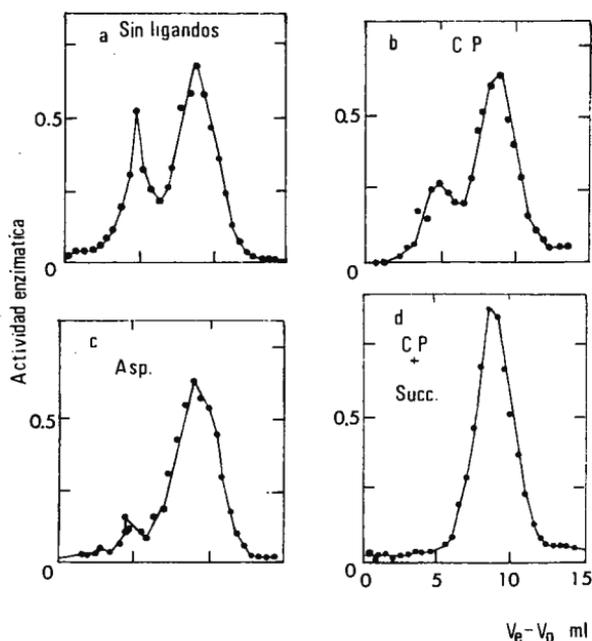


Figura 69

Siendo el control sin ligandos la parte (a) de la figura, el orden de efectividad es carbamoil-fosfato (b), aspártico en presencia de fosfato inorgánico (c), y succínico en presencia de carbamoil-fosfato (d). Teniendo presente que dichos ligandos se han utilizado en condiciones de saturación, el orden no viene prefijado por el grado de saturación que imprimen al centro activo; orden que tampoco es proporcional a las afinidades intrínsecas hacia el centro activo, ya que, por ejemplo, el carbamoil-fosfato se une 450 veces más fuertemente que el aspártico, y es éste un ligando más eficaz en la promoción de la disociación. Colman y Markus (421) establecen que el orden mencionado de efectividad de los sustratos

es el que corresponde a un incremento en los volúmenes moleculares, si bien la correlación entre ambos parámetros no es lineal. Para justificar este efecto, dichos autores proponen un modelo funcional (422) en el que, en presencia del ligando, la atracción electrostática que contribuye al dominio C:R se debilita y tiende a producir, en mayor o menor medida, las subunidades catalíticas (fig. 70). Collins y Stark (423)

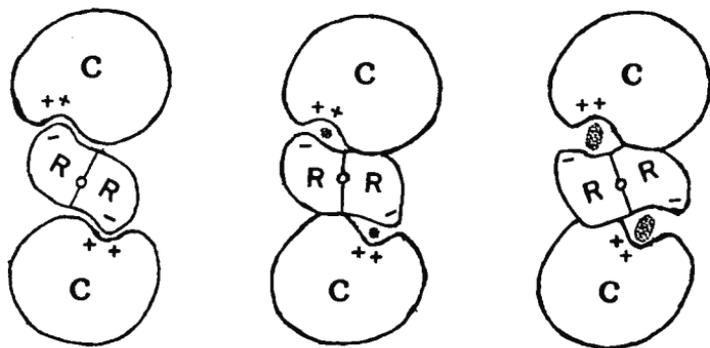


Figura 70

han sugerido la presencia de múltiples cargas positivas en el centro activo de la enzima, de modo que la carga electrostática del ligando ejercerá asimismo una influencia sobre la distorsión del dominio C:R. Estos resultados guardan cierta relación con las experiencias hidrodinámicas de Schachman, en que la disminución del coeficiente de sedimentación en presencia de sustratos puede atribuirse a un incremento del volumen hidrodinámico.

Cuando, en lugar de los sustratos, se ensayan los efectores alostéricos CTP y ATP, se ha encontrado que ambos nucleótidos estabilizan la estructura cuaternaria frente a la disociación inducida por el dodecil-sulfato sódico, como puede verse en la figura 71a y b. En presencia de dichos efectores no se observa presencia alguna de subunidad catalítica. Ello ha sido interpretado por Markus y colaboradores (cf. notas 421, 422) en el sentido de que tanto CTP como ATP inmovilizan el dímero regulador, suministrando un procedimiento de unión entre las subunidades catalíticas y reguladoras. Función que ambos ligandos llevan a cabo con independencia de su función fisiológica antagónica como inhibidor (CTP) o activador (ATP) alostéricos de la funcionalidad enzimática.

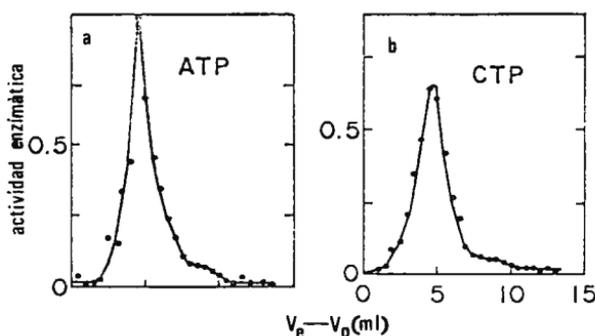


Figura 71

Estas experiencias que mencionamos sobre los cambios conformacionales inducidos por sustratos y efectores alostéricos están de acuerdo con los resultados de la proteólisis de la enzima intacta (424). Cuando se ensaya la digestibilidad de la enzima por tripsina en ausencia y presencia de diferentes ligandos, se concluye que el aspártico incrementa la velocidad de digestión, mientras que los efectores alostéricos CTP y ATP, a concentraciones aproximadas a las de saturación, decrecen la velocidad de digestión relativa al control. Cuando se examina el efecto de la concentración de aspártico sobre la digestibilidad trípica de la

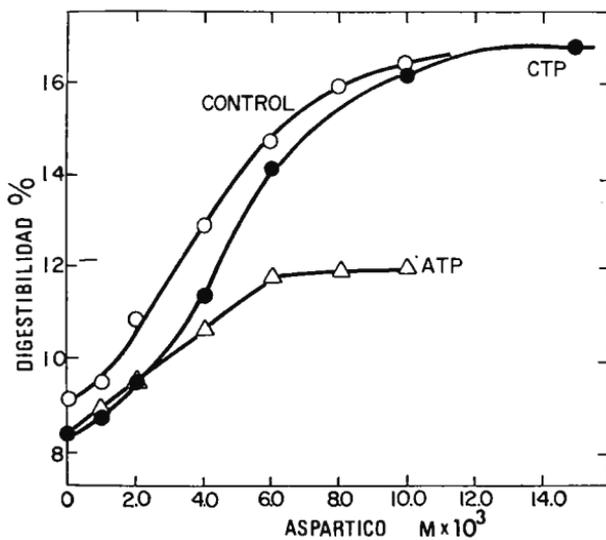


Figura 72

enzima, la curva control muestra que la aspártico-transcarbamilasa se hace más digestible a medida que aumenta la concentración de aspártico. Ahora bien, cuando está presente CTP, la digestibilidad en ausencia de aspártico es inferior a la del control; pero, al ir progresivamente aumentado la concentración del sustrato, se llega a alcanzar el mismo máximo en la velocidad de digestión; la presencia de ATP hace disminuir la velocidad relativa de digestión y desaparece la dependencia sigmoidea de la digestibilidad de la enzima en función de la concentración del aspártico. Ambos efectores decrecen, pues, la digestibilidad triptica de la aspártico-transcarbamilasa (fig. 72).

McClintok y Markus han examinado también el efecto de la digestión triptica sobre las propiedades alostéricas de la enzima, y obtienen una serie de resultados acerca de la capacidad de la aspártico-transcarbamilasa a dejarse regular por los efectores alostéricos, CTP y ATP, en función del grado de digestión por tripsina a una misma concentración de aspártico (fig. 73). La gráfica control sin digestión y a una serie

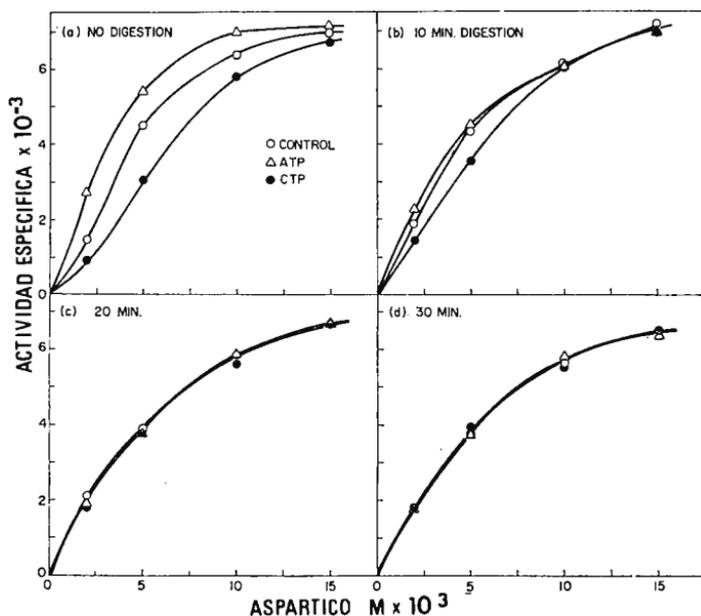


Figura 73

de concentraciones de aspártico da la conocida acción de ATP (activador) y CTP (inhibidor); a los diez minutos de digestión se juntan notablemente las gráficas, y a los veinte son ya por completo coincidentes. Ello significa la pérdida de las propiedades reguladoras de la enzima, que, por otro lado, sigue poseyendo actividad catalítica. La destrucción enzimática ha tenido lugar de manera preferente sobre la porción reguladora de la enzima. Esto está, a su vez, de acuerdo con la mayor sensibilidad al calor y a la acción de la urea y a la acción de los rayos X que exhibe la porción reguladora de la aspártico-transcarbamilasa.

Si, como acabamos de ver en la observación de una serie de efectos, la acción de ambos efectores alostéricos es similar, no lo es en otros, tales como la reactividad de los grupos tiólicos frente a los mercuriales (cf. nota 422) y las señales de resonancia paramagnética cuando la enzima se marca en presencia de dichos efectores (425).

Además de ATP y CTP, otros nucleótidos y compuestos relacionados influyen en la actividad catalítica de la ATC-asa de *E. coli*. Así, adenosina y AMP son activadores alostéricos, siendo el máximo efecto del segundo, a saturación, inferior a la mitad del efecto producido por ATP. Inosina, ITP y GTP inhiben la enzima; citidina se comporta asimismo como inhibidor en tanto que no lo son 3-metil-citidina y 7-metil-inosina. Haciendo uso de este comportamiento y de las propiedades generales de los nucleótidos, se ha postulado la interacción del N más fuertemente básico del anillo (N-1 del ATP, N-3 del CTP, N-7 de GTP e ITP) con una región electrofílica de la subunidad reguladora, posiblemente los iones  $Zn^{++}$  (426). Esta región experimentaría transiciones conformacionales acopladas a las transiciones de la enzima en su conjunto, de forma que la distinta afinidad de los nucleótidos hacia dichas conformaciones daría origen a su diferente influencia sobre la actividad enzimática. Dada la localización atribuida a los iones  $Zn^{++}$  en el dominio de unión R:C (cf. nota 412), los nucleótidos actuarían directamente sobre las interacciones entre subunidades y no sobre las subunidades reguladoras independientemente consideradas.

Esta influencia que ejercen los nucleótidos sobre la actividad de la ATC-asa varía según el origen de la enzima. ATP activa y CTP inhibe fuertemente en *E. coli* y *Citrobacter freundii* (427). ATP y UTP inactivan en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pseudomonas fluorescens* (cf. nota 396; 428). UMP es el inhibidor más potente de la enzima obtenida de *Phaseolus aureus* (429), seguido de UDP y UTP, sin que otros nucleótidos manifiesten acción alguna. El cambio que en la retroinhibición

de la actividad enzimática y según el origen de la enzima, se ejerce por UTP o CTP, se ha relacionado con el desarrollo de la afinidad hacia la parte pirimidínica del ATP (430).

Bajo ciertas condiciones experimentales se han obtenido formas modificadas de aspártico-transcarbamilasa. Así, en un mutante de *E. coli* que requiere uracilo se desreprimen las enzimas de la biosíntesis de pirimidinas en presencia de 2-tiouracilo, dando lugar a una enzima desensibilizada (431) capaz de exhibir propiedades singulares (432). Aunque la enzima posee en proporciones normales las dos clases de subunidades, su comportamiento frente al pH óptimo, termosensibilidad, etc., es del tipo del que exhiben las subunidades catalíticas libres; no exhibe interacciones homotrópicas entre las localizaciones catalíticas pero sigue siendo sensible a las interacciones heterotrópicas producidas por el inhibidor CTP. Dichas interacciones homotrópicas no aparecen ni en presencia de elevadas concentraciones de CTP, lo que sugiere que este inhibidor no actúa desplazando el equilibrio conformacional en dirección contraria a la actuación del ácido aspártico; esta falta de interacciones cooperativas entre las localizaciones catalíticas inducida por el 2-tiouracilo es, por el contrario, resultado de una modificación en la conformación de las subunidades reguladoras (433).

Acerca de la biosíntesis de aspártico-transcarbamilasa, se ha observado una producción equilibrada de las subunidades catalíticas y reguladoras por *E. coli* en la desrepresión enzimática. En la represión, la biosíntesis de las subunidades catalíticas cesa antes que la de las subunidades reguladoras, lo que sugiere que la biosíntesis de la enzima viene gobernada por un m-RNA policistrónico (434). A este respecto se han determinado los parámetros de expresión de los genes correspondientes, la periodicidad de la transcripción y el número de ribosomas que traduce cada molécula de m-RNA.

En la actualidad se dedican esfuerzos al estudio de la regulación de la síntesis de la aspártico-transcarbamilasa en bacterias; ello presenta dificultades procedentes en parte de la necesidad de disponer de ensayos independientes de las subunidades reguladoras. Recientemente se ha descrito un procedimiento que permite detectar 5 ng de subunidades reguladoras a concentraciones de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de extracto bruto; este ensayo utiliza  $^{125}\text{I}$ -subunidad catalítica que se une espontáneamente con la subunidad reguladora formando un complejo que se separa por electroforesis en gel de poliacrilamida (435). De esta forma se ha eva-

luado la proporción de subunidades reguladoras a enzima nativa en mutantes diversos de *Salmonella typhimurium*.

La determinación de los mecanismos alostéricos implicados en la regulación de la aspártico-transcarbamilasa no han conducido a resultados del todo concluyentes. Los resultados conseguidos al observar la unión de CTP mediante técnicas de diálisis en equilibrio (cf. nota 399; 436, 437) y empleando sondas marcadoras de espín no son coincidentes (438). Como ha quedado hecho mención, las discrepancias se han presentado incluso en la confrontación de la estructura hexamérica y la unión de succinato a base de cuatro moléculas por mol de enzima nativa (cf. nota 399). Los experimentos de unión de CTP han mostrado la presencia de seis localizaciones (cf. nota 436) divididas en dos grupos de 3 localizaciones independientes, fuertes y débiles. Mediante el empleo de  $^{14}\text{C}$ -CTP, Cook (437) sugiere la existencia de cambios secuenciales de la conformación de subunidades inducidos por el nucleótido.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) H. E. UMBARGER: *Science* 123,848 (1956).
- (2) R. A. YATES y A. B. PARDEE: *J. Biol. Chem.* 231,757 (1956).
- (3) F. JACOB y J. MONOD: *J. Mol. Biol.* 3,318 (1961).
- (4) D. E. ATKINSON: *Ann. Rev. Biochem.* 35,85 (1966).
- (5) W. EPSTEIN y J. R. BECKWITH: *Ann. Rev. Biochem.* 37,411 (1969).
- (6) P. DATTA: *Science* 165,556 (1969).
- (7) W. GILBERT y B. WÜLLER-HILL: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 56,1891 (1966); 58,2415 (1967).
- (8) M. PTASHNE: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57,306 (1967); *Nature* 314,232 (1967).
- (9) V. PIRROTTA y M. PTASHNE: *Nature* 222,541 (1969).
- (10) S. UDAKA: *Nature* 228,336 (1970).
- (11) A. D. RIGGS y S. BOURGEOIS: *J. Mol. Biol.* 34,361 (1968).
- (12) V. PIRROTTA, P. CHADWICK y M. PTASHNE: *Nature* 227,41 (1970).
- (13) P. FILNER, J. L. WRAY y J. E. VARNER: *Science* 165,358 (1969).
- (14) P. W. MAJERUS y E. KILBURN: *J. Biol. Chem.* 244,6254 (1969).
- (15) A. YOSHIDA, G. STAMATOYANNOPOULOS y A. MOTULSKY: *Science* 155,97 (1967).
- (16) R. GANSCHOW y R. T. SCHIMKE: *J. Biol. Chem.* 244,4649 (1967).
- (17) R. T. SCHIMKE y D. DOYLE: *Ann. Rev. Biochem.* 39,929 (1970).
- (18) S. NUMA, M. MATSUHASHI y F. LYNEN: *Biochem. Z.* 334,203 (1961).
- (19) W. E. KNOX y O. GREENGARD: *Adv. Enz. Reg.* 3,247 (1965).
- (20) H. C. PITOT y C. PERAINO: *J. Biol. Chem.* 240,3039 (1965).
- (21) P. J. FRITZ, E. S. VESELL, E. L. WHITE y K. M. PRUITT: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 62,558 (1969).
- (22) E. C. C. LIN y W. E. KNOX: *Biochim Biophys. Acta* 26,85 (1956).
- (23) F. T. KENNEY, J. R. REEL, C. B. HAGER y J. L. WITTLIFF, en *Regulatory Mechanisms for Protein Synthesis in Mammalian Cells*.
- (24) P. G. HOLT y I. T. OLIVER: *Biochemistry* 8,1429 (1969).
- (25) H. L. SEGAL y Y. S. KIM: *J. Cellular Comp. Physiol.* 66,11 (1965).
- (26) P. FEIGELSON, M. FEIGELSON y O. GREENGARD: *Recent Progr. Horm. Res.* 18,491 (1962).
- (27) G. WEBER, R. L. SINGHAL, S. K. SRIVASTAVA: *Adv. Enzyme Reg.* 3,43 (1965).
- (28) F. RUDDLE, *Proc. Park City Intern. Symp. Problems in Biology* (W. E. Hanley Ed., Univ. Utah Press, 1970).
- (29) W. D. WICKS, D. L. GREENMAN y F. T. KENNEY: *J. Biol. Chem.* 240,4414 (1965).
- (30) W. H. WUNNER, J. BELL y H. N. MUNRO: *Biochem. J.* 101,417 (1966).
- (31) H. N. MUNRO: *Fed. Proc.* 27,1231 (1968).
- (32) G. SHYAMALA, J. GORSKI: *J. Biol. Chem.* 244,1097 (1969).
- (33) T. S. HERMAN, G. M. FIMOGNARI y I. S. EDELMAN: *J. Biol. Chem.*, 243,3849 (1968).
- (34) H. R. MAURER y G. R. CHALKLEY: *J. Mol. Biol.* 27,431 (1967).
- (35) J. P. JOST, A. HSIE, S. D. HUGHES y L. RYAN: *J. Biol. Chem.* 245,351 (1970).

- (36) J. E. FUHR, I. M. LONDON y A. I. GRAYZEL: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63,129 (1969).
- (37) B. L. STREHLER, D. D. HENDLEY y G. P. HIRSCH: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57,1751 (1967).
- (38) M. J. PINE: Cancer Res. 27,522 (1967).
- (39) C. GANCEDO y H. HOLZER: European J. Biochem. 4,190 (1968).
- (40) F. MESSENGUY y J. WIAME: FEBS Letters 3,47 (1969).
- (41) A. BONSIGNORE, A. DE FLORA, M. A. MANGIAROTTI, I. LORENZONI y S. ALEMA: Biochem. J. 106,147 (1968).
- (42) J. MONOD, J. P. CHANGEUX y F. JACOB: J. Mol. Biol. 6,306 (1963).
- (43) L. PAULING, R. B. COREY y H. R. BRANSON: Proc. Natl. Acad. 37,205 (1951).
- (44) W. KAUZMANN, en *The mechanism of enzyme action*, Ed. por W. D. McElroy y B. Glass (Jons Hopkins Press, 1954).
- (45) J. A. SCHELLMAN: Compt. rend. trav. lab. Carlsberg Ser. Chim. 29,230 (1955).
- (46) I. M. KLOTZ y J. S. FRANZEN: J. Am. Chem. Soc. 84,3461 (1962).
- (47) G. NÉMETHY y H. A. SCHERAGA: J. Phys. Chem. 66,1773 (1962).
- (48) W. KAUZMANN: Adv. Protein Chem. 14 (1959).
- (49) H. A. SCHERAGA, G. NÉMETHY y I. Z. STEINBERG: J. Biol. Chem. 237,2506 (1962).
- (50) R. C. VALENTINE, en *Nobel Symposium* vol.11: «Symmetry and Function of Biological Systems at the Macromolecular Level» p.165. Ed. por A. Engstrom y B. Strandberg, J. Wiley (1969); R. H. Haschemeyer: Adv. Enzymol. 33,71 (1970).
- (51) N. G. WRIGLEY y J. V. HEATHER: J. Mol. Biol. 68,483 (1972).
- (52) H. A. SCHERAGA: Adv. Phys. Org. Chem. 6,103 (1968).
- (53) G. N. RAMACHANDRAN y V. SASISEKHARAN: Adv. Protein Chem. 23,283 (1968).
- (54) G. NÉMETHY y N. LAIKEN: *Il Farmaco* 25,999 (1971).
- (55) J. P. CHANGEUX, J. THIÉRY, Y. TUNG y C. KITTEL: Proc. Natl. Acad. Sci. 57,335 (1967).
- (56) J. P. CHANGEUX: Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 26,313 (1961).
- (57) J. C. GERHART y A. B. PARDEE: J. Biol. Chem. 237,891 (1962).
- (58) J. P. CHANGEUX: Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28,497 (1963).
- (59) K. D. GIBSON y H. A. SCHERAGA: *Physiol. Chem. and Physics* 1,109 (1969).
- (60) G. NÉMETHY, en *Conformation of Biopolymers*. Ed. por G. N. Ramachandran (Acad. Press, 1967).
- (61) A. V. HILL: J. Physiol. 40,190 (1910).
- (62) F. J. W. ROUGHTON, A. B. OTIS y R. L. J. LYSTER: Proc. Roy. Soc. B. 144,29 (1955).
- (63) E. ANTONINI, J. WYMAN, M. BRUNORI, E. BUCCI, C. FRONTICELLI, A. ROSSI FANELLI: J. Biol. Chem. 238,2950 (1963).
- (64) E. ANTONINI, J. WYMAN, M. BRUNORI, E. BUCCI, C. FRONTICELLI y A. ROSSI FANELLI: J. Biol. Chem. 240,1096 (1965).
- (65) C. TANFORD y Y. NOZAKI: J. Biol. Chem. 241,2832 (1966).
- (66) G. SCATCHARD: Ann. N. Y. Acad. Sci. 51,660 (1949).
- (66\*) R. K. CANNAN, A. KIBRICK y A. H. PALMER: Ann. N. Y. Acad. Sci. 41,243 (1941).
- (67) I. M. KLOTZ, F. M. WALKER y R. B. PIVAN: J. Amer. Chem. Soc. 68,1486 (1946).
- (68) C. FRIEDEN y R. COLMAN: J. Biol. Chem. 242,1705 (1967).
- (69) M. I. SHEIKH y J. V. MILLER: Biochim. Biophys. Acta 158,456 (1968).

- (70) P. F. COOPER y G. C. WOOD: *J. Pharm. Pharmacol.* 20,150S (1968).
- (71) G. C. WOOD y P. F. COOPER: *Chromatogr. Rev.* 12,88 (1970).
- (72) S. KERESZTES-NAGY, R. F. MAIS, Y. T. OESTER y J. F. ZAROLINSKI: *Anal. Biochem.* 48,80 (1972).
- (73) C. FRIEDEN: *J. Biol. Chem.* 239,3522 (1964).
- (74) E. L. KING y C. ALTMAN: *J. Phys. Chem.* 60,1375 (1956).
- (75) W. FERDINAND: *Biochem. J.* 98,278 (1966).
- (76) B. R. RABIN: *Biochem. J.* 102,22C (1967).
- (77) C. FRIEDEN: *J. Biol. Chem.* 242,4045 (1967).
- (78) A. HORN y H. BÖRNIG: *FEBS Letters* 3,325 (1969).
- (79) G. S. ADAIR: *J. Biol. Chem.* 63,529 (1925).
- (80) L. PAULING: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 21,186 (1935).
- (81) J. MONOD, J. WYMAN y J. P. CHANGEUX: *J. Mol. Biol.* 12,88 (1965).
- (82) D. E. KOSHLAND, G. NÉMETHY y D. FILMER: *Biochemistry* 5,365 (1966).
- (83) G. S. ADAIR: *Proc. Roy. Soc. London Ser. A* 109,292 (1925).
- (84) E. P. WHITEHEAD: *En Prog. in Bioph. & Mol. Biol.* vol.21. Ed. por J. A. V. Butler y D. Noble, Pergamon Press, 1970.
- (85) H. MUIRHEAD, J. M. COX, L. MAZZARELLA y M. F. PERUTZ: *J. Mol. Biol.* 28,117 (1967).
- (86) J. P. CHANGEUX y M. M. RUBIN: *J. Mol. Biol.* 21,265 (1966).
- (87) M. YOSHINO y N. OGASWARA: *J. Biochem.* 72,223 (1972).
- (87\*) J. P. CHANGEUX y M. M. RUBIN: *Biochemistry* 7,553 (1968).
- (88) M. E. KIRTLEY y D. E. KOSHLAND: *J. Biol. Chem.* 242,4192 (1967).
- (89) J. E. HABER y D. E. KOSHLAND: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58,2087 (1967).
- (90) D. E. KOSHLAND y K. E. NEET: *Ann. Rev. Biochem.* 37,387 (1968).
- (91) E. P. WHITEHEAD: *J. Theoret. Biol.* 8,276 (1965).
- (92) K. TAKETA y B. M. POGELL: *J. Biol. Chem.* 240,651 (1965).
- (93) A. CORNISH-BOWDEN y D. E. KOSLAND: *J. Biol. Chem.* 245,6241 (1970).
- (94) A. WORCEL, S. GOLDMAN y W. W. CLELAND: *J. Biol. Chem.* 240,3399 (1966).
- (95) B. D. SANWAL, y R. A. COOK: *Biochemistry* 5,886 (1966).
- (96) J. R. SWEENEY y J. R. FISHER: *Biochemistry* 7,561 (1968).
- (97) C. G. GRIFFIN y L. BRAND: *Arch. Biochem. Biophys.* 126,856 (1968).
- (98) K. KIRSCHNER: *En «Current Topics in Cellular Regulation»* 4,167 (1971).
- (99) W. W. CLELAND: *Biochim. Biophys. Acta* 67,104 (1963).
- (100) T. SUMI y M. UI: *Biochim. Biophys. Acta* 276,12 (1972).
- (101) S. CHA: *J. Biol. Chem.* 243,820 (1968).
- (102) H. F. FISHER y D. G. CROSS: *Nature* 228,247 (1970).
- (103) D. G. CROSS y H. F. FISHER: *J. Biol. Chem.* 245,2612 (1970).
- (104) C. FRIEDEN: *J. Biol. Chem.* 245,5788 (1970).
- (105) C. FRIEDEN: *Ann. Rev. Biochem.* 40,653 (1971).
- (106) H. E. UMBARGER: *Ann. Rev. Biochem.* 38,323 (1969).
- (107) N. M. LEE, E. M. LANSFORD y W. SHIVE: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24,315 (1966).
- (108) C. A. WOOLFOLK y E. R. STADTMAN: *Arch. Biochem. Biophys.* 118,736 (1967).
- (109) E. W. NESTER y R. A. JENSEN: *J. Bacteriol.* 91,1594 (1966).
- (110) B. D. SANWAL, M. W. ZINK y C. S. STACHOW: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12,510 (1963).

- (111) A. T. PHILLIPS y W. A. WOOD: *J. Biol. Chem.* 240,4703 (1965).
- (112) R. O. BURNS, J. Calvo, P. MARGOLIN y H. E. UMBARGER: *J. Bacteriol.* 91,1570 (1966).
- (113) S. R. GROSS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 54,1538 (1965).
- (114) A. PIÉRARD, N. GLANDORFF, M. MERGEAY y J. M. WIAME: *J. Mol. Biol.* 14,23 (1965).
- (115) M. FREUNDLICH, R. O. BURNS y H. E. UMBARGER: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48,1804 (1962).
- (116) G. N. COHEN: En «Current Topics in Cellular Regulation» 1,183 (1969).
- (117) G. N. COHEN, G. LEBRAS, H. ROBICHON-SZULMAJSTER: *J. Biol. Chem.* 236,2033 (1961).
- (118) E. R. STADTMAN: *Bacteriol. Rev.* 27,170 (1963).
- (119) J. C. PATTE, P. TRUFFA y G. N. COHEN: *Biochim. Biophys. Acta* 128,426 (1966).
- (120) J. C. PATTE, G. LEBRAS y G. N. COHEN: *Biochim. Biophys. Acta* 136,245 (1967).
- (121) P. TRUFFA, R. VAN RAPENBUSCH, J. JANIN, C. GROS y G. N. COHEN: *Eur. J. Biochem.* 5,73 (1968).
- (122) D. E. WAMPLER y E. W. WESTHEAD: *Biochemistry* 7,1661 (1968).
- (123) J. JANIN, R. VAN RAPENBUSCH, P. TRUFFA y G. N. COHEN: *Eur. J. Biochem.* 8,128 (1969).
- (124) F. FALCOZ-KELLY, R. VAN RAPENBUSCH y G. N. COHEN: *Eur. J. Biochem.* 8,146 (1969).
- (125) G. N. COHEN y J. C. PATTE: *Biochim. Biophys. Acta* 99,557 (1965).
- (126) P. J. VON DIPPE, A. ABRAHAM, Ch. A. NELSON y W. G. SMITH: *J. Biol. Chem.* 247,2433 (1972).
- (127) E. R. STADTMAN, G. N. COHEN, G. LEBRAS, H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER: *J. Biol. Chem.* 236,2033 (1961).
- (128) J. C. PATTE, M. ZUBER y F. BORNE: *Molec. gen. Genet.* 116,35 (1972).
- (129) P. DATTA y L. PRAKASH: *J. Biol. Chem.* 241,5827 (1966).
- (130) P. DATTA y H. GEST: *Nature* 203,1259 (1964).
- (131) H. PAULUS y E. GRAY: *J. Biol. Chem.* 239,PC4008 (1964).
- (132) P. DATTA y H. GEST: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 52,1004 (1964).
- (133) A. ROSNER y H. PAULUS: *J. Biol. Chem.* 246,2965 (1971).
- (134) H. PAULUS y E. GRAY: *J. Biol. Chem.* 243,1349 (1968).
- (135) I. SHIIO y R. MIYAJIMA: *J. Biochem.* 65,849 (1969).
- (136) C. LAFUMA, C. GROS y J. C. PATTE: *Eur. J. Biochem.* 15,111 (1970).
- (137) Y. YUGARI y C. GILVARG: *Biochim. Biophys. Acta* 62,612 (1962).
- (138) L. A. CHASIN y J. SZULMAJSTER, en *Spores*. Ed. por L. L. Campbell, American Soc. for Microbiology, Ann Arbor (Michigan) 1969).
- (139) E. D. BARBER y H. J. BRIGHT: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 60,1363 (1968).
- (140) J. W. OLGIVIE y J. H. SIGHTLER: *Biophys. J.* 8, A90 (1968).
- (141) D. E. WAMPLER, M. TAKAHASHI y E. W. WESTHEAD: *Biochemistry* 9,4210 (1970).
- (142) F. FALCOZ-KELLY, J. JANIN, J. C. SAARI, M. VÉRON, P. TRUFFA-BACHI y G. N. COHEN: *Eur. J. Biochem.* 28,507 (1972).
- (143) M. VÉRON, F. FALCOZ-KELLY y G. COHEN: *Eur. J. Biochem.* 28,520 (1972).
- (144) J. JANIN y G. N. COHEN: *Eur. J. Biochem.* 11,520 (1969).
- (145) J. JANIN y M. IWATSUBO: *Eur. J. Biochem.* 11,530 (1969).

- (146) W. L. STARNES, P. MUNK, S. B. MAUL, G. N. CUNNINGHAM, D. J. COX y W. SHIVE: *Biochemistry* 11,677 (1972).
- (147) L. BURLANT, P. DATTA y H. GEST: *Science* 148,1351 (1965).
- (148) H. PAULUS y E. GRAY: *J. Biol. Chem.* 242,4980 (1967).
- (149) H. K. KURAMITSU: *Biochim. Biophys. Acta* 167,643 (1968).
- (150) P. DATTA: *J. Biol. Chem.* 241,5836 (1966); 244,858 (1969).
- (151) M. FREUNDLICH: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10,277 (1963).
- (152) P. DATTA: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58,635 (1967).
- (153) R. MIYAJIMA y I. SHUO: *J. Biochem.* 71,219 (1972).
- (154) E. D. BARBER y H. J. BRIGHT: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 60,1370 (1968).
- (155) P. DATTA: *Science* 165,556 (1969).
- (156) D. L. FRIEDMAN y J. LARNER: *Biochemistry* 4,2261 (1965).
- (157) E. G. KREBS y D. A. WALSH: *Fed. Eur. Biochem. Soc. Symp.* 19,121 (1969).
- (158) D. A. WALSH, J. P. PERKINS, y E. G. KREBS: *J. Biol. Chem.* 243,3763 (1968).
- (159) T. A. LANGAN: *J. Biol. Chem.* 244,5763 (1969).
- (160) J. F. KUO y P. GREENGARD: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 64,1349 (1969).
- (161) E. MIYAMOTO, J. F. KUO y P. GREENGARD: *J. Biol. Chem.* 244,6395 (1969).
- (162) T. R. SODERLING, J. P. HICKENBOTTOM, E. M. REIMANN, F. L. HUNKELER, D. A. WALSH y E. G. KREBS: *J. Biol. Chem.* 245,6317 (1970).
- (163) J. D. CORBIN, E. M. REIMANN, D. A. WALSH y E. G. KREBS: *J. Biol. Chem.* 245, 4849 (1970).
- (164) J. K. HUTTUNEN, D. STEINBERG, y S. E. MAYER: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 67,290 (1970).
- (165) D. B. P. GOODMAN, H. RASMUSSEN y F. DiBELLA: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 67,652 (1970).
- (166) D. KABAT: *Biochemistry* 10,197 (1971).
- (167) O. J. MARTELO, S. L. C. WOO, E. M. REIMANN y E. W. DAVIE: *Biochemistry* 9, 4807 (1970).
- (168) G. M. WALTON, G. N. GILL, I. J. ABRASS y L. D. GARREN: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*: 68,880 (1971).
- (169) M. A. BROSTROM, E. M. REIMANN, D. A. WALSH y E. G. KREBS, en *Advances in Enzyme Regulation*. Ed. G. Weber (Pergamon Press, New York 1970) vol.8 p.191.
- (170) G. N. GILL y L. D. GARREN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39,335 (1970).
- (171) M. TAO, M. L. SALAS y F. LIPMANN: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 67,408 (1970).
- (172) A. KUMON, H. YAMAMURA y Y. NISHIZUKA: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41,1290 (1970).
- (173) E. M. REIMANN, C. O. BROSTROM, J. D. CORBIN, C. A. KING y E. G. KREBS: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42,187 (1971).
- (174) C. O. BROSTROM, J. D. CORBIN, C. A. KING, y E. G. KREBS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*: 68,2444 (1971).
- (175) Ch. S. RUBIN, J. ERLICHMAN y O. O. ROSEN: *J. Biol. Chem.* 247,36 (1972).
- (176) E. M. REIMANN, D. A. WALSH y E. G. KREBS: *J. Biol. Chem.* 246,1986 (1971).
- (177) A. KUMON, K. NISHIYAMA, H. YAMAMURA y Y. NISHIZUKA: *J. Biol. Chem.* 247,3726 (1972).
- (178) E. G. KREBS y E. H. FISCHER: *Biochim. Biophys. Acta* 20,150 (1956).
- (179) T. W. RALL, E. W. SUTHERLAND y W. D. WOSILAIT: *J. Biol. Chem.* 218,483 (1956).

- (180) C. O. BROSTROM, F. L. HUNKELER y E. G. KREBS: *J. Biol. Chem.* 246,1961 (1971).
- (181) L. M. G. HEILMEYER, F. MEYER, R. H. HASCHKE y E. H. FISCHER: *J. Biol. Chem.* 245,6649 (1970).
- (182) C. VILLAR-PALASÍ y S. H. WEI: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 67,345 (1970).
- (183) E. HELMREICH y C. F. CORI: *Adv. Enzyme Regul.* 3,91 (1965).
- (184) R. J. DE LANGE, R. G. KEMP, W. D. RILEY, R. A. COOPER y E. G. KREBS: *J. Biol. Chem.* 243,2200 (1968).
- (185) D. L. FRIEDMAN y J. LARNER: *Biochemistry* 2,669 (1963).
- (186) T. R. SODERLING, J. P. KICKENBOTTOM, E. M. REIMANN, F. L. HUNKELER, D. A. WALSH y E. G. KREBS; *Biochim. Biophys. Acta* 242,81 (1971).
- (187) C. H. SMITH, N. E. BROWN y J. LARNER: *Biochim. Biophys. Acta* 242,81 (1971).
- (188) E. H. FISCHER, S. S. HURD, P. KOH, V. L. SEERY y D. C. TELLER, en *Control of Glycogen Metabolism*. Ed. por Whelan, W. J. (Oslo).
- (189) J. H. WANG y D. J. GRAVES: *Biochemistry* 3,1437 (1964).
- (190) N. B. MADSEN y S. SHECHOSKY: *J. Biol. Chem.* 242,3301 (1967).
- (191) O. AVRAMOVIC y N. B. MADSEN: *J. Biol. Chem.* 243,1656 (1968).
- (192) M. H. BUC y H. BUC, en *Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions*. Ed. por E. Kvamme y A. Pihl (Oslo 1968).
- (193) L. M. G. HEILMEYER, F. MEYER, R. H. HASCHKE y E. H. FISCHER: *J. Biol. Chem.* 245,6649 (1970).
- (194) E. HELMREICH y C. F. CORI: *Adv. Enzyme Regul.* 3,91 (1965).
- (195) R. H. HASCHKE, K. W. GRÄTZ y L. M. G. HEILMEYER: *J. Biol. Chem.* 247,5351 (1972).
- (196) G. HOYLE: *Sci. Amer.* 222,84 (1970).
- (197) M. A. RIZACK: *J. Biol. Chem.* 239,392 (1964).
- (198) S. C. TSAI y M. VAUGHAN: *Fed. Proc.* 29,602 (1970).
- (199) E. M. REIMANN y D. A. WALSH: *Fed. Proc.* 29,601 (1970).
- (200) J. D. CORBIN y E. G. KREBS: *J. Biol. Chem.* 245,4849 (1970).
- (201) R. H. STELLWAGEN y R. D. COLE: *Ann. Rev. Biochem.* 38,951 (1969).
- (202) R. J. DE LANGE y E. L. SMITH: *Ann. Rev. Biochem.* 40,279 (1971).
- (203) T. A. LANGAN y L. K. SMITH: *Fed. Proc.* 26,603 (1967).
- (204) T. A. LANGAN: *Science* 162,579 (1968).
- (205) M. TAKEDA, H. YAMAMURA y Y. OHGA: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42,103 (1971).
- (206) J. F. KUO y P. GREENGARD: *J. Biol. Chem.* 245,2493 (1970).
- (207) Ch. EIL y I. G. WOOL: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43,1001 (1971).
- (208) J. F. KUO y P. GREENGARD: *J. Biol. Chem.* 244,3417 (1969).
- (209) P. GREENGARD y D. A. MCAFEE y J. KEBABIAN, en *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, vol.1 (Raven Press, New York 1972).
- (210) E. M. JOHNSON, T. UEDA, H. MAENO y P. GREENGARD: *J. Biol. Chem.* 247,5650 (1972).
- (211) V. G. ALLFREY, R. FAULKNER y A. E. MIRSKY: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51,786 (1964).
- (212) B. C. T. POGO, V. G. ALLFREY y A. E. MIRSKY: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55,805 (1966).
- (213) B. G. T. POGO, A. O. POGO, V. G. ALLFREY y A. E. MIRSKY: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59,1337 (1968).

- (214) B. J. NOLAND, J. M. HARDIN y G. R. SHEPHERD: *Biochim. Biophys. Acta* 246, 263 (1971).
- (215) F. R. LIBBY: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31,59 (1958),
- (216) H. NOHARA, T. TAKAHASHI y K. OGATA: *Biochim. Biophys. Acta* 154,529 (1968).
- (217) D. GALLWITZ, y C. E. SEKERIS: *Z. Physiol. Chem.* 350,150 (1969).
- (218) G. R. SHEPHERD, B. J. NOLAND y J. M. HARDIN: *Biochim. Biophys. Acta* 228,544 (1971).
- (219) T. TIDWELL, V. G. ALLFREY y A. E. MIRSKY: *J. Biol. Chem.* 243,707 (1968).
- (220) R. M. GUTIÉRREZ y L. S. HILICA: *Science* 157,1324 (1967).
- (221) M. G. ORD y L. A. STOCKEN: *Biochem. J.* 102,631 (1970).
- (222) A. J. LOUIE y G. H. DIXON: *J. Biol. Chem.* 247,5490 (1972).
- (223) M. T. SUNG y G. H. DIXON: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67,1616 (1970).
- (224) M. SUNG, E. P. M. CANDIDO, A. LOUIE, M. SANDERS y G. H. DIXON: *Fed. Proc.* 30,183 (1971).
- (225) A. J. LOUIE y G. H. DIXON: *J. Biol. Chem.* 247,5498 (1972).
- (226) E. P. M. CANDIDO y G. H. DIXON: *J. Biol. Chem.* 247,5506 (1972).
- (227) R. L. RUBIN y E. N. MOUDRIANAKIS: *J. Mol. Biol.* 67,361 (1972).
- (228) C. A. WOOLFOLK, B. M. SHAPIRO y E. R. STADTMAN: *Arch. Biochem. Biophys.* 116,177 (1966).
- (229) D. MECKE y H. HOLZER: *Biochim. Biophys. Acta* 122,341 (1966).
- (230) C. A. WOOLFOLK y E. R. STADTMAN: *Arch. Biochem. Biophys.* 118,736 (1967).
- (231) H. S. KINGDON y E. R. STADTMAN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27,470 (1967).
- (232) H. S. KINGDON, B. M. SHAPIRO y E. R. STADTMAN: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58,1703 (1967).
- (233) E. R. STADTMAN, B. M. SHAPIRO, A. GINSBURG, H. S. KINGDON y M. D. DENTON: *Brookhaven Symp. Biol.* 21,378 (1968).
- (234) H. S. KINGDON y E. R. STADTMAN: *J. Bacteriol.* 94,949 (1967).
- (235) W. B. ANDERSON, S. B. HENNIG, A. GINSBURG y E. R. STADTMAN: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67,1417 (1970).
- (236) S. B. HENNIG, W. B. ANDERSON y A. GINSBURG: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67,1761 (1970).
- (237) A. GINSBURG, J. YEH, S. B. HENNIG y M. D. DENTON: *Biochemistry* 9,633 (1970).
- (238) M. D. DENTON y A. GINSBURG: *Biochemistry* 9,617 (1970).
- (239) F. C. WEDLER y P. D. BOYER: *J. Biol. Chem.* 247,993 (1972).
- (240) D. H. WOLF y E. EBNER: *J. Biol. Chem.* 247,4208 (1972).
- (241) R. A. RONZIO, W. B. ROWE, S. WILK y A. MEISTER: *Biochemistry* 8,2670 (1969).
- (242) W. B. ROWE, R. A. RONZIO y A. MEISTER: *Methods Enzymol* 17A,900 (1970).
- (243) C. WU: *Biochim. Biophys. Acta* 89,137 (1964).
- (244) A. GOLDSTONE y E. ADAMS: *J. Biol. Chem.* 240,2077 (1965),
- (245) S. S. TATE, F. Y. LEU y A. MEISTER: *J. Biol. Chem.* 247,5312 (1972).
- (246) A. LEVITZKI, W. B. STALLCUP y D. E. KOSHLAND: *Biochemistry* 10,3371 (1971).
- (247) S. S. TATE y A. MEISTER: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68,781 (1971).
- (248) A. J. L. COOPER y A. MEISTER: *Biochemistry* 11,661 (1972).

- (249) C. FRIEDEN, en *Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions*. Ed. por E. Kvamme y A. Phil (Oslo).
- (250) L. W. NICHOL, W. J. H. JACKSON y D. J. WINZOR: *Biochemistry* 6,2449 (1967).
- (251) S. J. WAKIL: *J. Amer. Chem. Soc.* 80,6465 (1958).
- (252) S. J. WAKIL, E. B. TITCHNER y D. M. GIBSON: *Biochim. Biophys. Acta* 29,225 (1958).
- (253) S. NUMA, E. RINGELMANN y F. LYNEN: *Biochem. Z.* 340,228 (1964).
- (254) R. O. BRADY y S. GURIN: *J. Biol. Chem.* 199,421 (1952).
- (255) D. B. MARTIN y P. R. VAGELOS: *J. Biol. Chem.* 237,1787 (1962).
- (256) P. R. VAGELOS, A. W. ALBERTS y D. B. MARTIN: *J. Biol. Chem.* 238,533 (1963).
- (257) F. LYNEN, M. MATSUHASHI, S. NUMA y E. SCHWEIZER, en *The control of lipid metabolism*: *Biochemical Soc. Symp.* 24. Ed. por J. K. Grant (Acad. Press, 1963).
- (258) C. GREGOLIN, E. RYDER, R. C. WARNER, A. K. KLEINSCHMIDT y M. D. LANE: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 56,1751 (1966).
- (259) C. GREGOLIN, E. RYDER, R. C. WARNER, A. K. KLEINSCHMIDT, H. C. CHANG y M. D. LANE: *J. Biol. Chem.* 243, 4236 (1968).
- (260) A. M. NERVI, A. W. ALBERTS y P. R. VAGELOS: *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 401, (1971).
- (261) A. W. ALBERTS y P. R. VAGELOS: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59,561 (1968).
- (262) B. I. GERWIN, B. E. JACOBSON y H. G. WOOD: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 64,1317 (1969).
- (263) E. RYDER, C. GREGOLIN, H. C. CHANG y M. D. LANE: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57,1455 (1967).
- (264) A. W. ALBERTS, A. M. NERVI y P. R. VAGELOS: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63,1319 (1969).
- (265) J. MOSS y M. D. LANE: *J. Biol. Chem.* 247,4944 (1972).
- (266) J. MOSS y M. D. LANE: *J. Biol. Chem.* 247,4952 (1972).
- (267) R. B. GUCHHAIT, J. MOSS, W. SOKOLSKI y M. D. LANE: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68,653 (1971).
- (268) W. M. BORTZ B. y F. LYNEN: *Biochem. Z.* 56,658 (1963).
- (269) S. NAKANISHI y S. NUMA: *Eur. J. Biochem.* 16,161 (1970).
- (270) J. BIRNBAUM: *Arch. Biochem. Biophys.* 132,436 (1969).
- (271) J. BIRNBAUM: *J. Bacteriol.* 104,171 (1970).
- (272) M. D. GREENSPAN y J. M. LOWENSTEIN: *J. Biol. Chem.* 243,6273 (1968).
- (273) H. INOUE y J. M. LOWENSTEIN: *J. Biol. Chem.* 247,4825 (1972).
- (274) M. D. LANE y J. MOSS, en *Metabolic Pathways*. Ed. por H. J. Vogel, vol.5 (Acad. Press, 1971).
- (275) F. LYNEN: *Fed. Proc.* 20,941 (1961).
- (276) F. LYNEN: *Biochem. J.* 102,381 (1967).
- (277) R. Y. HSU, G. WASSON y J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.* 240,3736 (1965).
- (278) D. N. BURTON, A. G. HAAVIK y J. W. PORTER: *Arch. Biochem. Biophys.* 126,141 (1968).
- (279) S. SMITH y S. ABRAHAM: *J. Biol. Chem.* 245,3209 (1970).
- (280) D. N. BRINDLEY, S. MATSUMURA y K. BLOCH: *Nature* 224,666 (1969)
- (281) P. OVERATH y P. K. STUMPF: *J. Biol. Chem.* 239,4103 (1964).
- (282) J. L. BROOKS y P. K. STUMPF: *Arch. Biochem. Biophys.* 116,108 (1966).
- (283) K. P. HUANG y P. K. STUMPF: *Arch. Biochem. Biophys.* 143,412 (1971).

- (284) P. R. VAGELOS, P. W. MAJERUS, A. W. ALBERTS, A. R. LARRABEE y G. P. AILHAUD: *Fed. Proc.* 25,1485 (1966).
- (285) P. R. VAGELOS: *Ann. Rev. Biochem.* 33,139 (1964).
- (286) J. DELO, M. L. ERNST-FONBERG y K. BLOCH: *Arch. Biochem. Biophys.* 143,384 (1971).
- (287) P. R. VAGELOS: *J. Amer. Chem. Soc.* 81,4119 (1959).
- (288) P. R. VAGELOS y A. W. ALBERTS: *J. Biol. Chem.* 235,2786 (1960).
- (289) P. GOLDMAN y P. R. VAGELOS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 7,414 (1962).
- (290) P. GOLDMAN, A. W. ALBERTS y P. R. VAGELOS: *J. Biol. Chem.* 238,3579 (1963).
- (291) P. W. MAJERUS y P. R. VAGELOS: *Fed. Proc.* 23,166 (1964).
- (292) P. W. MAJERUS, A. W. ALBERTS y P. R. VAGELOS: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51, 1231 (1964).
- (293) S. J. WAKIL: *Ann. Rev. Biochem.* 31,369 (1962).
- (294) R. E. DUGAN, L. L. SLAKEY y J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.* 245,6312 (1970).
- (295) E. M. BARNES y S. J. WAKIL: *J. Biol. Chem.* 243,2955 (1968).
- (296) H. GOLDFINE: *J. Biol. Chem.* 241,3864 (1966).
- (297) H. GOLDFINE, G. P. AILHAUD y P. R. VAGELOS: *J. Biol. Chem.* 242,4466 (1967).
- (298) H. VAN DEN BOSCH y P. R. VAGELOS: *Biochim. Biophys. Acta* 218,233 (1970).
- (299) H. VAN DEN BOSCH, J. R. WILLIAMSON y P. R. VAGELOS: *Nature* 228,338 (1970).
- (300) D. OESTERHELT, H. BAUER y F. LYNEN: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63,1377 (1969).
- (301) I. PILZ, M. HERBST, O. KRATKY, D. OESTERHELT y F. LYNEN: *Eur. J. Biochem.* 13,55 (1970).
- (302) K. WILLECKE, E. RITTER y F. LYNEN: *Eur. J. Biochem.* 8,503 (1969).
- (303) A. HAGEN: Tesis doctoral (Universidad de Munich).
- (304) J. AYLING, R. PIRSON y F. LYNEN: *Biochemistry* 11,526 (1972).
- (305) G. LUST y F. LYNEN: *Eur. J. Biochem.* 7,68 (1968).
- (306) J. A. DORSEY y J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.* 243,3512 (1968).
- (307) W. PIRSON: Tesis doctoral (Universidad de Munich 1970).
- (308) U. HENNING, G. DENNERT, R. HERTEL y W. S. SHIPP: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31,227 (1966).
- (309) F. IMAMOTO, J. ITO y C. YANOFKY: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31,235 (1966).
- (310) E. SCHWEIZER y H. BOLLING: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67,660 (1970).
- (311) E. SCHWEIZER, L. KÜHN y H. CASTORPH: *Z. Physiol. Chem.* 352,377 (1971).
- (312) R. Y. HSU, G. WASSON y J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.* 240,3736 (1965).
- (313) P. C. YANG, R. M. BOCK, R. Y. HSU y J. W. PORTER: *Biochim. Biophys. Acta* 110,608 (1965).
- (314) P. H. W. BUTTERWORTH, P. C. YANG, R. M. BOCK y J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.* 242,3508 (1967).
- (315) S. KUMAR, J. K. DORSEY y J. W. PORTER: *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 40,825 (1970).
- (316) S. KUMAR, J. A. DORSEY, R. A. MUESING y J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.* 245,4732 (1970).
- (317) S. KUMAR, R. A. MUESING y J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.* 247,4749 (1972).
- (318) S. KUMAR y J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.* 246,7780 (1971).
- (319) G. T. PHILLIPS, J. E. NIXON, A. S. ABRAMOVITZ y J. W. PORTER: *Arch. Biochem. Biophys.* 138,357 (1970).

- (320) J. E. NIXON, G. T. PHILLIPS, A. S. ABRAMOVITZ y J. W. PORTER: Arch. Biochem. Biophys. 138,372 (1970).
- (321) G. T. PHILLIPS, J. E. NIXON, J. A. DORSEY, P. H. W. BUTTERWORTH, C. J. CHESTERTON y J. W. PORTER: Arch. Biochem. Biophys. 138,380 (1970).
- (322) V. C. JOSHI, C. A. PLATE y S. J. WAKIL: J. Biol. Chem. 245,2857 (1970).
- (323) C. A. PLATE, V. C. JOSHI y S. J. WAKIL: J. Biol. Chem. 245,2867 (1970).
- (324) S. YUN y R. Y. HSU: J. Biol. Chem. 247,2689 (1972).
- (325) S. SMITH y R. DILS: Biochim. Biophys. Acta 116,23 (1966).
- (326) E. M. CAREY y R. DILS: Biochim. Biophys. Acta 210,371 (1970).
- (327) S. SMITH y S. ABRAHAM: J. Biol. Chem. 246,6428 (1971).
- (328) H. A. SHERAGA, G. NÉMETHY y I. Z. STEINBERG: J. Biol. Chem. 237,2506 (1962).
- (329) H. M. KORCHAK y E. J. MASORA: Biochim. Biophys. Acta 58,354 (1962).
- (330) K. CHAKRABARTY y G. A. LEVEILLE: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 131,1051 (1969).
- (331) D. ZAKIM, R. S. PARDINI, R. H. HERMAN y H. E. SAUBERLICH: Biochim. Biophys. Acta 144,242 (1967).
- (332) K. DAKSHINAMUTRI y P. R. DESJARDINS: Biochim. Biophys. Acta 176,221 (1969).
- (333) E. R. DILLER y O. A. HARVEY: Biochemistry 3,2004 (1964).
- (334) W. S. BORTZ, S. ABRAHAM y I. L. CHAIKOFF: J. Biol. Chem. 238,1266 (1963).
- (335) D. W. ALLMANN, D. D. HUBBARD y D. M. GIBSON: J. Lipid Res. 6,63 (1965).
- (336) D. W. ALLMANN y D. M. GIBSON: J. Lipid Res. 6,51 (1965).
- (337) L. C. CHU, D. J. MCINTOSH, I. HINCENBERGS y M. A. WILLIAMS: Biochim. Biophys. Acta 187,573 (1969).
- (338) P. O. EGWIM y D. S. SGOUTAS: Amer. J. Clin. Nutr. 25,16 (1972).
- (339) P. W. MAJERUS y E. KILBURN: J. Biol. Chem. 244,6254 (1969).
- (340) J. V. DAHLEN, A. L. KENNAN y J. W. PORTER: Arch. Biochem. Biophys. 124,51 (1968).
- (341) D. N. BURTON, J. M. COLLINS, A. L. KENNAN y J. W. PORTER: J. Biol. Chem. 244,4510 (1969).
- (342) J. J. VOLPE y Y. KISHIMOTO: J. Neurochem. 19,737 (1972).
- (343) J. W. PORTER y R. W. LONG: J. Biol. Chem. 233,20 (1958).
- (344) P. K. TUBBS y P. B. GARLAND: 93,550 (1964).
- (345) J. D. ROBINSON, R. O. BRADY y R. M. BRADLEY: J. Lipid Res. 4,144 (1963).
- (346) G. LUST y F. LYNEN: Eur. J. Biochem. 7,68 (1968).
- (347) J. A. DORSEY y J. W. PORTER: J. Biol. Chem. 243,3512 (1968).
- (348) S. J. WAKIL, J. K. GOLDMAN, I. P. WILLIAMSON y R. E. TOOMEY: Proc. Natl. Acad. Sci. 65,880 (1966).
- (349) C. A. PLATE, V. C. JOSHI, B. SEDGWICK y S. J. WAKIL: J. Biol. Chem. 243,5439 (1968).
- (350) D. F. SILBERT, F. RUCH y P. R. VAGELOS: J. Bacteriol. 95,1658 (1968).
- (351) H. V. SCHAIRER y P. OVERATH: J. Mol. Biol. 44,209 (1969).
- (352) T. O. HENDERSON y J. J. MCNEILL: Biochem. Biophys. Res. Commun. 25,662 (1966).
- (353) T. O. HENDERSON y J. J. MCNEILL: Bacteriol. Proc. 134 (1967).
- (354) G. WEEKS y S. J. WAKIL: J. Biol. Chem. 245,1913 (1970).
- (355) C. YANOFSKY: Harvey Lect. 61,145 (1967).

- (356) E. W. MILES, M. HANATAKA e I. P. CRAWFORD: *Biochemistry* 7,2742 (1968).
- (357) R. FLURI, L. E. JACKSON, W. E. LEE e I. P. CRAWFORD: *J. Biol. Chem.* 246, 6620 (1971).
- (358) J. K. HARDMAN y D. F. HARDMAN: *J. Biol. Chem.* 246,6489 (1971).
- (359) R. G. H. COTTON e I. P. CRAWFORD: *J. Biol. Chem.* 247,1883 (1972).
- (360) T. ENATSU e I. P. CRAWFORD: *J. Bacteriol.* 95,107 (1968).
- (361) R. MAURER e I. P. CRAWFORD: *Arch. Biochem. Biophys.* 144,193 (1971).
- (362) R. MAURER e I. P. CRAWFORD: *J. Biol. Chem.* 246,6625 (1971).
- (363) J. R. GUEST, G. R. DRAPEAU, B. C. CARLTON y C. YANOFSKY: *J. Biol. Chem.* 242,5442 (1967).
- (364) W. B. FREEDBERG y J. K. HARDMAN: *J. Biol. Chem.* 246,1439 (1971).
- (365) G. M. HATHAWAY: *J. Biol. Chem.* 247,1440 (1972).
- (366) C. YANOFSKY, G. R. DRAPEAU, J. R. GUEST y B. C. CARLTON: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57,296 (1967).
- (367) I. P. CRAWFORD y S. SIKES: *Genetics* 66,607 (1970).
- (368) R. G. H. COTTON e I. P. CRAWFORD: *J. Biol. Chem.* 247,1883 (1972).
- (369) D. M. BONNER, J. A. DEMOSS y S. E. MILLS, en *Evolving Genes and Proteins*. Ed. por H. J. Vogel y V. Bryson (Acad. Press, N.Y. 1965).
- (370) T. R. MANNEY, W. DUNTZE, N. JANOSKO y J. SALAZAR: *J. Bacteriol.* 99,590 (1969).
- (371) E. J. HENDERSON, H. ZALKIN y L. H. HWANG: *J. Biol. Chem.* 245,1424 (1970).
- (372) H. ZALKIN y D. KLING: *J. Biol. Chem.* 246,6891 (1971).
- (373) H. NAGANO, H. ZALKIN y E. J. HENDERSON: *J. Biol. Chem.* 245,3810 (1970).
- (374) M. GRIESHABER y R. BAUERLE: *Nature* 236,232 (1972).
- (375) J. F. KANE y R. A. JENSEN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41,328 (1970).
- (376) J. F. KANE, W. M. HOLMES y R. A. JENSEN: *J. Biol. Chem.* 247,1587 (1972).
- (377) K. BREW, T. C. VANAMAN y R. L. HILL: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59,491 (1968).
- (378) N. H. GILES, M. E. CASE, C. W. H. PARTRIDGE y S. I. AHMED: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58,1453 (1967).
- (379) L. BOURGOYNE, M. E. CASE y N. H. GILES: *Biochim. Biophys. Acta* 191,452 (1969).
- (380) S. I. AHMED y N. H. GILES: *J. Bacteriol.* 99,231 (1969).
- (381) F. H. GAERTNER: *Arch. Biochem. Biophys.* 151,277 (1972).
- (382) E. W. NESTER, J. H. LORENCE y D. S. NASSER: *Biochemistry* 6,1553 (1967).
- (383) R. G. H. COTTON y F. GIBSON: *Biochim. Biophys. Acta* 100,76 (1965).
- (384) D. L. BRUTLAG, M. R. ATKINSON, P. SETLOW y A. KORNBERG: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37,982 (1969).
- (385) H. KLENOW y I. HENNINGSEN: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 65,168 (1970).
- (386) H. KLENOW y K. OVERGAARD: *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 6,25 (1970).
- (387) T. M. JOVIN, P. T. ENGLUND y L. L. BERTSCH: *J. Biol. Chem.* 244,2996 (1969).
- (388) A. KORNBERG: *Science* 163,1410 (1969).
- (389) P. SETLOW, D. L. BRUTLAG y A. KORNBERG: *J. Biol. Chem.* 247,224 (1972).
- (390) R. B. KELLY, N. R. COZZARELLI, M. P. DEUTSCHER, I. R. LEHMAN y A. KORNBERG: *J. Biol. Chem.* 245,39 (1970).
- (391) J. C. GERHART y H. HOLOUBEK: *J. Biol. Chem.* 242,2886 (1967).
- (392) J. C. GERHART y H. K. SCHACHMAN: *Biochemistry* 4,1054 (1965).
- (393) M. SHEPHERDSON y A. B. PARDEE: *J. Biol. Chem.* 235,3233 (1960).

- (394) M. R. BETHELL y M. E. JONES: Arch. Biochem. Biophys. 134,352 (1969).
- (395) J. NEUMANN y M. E. JONES: Arch. Biochem. Biophys. 104,438 (1964).
- (396) L. B. ADAIR y M. E. JONES: J. Biol. Chem. 247,2308 (1972).
- (397) D. C. WILEY y W. N. LIPSCOMB: Nature 218,1119 (1968).
- (398) M. R. BETHELL, K. E. SMITH, J. S. WHITE y M. E. JONES: Proc. Natl. Acad. Sci. 60,1442 (1968).
- (399) J. P. CHANGEUX, J. C. GERHARDT y H. K. SCHACHMAN: Biochemistry 7,531 (1968).
- (400) P. D. J. WEITZMAN y D. W. WILSON: J. Biol. Chem. 241,5481 (1966).
- (401) G. L. HERVÉ y G. R. STARK: Biochemistry 6,3743 (1967).
- (402) K. WEBER: J. Biol. Chem. 243,543 (1968).
- (403) K. WEBER: Nature 218,1116 (1968).
- (404) J. C. GERHART y H. K. SCHACHMAN: Biochemistry 7,538 (1968).
- (405) E. A. MEIGHEN, V. PIGIET y H. K. SCHACHMAN: Proc. Natl. Acad. Sci. 65,234 (1970).
- (406) G. E. DAVIES y G. R. STARK: Proc. Natl. Acad. Sci. 66,651 (1970).
- (407) J. P. ROSENBUSCH y K. WEBER: J. Biol. Chem. 246,1644 (1971).
- (408) S. P. COLOWICK y F. C. WOMACK: J. Biol. Chem. 244,774 (1969).
- (409) R. W. PORTER, M. O. MODEBE y G. R. STARK: J. Biol. Chem. 244,1846 (1969).
- (410) G. G. HAMMES, R. W. PORTER y C. W. WU: Biochemistry 9,2992 (1970).
- (411) J. A. COHLBERG, V. P. PIGIET y H. K. SCHACHMAN: Biochemistry 11,3396 (1972).
- (412) M. E. NELBACH, V. P. PIGIET, J. C. GERHART y H. K. SCHACHMAN: Biochemistry 11,315 (1972).
- (413) J. C. GERHART y H. HOLOUBEK: J. Biol. Chem. 242,2886 (1967).
- (414) G. E. DAVIES y G. R. STARK: Proc. Natl. Acad. Sci. 66,651 (1970).
- (415) M. W. KIRSCHNER y H. K. SCHACHMAN: Biochemistry 10,1919 (1971).
- (416) D. C. WILEY, D. R. EVANS, S. G. WARREN, C. H. McMURRAY, B. F. P. EDWARDS, W. A. FRANKS y W. N. LIPSCOMB: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36,285 (1971).
- (417) K. E. RICHARDS y R. C. WILLIAMS: Biochemistry 18,3393 (1972).
- (418) J. C. GERHART y A. B. PARDEE: Fed. Proc. 23,727 (1964).
- (419) R. HERSH y H. K. SCHACHMAN: J. Amer. Chem. Soc. 77,5228 (1955).
- (420) M. W. KIRSCHNER y H. K. SCHACHMAN: Biochemistry 10,1900 (1971).
- (421) P. D. COLMAN y G. MARKUS: J. Biol. Chem. 247,3829 (1972).
- (422) G. MARKUS, D. K. MCCLINTOCK y J. B. BUSSEL: J. Biol. Chem. 246,762 (1971).
- (423) K. D. COLLINS y G. R. STARK: J. Biol. Chem. 244,1869 (1969).
- (424) D. K. MCCLINTOCK y G. MARKUS: J. Biol. Chem. 243,2855 (1968).
- (425) T. BUCKMAN: Biochemistry 9,3255 (1970).
- (426) R. E. LONDON y P. G. SCHMIDT: Biochemistry 11,3136 (1972).
- (427) M. S. COLEMAN y M. E. JONES: Biochemistry 10,3390 (1971).
- (428) J. NEUMANN y M. E. JONES: Arch. Biochem. Biophys. 104,438 (1964).
- (429) B. L. ONG y J. F. JACKSON: Biochem. J. 129,571 (1972).
- (430) J. C. GERHART: Curr. Top. Cell. Regul. 2,275 (1970).
- (431) J. R. BECKWITH, A. B. PARDEE, R. AUSTRIAN y F. JACOB: J. Mol. Biol. 5,618 (1962).
- (432) D. KERBIRIOU y G. HERVÉ: J. Mol. Biol. 64,379 (1972).

- (433) D. KERBIRIOU y G. HERVÉ: *J. Mol. Biol.* 78,687 (1973).  
(434) B. PERBAL y G. HERVÉ: *J. Mol. Biol.* 70,511 (1972).  
(435) J. M. SYVANEN, Y. R. YANG y M. W. KIRSCHNER: *J. Biol. Chem.* 248,3762 (1973).  
(436) C. C. WINLUND y M. J. CHAMBERLAIN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40,43 (1970).  
(437) R. A. COOK: *Biochemistry* 11,3792 (1972).  
(438) T. BUCKMAN: *Biochemistry* 9,3255 (1970).

### *Agradecimiento*

El autor agradece la colaboración que ha permitido la reproducción de los originales de las figuras 11, 12, 13, 23 y 24 al Prof. WYMAN; 15, 19, 20 . 21 al Prof. FRIEDEN; 7, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38 al Prof. KOSHLAND; 44, 45, 46 y 47 al Prof. COHEN; 52 al Prof. FISCHER; 55, 56 y 57 al Prof. PORTER; 63, 64, 65, 66, 67 y 68 al Prof. SCHACHMAN y 69, 70, 71, 72 y 73 al Prof. MARKUS, y cuyas referencias bibliográficas figuran en el texto.

## CAPÍTULO VIII

### TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DEL MENSAJE GENÉTICO

M. SALAS

Instituto «G. Marañón». Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INTRODUCCIÓN . . . . .	498
I. TRANSCRIPCIÓN DEL DNA . . . . .	498
1. RNA polimerasa . . . . .	498
2. Etapas en la transcripción del DNA . . . . .	500
A) Unión de la RNA polimerasa al DNA . . . . .	501
B) Iniciación de la síntesis de RNA . . . . .	502
C) Elongación de la cadena de RNA . . . . .	504
D) Terminación de la síntesis de RNA . . . . .	504
3. Control de la transcripción en bacterias . . . . .	505
A) Cambios reversibles en la transcripción . . . . .	506
B) Cambios irreversibles en la transcripción . . . . .	508
4. Transcripción en organismos eucarióticos . . . . .	513
II. TRADUCCIÓN DEL RNA MENSAJERO . . . . .	514
1. Clave genética . . . . .	514
2. Etapas en la traducción del RNA mensajero . . . . .	518
A) Iniciación de la síntesis de proteínas . . . . .	519
B) Elongación de la cadena polipeptídica . . . . .	526
C) Terminación de la cadena polipeptídica . . . . .	529
3. Control de la traducción . . . . .	531

## INTRODUCCION

La transferencia de la información genética contenida en el DNA para dar lugar a la síntesis de proteínas se realiza a través de un paso intermedio en que la secuencia de nucleótidos en el DNA se transcribe a secuencias de nucleótidos complementarios en el RNA, siendo estas secuencias las que se traducen finalmente a proteínas. De este modo quedan definidos los dos procesos claves en la expresión del material genético: transcripción y traducción.

En principio, el control de la expresión del material genético podría realizarse bien en el proceso de transcripción o en el de traducción. La evidencia ya existente ha puesto de manifiesto que el control fundamental se realiza a nivel de transcripción, lo cual no implica que el proceso de traducción no sea regulado.

### I. TRANSCRIPCION DEL DNA

Jacob y Monod en 1961 (1) propusieron el modelo del operón como la unidad funcional de la expresión genética en bacterias. Un operón es una secuencia lineal de genes, formando parte normalmente de la misma ruta bioquímica, que se transcriben a la vez para dar lugar a un único RNA mensajero policistrónico.

Para el control de la iniciación de la transcripción de un operón se han definido dos sitios reguladores claves: 1) *el promotor*, situado al comienzo del operón, al cual se une la RNA polimerasa, y 2) *el operador*, región del DNA situada a continuación del promotor, a la cual se une el represor, realizando un control negativo de la transcripción. Un tercer sitio regulador importante en la expresión de un operón debe ser aquel que determina la terminación de la transcripción del mismo.

#### 1. RNA polimerasa

La enzima responsable de la síntesis de las diferentes clases de RNA en bacterias (mensajero, ribosómico y de transferencia) es la RNA polimerasa. Por tanto, para tratar de descifrar los mecanismos que controlan la transcripción debemos conocer la estructura y propiedades de dicha enzima.

La RNA polimerasa se ha purificado hasta homogeneidad de una serie de bacterias como *E. coli* (2), *B. subtilis* (3), *Azotobacter vinelandii* (4), *Micrococcus lysodeikticus* (5), *Pseudomonas putida* (6) y *B. amyloliquefaciens* (7). Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, se han separado cuatro subunidades, que se han denominado  $\beta'$ ,  $\beta$ ,  $\sigma$  y  $\alpha$ . Los pesos moleculares de las subunidades  $\beta'$ ,  $\beta$  y  $\alpha$  son similares para las distintas RNA polimerasas,  $\sim 160.000$ ,  $150.000$  y  $40.000$ , respectivamente. El peso molecular de la subunidad  $\sigma$  es  $\sim 90.000$  en todos los casos estudiados, excepto en la enzima de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, que es de  $55.000$  (3, 7). La estequiometría de las subunidades en la enzima completa (holoenzima) es  $1\beta'$ ,  $1\beta$ ,  $1\sigma$ ,  $2\alpha$ . En el caso de la enzima de *E. coli*, un análisis de los péptidos trípticos de las cuatro subunidades ha indicado que todas ellas son diferentes (8).

Además de las cuatro subunidades indicadas, en algunos preparados de la enzima de *E. coli* se encuentra presente una subunidad, llamada  $\omega$ , con un peso molecular de  $\sim 10.000$  (9-10). No está claro, sin embargo, si esta cadena polipeptídica es una subunidad de la RNA polimerasa o un contaminante que se une fuertemente a la enzima «in vitro».

La subunidad  $\sigma$  se ha separado del resto de la enzima por cromatografía en columna de fosfocelulosa (11-12). La enzima resultante, llamada enzima mínima, cuya estructura es  $\beta'\beta\alpha_2$ , es activa con ciertos DNAs, como el DNA fragmentado de timo de ternera (11) y poli dAT (12), pero no con DNAs intactos, como el DNA de T4 (11) o de  $\phi 29$  (12). A pesar del diferente peso molecular de las subunidades  $\sigma$  de *E. coli* y *B. subtilis*, ambas subunidades estimulan la enzima mínima heteróloga (13). La subunidad  $\sigma$ , como se verá más adelante, se requiere para la selección de los sitios de iniciación de la transcripción.

Del resto de la enzima, las subunidades  $\beta'$  y  $\beta$  parecen estar implicadas en la unión al DNA. Se ha disociado la enzima mínima en  $\beta'\beta$  y  $\alpha$  por centrifugación en gradiente de sacarosa conteniendo CILi 3 M (8). Las subunidades  $\beta'\beta$ , pero no las  $\alpha$  ni la  $\sigma$ , son capaces de retener DNA de T4, marcado radioactivamente, en filtros de nitrato de celulosa, en la misma proporción que lo hace la enzima mínima o la holoenzima. Es decir, una de las dos subunidades,  $\beta'$  o  $\beta$ , o ambas, se requieren para la unión de la enzima al DNA. Posteriormente se ha puesto de manifiesto que ambas subunidades independientemente, aunque asociadas cada una de ellas a la subunidad  $\alpha$ , son capaces de unirse al DNA (14).

Por otra parte, la subunidad  $\beta$  es la que confiere a la RNA polimerasa sensibilidad o resistencia al antibiótico rifamicina. Se ha aislado una

RNA polimerasa resistente a rifamicina, y se ha visto que la subunidad  $\beta$  de la enzima mutante tiene una movilidad alterada en electroforesis en acetato de celulosa (15). También se ha demostrado la unión de rifamicina radioactiva a la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa (8). La rifamicina no inhibe ni la unión de la RNA polimerasa al DNA ni la elongación de la cadena (16-17). Se ha sugerido que el paso inhibido por el antibiótico es la formación de un complejo de iniciación de la enzima con un nucleosido trifosfato conteniendo una purina (18). Sin embargo, como veremos más adelante, no hay un total acuerdo sobre el paso concreto en que la rifamicina inhibe la acción de la RNA polimerasa, aunque lo hace en algún paso durante el proceso de iniciación de la transcripción. Por tanto, la subunidad  $\beta$  debe intervenir en algún paso del proceso de iniciación.

La función de la subunidad  $\alpha$  en la transcripción se desconoce. Una posibilidad es que intervenga en el proceso de polimerización o elongación de la cadena de RNA.

Se han aislado un número elevado de mutantes resistentes a drogas (rifamicina y estreptolidigina) y sensibles a temperatura que afectan a la subunidad  $\beta$  y al menos a otra subunidad de la RNA polimerasa (19). Estas mutaciones están muy próximas en el mapa genético de *E. coli*, sugiriendo que las subunidades de la RNA polimerasa se comportan como un operón. Esto está de acuerdo con el hecho de que, al menos las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  se expresan de un modo secuencial en *E. coli* (20). Recientemente se han aislado, por primera vez, mutantes ámbar de la RNA polimerasa de *E. coli* que probablemente están afectados en la subunidad  $\beta$  (21).

## 2. Etapas en la transcripción del DNA

A continuación vamos a considerar los pasos necesarios en la transcripción para que la síntesis de moléculas de RNA se inicie y termine en los lugares correctos del DNA y para que la banda del DNA que se transcribe se copie de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. De acuerdo con esto, vamos a considerar cuatro pasos esenciales en el proceso de transcripción:

- A) Unión de la RNA polimerasa al DNA.
- B) Iniciación de la síntesis de RNA.
- C) Elongación de la cadena de RNA.
- D) Terminación de la cadena de RNA.

### A) UNIÓN DE LA RNA POLIMERASA AL DNA

La RNA polimerasa se puede unir al DNA de dos formas, que podríamos llamar inespecífica y específica. La unión inespecífica no requiere la presencia de la subunidad  $\sigma$ , puesto que tiene lugar tanto con enzima mínima como con la holoenzima; esta unión es rápida y fácilmente reversible (22-23). La falta de especificidad se pone de manifiesto por el aislamiento de complejos RNA polimerasa-DNA, en que el número de moléculas de enzima por DNA es muy elevado (24). La unión específica supone la unión de la polimerasa a los verdaderos promotores del DNA y requiere la presencia de subunidad  $\sigma$ , formando un complejo muy estable con una vida media de sesenta horas (25-26). Cuando se usa como molde un DNA intacto, la formación de un complejo estable con un promotor requiere temperaturas superiores a 20° C; esto podría indicar que en dicho complejo la región de doble hélice correspondiente en el DNA puede estar desnaturalizada parcialmente (27).

Las mismas condiciones que favorecen la formación de un complejo estable hacen que se forme un complejo RNA polimerasa-DNA resistente al antibiótico rifamicina. Sin embargo, la resistencia a rifamicina de este complejo tiene una vida media dos o tres órdenes de magnitud menor que la del complejo formado en ausencia del antibiótico (28). Para explicar la diferente estabilidad de ambos complejos, Travers (29) ha sugerido que la polimerasa en el complejo existe en dos estados conformacionales en equilibrio, que ha denominado forma I y forma II. La rifamicina inhibiría el paso de la forma I a la II, impidiendo así la iniciación de las cadenas de RNA.

El conocimiento del papel concreto de la subunidad  $\sigma$  en la unión de la polimerasa al DNA es de un gran interés. El RNA sintetizado en presencia de  $\sigma$ , utilizando el DNA de diferentes fagos como molde, es asimétrico, en el sentido de que nunca se transcriben regiones complementarias de las dos bandas del DNA (30-32). Por el contrario, el RNA sintetizado por la enzima mínima en las mismas condiciones es parcialmente simétrico (30-32); es decir, en ausencia de la subunidad  $\sigma$  no hay selectividad en la iniciación de la transcripción de una sola de las dos bandas del DNA. Para explicar el modo como la RNA polimerasa reconoce a los promotores en el DNA, se han sugerido dos modelos (27):

a) La subunidad  $\sigma$  identifica la secuencia de nucleótidos del promotor y dirige al resto de la enzima a unirse a esta región.

b) La enzima mínima identifica la secuencia específica, pero debe unirse a la subunidad  $\sigma$  para aumentar su afinidad por esta región y dar lugar a una unión estable.

Ambos modelos son casos extremos; otra posibilidad alternativa sería que ambos, la subunidad  $\sigma$  y la enzima mínima, contienen determinantes de especificidad esenciales para el reconocimiento del promotor.

### B) INICIACIÓN DE LA SÍNTESIS DE RNA

La iniciación de la transcripción se puede definir como la unión de los dos nucleosido-trifosfato iniciales al complejo enzima-DNA, seguido de la eliminación de pirofosfato inorgánico para formar el primer dinucleosido-tetrafosfato.

Cuando se puso de manifiesto que el promotor está situado antes que el operador y distal a los genes estructurales, se pensó que, al unirse la polimerasa al promotor, la región del operador se transcribiría en ausencia de represor, siendo bloqueada la polimerasa en su presencia (33). Sin embargo, experimentos recientes sobre la transcripción de la región temprana del DNA del fago  $\lambda$  por la RNA polimerasa de *E. coli* han demostrado que existe una secuencia de unos 200 nucleótidos, que no se transcribe, situada entre el promotor y el sitio de iniciación de la transcripción (34-35). Se han sugerido dos modelos posibles para que la RNA polimerasa pase desde el sitio promotor hasta el sitio de iniciación de la transcripción, ya que esta región mide varios diámetros de enzima:

a) El DNA se condensa de tal forma, que ambos sitios se aproximan.

b) La RNA polimerasa pasa secuencialmente de un sitio a otro.

Para dar cuenta de la segunda posibilidad pueden considerarse varios mecanismos: 1) la enzima podría moverse de un sitio a otro por un proceso de difusión; 2) el movimiento de la polimerasa podría requerir liberación de energía en un proceso que podría llamarse de «pseudo-transcripción», en el cual los nucleosido-trifosfatos son hidrolizados, pero no se polimerizan; 3) otra posibilidad sería que el movimiento de la polimerasa a través de esta región implicase la formación de una cadena de RNA que fuese degradado rápidamente; esto, sin embargo, es poco probable, puesto que se ha visto que, en dicho sistema, las cadenas de

RNA sintetizadas tienen un resto trifosfato en posición 5'-terminal (34), lo cual implica que la síntesis del primer nucleótido se está iniciando en ese punto.

Parece, por tanto, que el mecanismo más probable sería el 2). Este mecanismo podría comprobarse directamente estudiando la posible liberación de nucleosido-difosfatos o monofosfatos en la reacción catalizada por la RNA polimerasa.

Para poder generalizar este modelo al menos en el caso de los sistemas bacterianos, sería importante demostrar, en el caso de otros operones, la existencia de una región que no se transcribe «in vitro», situada a continuación del promotor.

En relación con el propio proceso de iniciación, se ha visto que, empleando diversos DNAs nativos de fagos como moldes para la transcripción «in vitro» por la RNA polimerasa de *E. coli*, el nucleosido-trifosfato que se incorpora en el extremo 5' de las cadenas de RNA es siempre una purina, ATP o GTP (36). Por otra parte, se ha observado que, usando como molde la forma replicativa del DNA del fago fd, siempre se incorpora una purina en el extremo 5' de las cadenas del RNA sintetizado, tanto si se emplea enzima completa como enzima mínima (30). Lo mismo ocurre cuando se emplea DNA de los fagos T7 (31) o  $\phi 29$  (32) como molde. Sin embargo, mientras que, en el caso de los DNAs de fd (30) y  $\phi 29$  (32), la proporción relativa de iniciación con GTP y ATP no se altera por adición de  $\sigma$ , la iniciación con ATP en el caso de T7 es estimulada unas diez veces por adición de esta subunidad (31). Por otra parte, en el caso del DNA de fd, la segunda posición de las cadenas de RNA sintetizadas la ocupa preferentemente una pirimidina cuando se emplea enzima completa, mientras que es un nucleótido variable cuando se usa enzima mínima (30).

Como se indicó anteriormente, el producto de la síntesis de RNA es asimétrico con enzima completa, y parcialmente simétrico con enzima mínima. De acuerdo con esto, se ha demostrado que la RNA polimerasa con subunidad  $\sigma$  da lugar a la síntesis del RNA correspondiente a la región temprana del DNA de T4, mientras que la transcripción del mismo DNA por la enzima mínima produce una iniciación al azar de las dos bandas del DNA (37).

Todos estos resultados indican que la enzima mínima es capaz de sintetizar moléculas de RNA que se inician con purinas; sin embargo, para que tal iniciación sea específica se requiere la presencia de la subunidad  $\sigma$ .

### C) ELONGACIÓN DE LA CADENA DE RNA

El crecimiento de las cadenas de RNA tiene lugar por adición secuencial de nucleosidos monofosfato al extremo 3' de la cadena de RNA naciente. Las velocidades de elongación (40-100 nucleotidos/segundo) son comparables «in vivo» e «in vitro» (38). Se ha sugerido que la velocidad de crecimiento de la cadena de RNA puede variar, dependiendo de la secuencia del DNA que ha de ser transcrito. En apoyo de esta hipótesis se ha visto que la velocidad de síntesis del RNA transcrito usando DNA de T7 como molde es dos a tres veces mayor que cuando se usa DNA de T4 (38).

El proceso de elongación de la cadena de RNA es inhibido por el antibiótico estreptolidigina, que, del mismo modo que la rifamicina, parece actuar a nivel de la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa. Este antibiótico inhibe también el proceso de iniciación en la formación del primer enlace fosfodiéster (39).

Experimentos sobre el modo de acción de la subunidad  $\sigma$  han indicado que ésta actúa catalíticamente (40) y que no se requiere para la elongación de la cadena de RNA (41). Se ha sugerido que, en algún momento,  $\sigma$  se libera del resto de la polimerasa y la enzima mínima continúa la síntesis de la cadena de RNA. El momento concreto en que se produce la liberación de  $\sigma$  se desconoce. Se ha visto que  $\sigma$  no se libera durante el intercambio de pirofosfato usando UTP y trazas de ATP con poli dAT como molde (42). Puesto que, por otra parte, la subunidad  $\sigma$  se libera cuando se une RNA a la RNA polimerasa (43), existe la posibilidad de que  $\sigma$  se libere en el proceso de transcripción cuando se haya sintetizado una cadena de RNA de una determinada longitud. Otra posibilidad es que  $\sigma$  no se libere «in vivo» del complejo; sin embargo, en contra de esta posibilidad está el hecho de que se ha aislado de *E. coli* un complejo DNA-RNA polimerasa en el que están presentes las subunidades  $\beta'$ ,  $\beta$  y  $\alpha$  y está ausente la subunidad  $\sigma$  (44).

### D) TERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE RNA

Teniendo en cuenta los trabajos existentes sobre el proceso de terminación de la cadena de RNA, pueden considerarse tres clases de terminación (27):

- a) Terminación inducida por la secuencia del DNA.
- b) Terminación inducida por concentración alta de sal.
- c) Terminación inducida por el factor de terminación  $\rho$ .

El primer tipo de terminación, inducida por secuencias específicas en el DNA, se ha encontrado en una serie de DNAs, como la forma replicativa del DNA del fago fd (45) y los DNAs de T7 y T4 (46). Este tipo de terminación produce la liberación de la RNA polimerasa y de las cadenas de RNA.

El segundo tipo de terminación, inducida por concentraciones altas de sal (CIK 0,2 M), produce también la liberación de las cadenas de RNA y de la RNA polimerasa, dando lugar a RNAs específicos con secuencias definidas en el extremo 3' de la cadena (47).

Sin embargo, los RNAs liberados según los dos mecanismos de terminación indicados son más largos que los RNAs correspondientes sintetizados «in vivo», lo que sugiere la necesidad de algún factor adicional. Efectivamente, se ha encontrado en *E. coli* un factor de terminación, al que se ha llamado  $\rho$ , que se requiere para producir cadenas de RNA de la misma longitud que la obtenida «in vivo» (48). Este factor de terminación de síntesis de RNA se ha purificado también de *B. subtilis* (49). Ambos factores de terminación constan de cuatro subunidades idénticas de peso molecular 50.000.

El factor de terminación de *E. coli* se une a la RNA polimerasa y al DNA; de un modo similar a la subunidad  $\sigma$ , el factor puede reusarse ciclicamente (50).

Para finalizar la discusión sobre cada uno de los pasos en la síntesis de una molécula específica de RNA, conviene considerar la velocidad de éstos. La unión de la enzima al DNA es muy rápida y se realiza en pocos segundos. La iniciación, por el contrario, es considerablemente más lenta y no se completa hasta pasado un tiempo que oscila de uno a dos minutos; la lentitud de este proceso podría deberse al tiempo necesario para que la RNA polimerasa recorra la región de DNA comprendida entre el promotor y el sitio de iniciación. La elongación de la cadena de RNA es de nuevo muy rápida, incorporándose 40 a 100 nucleótidos por segundo. Finalmente, la terminación inducida por sal es también un proceso muy lento; faltan datos por el momento sobre la velocidad de terminación llevada a cabo por el factor de terminación  $\rho$ .

### 3. Control de la transcripción en bacterias

Para un control eficiente de la transcripción, éste debe realizarse a nivel de iniciación, englobando aquí los procesos de unión de la RNA

polimerasa al DNA y el propio proceso de iniciación. En la iniciación de la transcripción pueden considerarse dos clases de control (29); uno de ellos, reversible, operaría en el control de las funciones normales de una célula; el segundo, irreversible, es el control que tiene lugar, por ejemplo, en la esporulación de una bacteria o en el desarrollo de un fago lítico.

#### A) CAMBIOS REVERSIBLES EN LA TRANSCRIPCIÓN

Un ejemplo de control reversible de la transcripción es el caso del control de la transcripción del DNA ribosómico. Los genes responsables de la síntesis del RNA ribosómico dan cuenta sólo de un 0,2-0,4 por 100 del DNA total bacteriano (51-53), mientras que aproximadamente un 40 por 100 del RNA que se sintetiza en bacterias creciendo exponencialmente es RNA ribosómico (54-57). Se ha sugerido, por tanto, la existencia de algún factor responsable de que la iniciación de la transcripción de dicha región del DNA sea mucho más frecuente que la de otras regiones. De acuerdo con esto, se describió la existencia de un factor en *E. coli*, al que se llamó  $\varphi_R$ , que estimulaba «in vitro» la síntesis del RNA ribosómico, requiriendo para su acción la presencia de la RNA polimerasa con la subunidad  $\sigma$ . La actividad del factor  $\varphi_R$  podía ser sustituida por las subunidades  $\gamma$  y  $\delta$  de la replicasa del fago Q $\beta$  (58).

Posteriormente, sin embargo, se ha puesto de manifiesto que la RNA polimerasa de *E. coli*, en presencia de la subunidad  $\sigma$ , es capaz de sintetizar «in vitro» RNA ribosómico usando DNA de *E. coli* como molde (59-60). El factor  $\psi_R$  parece estimular la síntesis total de RNA, pero no la proporción relativa de RNA ribosómico (aproximadamente 10 por 100 del total).

En el caso de la RNA polimerasa de *B. subtilis*, transcribiendo «in vitro» DNA de *B. subtilis*, también se ha encontrado que aproximadamente 10 por 100 del RNA total sintetizado es RNA ribosómico (61). Por otra parte, se ha aislado de *B. subtilis* un complejo DNA-RNA polimerasa capaz de iniciar «in vitro» la síntesis de RNA, que da lugar a un mínimo de un 11 por 100 de RNA ribosómico respecto al total (62).

Todos estos resultados indican que la frecuencia de iniciación de la síntesis de RNA ribosómico «in vitro» es unas cincuenta veces superior a la esperada si todas las secuencias del DNA se transcribieran con la misma frecuencia. Es posible que la propia subunidad  $\sigma$  tenga una

afinidad mayor por los promotores correspondientes al RNA ribosómico que por el resto de los promotores del DNA, siendo éste el factor responsable de su mayor eficiencia de transcripción.

Un caso de control reversible más específico es del factor llamado CRP, que se requiere, junto con 3',5'-AMP, para la transcripción del DNA correspondiente al operón de la lactosa (63). Este factor, en presencia de 3',5'-AMP, se liga al DNA, haciendo que la RNA polimerasa con subunidad  $\sigma$  se ligue posteriormente al sitio correcto del operón de la lactosa; en ausencia del factor CRP y 3',5'-AMP, la RNA polimerasa es incapaz de transcribir dicho operón (64).

Se han aislado de *E. coli* otras dos proteínas, que pueden clasificarse entre las que ejercen un control reversible de la transcripción: la proteína M (65) y la proteína H (66). Ambas proteínas estimulan la síntesis de RNA usando una variedad de DNAs como moldes si se preincuban con DNA y RNA polimerasa antes de la adición de nucleosido-trifosfatos y rifamicina, pero no estimulan la transcripción si se añaden al mismo tiempo que el antibiótico. Ambas proteínas necesitan para su acción la presencia de la subunidad  $\sigma$ . Estos resultados sugieren que las proteínas M y H podrían actuar en un paso de preincubación, dando lugar a complejos resistentes a rifamicina. Teniendo en cuenta su modo similar de actuación, podría pensarse que ambas proteínas son idénticas. Sin embargo, la proteína M tiene un peso molecular similar al de la subunidad  $\sigma$  ( $\sim 90.000$ ) y es lábil al calor, mientras que la proteína H tiene un peso molecular de  $\sim 10.000$  y es muy resistente al calor. Además, la proteína H estimula la transcripción cuando se usa un exceso de DNA sobre RNA polimerasa, mientras que causa una inhibición parcial si se emplea un exceso de enzima. Para explicar este doble efecto de la proteína H se ha sugerido que, cuando hay un exceso de RNA polimerasa sobre DNA, se inicia la transcripción en sitios incorrectos, y el factor H inhibiría esta unión incorrecta de la enzima. Por el contrario, cuando el DNA está en exceso, si la proteína H inhibe la iniciación inespecífica, pueden unirse un número mayor de moléculas de polimerasa a los sitios específicos de iniciación (66).

Otro tipo de proteínas reguladoras que entrarían dentro de la clase de control reversible de la transcripción son los represores, que se ligan al operador de un operón, inhibiendo la transcripción del mismo (1).

Se ha estudiado la acción «in vitro» del represor del fago  $\lambda$  y el del operón de la lactosa. En este último caso, la inhibición por el represor de la síntesis «in vitro» del RNA mensajero correspondiente es contra-

restrada por la adición de isopropiltiogalactosido, un inductor «in vivo» de la expresión de dicho operón (64).

El represor podría inhibir la transcripción de acuerdo con alguno de los mecanismos siguientes: *a)* inhibición de la unión de la RNA polimerasa al DNA; *b)* el represor podría actuar en un paso posterior al de unión de la polimerasa al DNA, pero anterior a la formación del primer enlace nucleotídico; *c)* el represor podría actuar después de la formación del primer enlace nucleotídico.

El represor del operón de la lactosa no inhibe «in vitro» la unión de la RNA polimerasa al DNA (67), actuando en un paso posterior a dicha unión, posiblemente impidiendo el desplazamiento de la polimerasa desde el sitio promotor al verdadero sitio de iniciación.

En el caso del represor del fago  $\lambda$ , realizando la iniciación de la transcripción en condiciones controladas, se ha obtenido una represión total de la transcripción de los genes tempranos del DNA de  $\lambda$ . Si en vez de DNA de  $\lambda$  se utiliza DNA de  $\lambda$  imm 434, que carece del sitio de unión para la proteína CI (el represor de  $\lambda$ ), no se obtiene represión «in vitro» (68).

Como en el caso del represor del operón de la lactosa, el represor de  $\lambda$  inhibe la síntesis de RNA tanto si se añade antes que la polimerasa se una al DNA como si se añade después que se ha realizado la unión polimerasa-DNA (69). También inhibe el represor de  $\lambda$  si se añade después que la polimerasa ha formado un complejo de iniciación, lo que se consigue por preincubación de la RNA polimerasa con el DNA durante veinte minutos a 17° C; a continuación se añade ATP, GTP y rifampicina, después el represor y, finalmente, se inicia la síntesis de RNA por adición de UTP y CTP a 37° C. Estos resultados indican que el represor de  $\lambda$  es capaz de inhibir la transcripción después que se ha formado un «complejo de iniciación» en presencia de ATP y GTP; queda, sin embargo, por definir la naturaleza de dicho complejo de iniciación (69).

## B) CAMBIOS IRREVERSIBLES EN LA TRANSCRIPCIÓN

En este tipo de control de la transcripción tienen lugar cambios irreversibles en el mecanismo de transcripción, apareciendo una nueva actividad y desapareciendo, en general, la preexistente. La transcripción es el resultado de un cambio en la especificidad de iniciación de la polimerasa, bien por modificación de la enzima mínima, de la subunidad  $\sigma$

o de ambas. Otra posibilidad es que se sintetice «de novo» una RNA polimerasa distinta a la preexistente, con diferente especificidad de iniciación (29).

Un ejemplo de este tipo de control de transcripción es la esporulación en *B. subtilis*. Se ha demostrado que durante la esporulación de *B. subtilis* no hay síntesis de RNA ribosómico (70). Por otra parte, el DNA del fago  $\phi e$  no es transcrito «in vitro» por la RNA polimerasa aislada de células en esporulación, siendo transcrito por la enzima de células vegetativas (71). Esto sugiere la existencia de cambios en la RNA polimerasa aislada de células en esporulación respecto a la enzima de células vegetativas. Efectivamente, se encontró que la enzima purificada de células en esporulación había perdido la subunidad  $\sigma$  y tenía una de las subunidades  $\beta$ , modificada en forma de una proteína de peso molecular menor,  $\sim 110.000$  (72). Se han aislado de *B. subtilis* mutantes resistentes a rifamicina que son incapaces de esporular y que retienen la capacidad de transcribir el DNA de  $\phi e$  (73). Esto sugiere que, al estar modificada la subunidad  $\beta$ , es incapaz de sufrir la transformación que da lugar a la RNA polimerasa de células esporuladas, lo que implica que la polimerasa juega un papel importante en el paso de células vegetativas a células en esporulación.

Por otra parte, se ha estudiado la composición en subunidades de la RNA polimerasa aislada de esporas de *B. subtilis*. Las subunidades de esta enzima son similares a las de la enzima de células vegetativas, excepto que una de las subunidades  $\beta$  está modificada, teniendo un peso molecular de 130.000. En este caso, a diferencia de la enzima de células en esporulación, está presente la subunidad  $\sigma$  (64).

Recientemente se ha obtenido conversión «in vitro» de una de las subunidades  $\beta$  de la RNA polimerasa aislada de células vegetativas en una subunidad de peso molecular similar a la obtenida de esporas por tratamiento de la enzima con una proteasa purificada de *B. megaterium* (75). Dicha proteasa está también presente en *B. subtilis* (76) y puede ser la responsable de la transformación de la subunidad  $\beta$  «in vivo».

Otro ejemplo de control irreversible de la transcripción es el desarrollo de los fagos líticos. Inmediatamente después de la infección por estos fagos, la RNA polimerasa de la bacteria huésped sintetiza una clase de RNA específico del fago, llamado temprano. A continuación se sintetiza una segunda y, a veces, una tercera clase de RNA específico del fago. La síntesis de estas dos últimas clases de RNA depende de la síntesis de proteínas específicas del virus.

Vamos a considerar primero la transcripción de los fagos T7 y T3, muy similares entre sí, y a continuación la de los fagos  $\lambda$  y T4.

El DNA de T7, de doble banda, tiene un peso molecular de  $26 \times 10^6$  (77) y da lugar solamente a dos clases de RNA, tempranos y tardíos (78), que se transcriben a partir de una de las dos bandas del DNA (79). La RNA polimerasa de la bacteria huésped, *E. coli*, lleva a cabo «in vitro», y probablemente «in vivo», la síntesis del RNA temprano (80), mientras que la síntesis del RNA tardío depende de la proteína producto del gen 1 (81). Un hecho relevante en el desarrollo de T7 es que, poco tiempo después de la infección, la producción de fago se hace resistente a rifamicina (80). En un principio no se supo interpretar adecuadamente este resultado, y se propuso que el producto del gen 1 era una nueva subunidad  $\sigma$  inducida por el fago que reemplazaba a la existente en la RNA polimerasa de la bacteria, alterando la especificidad de iniciación de la enzima de tal modo que podría sintetizar RNAs mensajeros tardíos (80). Sin embargo, experimentos posteriores mostraron claramente que el producto del gen 1 es una nueva RNA polimerasa resistente a rifamicina y distinta a la de la bacteria huésped, que consta de una sola subunidad de peso molecular 110.000 (82). El fago T3 también induce la síntesis de una nueva RNA polimerasa resistente a rifamicina y similar a la inducida por el fago T7 (83-84). Sin embargo, ambas enzimas son distintas y tienen especificidad diferente; la enzima de T3 es muy específica para el DNA de T3, trabajando con eficiencia mucho menor con el DNA de T7 (83), mientras que la polimerasa inducida por el fago T7 transcribe con la misma eficiencia ambos DNAs.

Poco después de la infección de *E. coli* por T7 se inhibe la síntesis del RNA bacteriano (79). Esta parada de la síntesis de RNA de la bacteria no se induce en presencia de cloranfenicol, lo que sugiere que está bajo el control del fago. Se ha aislado de bacterias infectadas con T3 una proteína que inhibe la actividad de la RNA polimerasa de *E. coli*, requiriendo la presencia de la subunidad  $\sigma$  para producir la inhibición (85). Esta proteína no inhibe a la RNA polimerasa inducida por el fago T3 y su acción sobre la polimerasa bacteriana es a nivel de iniciación de la síntesis de RNA.

En el caso de los fagos  $\lambda$  y T4, el control de la transcripción es más complejo que en T7, induciéndose tres clases fundamentales de RNA, que se han llamado tempranos, tempranos retrasados y tardíos. El RNA temprano es sintetizado por la RNA polimerasa de la bacteria y aparece inmediatamente después de la infección. El RNA temprano retrasado

aparece en bacterias infectadas por T4 dos minutos después de la infección a 30° C (86-87); el RNA tardío aparece a los diez-doce minutos después de la infección y requiere la replicación del DNA del fago T4 (88). Se desconoce el gen implicado en la síntesis de RNA mensajero temprano retrasado en T4, siendo el producto del gen 55 el responsable de la síntesis de mensajero tardío (89).

En el caso del fago  $\lambda$ , la proteína del gen N, que se sintetiza poco después de la infección, da lugar a la síntesis del RNA mensajero temprano retrasado, y la proteína del gen Q inicia la síntesis del mensajero tardío (90-93).

A diferencia de lo que pasa con el fago T7, el fago T4 es sensible a rifamicina durante todo el período de su desarrollo (94). Esto sugiere que, o bien la subunidad  $\beta$  de la polimerasa de la bacteria se conserva, o bien se induce una nueva subunidad o enzima sensible a rifamicina.

No se ha encontrado la inducción de una RNA polimerasa resistente a rifamicina después de la infección por los fagos T4 y  $\lambda$ , como ocurre en T7. Se han sugerido varias posibilidades para dar cuenta de la activación de la transcripción de nuevos genes (27): 1) Alteración de la especificidad de iniciación de la RNA polimerasa del huésped por síntesis de una nueva subunidad  $\sigma$ , por modificación de la enzima mínima o por ambas causas. 2) Síntesis «de novo» de una RNA polimerasa con distinta especificidad de iniciación. 3) Síntesis de una proteína que antagonice la terminación normal de las cadenas de RNA y permita a la polimerasa del huésped la lectura de los genes siguientes (factor de antiterminación). 4) Síntesis de una proteína que actúa como control positivo, necesaria para la síntesis de RNA en ciertos promotores, pero que no es un componente de la RNA polimerasa. Tal factor podría actuar a través de su unión al DNA. 5) Modificación del DNA.

La evidencia existente indica que, en los fagos T4 y  $\lambda$ , el control de la transcripción tiene lugar de acuerdo con el modelo 1).

En el caso de  $\lambda$  se ha puesto de manifiesto la existencia de mutaciones en el gen N, que es el gen responsable de la síntesis de RNA mensajero temprano retrasado, que no son detectadas en determinadas estirpes bacterianas llamadas *ron*<sup>+</sup> y sí lo son en estirpes *ron*. La mutación *ron*<sup>+</sup> consiste en una modificación de la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa de la bacteria. La mutación en el gen N hace que el producto de este gen no se una a la subunidad  $\beta$  de las estirpes *ron*, aunque sí se une a dicha subunidad de las estirpes *ron*<sup>+</sup> (95).

Asimismo se ha sugerido que el producto del gen Q puede ser una

subunidad  $\sigma$  específica que se une a la enzima mínima de la bacteria y da lugar a la síntesis de mensajero tardío (96).

En el caso de infección por el fago T4, vamos a considerar primero las modificaciones que tienen lugar en la enzima mínima de la bacteria. Si se premarca la RNA polimerasa antes de la infección, se observa que después de la infección se conservan las tres subunidades  $\beta'$ ,  $\beta$  y  $\alpha$ . Sin embargo, la subunidad  $\alpha$  se modifica (97) por la unión covalente de un resto 5'-AMP (98) poco después de la infección; aproximadamente la mitad de las moléculas aparecen modificadas en dos minutos a 37° C (99). La subunidad  $\beta'$  también se modifica, entre los diez y quince minutos después de la infección a 30° C, aumentando su carga negativa (100). Este resultado es consistente con la observación de que una estirpe bacteriana con una polimerasa mutante que tiene una subunidad  $\beta'$  sensible a temperatura pierde su termosensibilidad después de la infección por T4 (101). Se ha detectado también una modificación en la movilidad de la subunidad  $\beta$  después de la infección con T4 (102). La composición en péptidos tripticos de las tres subunidades  $\beta'$ ,  $\beta$  y  $\alpha$  después de la infección es distinta a la de las subunidades de la polimerasa del huésped (103).

Las modificaciones descritas en la enzima mínima después de la infección por T4 parecen no ser suficientes para determinar la especificidad de iniciación de los genes tempranos retrasados y tardíos, ya que a bajas concentraciones de la subunidad  $\sigma$  de *E. coli* ninguna de las enzimas mínimas modificadas (temprana y tardía) transcribe «in vitro» el DNA de T4 (100). Se ha sugerido la existencia de un factor en células infectadas por T4 que estimula tanto a la enzima mínima de bacterias sin infectar como a la obtenida a tiempos tempranos de bacterias infectadas, dando lugar a la síntesis de RNA temprano retrasado (104).

La síntesis de RNA tardío en bacterias infectadas con T4 es totalmente dependiente del producto del gen 55 (105). «In vitro» se ha demostrado que un complejo DNA-RNA polimerasa, aislado de células infectadas con un mutante defectivo en el gen 55, podía sintetizar RNA tardío por adición de una fracción sobrenadante conteniendo el producto del gen 55 (106). Recientemente se ha descrito la inducción, en bacterias infectadas con T4, de cuatro polipéptidos de peso molecular comprendido entre 10.000 y 22.000 que se asocian con la RNA polimerasa (107). El polipéptido de peso molecular 22.000 está ausente en células infectadas con mutantes sin sentido en el gen 55, lo que sugiere que dicho polipéptido juega un papel esencial en la transcripción de los genes tardíos de T4.

En relación con el modelo 5, en que la conformación del DNA puede jugar un papel importante en la transcripción del mismo, se ha descrito el caso del DNA del virus SV40. Cuando este DNA, circular superenrollado, es transcrito «in vitro» por la RNA polimerasa, da lugar a un producto asimétrico con un peso molecular que corresponde a la transcripción del genoma completo. Sin embargo, cuando se produce una rotura en una de las bandas del DNA y éste se desenrolla, aunque permanece circular, el producto de su transcripción es parcialmente simétrico y de tamaño muy heterogéneo (108).

Un caso especial de control de la transcripción es el del fago PM2, que contiene en la partícula viral su propia RNA polimerasa (109).

#### 4. Transcripción en organismos eucarióticos

Hasta aquí hemos considerado los mecanismos de transcripción presentes en células procarióticas. Las células eucarióticas son considerablemente más complejas que las procarióticas, y es lógico suponer que lo sean también los mecanismos de transcripción. Efectivamente, así como en células procarióticas existe una única RNA polimerasa que, dirigida por los efectores adecuados (activadores e inhibidores), da lugar a la síntesis de las distintas clases de RNA, en células eucarióticas se ha descrito la existencia de al menos tres RNA polimerasas distintas, una presente en el nucléolo, encargada de la síntesis de RNA ribosómico; otra nucleoplásmica, responsable de la síntesis del RNA mensajero, y otra mitocondrial, que transcribe el DNA presente en las mitocondrias.

Las dos últimas polimerasas, nucleoplásmica y mitocondrial, se han obtenido en estado homogéneo. La RNA polimerasa nucleoplásmica consta de cuatro subunidades de pesos moleculares 190.000, 150.000, 35.000 y 25.000, estando presentes en la enzima una subunidad de cada clase (110). La estructura general de esta enzima es similar a la de la RNA polimerasa bacteriana. Sin embargo, esta enzima no es inhibida por rifamicina, siendo inhibida por  $\alpha$ -amanitina, que reacciona estequiométricamente con la polimerasa y parece inhibir el crecimiento de la cadena de RNA (111).

Se han obtenido preparados de RNA polimerasa nucleoplásmica que son activos con DNA desnaturalizado, pero no con DNA nativo, y se ha identificado un factor con un coeficiente de sedimentación  $\sim 3S$ .

que estimula la síntesis de RNA usando DNA nativo como molde. Este factor se une a la RNA polimerasa, pero no al DNA (112-113).

La RNA polimerasa mitocondrial se ha obtenido pura de hígado de rata y de *Neurospora crassa* (114-115). Consta de una única cadena polipeptídica de peso molecular 65.000, siendo todavía de menor peso molecular que la polimerasa inducida por los fagos T7 y T3. Sin embargo, a diferencia de estas últimas polimerasas, la RNA polimerasa mitocondrial es inhibida por rifamicina, de un modo similar a la enzima bacteriana.

La transcripción del DNA mitocondrial, que contiene una única molécula de DNA de doble cadena con un peso molecular de  $10 \times 10^6$ , es el sistema más simple existente en una célula eucariótica. Las mitocondrias han sido consideradas como bacterias simbióticas que han perdido la capacidad de existencia independiente (116). Efectivamente, poseen una RNA polimerasa, que podríamos considerar muy primitiva, ya que una sola subunidad de peso molecular relativamente bajo es capaz de realizar todos los pasos del proceso de transcripción. La RNA polimerasa bacteriana supone una evolución considerable respecto a la mitocondrial.

## II. TRADUCCION DEL RNA MENSAJERO

La segunda etapa en el proceso de transferencia de la información genética contenida en el DNA para dar lugar a la síntesis de proteínas es el proceso de traducción en que una secuencia de cuatro bases contenida en el RNA mensajero da lugar a una secuencia de veinte aminoácidos presentes en las proteínas. El conjunto de reglas por las cuales se realiza esta transferencia de información se conoce con el nombre de clave genética.

### 1. Clave genética

El primer trabajo sobre la naturaleza general de la clave genética se debe al grupo de Crick (117), quienes, mediante experimentos de tipo genético realizados en la región rII del fago T4, pusieron de manifiesto la naturaleza triplete de la misma; es decir, tres bases en el mRNA especifican un aminoácido. Experimentos posteriores «in vitro» del

grupo de Khorana (118), utilizando polinucleótidos sintéticos de secuencias de bases conocidas, confirmaron dicha conclusión.

La síntesis de proteínas tiene lugar en los ribosomas donde el RNA mensajero se traduce en la dirección 5' a 3' (119-120), dando lugar a proteínas específicas cuya síntesis se inicia en el extremo amino terminal y procede secuencialmente, finalizando con el grupo carboxilo (121-122).

Para explicar cómo un aminoácido podría reconocer una secuencia de bases en el mRNA, Crick (123) postuló la existencia de un trinucleótido que serviría de adaptador entre el triplete del mensajero y el aminoácido correspondiente. Poco después se descubrió la existencia del ácido ribonucleico soluble o de transferencia (tRNA), que actuaba como la molécula adaptadora postulada por Crick (124). Sin embargo, en vez de ser un trinucleótido, era una molécula de tamaño considerablemente mayor, con un peso molecular  $\sim 25.000$ . Como veremos más adelante, existen más de veinte moléculas distintas de RNA de transferencia, al menos una para cada aminoácido.

El desciframiento de la clave genética, es decir, de la secuencia de bases en los tripletes específicos para cada aminoácido, se realizó en la primera mitad de la década de los 60. El paso fundamental para ello fue la puesta a punto por Nirenberg y Matthaei (125) de un sistema de *E. coli* de síntesis de proteínas «in vitro» que daba lugar a polipéptidos específicos, utilizando como mensajeros polinucleótidos sintéticos de composición de bases conocida. Estos polímeros fueron sintetizados con la polinucleótido-fosforilasa, descubierta unos años antes por Grunberg-Manago y Ochoa (126). De esta forma se pudo determinar la composición de bases de los tripletes (codones) que especificaban a los distintos aminoácidos (127-128). Posteriormente, mediante la técnica de unión de aminoacil-tRNAs, marcados radioactivamente en la mitad aminoácido, a los ribosomas en presencia de tripletes específicos, se determinó la secuencia de nucleótidos en los distintos tripletes (129). La mayoría de estos datos se confirmaron utilizando como mensajeros polinucleótidos sintéticos de secuencias de bases específicas (130-131).

En la figura 1 se muestra la clave genética como se conoce en la actualidad. Conviene destacar las características siguientes:

a) La clave es degenerada; es decir, hay aminoácidos que son especificados por más de un triplete.

b) Varios de los tripletes para un mismo aminoácido tienen las dos primeras bases comunes, y sólo varían en la tercera; es decir, hay degeneración en la tercera base.

1 \ 2	U	C	A	G
U	UUPi PHE	UCX SER	UAPi TYR	UGPi CYS
	UUPu LEU		UAPu FIN	UGA FIN
C	CUX LEU	CCX PRO	CAPi HIS	CGX ARG
			CAPu GLN	
A	AUPi ILE	ACX THR	AAPi ASN	AGPi SER
	AUA ILE		AAPu LYS	AGPu ARG
	AUG MET			
G	GUX VAL	GCX ALA	GAPi ASP	GGX GLY
			GAPu GLU	

Pi = pirimidina ; Pu = purina ; X = U, C, A, G

Figura 1.—Clave genética.

c) Dos tripletes, AUG y GUG, especifican formil metionina además de metionina y valina respectivamente. De estos tripletes trataremos más adelante en relación con la iniciación de la síntesis de proteínas.

d) Tres tripletes, UAA, UAG y UGA, no especifican a ningún aminoácido. Volveremos a hablar de ellos más adelante en relación con la terminación de la síntesis de proteínas.

La existencia de 64 tripletes distintos, de los que, al menos, 61 especifican a algún aminoácido, planteó la pregunta sobre si existían otros tantos RNAs de transferencia, cada uno de los cuales serviría de adapta-

dor para un triplete, o si cada aminoácido tendría su tRNA, que serviría de adaptador para los tripletes correspondientes a dicho aminoácido.

Si el reconocimiento del triplete en el mensajero se realiza mediante una región de tres bases en el tRNA (anticodon) de acuerdo con las reglas de Watson y Crick, deberían existir tantos adaptadores como tripletes. Sin embargo, Crick postuló una hipótesis, que se conoce con el nombre de «Wobble» (132), en que sugiere que las dos primeras bases de la región del anticodon del tRNA forman los puentes de hidrógeno clásicos con las bases correspondientes en el mRNA; sin embargo, en la tercera base del tRNA puede haber un cierto relajamiento en el apareamiento con la base correspondiente en el mRNA, de acuerdo con las reglas que se indican en la figura 2. De acuerdo con esta hipótesis, el número de moléculas de tRNA necesarias para reconocer los distintos tripletes sería menor de 64.

Figura 2.—Reglas de Crick ("Wobble") para el apareamiento en la tercera posición de la región del anticodon del tRNA y del triplete correspondiente del mRNA.

Base en el anticodon	Bases reconocidas en el codon
U	A } G }
C	G
A	U
G	U } C }
I	U } C } A }

Estudios posteriores han confirmado la hipótesis de Crick, cumpliéndose siempre las reglas siguientes:

a) Cambios en la primera y segunda base del triplete en el mensajero requiere la existencia de un tRNA distinto.

b) Una misma molécula de tRNA es capaz de reconocer varios tripletes que implican cambio en la tercera base, observándose siempre en este caso las reglas dadas por Crick.

En algún caso existe redundancia a nivel de tRNA; es decir, puede haber más de una especie de tRNA que reconozca al mismo grupo de

tripletes. El significado biológico de esta redundancia podría ser una salvaguardia contra las mutaciones.

La unión del aminoácido al tRNA correspondiente se realiza mediante la enzima llamada aminoacil-tRNA sintetasa. Existen al menos veinte enzimas diferentes, una para la activación de cada aminoácido. Cada tRNA debe poseer, por tanto, además de la región del anticodon específica para el triplete correspondiente, una región que sea reconocida por la aminoacil-tRNA sintetasa que determine la unión del aminoácido al extremo 3'-OH de la adenosina terminal presente en todas las moléculas de tRNA y una región con afinidad por los ribosomas y/o los factores que dirigen la unión del aminoacil-tRNA a los mismos.

## **2. Etapas en la traducción del RNA mensajero**

La biosíntesis de proteínas es un proceso extraordinariamente complejo en el que intervienen un número elevado de macromoléculas: ribosomas, formados por dos subunidades que contienen tres clases de RNA y unas 50 proteínas distintas; RNAs de transferencia (aproximadamente, 40 especies), proteínas implicadas en la iniciación de la cadena polipeptídica (al menos tres especies) y proteínas implicadas en la elongación y terminación de la cadena polipeptídica (al menos siete especies). A pesar de la complejidad del proceso, hoy día se conoce ya con bastante detalle el mecanismo por el cual tienen lugar los distintos pasos en la biosíntesis de las proteínas.

Se han considerado tres pasos fundamentales en el proceso de traducción:

- A) Iniciación.
- B) Elongación.
- C) Terminación.

El desciframiento de los mecanismos que intervienen en cada uno de estos pasos se realizó en sistemas procarióticos, en los que vamos a centrar nuestra revisión. Estudios que se están realizando actualmente en sistemas eucarióticos están poniendo de manifiesto que la síntesis de proteínas transcurre esencialmente por los mismos mecanismos con ligeras variantes.

## A) INICIACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

En este paso se incluye la unión del mRNA a la subunidad ribosómica 30S y la unión del aminoacil-tRNA iniciador (formil-metionil-tRNA) al sitio llamado donador o «P» del ribosoma.

En 1963 se puso de manifiesto que  $\sim 40$  por 100 de las proteínas de *E. coli* tenían metionina en posición amino terminal (133). Esta fue la primera sugerencia de que la metionina podía estar implicada de algún modo en la iniciación de la síntesis de proteínas.

Un año más tarde, Marcker y Sanger (134) describieron la existencia en *E. coli* de dos especies de tRNA para la metionina; una en que la metionina unida podía ser formilada ( $\text{tRNA}_{\text{F}}^{\text{met}}$ ) y otra que no era formilada ( $\text{tRNA}_{\text{M}}^{\text{met}}$ ). La misma metionil-tRNA sintetasa esterifica a ambos tRNAs (135-136), que son funcional y estructuralmente distintos. La metionina es formilada, una vez que está unida al  $\text{tRNA}_{\text{F}}$ , mediante la enzima met-tRNA transformilasa, siendo el  $\text{N}^{10}$ -formiltetrahydrofolato el donador del grupo formilo (137). El met- $\text{tRNA}_{\text{F}}$  reconoce los codones AUG y GUG, mientras que el met- $\text{tRNA}_{\text{M}}$  reconoce sólo el triplete AUG (138). A concentraciones altas de  $\text{Mg}^{++}$ , el met- $\text{tRNA}_{\text{F}}$  sin formilar produce la incorporación de metionina en posición amino terminal, mientras la metionina del met- $\text{tRNA}_{\text{M}}$  se incorpora en posiciones internas (139). Esto implica que la propia molécula de  $\text{tRNA}_{\text{F}}$  tiene especificidad que determina la iniciación de la cadena peptídica. Sin embargo, a concentraciones bajas de  $\text{Mg}^{++}$ , más fisiológicas, el requerimiento por el grupo formilo es absoluto, ya que sin él no se produce incorporación de metionina en posición amino terminal (140).

El RNA de los bacteriófagos MS2, f2 y R17 es un mensajero policistrónico y dirige la síntesis «in vitro» de tres proteínas específicas. Poco después del descubrimiento del formil-metionil-tRNA (F-met-tRNA) se vio que las tres proteínas sintetizadas en un sistema libre de células de *E. coli*, utilizando el RNA de estos fagos como mensajero, comenzaba con F-met (141-144).

Cuando, por otra parte, la síntesis de proteínas «in vitro» era dirigida por el mRNA endógeno de *E. coli* se observó la incorporación de un residuo de F-met por cada 150 aminoácidos (145), siendo la F-met el único formil-aminoácido detectado. Esto indica que el F-met- $\text{tRNA}_{\text{F}}$  es el iniciador de la síntesis de proteínas en *E. coli*.

Como se indicó anteriormente, una gran parte de las proteínas de *E. coli* tienen metionina en posición amino terminal, lo que implica la

existencia de una enzima capaz de eliminar el resto formilo de las proteínas. Dicha actividad se ha detectado en extractos de *E. coli*, *B. stearothermophilus* y *B. subtilis* (146-147).

#### Factores de iniciación.

Debido al elevado contenido en nucleasas de los ribosomas de *E. coli*, se puso a punto un procedimiento de purificación, que consiste en el lavado de los ribosomas a concentración alta de sal ( $\text{CINH}_4$  0,5M), seguido de cromatografía en columna de DEAE-celulosa (148). Cuando se usaban estos ribosomas junto con la fracción sobrenadante (S100) de *E. coli*, este sistema era capaz de traducir mensajeros sintéticos a concentración alta de  $\text{Mg}^{++}$ , pero no mensajeros naturales, como el RNA del fago MS2. La adición de un concentrado del lavado de los ribosomas restablecía la capacidad para traducir el MS2-RNA (149).

Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa, la actividad presente en el lavado de los ribosomas se fraccionó en dos componentes, llamados inicialmente F1 y F2 (150), a los que actualmente se denomina IF1 e IF2. Se demostró que ambos factores estaban implicados en la iniciación de la síntesis de proteínas, ya que eran necesarios para la unión de F-met-tRNA<sub>F</sub> a los ribosomas en presencia del triplete AUG (150).

Posteriormente, lavando los ribosomas con  $\text{CINH}_4$  1 M, se detectó la presencia de un tercer factor, IF3 (151-152). Este factor se requiere para la unión de mensajeros naturales a los ribosomas, pero no es necesario para la unión de mensajeros sintéticos aun cuando tengan el triplete AUG en el extremo 5' de la cadena polinucleotídica. Es decir, los mensajeros naturales deben contener alguna señal específica que falta en los mensajeros sintéticos, que hace necesaria la presencia del factor IF3 para su unión a los ribosomas. Como veremos más adelante, el factor IF3 tiene también una actividad que disocia los ribosomas 70S en sus subunidades 50S y 30S.

Los tres factores de iniciación están presentes en la subunidad ribosómica 30S (153-154). Se han purificado a partir del lavado de los ribosomas, obteniéndose los tres en un alto grado de pureza. IF1 se ha obtenido con una pureza mayor del 90 por 100 (155-156); tiene un peso molecular de 9.000 y es relativamente estable al calor. IF2 presenta una sola banda en electroforesis en gel de poliacrilamida a pH 4,5 y 7,8 (156-157); tiene un peso molecular de 80.000. IF3 se ha obtenido también homogéneo (158); su peso molecular es de 21.000.

Antes de seguir adelante vamos a ver el papel de las subunidades ribosómicas en la iniciación de la síntesis de la cadena polipeptídica. Experimentos de intercambio de las subunidades ribosómicas «in vivo» e «in vitro» sugerían la existencia de polisomas y de subunidades ribosómicas 30S y 50S, sin detectarse la presencia de monosomas 70S. Los polisomas, una vez finalizada la síntesis de la proteína correspondiente, se disociaban en las subunidades 30S y 50S (159-160).

Efectivamente, Nomura y colaboradores pusieron de manifiesto que el proceso de iniciación se inicia con la subunidad 30S, uniéndose a ella el mRNA. A continuación se une a este complejo el F-met-tRNA<sub>F</sub>, formando lo que se llama «complejo de iniciación» (161). Evidencia de que la formación de dicho complejo es un paso necesario en la iniciación de la traducción se obtuvo de experimentos «in vitro» en que ribosomas pesados 70S de *E. coli*, marcados con N<sup>15</sup> y deuterio se mezclaron con subunidades ligeras 50S, poli AUG, F-met-tRNA<sub>F</sub> y factores de iniciación. El F-met-tRNA<sub>F</sub> se unía a ribosomas 70S híbridos formados por una subunidad pesada 30S y una 50S ligera (162).

El GTP se requiere para la unión de F-met-tRNA<sub>F</sub> a la subunidad 30S (163-166), uniéndose una molécula de GTP por cada complejo de iniciación (167). Posteriormente, al unirse la subunidad 50S, se produce la hidrólisis en forma de GDP y P<sub>i</sub>. En relación con la hidrólisis del GTP se ha puesto de manifiesto la existencia de una actividad GTPasa dependiente de ribosomas y de factor IF2 (157, 168-169). El análogo del GTP, el 5'-guanilil-metilen-difosfonato (GMP-PCP), puede sustituir al GTP en la unión del F-met-tRNA<sub>F</sub> a la subunidad 30S; sin embargo, el complejo de iniciación que se forma es inactivo para la formación subsiguiente de un enlace peptídico (170).

Como se dijo anteriormente, el factor IF1 se requiere, junto al IF2, para la unión dependiente de AUG de F-met-tRNA<sub>F</sub> a los ribosomas. Sin embargo, el requerimiento por IF1 no es absoluto, ya que el factor IF2 por sí solo es capaz de estimular dicha unión (150). Utilizando IF1, marcado radiactivamente (155), se observó que éste se une a la subunidad 30S sólo cuando el resto de los componentes están presentes (mRNA, IF3, IF2, F-met-tRNA y GTP). Posteriormente se libera del complejo de iniciación cuando, al añadir la subunidad 50S, se forman ribosomas 70S.

El factor IF3 homogéneo posee dos actividades: estimula la unión de mensajeros naturales a la subunidad 30S y disocia ribosomas 70S en 50S y 30S (158-171). Mediante el uso de IF3 marcado radiactivamen-

te (172) se ha visto que éste se une a la subunidad 30S en una relación molar  $\sim 1$ , pero no a la 50S ni a ribosomas 70S. En el proceso de disociación de los ribosomas 70S, IF3 se une a la subunidad 30S, liberándose posteriormente al unirse la subunidad 50S para formar el complejo mRNA-70S-F-met-tRNA<sub>F</sub>.

Podemos resumir el proceso de iniciación de la síntesis de proteínas con el esquema que se presenta en la figura 3. El factor IF3 se une a la subunidad 30S (a) y dirige específicamente la unión de ésta al sitio de iniciación del RNA mensajero (b). A continuación se une el F-met-tRNA<sub>F</sub> al sitio donador o «P» de la subunidad 30S, en presencia de IF1, IF2 y GTP (c) y, posteriormente, se une la subunidad 50S al complejo anterior produciéndose la hidrólisis de GTP en forma de GDP y P<sub>i</sub> y liberándose los factores IF1 e IF3 (d); por el momento no se sabe si el factor IF2 permanece ligado al complejo o se libera junto con los otros dos factores. De esta forma, el ribosoma está preparado para comenzar el proceso de elongación (e). Finalmente, cuando se llega a un triplete de terminación, se produce la liberación de la cadena polipeptídica (f) y el factor IF3 interviene de nuevo disociando los ribosomas 70S (g), uniéndose a la subunidad 30S para comenzar un nuevo ciclo de síntesis de proteínas.

#### Control de la iniciación de la traducción.

En un principio se pensó que el triplete de iniciación para el comienzo de la síntesis de proteínas se reconocería por su situación en el extremo 5' del mensajero. Sin embargo, el estudio de las secuencias de los RNAs de los fagos R17 y MS2 indicó que esto no es así, ya que en ningún caso se encontró el triplete AUG o GUG en el extremo 5' de la cadena (173-175). De hecho, en el caso del RNA del fago Q $\beta$  no aparece el primer triplete AUG hasta los nucleótidos números 62-64 (176).

Se postuló entonces que alrededor de los sitios de iniciación en los RNAs mensajeros debería existir alguna secuencia específica que dirigiera a los ribosomas y/o a los factores de iniciación a dicho sitio. Para determinar las secuencias de nucleótidos en las regiones de iniciación se marcó radiactivamente el RNA de los fagos R17 y Q $\beta$  y se unió a los ribosomas en condiciones de formación de complejo de iniciación; a continuación se trató el complejo con RNasa para degradar las regiones del RNA no protegidas por los ribosomas, y, finalmente, se determinó la secuencia de bases en las regiones resistentes al tratamiento con RNasa. De esta forma se determinó la secuencia de nucleóti-

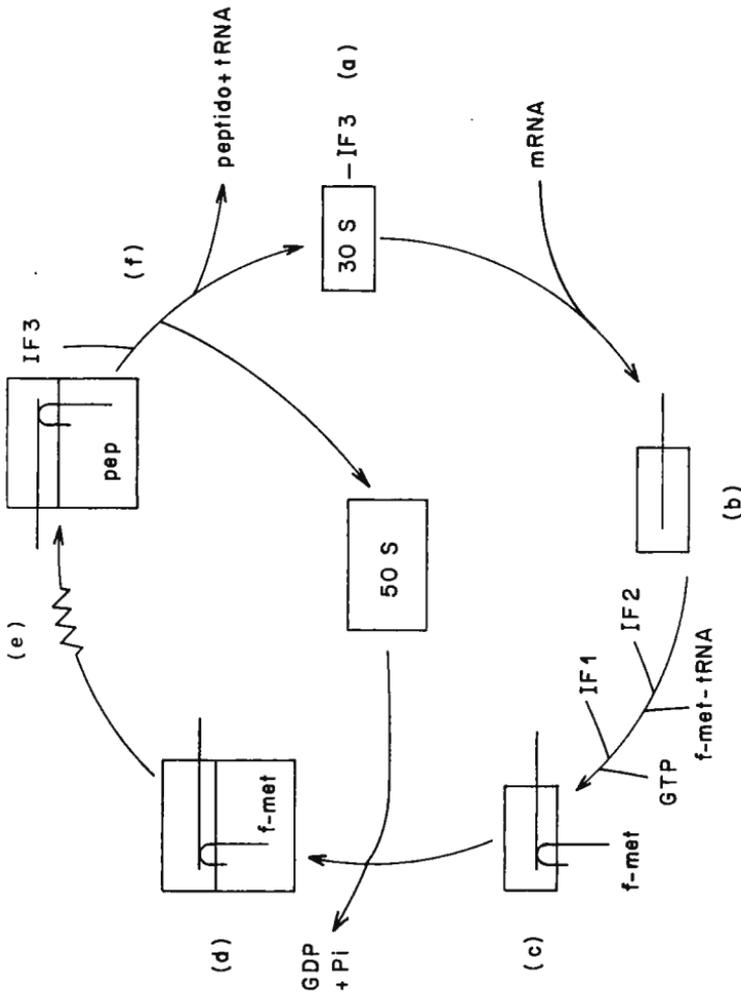


Figura 3.—Iniciación de la síntesis de proteínas. Adaptado de Sabol y colaboradores (158).

dos en las regiones de iniciación de los tres cistrones del RNA del fago R17 (177) y Q $\beta$  (178-180). Como se muestra en la figura 4, no hay secuencias de nucleótidos comunes en ninguno de los seis casos, lo que indica que la región de iniciación es específica para cada cistrón.

Figura 4.—Secuencias de nucleótidos de las regiones de iniciación de las tres proteínas de los fagos Q $\beta$  y R17. Los aminoácidos que se indican han sido determinados experimentalmente.

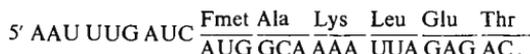
Proteína de maduración de Q $\beta$



Proteína de maduración de R17



Proteína de la cubierta de Q $\beta$



Proteína de la cubierta R17



Replicasa de Q $\beta$



Replicasa de R17



La determinación de las secuencias en las regiones de iniciación permite sacar algunas conclusiones sobre la iniciación de la síntesis de proteínas. En primer lugar puede verse que el triplete iniciador es siempre AUG y no GUG. Por otra parte, en ningún caso dicho triplete AUG está precedido inmediatamente por un triplete terminador (UAA, UAG o UGA); este hecho sugiere que en los mensajeros policistrónicos existen regiones que no se traducen.

Aunque los ribosomas de *E. coli* son capaces de iniciar «in vitro» la traducción de los tres cistrones del RNA del fago f2, los ribosomas de *B. stearothermophilus* pueden iniciar solamente la traducción del cistrón

correspondiente a la proteína de maduración (181), que es el gen situado más próximo al extremo 5' terminal (182). Esta especificidad de iniciación diferente se atribuyó a los factores de iniciación presentes en los ribosomas de uno y otro organismo. De acuerdo con esta interpretación, se aisló, de ribosomas de bacterias infectadas por el fago T4, un factor termosensible que, cuando se añade a ribosomas de bacterias sin infectar libres de factores de iniciación, da lugar a una traducción preferente del mensajero de T4 sobre el mensajero de *E. coli* o el RNA del fago MS2.

El candidato más probable para este tipo de control de iniciación de la traducción es el factor IF3, puesto que es el responsable de la unión del mRNA a la subunidad ribosómica 30S. Efectivamente, el grupo de Revel (184) ha descrito el aislamiento de ribosomas de *E. coli*, de una especie de IF3, que no reconoce los sitios de iniciación del RNA del fago MS2, pero estimula la unión del mensajero del fago T4 a los ribosomas. Independientemente, Lee-Huang y Ochoa (185) han purificado el factor IF3 de bacterias infectadas con T4, y han observado que este factor estimula preferentemente la unión del mensajero tardío de T4 a los ribosomas. Más aún, han aislado de *E. coli* sin infectar subfracciones del factor IF3 que muestran distinta especificidad hacia el RNA de MS2 o hacia el mensajero tardío de T4. Estos resultados sugieren que el factor IF3, que reconoce al mensajero tardío de T4, está presente en las bacterias no infectadas y que la infección por T4 inactiva las moléculas de IF3 que reconocen al MS2-RNA.

Parece existir, por tanto, un control positivo de la iniciación de la traducción ejercido por los factores IF3, de los cuales se han identificado hasta la fecha dos factores con distinta especificidad de iniciación. Este tipo de control podría compararse al ejercido por el factor o factores  $\sigma$  en la iniciación de la transcripción (29).

Además del control positivo de la traducción, parece existir algún tipo de control negativo de la misma, ya que se ha aislado recientemente de ribosomas de *E. coli*, una proteína inhibidora, que se ha denominado factor de interferencia, *i*, que interacciona con el factor IF3 y reduce específicamente la iniciación de la síntesis de la proteína de la cubierta del RNA del fago MS2 (186).

#### Iniciación en organismos eucarióticos.

En relación con la iniciación de la síntesis de proteínas en sistemas eucarióticos, la primera indicación de la existencia de dos especies de tRNA<sup>met</sup> se obtuvo cuando se vio que aproximadamente la mitad del

met-tRNA de hígado de conejillo de Indias se formilaba en presencia de la transformilasa de *E. coli* (187). No se detectó la presencia de transformilasa en extratos de células de eucarióticos, sugiriendo que, si la iniciación tiene lugar con un met-tRNA iniciador, la formilación no es necesaria. De un modo similar a lo que sucede en organismos procarióticos, se encontró metionina en posición amino terminal en una serie de proteínas aisladas de organismos eucarióticos, sugiriendo que también en este caso la metionina es el aminoácido iniciador.

Poco después del descubrimiento de los factores de iniciación en *E. coli*, se obtuvo, del lavado de ribosomas de reticulocitos con ClK 0,5 M, una fracción que estimulaba la incorporación de valina en posición amino terminal de la globina (188). Posteriormente, esta fracción se separó en dos componentes (189-190), y más tarde se aisló un tercer componente que se requería para la traducción de mensajes naturales (191). Los dos primeros factores estimulaban la unión de met-tRNA<sub>F</sub> a ribosomas de reticulocitos en presencia de AUG (192). Evidencia adicional de que uno de los factores de iniciación puede ser específico de mensajero se obtuvo del hecho de que el mRNA de la miosina, aislado de músculo de embrión de pollo, no es traducido con ribosomas lavados obtenidos de reticulocitos, a menos que se añadan factores de iniciación aislados de músculo (193). Estos resultados sugieren la existencia de factores específicos de cada célula implicados en la iniciación de la síntesis de proteínas, estimulando la unión del mensajero a los ribosomas.

En conclusión, los datos que se tienen actualmente sugieren que el mecanismo de iniciación de la síntesis de proteínas en organismos eucarióticos puede ser muy similar al que existe en procarióticos, siendo la diferencia fundamental el que los primeros no requieren la formilación del met-tRNA<sub>F</sub> para la iniciación de la traducción.

## B) ELONGACIÓN DE LA CADENA POLIPEPTÍDICA

Una vez formado el complejo de iniciación conteniendo F-met-tRNA<sub>F</sub>-mRNA-30S, se une la subunidad 50S, formándose el ribosoma 70S y quedando el sistema preparado para el crecimiento de la cadena polipeptídica.

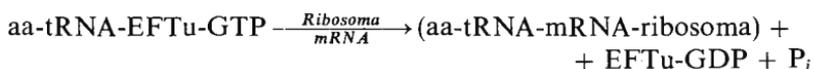
El proceso de elongación implica, al menos, tres pasos distintos: a) unión específica del aminoacil-tRNA, correspondiente al triplete siguiente al iniciador, a un sitio del ribosoma próximo al sitio «P», que

se ha denominado sitio aceptor («A»); b) formación del enlace peptídico entre el grupo amino del aminoacil-tRNA recién unido al ribosoma y el grupo carboxilo de la F-met, quedando el tRNA<sub>F</sub> unido al sitio «P» y pasando la F-met a ocupar el sitio aceptor en forma de F-met-aa-tRNA; c) liberación del tRNA<sub>F</sub> del sitio «P» y traslocación del mensajero y del peptidil-tRNA recién sintetizado del sitio aceptor al sitio donador del ribosoma, dejando libre el primero para la unión del aminoacil-tRNA específico del triplete siguiente y, por un proceso similar al descrito, continuar la elongación de la cadena peptídica.

En el proceso de elongación se requieren tres factores proteicos, llamados EFTu, EFTs y EFG, que se obtienen de la fracción soluble (194-196), además de la enzima que produce la formación del enlace peptídico, que se ha llamado peptidil transferasa (197) y forma parte de la subunidad ribosómica 50S. Los factores EFTu y EFTs se encuentran normalmente asociados, y de esta forma se les llama factor EFT.

El factor EFTu se ha purificado hasta homogeneidad y se ha cristalizado (198); su peso molecular es de 39.000 (199) y tiene una gran afinidad por el GDP (200). El factor EFTs se ha purificado extensamente, aunque no se ha cristalizado (201); tiene un peso molecular de 19.000. El factor EFG se ha purificado hasta homogeneidad y se ha cristalizado (198). Los valores que se han dado para su peso molecular oscilan entre 72.000 y 84.000.

La unión del aminoacil-tRNA al sitio receptor del ribosoma es catalizada por los factores EFTu y EFTs de acuerdo con el esquema que se indica a continuación:



El complejo EFTu-GDP, liberado al unirse el aa-tRNA al ribosoma, reacciona con el factor EFTs para formar el complejo EFTu-EFTs. Este reacciona, a su vez, con aa-tRNA y GTP, formando un complejo ternario aa-tRNA-EFTu-GTP, del que se libera el factor EFTs (202). Finalmente, el aa-tRNA se une al sitio aceptor del ribosoma, liberándose P<sub>i</sub> y el complejo EFTu-GDP. La unión del aminoacil-tRNA al ribosoma, requiere, por tanto, la hidrólisis de GTP, siendo ésta la segunda etapa en que se hidroliza GTP en la síntesis de proteínas.

El GMP-PCP puede reemplazar al GTP en la unión del aa-tRNA al ribosoma. Sin embargo, en estas condiciones no tiene lugar la formación subsiguiente de enlace peptídico.

Una vez que el aa-tRNA está unido al sitio aceptor del ribosoma, su grupo amino terminal forma un enlace peptídico bien con el grupo carboxilo de F-met en el primer ciclo de elongación, o con el correspondiente al aminoácido unido al tRNA del peptidil-tRNA en ciclos subsiguientes de elongación. La enzima responsable de la formación del enlace peptídico, la peptidil transferasa, forma parte de la subunidad ribosómica 50S (203).

Una vez formado el enlace peptídico, el peptidil-tRNA recién formado queda unido transitoriamente al sitio aceptor del ribosoma, y el tRNA libre, que había estado unido previamente a F-met o al resto peptídico, queda en el sitio donador del ribosoma. El paso siguiente en el proceso de elongación es la eliminación del tRNA de dicho sitio y la traslocación del peptidil-tRNA y del triplete correspondiente en el mRNA del sitio aceptor al sitio donador. Ambos pasos son catalizados por el factor EFG y requieren GTP (204). El GMP-PCP no puede sustituir al GTP, lo que sugiere que se produce hidrólisis de GTP en este proceso.

El papel del factor EFG en la translocación se demostró mediante el uso del oligonucleotido sintético AUG UUU UUU como mensajero. Para la formación del dipéptido F-met-phe se requiere además de factores de iniciación y ribosomas, factor EFT y GTP. Para la formación del tripéptido F-met-phe-phe se requiere, además, factor EFG, lo que sugiere que este factor interviene en la translocación del F-met-phe-tRNA y del mRNA (205).

Mediante el uso de tRNA marcado radiactivamente, se demostró que el tRNA que se encontraba en el sitio «P» unido bien a F-met o a péptido, queda fijado a los ribosomas después que se produce la formación de enlace peptídico y no es liberado hasta que se añade el factor EFG y GTP (206). La velocidad de liberación del tRNA del ribosoma es similar a la de translocación, lo que sugiere un acoplamiento entre ambos procesos.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que la actividad GTPasa que interviene en la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma y en el proceso de translocación es la misma proteína y está localizada en la subunidad 50S (207-209).

Hasta la fecha no se han aislado mutantes del factor EFT, pero se

han aislado dos tipos de mutantes del factor EFG en *E. coli*. Uno de ellos es un mutante sensible a temperatura que está alterado en la polimerización de los aminoácidos (210); el otro es un mutante resistente a ácido fusídico (211).

En eucarióticos se han aislado dos factores de elongación, uno equivalente al factor EFT y otro al factor EFG, con propiedades muy similares a las de los factores de procarióticos.

### C) TERMINACIÓN DE LA CADENA POLIPEPTÍDICA

La existencia de mutantes sin sentido que dan lugar a la terminación prematura de la cadena peptídica (212) sugería la existencia de señales de terminación naturales que estarían formadas por uno o varios de los tripletes sin sentido.

En un principio se pensó que podría haber tRNAs específicos que reconocerían los tripletes de terminación. Sin embargo, fallaron todos los intentos para demostrar su existencia. Por otra parte, se encontró un factor de terminación, al que se llamó factor R. Este factor producía la liberación de la cadena polipeptídica del ribosoma libre de tRNA a partir de un complejo peptidil-tRNA-ribosoma-mRNA (213). Posteriormente, el factor R se fraccionó en dos, R1 y R2. El factor R1 se requería para la terminación cuando estaban presentes los tripletes UAA y UAG; el factor R2 era activo con los tripletes UAA y UGA (214). Además de estos dos factores, se encontró un factor adicional, al que se llamó factor S, que por sí sólo no tenía actividad de terminación, pero que estimulaba la unión de los factores R1 y R2 al triplete terminador correspondiente, disminuyendo su  $K_m$  (215-216).

Se han obtenido resultados que indican que la peptidil transferasa, la enzima presente en la subunidad 50S de los ribosomas que forma el enlace peptídico, interviene en el proceso de terminación. Se han estudiado una serie de parámetros en que las actividades peptidil-transferasa y de terminación van en paralelo (217). Por otra parte, antibióticos que inhiben a la peptidil transferasa también inhiben la reacción de terminación (218-219). Teniendo en cuenta estos resultados, se ha propuesto que la reacción de terminación puede dividirse en dos pasos: *a*) unión del factor R a la señal de terminación correspondiente en presencia del factor S, y *b*) reacción hidrolítica; el factor R convertiría a la peptidil-transferasa en una hidrolasa, produciendo la transferencia

de la mitad peptídico del peptidil-tRNA al H<sub>2</sub>O en vez de al aminoacil-tRNA.

Una vez liberada la cadena polipeptídica del ribosoma, debe quedar todavía unido el tRNA correspondiente. Este tRNA podría no ser liberado por el factor EFG en presencia de GTP, como ocurre en el proceso de translocación. Se ha aislado un factor que libera tRNA de los ribosomas en ausencia de translocación (220-221). Este factor no requiere GTP, a diferencia del factor EFG.

El análisis de las secuencias de nucleótidos del RNA del fago R17 ha permitido conocer por primera vez una señal de terminación utilizada «in vivo». Nichols (222) aisló un fragmento del RNA del fago R17, del que determinó la secuencia de nucleótidos. Este fragmento contenía los tripletes correspondientes a los seis últimos aminoácidos de la proteína de la cubierta del fago y a los seis primeros aminoácidos de la proteína siguiente, la replicasa (fig. 5). Como puede verse, después del triplete correspondiente al último aminoácido de la proteína de la cubierta hay dos tripletes de terminación seguidos, UAA y UAG. A continuación hay una región de 30 nucleótidos que probablemente no se traduce y, finalmente, comienza el cistron de la replicasa.

Figura 5.—Secuencia de nucleótidos en el RNA del fago R17 correspondiente a la región de terminación de la proteína de la cubierta y de iniciación de la replicasa.

Tyr	Terminación		Fmet	Ser	Lys
... UAC	UAA UAG	AUG CCG GCC AUU CAA ACA UGA GGA UUA CCC	AUG	UCG	AAG ...

La existencia de dos tripletes de terminación aseguran una terminación correcta, puesto que, si ésta no se realiza completamente en el primer triplete de terminación, queda un segundo triplete para asegurar una terminación total.

La existencia de más de un codon de terminación también puede explicar por qué la supresión de un triplete de terminación no es letal en estirpes su<sup>+</sup>. De otra manera, la supresión daría lugar a la unión de los polipéptidos sintetizados por un mensajero policistrónico. La existencia de un segundo triplete de terminación diferente al primero evitaría este problema. Sin embargo, no se sabe actualmente si la existencia de dos tripletes de terminación seguidos es un fenómeno general que existe para la terminación de todas o la mayoría de las proteínas.

Se puede observar también en la figura 5 que, después de los dos tripletes de terminación, existe un triplete de iniciación AUG, seguido

de cinco tripletes y de un triplete de terminación UGA. Esta secuencia podría determinar un péptido de seis aminoácidos; sin embargo, los intentos para detectar el posible péptido han fallado. Es posible que dicho triplete AUG no tenga las propiedades necesarias para actuar como iniciador.

La terminación en eucarióticos, como el resto de los procesos, parece ser similar a la terminación en procarióticos. Se han aislado mutantes supresores de *Saccharomyces cerevisiae* (233) que suprimen las mutaciones sin sentido UAA y UAG. Recientemente se ha puesto de manifiesto que el triplete UAA actúa como codon sin sentido, dando lugar a la terminación de la síntesis de citocromo c en levadura de panadería (224). También se ha aislado un factor de terminación de ribosomas de reticulocitos (225).

### 3. Control de la traducción

La existencia de dos o más factores de iniciación IF3 diferentes indica que el proceso de traducción está también sometido a regulación.

Un caso especial en el que se ha demostrado que existe un control muy específico a nivel de traducción es el de los fagos RNA de *E. coli* (MS2, R17, Q $\beta$ ,  $\phi$ 2). En este caso, el RNA infectante contiene toda la información para ser traducido directamente; es decir, puede actuar a la vez como mensajero y como molde para su replicación. Sin embargo, en bacterias infectadas por cualquiera de estos fagos, solamente se detecta una proteína específica del fago, la RNA replicasa, en los primeros minutos después de la infección. Puesto que la síntesis de la replicasa ocurre aun en ausencia de síntesis de RNA, la enzima debe ser traducida directamente de la molécula de RNA infectante que se encuentra asociada a los ribosomas poco después de la infección (226). Sin embargo, la traducción del gen de la replicasa depende de la traducción, al menos parcial, del gen que especifica la proteína de la cubierta, puesto que bacterias su<sup>-</sup> infectadas con un mutante polar en dicha proteína no sintetizan replicasa. Así, pues, para la apertura del sitio de iniciación de la replicasa debe iniciarse la síntesis de la proteína de la cubierta y proseguir la elongación hasta una longitud suficiente, sin que su síntesis se complete, ya que en los primeros minutos después de la infección no se detectan moléculas enteras de proteína de la cubierta.

Después de la traducción del gen correspondiente a la replicasa a

partir del RNA infectante, dicho RNA es usado como molde para la replicación. El descubrimiento de que una de las subunidades del huésped que se asocia a la replicasa es idéntica al factor *i* que inhibe la unión de los ribosomas al sitio de iniciación de la proteína de la cubierta (227), suministra un posible mecanismo para la conversión eficiente de la molécula de RNA infectante, de mensajero a molde para la replicación.

Hacia los diez a veinte minutos después de la infección, cuando se empiezan a acumular los intermedios replicativos y el RNA progenie, se detectan las primeras moléculas de las proteínas de maduración y de la cubierta. Poco después cesa la formación de la replicasa, disminuyendo la síntesis de la proteína de maduración y continuando a velocidad máxima la síntesis de la proteína de la cubierta.

La explicación más simple para dar cuenta del cese de la síntesis de la replicasa es que, cuando la proteína de la cubierta alcanza un determinado nivel, inhibe la iniciación de la síntesis de la replicasa, como se ha observado «in vitro» (228-231).

En cuanto a la regulación de la síntesis de la proteína de maduración, es posible que esté determinada por la estructura secundaria del RNA o que exista algún componente del huésped que limite su síntesis (232).

La extensión en la que los mecanismos de control de la traducción de los fagos RNA serán de una aplicación general se desconoce por el momento. Puesto que en la actualidad es posible sintetizar proteínas «in vitro» con RNAs mensajeros específicos de origen viral y celular, será de un gran interés el estudiar si los mecanismos descritos de control de la traducción de los fagos RNA son aplicables también a la traducción de los mensajeros de células procarióticas y eucarióticas.

## BIBLIOGRAFIA

1. F. JACOB y J. MONOD: *J. Mol. Biol.* 3,318 (1961).
2. R. R. BURGESS: *J. Biol. Chem.* 244,6160 (1969).
3. J. AVILA, J. M. HERMOSO, E. VIÑUELA y M. SALAS: *Nature* 226,1944 (1970).
4. J. S. KRAKOW y W. J. HORSLEY, *Methods in Enzymology* vol. 12b p.566 (1968).
5. S. LEE-HUANG y R. C. WARNER: *J. Biol. Chem.* 244,3793 (1969).
6. J. C. JOHNSON, M. DEBACKER y J. A. BOEZI: *J. Biol. Chem.* 246,1222 (1971).
7. J. M. HERMOSO, J. AVILA, F. JIMÉNEZ y M. SALAS: *Biochim. Biophys. Acta* 277,280 (1972).
8. W. ZILLIG, K. ZECHEL, D. RABUSSAY, M. SCHACHNER, V. S. SETHI, P. PALM, A. HEIL y W. SEIFERT: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,47 (1970).
9. R. R. BURGESS: *J. Biol. Chem.* 244,6168 (1969).
10. D. BERG y M. CHAMBERLIN: *Biochemistry* 9,5055 (1970).
11. R. R. BURGESS, A. A. TRAVERS, J. J. DUNN, y E. K. F. BAUTZ: *Nature* 221,43 (1969).
12. J. AVILA, J. M. HERMOSO, E. VIÑUELA y M. SALAS: *Eur. J. Biochem.* 21,526 (1971).
13. H. R. WHITELEY y H. E. HEMPHILL: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41,647 (1970).
14. A. ISHIHAMA: *Biochemistry* 11,1250 (1972).
15. D. RABUSSAY y W. ZILLIG: *FEBS Letters* 5,104 (1969).
16. A. SIPPEL y G. HARTMANN: *Biochim. Biophys. Acta* 157,218 (1968).
17. E. DIMAURO, L. SNYDER, P. MARINO, A. LAMBERTI, A. COPPO y G. P. TOCCHINI-VALENTINI: *Nature* 222,533 (1969).
18. D. A. GOLDTHWAIT, D. A. ANTHONY y C. W. WU, *Lepetit Colloq. on RNA polymerase and transcription* (ed. L. Silvestri) p.10 (North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1970).
19. A. JACOBSON y D. GILLESPIE: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44,1030 (1971).
20. H. MATZURA, S. MOLIN y O. MAALØE: *J. Mol. Biol.* 59,17 (1971).
21. S. J. AUSTIN, I. P. B. TITAWELLA, R. S. HAYWARD y J. G. SCAIFE: *Nature New Biol.* 232,133 (1971).
22. J. P. RICHARDSON: *J. Mol. Biol.* 21,83 (1966).
23. O. W. JONES y P. BERG: *J. Mol. Biol.* 22,199 (1966).
24. D. PETTJOHN y T. KAMIYA: *J. Mol. Biol.* 29,275 (1967).
25. D. C. HINKLE y M. CHAMBERLIN: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,65 (1970).
26. W. ZILLIG, K. ZECHEL, D. RABUSSAY, M. SCHACHNER, V. S. SETHI, P. PALM, A. HEIL y W. SEIFERT: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,47 (1970).
27. M. CHAMBERLIN: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,851 (1970).
28. A. SIPPEL y G. HARTMANN: *Eur. J. Biochem.* 16,152 (1970).
29. A. A. TRAVERS: *Nature New Biology* 229,69 (1971).
30. M. SUGIURA, T. OKAMOTO y M. TAKANAMI. *Nature* 225,598 (1970).

31. C. G. GOFF y E. G. MINKLEY, *Lepetit Colloq. on RNA polymerase and transcription* (ed. L. Silvestri), p.124 (North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1970).
32. F. JIMÉNEZ, *Tesina de Licenciatura* (Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid 1972).
33. J. IPPEN, J. H. MILLER, J. SCAIFE y J. BECKWITH: *Nature* 217,825 (1968).
34. F. R. BLATTNER y J. E. DAHLBERG: *Nature New Biol.* 237,227 (1972).
35. F. R. BLATTNER, J. E. DAHLBERG, J. K. BOETTIGER, M. FIANDT y W. SZYBALSKI: *Nature New Biol.* 237,232 (1972).
36. U. MAITRA, Y. NAKATA y J. HURWITZ: *J. Biol. Chem.* 242,4908 (1967).
37. E. K. F. BAUTZ, F. A. BAUTZ y J. J. DUNN: *Nature* 223,1022 (1969).
38. H. BREMER: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,109 (1970).
39. G. CASSANI, R. R. BURGESS y H. M. GOODMAN: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,59 (1970).
40. A. A. TRAVERS y R. R. BURGESS: *Nature* 222,537 (1969).
41. J. L. DARLIX, A. SENTENAC, A. RUET y P. FROMAGEOT: *Eur. J. Biochem.* 11,43 (1969).
42. J. S. KRAKOW y K. VON DER HELM: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,73 (1970).
43. J. S. KRAKOW, K. DALEY y M. KARSTADT: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 62,432 (1969).
44. O. G. STONINGTON y D. E. PETTIJOHN: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68,6 (1971).
45. M. TAKANAMI, T. OKAMOTO y M. SUGIURA: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,179 (1970).
46. J. P. RICHARDSON: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,127 (1970).
47. R. L. MILLETTE, C. D. TROTTER, P. HERRLICH y M. SCHWEIGER: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,135 (1970).
48. J. W. ROBERTS: *Nature* 224,1168 (1969).
49. J. AVILA, *Tesis Doctoral* (Facultad de Ciencias, Universidad de Madrid, 1971).
50. J. L. DARLIX, A. SENTENAC y P. FROMAGEOT: *FEBS Letters* 13,165 (1971).
51. M. OISHI y N. SUEOKA: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 54,483 (1965).
52. I. SMITH, D. DUBNAU, P. MORELL y J. MARMUR: *J. Mol. Biol.* 33,123 (1968).
53. S. A. YANKOFSKY y S. SPIEGELMAN: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48,1466 (1962).
54. D. KENNEL: *J. Mol. Biol.* 34,85 (1968).
55. R. A. LAZZARINI y A. E. DAHLBERG: *J. Biol. Chem.* 246,420 (1971).
56. D. E. PETTIJOHN, K. CLARKSON, C. R. KOSSMAN y O. G. STONINGTON: *J. Mol. Biol.* 52,281 (1970).
57. W. SLASER, J. JANIN y C. LEVINTHAL: *J. Mol. Biol.* 31,237 (1968).
58. A. A. TRAVERS, R. I. KAMEN y R. F. SCHLEIF: *Nature* 228,748 (1970).
59. W. A. HASELTINE: *Nature* 235,329 (1972).
60. D. E. PETTIJOHN: *Nature New Biology* 235,204 (1972).
61. C. HUSSEY, J. PERO, R. G. SHORENSTEIN y R. LOSICK: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69,407 (1972).
62. J. A. WINSTEIN y P. C. HUANG: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69,1387 (1972).
63. B. DE CROMBRUGGHE, B. CHEN, M. GOTTESMAN, I. PASTAN, H. E. VARMUS, M. EMER y R. L. PERLMAN: *Nature New Biology* 230,37 (1971).
64. G. DE CROMBRUGGHE, B. CHEN, W. ANDERSON, P. NISSLEY, M. GOTTESMAN, I. PASTAN y R. PERLMAN: *Nature New Biology* 231,139 (1971).

65. J. DAVIDSON, K. BROOKMAN, L. PILARSKI y H. ECHOLS: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35,95 (1970).
66. M. JACQUET, R. CUKIER-KAHN, J. PLA y F. GROSS: Biochem. Biophys. Res. Commun. 45,1597 (1971).
67. B. CHEN, B. DE CROMBRUGGHE, W. B. ANDERSON, M. E. GOTTESMAN, I. PASTAN y R. L. PERLMAN: Nature New Biol. 233,67 (1971).
68. A. M. WU, S. GHOSH, A. ECHOLS y W. G. SPIEGELMAN: J. Mol. Biol. 67,407 (1972).
69. A. M. WU, S. GHOSH y H. ECHOLS: J. Mol. Biol. 67,423 (1967).
70. C. HUSSEY, R. LOSICK y A. L. SONENSHEIN: J. Mol. Biol. 57,59 (1971).
71. R. LOSICK y A. L. SONENSHEIN: Nature 224,35 (1969).
72. R. LOSICK, R. G. SHORENSTEIN y A. L. SONENSHEIN: Nature 227,910 (1970).
73. A. L. SONENSHEIN y R. LOSICK: Nature 227,906 (1970).
74. J. C. C. MAIA, P. KERJAN y J. SZULMAJSTER: FEBS Letters 13,269 (1971).
75. J. MILLET, P. KERJAN, J. P. AUBERT y J. SZULMAJSTER: FEBS Letters 23,47 (1972).
76. J. MILLET: Compt. Rend. 272,1806 (1971).
77. F. W. STUDIER: J. Mol. Biol. 11,373 (1965).
78. W. C. SUMMERS y R. B. SIEGEL: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35,253 (1970).
79. W. C. SUMMERS y W. SZYBALSKI: Virology 34,9 (1968).
80. W. C. SUMMERS y R. B. SIEGEL: Nature 223,1111 (1969).
81. R. B. SIEGEL y W. C. SUMMERS: J. Mol. Biol. 49,115 (1970).
82. M. CHAMBERLIN, J. MCGRATH y L. WASKELL: Nature 228,227 (1970).
83. J. J. DUNN, F. A. BAUTZ y E. K. F. BAUTZ: Nature New Biology 230,94 (1971).
84. U. MAITRA: Biochem. Biophys. Res. Commun. 43,443 (1971).
85. S. P. MAHADIK, B. DHARMGRONGARTAMA y P. R. SRINIVASAN: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 69,162 (1972).
86. W. SALSER, A. BOLLE y R. EPSTEIN: J. Mol. Biol. 49,271 (1970).
87. R. J. GRASSO y J. M. BUCHANAN: Nature 224,882 (1969).
88. A. BOLLE, R. EPSTEIN, W. SALSER y E. P. GEIDUSCHEK: J. Mol. Biol. 33,339 (1968).
89. J. F. PULITZER y E. P. GEIDUSCHEK: J. Mol. Biol. 49,489 (1970).
90. C. M. RADDING y H. ECHOLS: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 60,707 (1968).
91. M. SCHWATZ: Virology 40,23 (1970).
92. B. BUTLER, y H. ECHOLS: Virology 40,212 (1970).
93. N. HOPKINS: Virology 40,223 (1970).
94. R. HASELKORN, M. VOGEL y R. D. BROWN: Nature 221,836 (1969).
95. A. GHYSEN y M. PIRONIO: J. Mol. Biol. 65,259 (1972).
96. S. NAONO y K. TOKUYAMA: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35,375 (1970).
97. G. WALTER, W. SEIFERT y W. ZILLIG: Biochem. Biophys. Res. Commun. 30,240 (1968).
98. C. G. GOFF y K. WEBER: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35,101 (1970).
99. W. SEIFERT, P. QASBA, G. WALTER, P. PALM, M. SCHACHNER y W. ZILLIG: Eur. J. Biochem. 9,319 (1969).
100. A. TRAVERS: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35,241 (1970).
101. R. B. KHESIN, *Lepetit Colloquium on RNA polymerase and transcription* (ed. L. Silvestri) p.167 (North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1970).
102. W. SEIFERT, D. RABUSSAY y W. ZILLIG: FEBS Letters 16,175 (1971).
103. M. SCHACHNER y W. ZILLIG: Eur. J. Biochem. 22,513 (1971).

104. A. A. TRAVERS: *Nature* 225,1009 (1970).
105. J. PULITZER y E. P. GEIDUSCHEK: *J. Mol. Biol.* 49,489 (1970).
106. L. SNYDER y E. P. GEIDUSCHEK: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 59,459 (1968).
107. A. STEVENS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69,603 (1972).
108. M. HERZBERG y E. WINOCOUR: *J. Virol.* 6,607 (1970).
109. A. DATTA y R. M. FRANKLIN: *Nature New Biology* 236,131 (1972).
110. R. F. WEAVER, S. P. BLATTI y W. J. RUTTER: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68,2994 (1971).
111. S. T. JACOB, E. M. SAJDEL, W. MUECKE y H. N. MUNRO: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,681 (1970).
112. H. STEIN y P. HAUSEN: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,709 (1970).
113. K. H. SEIFART: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,719 (1970).
114. B. D. REID y P. PARSONS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68,2830 (1971).
115. H. KUNTZEL y K. P. SCHAFER: *Nature* 231,265 (1971).
116. G. ATTARDI, Y. ALONI, B. ATTARDI, D. OJALA, L. PICA-MATTOCCIA, D. L. ROBERSON y B. STORRIE: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35,599 (1970).
117. F. H. C. CRICK, L. BARNETT, S. BRENNER y R. J. WATTS-TOBIN: *Nature* 192,1277 (1961).
118. S. NISHIMURA, D. S. JONES, E. OHTSUKA, M. HAYATSU, T. M. JACOB, y H. G. KHORANA: *J. Mol. Biol.* 13,283 (1965).
119. M. SALAS, M. A. SMITH, W. M. STANLEY, A. J. WAHBA y S. OCHOA: *J. Biol. Chem.* 240,3988 (1965).
120. E. TERZAGUI, Y. OKADA, G. STREISINGER, J. EMRICH, M. INOUE y A. TSUGITA: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56,500 (1966).
121. J. BISHOP, J. LEAHY y R. SCHWEET: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 46,1030 (1960).
122. H. M. DINTZIS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47,247 (1961).
123. F. H. C. CRICK: *Biochemical Soc. Symp.* nº 14 (Cambridge, University Press, 1957), p.25.
124. M. B. HOAGLAND, M. L. STEPHENSON, J. F. SCOTT, L. I. HECHT y P. C. ZAMECNIK: *J. Biol. Chem.* 231,241 (1958).
125. M. W. NIRENBERG y J. H. MATTHAEI: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47,1588 (1961).
126. M. GRUNBERG-MANACO y S. OCHOA: *J. Amer. Chem. Soc.* 77,3165 (1955).
127. M. W. NIRENBERG, O. W. JONES, P. LEDER, B. F. C. CLARK, W. S. SLY y S. PESTKA: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28,549 (1963).
128. J. F. SPEYER, P. LENGVEL, C. BASILIO, A. J. WAHBA, R. S. GARDNER y S. OCHOA: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28,559 (1963).
129. M. W. NIRENBERG y otros: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31,11 (1966).
130. H. G. KHORANA y otros: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31,39 (1966).
131. A. J. WAHBA, M. SALAS y W. M. STANLEY Jr.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31,103 (1966).
132. F. H. C. CRICK: *J. Mol. Biol.* 19,548 (1966).
133. J. P. WALLER: *J. Mol. Biol.* 7,483 (1963).
134. K. A. MARCKER y F. SANGER: *J. Mol. Biol.* 8,835 (1964).
135. D. CASSIO y J. P. WALLER: *Eur. J. Biochem.* 5,33 (1968).
136. C. J. BRUTON y B. S. HARTLEY: *Biochem. J.* 108,281 (1968).
137. K. A. MARCKER: *J. Mol. Biol.* 14,63 (1965).
138. B. F. C. CLARK y K. A. MARCKER: *J. Mol. Biol.* 17,394 (1966).

139. B. F. C. CLARK y K. A. MARCKER: *Nature* 207,1038 (1965).
140. M. SALAS, M. J. MILLER, A. J. WAHBA y S. OCHOA: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57,1865 (1967).
141. J. M. ADAMS y M. R. CAPECCHI: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55,147 (1966).
142. R. E. WEBSTER, D. L. ENGELHARDT y N. D. ZINDER: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55,155 (1966).
143. E. VIÑUELA, M. SALAS y S. OCHOA: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57,729 (1967).
144. H. F. LODISH: *Nature* 220,345 (1968).
145. M. R. CAPECCHI: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55,1517 (1966).
146. J. M. ADAMS: *J. Mol. Biol.* 33,571 (1968).
147. M. TAKEDA y R. E. WEBSTER: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 60,1487 (1968).
148. W. M. STANLEY Jr. y A. J. WAHBA, *Methods in Enzymology* vol.12A p.524 (1967).
149. W. M. STANLEY, M. SALAS, A. J. WAHBA y S. OCHOA: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56,290 (1966).
150. M. SALAS, M. B. HILLE, J. A. LAST, A. J. WAHBA y S. OCHOA: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57,387 (1967).
151. M. REVEL, M. HERZBERG, A. BECAREVIC y F. GROSS: *J. Mol. Biol.* 33,231 (1968).
152. K. IWASAKI, S. L. SABOL, A. J. WAHBA y S. OCHOA: *Arch. Biochem. Biophys.* 125,542 (1968).
153. R. PARENTI-ROSINA, A. EISENSTADT y J. M. EISENSTADT: *Nature* 221,363 (1969).
154. M. J. MILLER, M. ZASLOFF y S. OCHOA: *FEBS Letters* 3,50 (1969).
155. J. W. B. HERSHEY, K. F. DEWEY y R. E. THACH: *Nature* 222,944 (1969).
156. A. J. WAHBA, Y. B. CHAE, K. IWASAKI, R. MAZUMDER, M. J. MILLER, S. L. SABOL y M. A. G. SILLERO: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34,285 (1969).
157. Y. B. CHAE, R. MAZUMDER y S. OCHOA: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 62,1181 (1969).
158. S. L. SABOL, M. A. G. SILLERO, K. IWASAKI y S. OCHOA: *Nature* 228,1269 (1970).
159. G. MANGIAROTTI y D. SCHLESSINGER: *J. Mol. Biol.* 20,123 (1966).
160. R. O. R. KAEMPFER, M. MESELSON y H. J. RASKAS: *J. Mol. Biol.* 31,277 (1968).
161. M. NOMURA y C. V. LOWRY: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58,946 (1967).
162. C. GUTHRIE y M. NOMURA: *Nature* 219,232 (1968).
163. J. S. ANDERSON, M. S. BRETSCHER, B. F. C. CLARK y K. A. MARCKER: *Nature* 215, 490 (1967).
164. P. LEDER y M. M. NAU: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58,774 (1967).
165. M. B. HILLE, M. J. MILLER, K. IWASAKI y A. J. WAHBA: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58,1652 (1967).
166. T. OHTA, S. SARKAR y R. E. THACH: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58,1638 (1967).
167. S. S. THACH y R. E. THACH: *Nature New Biol.* 229,219 (1971).
168. D. KOLAKOSKY, K. F. DEWEY, J. W. B. HERSHEY y R. E. THACH: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 61,1066 (1968).
169. J. C. LELONG, M. GRUNBERG-MANAGO, J. DONDON, D. GROS y F. GROS: *Nature* 226,505 (1970).
170. J. W. B. HERSHEY y R. E. THACH: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57,759 (1967).
171. A. R. SUBRAMANIAN y B. D. DAVIS: *Nature* 228,1273 (1970).
172. S. L. SABOL y S. OCHOA: *Nature New Biology* 234,233 (1971).
173. R. DE WACHTER, J. P. VERHASSEL y W. FIERS: *FEBS LETTERS* 1,93 (1968).
174. R. ROBLIN: *J. Mol. Biol.* 36,125 (1968).
175. R. DE WACHTER y W. FIERS: *Nature* 221,233 (1969).

176. M. A. BILLETER, J. E. DAHLBERG, H. M. GOODMAN, J. HINDLEY y C. WEISSMANN: *Nature* 224,1083 (1969).
177. J. A. STEITZ: *Nature* 224,957 (1969).
178. J. HINDLEY y D. H. STAPLES: *Nature* 224,964 (1969).
179. D. H. STAPLES, J. HINDLEY, M. A. BILLETER y C. WEISSMANN: *Nature New Biology* 234,202 (1971).
180. D. H. STAPLES y J. HINDLEY: *Nature New Biology* 234,211 (1971).
181. H. F. LODISH: *Nature* 226,705 (1970).
182. P. G. N. JEPPESEN, J. A. STETZ, R. F. GESTELAND y P. F. SPAHR: *Nature* 226,230 (1970).
183. W. T. HSU y S. B. WEISS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 64,345 (1969).
184. H. BERISSI, Y. GRONER y M. REVEL: *Nature New Biology* 234,44 (1971).
185. S. LEE-HUANG y S. OCHOA: *Nature New Biology* 234,236 (1971).
186. Y. GRONER, Y. POLLACK, H. BERISSI y M. REVEL: *Nature New Biology* 239,16 (1972).
187. C. T. CASKEY, B. REDFIELD y H. WEISSBACH: *Arch. Biochem. Biophys.* 120,119 (1967).
188. R. L. MILLER y R. SCHWEET: *Arch. Biochem. Biophys.* 125,632 (1968).
189. B. B. COHEN: *Biochem. J.* 115,523 (1969).
190. D. A. SHAFRITZ, P. M. PRICHARD, J. M. GILBERT y W. F. ANDERSON: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38,721 (1970).
191. P. M. PRICHARD, J. M. GILBERT, D. A. SHAFRITZ y W. F. ANDERSON: *Nature* 226,511 (1970).
192. D. A. SHAFRITZ y W. F. ANDERSON: *Nature* 227,918 (1970).
193. S. M. HEYWOOD: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34,799 (1969).
194. J. E. ALLENDE, R. E. MONRO y F. LIPMANN: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51,124 (1964).
195. Y. NISHIZUKA y F. LIPMANN: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55,212 (1966).
196. J. LUCAS-LEND y F. LIPMANN: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55,1562 (1966).
197. R. E. MONRO, B. E. H. MADEN y R. R. TRAUT, *Genetics Elements: Properties and Functions* (1967). Ed. D. Shugar, p.179 (New York, Academic Press).
198. A. PARMEGGIANI y E. M. GOTTSCHALK: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34,377 (1969).
199. J. LUCAS-LENARD y F. LIPMANN: *Ann. Rev. Biochem.* 40,425 (1971).
200. D. COOPER y J. GORDON: *Biochemistry* 8,4289 (1969).
201. J. GORDON, J. LUCAS-LENARD y F. LIPMANN, *Methods in Enzymology* vol.20c p.281 (1971).
202. J. GORDON: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 59,179 (1968).
203. B. E. H. MADEN, R. R. TRAUT y R. E. MONRO: *J. Mol. Biol.* 35,333 (1968).
204. A. L. HAENNI y J. LUCAS-LENARD: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 61,1363 (1968).
205. R. W. ERBE, M. M. NAU y P. LEDER: *J. Mol. Biol.* 39,441 (1969).
206. J. LUCAS-LENARD y A. L. HAENNI: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69,93 (1969).
207. J. MODOLELL, B. CABRER, A. PARMEGGIANI y D. VÁZQUEZ: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68,1796 (1971).
208. E. CUNDLIFFE: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44,912 (1971).
209. N. RICHMAN y J. W. BODLEY: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69,686 (1972).

210. G. P. TOCCHINI-VALENTINI, L. FELICETTI y G. M. RIVALDI: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34,463 (1969).
211. K. KINOSHITA, G. KAWAND y N. TANAKA: Biochem. Biophys. Res. Commun. 33,769 (1968).
212. A. S. SARABHAI, A. O. W. STRETTON, S. BRENNER y A. BOLLE: Nature 201,13 (1964).
213. M. R. CAPECCHI: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 58,1144 (1967).
214. E. SCOLNICK, R. TOMPKINS, C. T. CASKEY y M. W. NIRENBERG: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61,768 (1968).
215. G. MILMAN, J. GOLDSTEIN, E. SCOLNICK y T. CASKEY: Prgc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63,183 (1969).
216. J. GOLDSTEIN, G. MILMAN, E. SCOLNICK y T. CASKEY: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 65,430 (1970).
217. Z. VOGEL, A. ZAMIR y D. ELSON: Biochemistry 8,5161 (1969).
218. M. R. CAPECCHI y H. A. KLEIN: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34,469 (1969).
219. C. T. CASKEY, E. SCOLNICK, R. TOMPKINS, J. GOLDSTEIN y G. MILMAN: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34,479 (1969).
220. A. KAJI, K. IGARASHI y H. ISHITSUKA: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34,167 (1969).
221. H. ISHITSUKA y A. KAJI: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66,168 (1970).
222. J. L. NICHOLS: Nature 225,147 (1970).
223. D. C. HAWTHORNE: J. Mol. Biol. 43,71 (1969).
224. J. W. STEWART, F. SHERMAN, M. JACKSON, F. L. X. THOMAS y N. SHIPMAN: J. Mol. Biol. 68,83 (1972).
225. J. L. GOLDSTEIN, R. L. SINSHEIMER: J. Mol. Biol. 23,495 (1967).
226. G. N. GODSON y R. L. SINSHEIMER: J. Mol. Biol. 23,495 (1967).
227. Y. GRONER, R. SCHEPS, D. KOLAKOFSKY y M. REVEL: Nature New Biology 239,16 (1972).
228. T. SUGIYAMA y D. NAKADA: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57,1744 (1967).
229. H. D. ROBERTSON, R. E. WEBSTER y N. D. ZINDER: Nature 218,533 (1968).
230. K. EGGEN, M. P. DESCHGER y D. NATHANS: J. Mol. Biol. 39,293 (1969).
231. H. F. LODISH: Biochem. Biophys. Res. Commun. 37,127 (1969).
232. M. KOZAK y D. NATHANS: Bacteriological Rev. 36,109 (1972).



# CAPÍTULO IX

## *INTERACCIONES HISTONAS-DNA*

F. MONTERO

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN . . . . .	542
I. HISTONAS . . . . .	543
II. EVIDENCIAS DE LA INTERACCIÓN . . . . .	543
III. ESTUDIO ESTRUCTURAL . . . . .	546
1. Estructura primaria de histonas . . . . .	546
2. Estructura secundaria de histonas . . . . .	547
3. Métodos de estudio . . . . .	550
A) Experimentos de disociación . . . . .	550
B) Experimentos de valoración con ácidos . . . . .	550
C) Experimentos sobre la curva de transición de los complejos DNA-histonas . . . . .	550
D) Experimentos de unión a colorantes . . . . .	551
E) Diagnóstico estructural sobre disoluciones . . . . .	552
F) Diagnóstico estructural en fase sólida, Difracción de Rayos X . . . . .	553
IV. NATURALEZA DE LAS INTERACCIONES . . . . .	555

## INTRODUCCION

Se sabe que toda la información genética de los organismos vivos está incluida y es transmitida por medio del DNA. También es un hecho de sobra conocido y comprobado a través de innumerables experimentos que todas las células de un mismo organismo (aunque esté diferenciado) tienen su DNA idéntico. Pero en los organismos superiores existe un alto grado de diferenciación celular. Se comportan como si la información correspondiente al DNA de cada célula no se expresase de forma total, como si parte de esa información quedara sin transcribir. De cómo se verifica esta diferenciación, así como quiénes son los responsables de impedir esta transcripción total poco se sabe en nuestros días. La respuesta habrá que buscarla en alguno de los componentes del núcleo celular. Sean o no las verdaderas responsables, han sido las histonas de entre todos los componentes nucleares las más estudiadas en este sentido (1), y, dentro de todas sus posibles actividades, ha sido la inhibición de la transcripción del DNA al RNA la que mayor atención ha recibido como mecanismo de su función reguladora (2).

TABLA I

Algunas características de las distintas fracciones de histonas.

Fracción	Lys/Arg	res. bas/res. ádic.	Pm
F <sub>1</sub>	15,0	4,6	19.000
F <sub>2b</sub>	2,0	1,7	13.700
F <sub>2a1</sub>	1,1	1,4	9.000
F <sub>2a2</sub>	0,9	2,2	
F <sub>3</sub>	0,8	1,6	14.000

## I. HISTONAS

Las histonas, proteínas básicas del núcleo celular, presentes en las células de organismos eucarióticos, se pueden obtener hoy día con bastante facilidad y separarse electroforéticamente en cinco fundamentales fracciones (3). Algunas de las características principales de estas fracciones se muestran en la tabla I.

### Histonas como represores

Se presentan dos problemas fundamentales para que sean las histonas las responsables del hecho de la diferenciación celular, o por lo menos el instrumento para que sea impedida la total transcripción del DNA (4). El primero de ellos es el hecho de sobra conocido de su poca heterogeneidad molecular, demostrada tanto por su movilidad electroforética como por su composición de aminoácidos y su secuencia (3,4), si bien es verdad que ha sido demostrada recientemente la microheterogeneidad de algunas fracciones (5). El segundo de los problemas consiste en no haber sido demostrado todavía una verdadera especificidad de unión de las distintas fracciones al DNA, conducta esperada si fueran las verdaderas responsables de tal función. Pero, en todo caso, si las histonas tienen alguna función en el hecho de la represión, debe ser una consecuencia de las interacciones que tengan lugar entre ellas y el DNA, y los cambios estructurales a que daría lugar dicha interacción sería, por otra parte, una nueva posibilidad. De aquí se deriva el hecho de que estudiar las interacciones de las histonas al DNA sea considerado de mucho interés como una vía más para dilucidar el complejo problema de la diferenciación celular.

## II. EVIDENCIAS DE LA INTERACCION

El hecho de que las histonas sean capaces de precipitar al DNA nos induce a pensar en la existencia de algún tipo de interacciones. No hay ninguna prueba, en cambio, que nos demuestre que esta precipitación sea específica, ni que las histonas tengan especial preferencia por una zona determinada del DNA. Sin embargo, si se encontraron diferencias cuantitativas cuando se hicieron comparativamente precipitaciones con las distintas fracciones de histonas, y que esta precipitación

dependía de determinadas variables que fueron modificadas a lo largo de los experimentos (6). Así se comprobó que el DNA contenido en 5 ml de una solución a una concentración de 0,1 mg en cada mililitro precipitaba de forma total al añadir 0,4 ml de una disolución de fracción F1 de histonas (a una concentración de 1 mg en cada mililitro), mientras que eran necesarias cantidades superiores a 0,8 ml cuando la precipitación se realizaba con disoluciones de otras fracciones de histonas (a la misma concentración que la anterior), si bien las diferencias entre las cuatro fracciones restantes eran menores. Las histonas, por tanto, son capaces de interaccionar con el DNA conduciéndonos a asociaciones moleculares que precipitan, siendo esta precipitación cuantitativamente diferente según de qué fracción de histonas se trate, no pudiendo decir nada todavía sobre la posible existencia de una diferencia cualitativa en la naturaleza de la interacción.

Sin embargo, como ya apuntábamos anteriormente, la cantidad de DNA precipitado varía introduciendo modificaciones en los experimentos de precipitación. Mientras la precipitación de DNA con histona F<sub>1</sub> era considerable, según veíamos en el párrafo anterior, si a dicha fracción de histona se la somete previamente a una digestión enzimática los péptidos obtenidos son incapaces de precipitarlo, indicándonos esto que el tamaño molecular ha de jugar un papel importante. Sin embargo, si el DNA se ha incubado previamente con péptido, y posteriormente se le añade histona F<sub>1</sub> la precipitación tiene lugar mucho antes que en el caso en que no hubiera habido incubación. Estos experimentos dieron similares resultados cuando se realizaron con la fracción rica en arginina.

Otro de los factores estudiados es la influencia de la concentración de los interaccionantes sobre la precipitación, observando que conforme se aumenta tanto la concentración de DNA como la concentración de histonas tiene lugar la precipitación con mayor facilidad, y el péptido, que en experimentos anteriores era incapaz de precipitar al DNA, si aumentamos suficientemente la concentración de ambos, ésta tiene lugar en cantidades apreciables.

Los experimentos detallados anteriormente fueron realizados por Sluysen (7), que, a la vista de los resultados, propuso un modelo que, sin tener en cuenta la naturaleza de las interacciones que pudieran tener lugar, explica, sin embargo, cada uno de los hechos anteriores. Es un modelo cuya base es simplemente probabilística. Supone Sluysen que la precipitación ocurre debido a que las moléculas de histona entrecruzan a varias moléculas de DNA, tal como se puede observar en la figura 1.

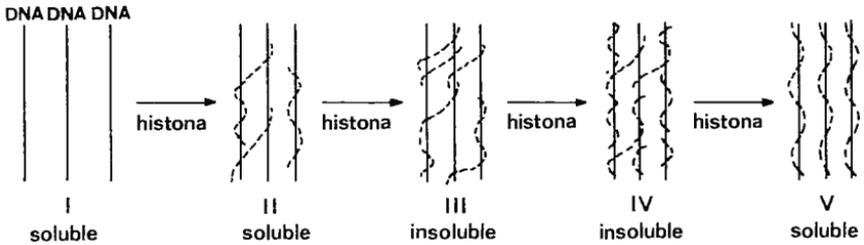


Figura 1

A poca cantidad de histona serán pocas las probabilidades de entrecruzamiento, ya que quedará la suficiente cantidad de cadena libre de DNA para que una molécula de histona se reasocie con solo una molécula de DNA. Pero conforme vayamos aumentando la concentración de histonas es mucha la probabilidad de que varias moléculas se entrecrucen al mismo tiempo con una misma molécula de DNA, quedando parte de la histona sin asociar, parte que buscará otra molécula de DNA con la cual interactuar. Es el caso del complejo III indicado en la figura, que será insoluble debido a su gran tamaño. Sin embargo, cuando hay excesiva cantidad de histona, se produce una redisolución del complejo, debido a que una molécula de histona colocada sobre una molécula de DNA es muy improbable que encuentre libre otro trozo de cadena de un DNA distinto, ya que probablemente estará ocupado. Este es el caso del complejo V, soluble indicado en la figura. Cuando tenemos DNA y péptido a baja concentración, se formará complejo soluble II, ya que el péptido tiene una cadena relativamente pequeña y sería baja la probabilidad de entrecruzamiento. En cambio, cuando se añade una cantidad suficiente de histona  $F_1$ , se forma un complejo insoluble III. A altas concentraciones de péptido y DNA, las moléculas estarán más próximas entre sí y, como consecuencia, el entrecruzamiento puede llegar a ser posible. Si hemos hecho una previa incubación del DNA con el péptido, muchas posiciones de la molécula de DNA estarán ya ocupadas y, por tanto, lo probable es que la histona se asocie a más de una molécula de DNA, produciendo un mayor entrecruzamiento a una concentración menor que si el DNA no se hubiera incubado previamente con el péptido.

El hecho de que sea la fracción  $F_1$  la que precipite más fácilmente al DNA lleva implícito, según este modelo, que es la fracción que forma más entrecruzamiento. Esta suposición viene confirmada por la propia conformación de la proteína, como veremos en los siguientes apartados.

### III. ESTUDIO ESTRUCTURAL

Una vez demostrada de forma clara la existencia de una interacción entre la histona y el DNA y antes de tratar de explicar la posible naturaleza de estas interacciones nos conviene tener en cuenta los cambios estructurales a que está sometido el complejo DNA-histona, así como las propias posibilidades estructurales de los interaccionantes, que de una forma u otra nos van a influir en la estructura final del complejo, y que posiblemente tendrán una alta implicación biológica. Pasaremos por alto el estudio estructural del DNA para fijarnos exclusivamente en la molécula de histona, y posteriormente en el complejo DNA-histonas, que serán consideradas desde distintas técnicas de experimentación.

#### 1. Estructura primaria de histonas

Aunque no se conoce la secuencia completa de todas las fracciones de histona, en cambio, se observa, sin más que considerar la proporción de aminoácidos, una clara diferencia entre unas fracciones y otras. Una distinta proporción de arginina, lisina, aminoácidos ácidos, prolina, etcétera puede ser observada en las distintas fracciones. Es también interesante señalar en este apartado, para razonamientos posteriores, algunos datos sobre la distribución de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica de algunas fracciones. Así, la mitad amino terminal de la fracción  $F_{2a1}$  es muy similar en su distribución de aminoácidos que la fracción carboxilo terminal de la fracción  $F_1$  (8). La principal diferencia radica en que la glicocola es la fracción  $F_{2a1}$  es sustituida por prolina en la fracción  $F_1$ . Ambas mitades tienen una alta proporción de residuos básicos y se ha sugerido que son estos trozos de moléculas los primeros implicados en una interacción al DNA por simple atracción electrostática. Pero teóricamente esto tiene grandes dificultades, debido a la irregular distribución de estos residuos básicos y a la coincidencia de bases contiguas. Otro hecho es la también similitud de la mitad carboxilo terminal de la fracción  $F_{2a1}$  con la mitad amino terminal de la fracción  $F_1$ , excepto en los residuos aromáticos. A esta mitad carboxilo terminal de la fracción  $F_{2a1}$  se ha sugerido como responsable de la conformación que la proteína adquiere cuando se encuentra aislada, sin interaccionar con el DNA (9).

## 2. Estructura secundaria de histonas

Las diferencias observadas en la estructura primaria han de quedar reflejadas sin duda en la estructura secundaria. Los datos obtenidos con técnicas de dispersión rotatoria óptica (10) indicaban que todas las fracciones se encontraban en conformación de cadena estadística cuando estaban disueltas en agua, y que, conforme se aumentaba la fuerza iónica del medio, había un marcado incremento en los parámetros de D.R.O., excepto en la fracción  $F_1$ , en la cual dicho incremento fue mucho menos acusado. También se producía este incremento cuando las distintas fracciones se ponían en un medio favorable para la formación de  $\alpha$ -hélice (por ejemplo, se suspendían en 2-cloroetanol), incremento que de forma similar a como ocurría en el caso del aumento de fuerza iónica, para la fracción  $F_1$  fue mucho menos acusado. Sin embargo, fue preciso combinar estos datos con los obtenidos por otras técnicas para poder sacar conclusiones más claras y definidas. Los espectros de infrarrojo nos pueden dar una idea a este respecto. Aparecen en dichos espectros dos bandas amidas claramente definidas (I y II). La banda I aparece a  $1.630\text{ cm}^{-1}$  y corresponde al hecho de estar implicados estos restos en trozos de forma  $\beta$ ; mientras que la banda II, que aparece entre  $1.640$  y  $1.660\text{ cm}^{-1}$ , es la correspondiente a la conformación  $\alpha$ -hélice. Hay que dejar bien claro que esta técnica nunca nos puede dar una información exacta sobre la proporción que de ambas conformaciones existen en una molécula, pero sí sobre variaciones relativas de ambas formas. Así, se observa una alta proporción de forma  $\beta$  para la fracción  $F_1$ , en comparación con las demás fracciones, proporción que aumenta cuando el espectro se hace en presencia de 2-cloroetanol (10). Parece, pues, como si la forma  $\beta$  fuera propia de la fracción  $F_1$ , mientras que en las demás fracciones existiese una mezcla de cadena estadística y  $\alpha$ -hélice.

Un dato interesante para los fines que perseguimos es conocer qué residuos de aminoácidos están directamente implicados en las regiones de  $\alpha$ -hélice en disoluciones acuosas de alta fuerza iónica. Se puede pensar que el aumento de  $\alpha$ -hélice, al incrementar la fuerza iónica del medio, se debe a la disminución de repulsión electrostática debida a los laterales de cadena cargados. La fracción  $F_3$  posee, al mismo tiempo que muchos residuos básicos, una alta proporción de ácidos (11). Realizando cambios de pH se observa que la neutralización de ambos grupos incrementa la proporción de  $\alpha$ -hélice. Para la  $F_1$  existe en cambio, muy pequeña

variación, apoyando las anteriores hipótesis. Una información adicional respecto a qué restos están implicados en estas transformaciones no las ofrecen los espectros de resonancia magnética nuclear. Los protones de los residuos implicados en segmentos de  $\alpha$ -hélice tienen menos posibilidad de movimiento que los correspondientes a un segmento de cadena estadística, debido al entorno relativamente rígido que le rodea, traduciéndose en un ensanchamiento del pico correspondiente cuando se verifica el espectro de resonancia magnética nuclear (10). Así se observa, por ejemplo, que, cuando se aumenta la fuerza iónica del medio, los picos asignados a restos de leucina, isoleucina y valina sufren un ensanchamiento considerable y una disminución en la altura del pico, indicándonos que son estos residuos los fundamentalmente implicados en los segmentos en los cuales ocurre una transición desde cadena estadística a  $\alpha$ -hélice cuando se aumenta la fuerza iónica del medio. En cambio, si los experimentos se realizan con la fracción de histonas rica en lisina, se observa un escaso ensanchamiento de los picos, indicándonos una escasa transición.

Por otra parte, sabemos que cada vuelta completa de  $\alpha$ -hélice contiene 3,6 aminoácidos, de forma que, al cabo de cinco vueltas exactas (18 aminoácidos), un resto ha de estar exactamente en la proyección de otros separados entre sí 18 lugares en la secuencia de la proteína. Si trasladamos estas consideraciones a la fracción de histonas  $F_{2a1}$  (cuya secuencia se muestra en la figura 2), observamos que los segmentos correspondientes a una mayor potencialidad para la formación de  $\alpha$ -hélice son en primer lugar el comprendido entre los aminoácidos 72 al 90, seguido de los segmentos 91-108 y 109-126, debido a su alta proporción de residuos apolares que pueden realizar entre sí interacciones hidrofóbicas, estabilizando la  $\alpha$ -hélice, ocurriendo precisamente lo contrario en los segmentos 1-18 y 19-36, donde la gran proporción de residuos básicos hará muy difícil la estabilización de esta estructura. El contenido en  $\alpha$ -hélice esperado teóricamente con este modelo está plenamente en concordancia con los datos obtenidos por D.R.O.

Si, efectivamente, es la parte carboxilo terminal de la molécula de  $F_{2a1}$  la que interviene fundamentalmente en el cambio estructural, al hacer espectros de resonancia magnética nuclear serán precisamente los picos asignados a aminoácidos que predominen en esta mitad los que mayores cambios sufrirán conforme se vaya variando la fuerza iónica del medio. Y, en efecto, así ocurre; los picos correspondientes a la fenilalanina, tirosina e histidina se ensanchan y llegan casi a desaparecer

si aumentamos suficientemente la fuerza iónica, mientras que el pico correspondiente a la glicocola (aminoácido que se encuentra preferentemente en la mitad amino terminal) no sufre apenas variación. Si estos experimentos, en cambio, se llevan a efecto con la fracción  $F_1$ , no se observan cambios tan bruscos, aunque de hecho hay variaciones en algunos picos, ya que, si bien es verdad que esta fracción se encuentra preferiblemente en forma  $\beta$ , no se puede excluir la existencia de algo de  $\alpha$ -hélice, siendo también en este caso las regiones ricas en residuos apolares las que más intervienen.

Parece, pues, bien establecido que la fracción  $F_1$  de histonas toma en solución fundamentalmente la forma extendida  $\beta$ . Falta por saber si adopta esta misma estructura «in vivo». Se pudieron obtener desoxirribonucleoproteínas parcialmente liberadas de histonas por extracción salina y se observó que deuteroando los hidrógenos lábiles de la fracción  $F_1$  se sustituían rápidamente, hecho que no tenía lugar con el resto de las fracciones (11). Este hecho induce a pensar en la no implicación de  $\alpha$ -hélice en la fracción  $F_1$  cuando se encuentra asociada al DNA «in vivo» y, en cambio, su predominancia en las demás fracciones. Esta conclusión es concordante y apoya completamente al modelo de Sluyser, en el cual se veía la mayor facilidad de la fracción  $F_1$  para formar entrecruzamiento con moléculas de DNA. La forma extendida  $\beta$  no cabe duda que ofrece una mayor facilidad a este respecto que la  $\alpha$ -hélice. En vista de estos condicionamientos estructurales, y en el deseo de extrapolarlos a los fenómenos que «in vivo» puedan tener lugar, se ha sugerido que posiblemente sea esta fracción de histona la responsable de la transición que en el núcleo celular tiene lugar de cromatina difusa a cromatina densa (12). Por lo que a otras fracciones se refiere, Jirgenson y Hnilica (13) han demostrado que existe un idéntico efecto de aumento de  $\alpha$ -hélice, al aumentar la fuerza iónica, que si se añade DNA a las disoluciones de histonas; por lo que se puede arriesgar a pensar que las conclusiones sacadas hasta ahora puedan ser extrapoladas (con las limitaciones lógicas) a «in vivo». Por otra parte, el contenido en hélice en una disolución de histonas totales en  $\text{ClNa}$  1 M es del 23 por 100, valor muy similar al tanto por ciento calculado para una desoxirribonucleoproteína nativa (14). Otros datos adicionales (15) afirman también la hipótesis de que las regiones que sufren el cambio estructural a hélice por efecto de la fuerza iónica son las mismas que las que la hacen bajo la acción del DNA, conteniendo estas regiones, como ya dijimos anteriormente, una alta proporción de residuos apolares. Además

parece bastante lógico pensar, en primera aproximación, que son las regiones que permanecen en forma de cadena estadística las que probablemente se unan más fácilmente al DNA por medio de interacciones electrostáticas, mientras que las zonas en hélice pueden estar implicadas en interacciones hidrofóbicas con otras moléculas de proteína para formar agregados de orden superior, o bien formar interacciones hidrofóbicas con las mismas u otras moléculas de DNA.

### 3. Estudio de los complejos DNA-histonas

Hasta nuestros días ha sido abordado el problema desde innumerables técnicas que trataremos de enumerar brevemente y hacer una implícita discusión de las mismas, así como de las conclusiones que se pudieran sacar.

#### A) EXPERIMENTOS DE DISOCIACIÓN

Se han hecho numerosos experimentos de disociación sobre los complejos de desoxirribonucleoproteínas, añadiendo cada vez concentraciones más elevadas de  $\text{ClNa}$ , siendo la separación gradual e irregular y no verificándose de una forma continua (16). Si analizamos el tipo de histonas que van quedando unidas al DNA a las distintas concentraciones de  $\text{ClNa}$ , observamos que es la fracción  $F_1$  la que antes se separa, y lo hace de forma selectiva, mientras que en las demás fracciones no existe mucha especificidad en la separación. Es paradójico el hecho de que sea la fracción  $F_1$  la que antes se separa, a pesar de que es la fracción que con mayor facilidad precipita el DNA.

#### B) EXPERIMENTOS DE VALORACIÓN CON ÁCIDOS

Murray (17) observó que a pH 2,6 se separaba la fracción  $F_1$ , y a menores valores de pH se van separando, si bien de una forma no completamente selectiva, las distintas fracciones.

#### C) EXPERIMENTOS SOBRE LA CURVA DE TRANSICIÓN DE LOS COMPLEJOS DNA-HISTONAS

El primer hecho importante que se observa en las curvas de transición de los complejos DNA-histona es que aparece una bifasicidad,

dando lugar a dos temperaturas de transición. La más baja de ambas experimenta una variación creciente conforme los complejos tienen mayor proporción de histonas, mientras que la temperatura de transición superior permanece prácticamente constante a las distintas proporciones. La hipercromicidad total era similar en todos los complejos. Junto con estos datos, Olins (18) saca una serie de conclusiones que nos es conveniente mencionar. Es probable que la alta temperatura de transición corresponda a regiones de íntima interacción de la histona al DNA, ya que la doble hélice estará más estabilizada. Su constancia sugiere que forma una estructura similar a todas las proporciones. Sin embargo, es más difícil aventurar las posibles causas de la variación de la temperatura de transición menor, aunque se sospecha que ocurra un fenómeno similar a cuando se añaden cationes mono y divalentes a disoluciones de DNA, estabilizando la repulsión de los fosfatos y, en consecuencia, la doble hélice del DNA. Otro hecho interesante que merece la pena mencionar es que, a pesar de la constancia del alto punto de transición, cambia, sin embargo, considerablemente si al medio se le añade metanol. Entonces se observa un decrecimiento brusco, decrecimiento que hace suponer la existencia en la zona de íntima unión de la histona al DNA interacciones no solamente polares, sino también apolares en dicha asociación. Por tanto, y refiriéndonos a este dato concreto, la existencia de interacciones hidrofóbicas es perfectamente posible.

#### D) EXPERIMENTOS DE UNIÓN A COLORANTES

Sobre la base del amplio conocimiento que actualmente se tiene de la unión de diversos colorantes (fundamentalmente actinomicina D y bromuro de etidio a la molécula de DNA (19), Olins realizó una serie de experimentos que tenían como objeto observar la influencia que tenían las histonas acomplejadas al DNA sobre los parámetros de unión. En los resultados obtenidos se pudo observar que, concretamente la fracción  $F_1$  de histonas, no afectaba prácticamente a los parámetros de unión de la actinomicina D, no pudiendo decir lo mismo con respecto al bromuro de etidio, donde dichos parámetros tenían una clara dependencia con respecto a la proporción de historia unida al DNA. Está bien establecido (20) que, para que la actinomicina D se una al DNA, éste ha de encontrarse en forma doble helicoidal. Por otra parte, a partir de datos obtenidos por diagnosis estructural en fase sólida con difracción

de rayos X se ha afirmado la idea de que la actinomicina D se une formando puentes de hidrógeno con la desoxiguanidina en el surco estrecho del DNA. Puede ser, pues, que la histona  $F_1$  se encuentre unida al surco ancho del DNA, por lo que no afectaría a la unión con la actinomicina D. Se podría pensar que la actinomicina D desplazase completamente a la histona, dándose una situación de equilibrio. Parece, sin embargo, improbable que esto ocurra así, ya que el bromuro de etidio que tiene una constante de unión unas tres veces superiores a la actinomicina D, no es capaz de desplazar a la histona.

También se sabe (21) que el bromuro de etidio se une al DNA intercalándose en su estructura entre dos pares de bases consecutivas. La fracción  $F_1$  inhibe la unión; en cambio, no altera la constante de unión. Esto nos induce a pensar que el colorante no puede unirse al DNA en las regiones en que éste está unido a la histona. No se conoce, sin embargo, el mecanismo de la unión. Olins asegura que pudiera tratarse de un bloqueo de los sitios de unión por alteración de la flexibilidad del DNA, o bien impidiendo la interacción entre el bromuro de etidio y los fosfatos del nucleótido. Con todo, estudios realizados con nucleohistona total demuestran que sólo posee la mitad de sitios disponibles para la interacción con la actinomicina. Puede ser que otras fracciones de histonas sean inhibitoras efectivas de la unión. No obstante, existen hechos recientes que reafirman la creencia de que las histonas se unen precisamente al surco ancho de DNA. De hecho, la molécula de dibromuro N,N,N-trimetil,N',N'-dimetil,N'-( $\rho$ -2,4-dinitroanilinoetil)-1,3-diamonio-propano, que se une exclusivamente al surco estrecho del DNA, no interfiere en absoluto en la transcripción, hecho que nos hace suponer que la regulación de este paso se verifica precisamente en el surco ancho del DNA (22).

#### E) DIAGNOSIS ESTRUCTURAL SOBRE DISOLUCIONES

Interesantes experimentos de asociación de histonas a DNA con su consiguiente estudio estructural por medio de dicroísmo circular fueron realizados por G. D. Fasman y colaboradores (29, 30). Al representar las variaciones de elipticidad en las curvas de dicroísmo circular de complejos  $F_1$  — DNA, se obtienen curvas sigmoides que sugieren que hay transiciones estructurales cooperativas implicadas en la formación de agregados específicos, asociados con cambios con-

formacionales del DNA. Otro hecho interesante es que una pequeña cantidad de  $F_1$  unida al DNA impide que se produzcan cambios estructurales inducidos por la asociación de  $F_{2a1}$ , fenómeno que no ocurre si se opera al revés. Estos datos están en abierta contradicción con los obtenidos en experimentos de disociación, en los cuales es la fracción  $F_1$  la que antes se separa, y se explica en cierto modo en función de que la fracción  $F_1$  sea la que verdaderamente induzca la conformación del DNA, ayudando las demás fracciones a mantenerla, de tal modo que, si selectivamente separamos esta fracción, el DNA sigue conservando su estructura.

Cuando histona  $F_1$  se fragmenta por acción de N bromo succinimida, da como resultado dos especies moleculares: la parte N-terminal de la molécula, de bajo peso molecular y poca proporción de lisina que acompañado al DNA no causaba sustanciales cambios estructurales, y la parte C-terminal, muy básico, que tenía mucha mayor efectividad en el cambio conformacional del DNA que la molécula de  $F_1$  intacta, pareciendo, pues, que la parte N-terminal de la molécula modera este efecto.

#### F) DIAGNOSIS ESTRUCTURAL EN FASE SÓLIDA. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

El diagrama obtenido a bajo ángulo de reflexión como consecuencia de exponer a la difracción de rayos X a una muestra de desoxirribonucleo-histona es perfectamente comparable al obtenido de una estructura superhelicoidal (23). A partir de dichos espectros de difracción se puede calcular las magnitudes fundamentales de la superhélice, resultando tener un diámetro de  $120 \text{ \AA}$  y una distancia entre paso de rosca de  $100 \text{ \AA}$ . Para ver hasta qué punto intervenían las historias en la formación y estabilización de esta superhélice, se realizaron dos tipos de experimentos (23). El primero de ellos consistió en realizar una disociación, en la cual las histonas fueron gradualmente separadas de la nucleohistona total incrementando la concentración salina, e ir midiendo su estado de superhelicidad realizando espectros de difracción de las asociaciones residuales. Se observó que, a partir de una concentración de  $\text{CINa } 1,1 \text{ M}$ , el espectro mostraba ausencia completa de superhélice, pero que, en cambio, seguían presentes las reflexiones características de un DNA doble helicoidal. El segundo de los experimentos consistió en realizar reconstrucciones de nucleohistonas a partir de sus componentes, mezclando DNA

e histona total a pH 7 y en ClNa 2 M y posterior diálisis. La nucleohistona obtenida se sometió a difracción de rayos X y se observó que la superhélice estaba perfectamente reconstruida.

Con el fin de averiguar qué fracciones concretamente eran las que influían de forma determinante en la formación de esta estructura, se realizaron los experimentos de reasociación, pero llevándolos a cabo, no con histona total, sino separadamente, con las distintas fracciones. Se observó que únicamente la fracción  $F_1$  no era capaz de contribuir a la formación de superhélice. Está, por lo tanto, bastante claro que una diferencia al menos en contribución estructural existe entre la fracción muy rica en lisina y el resto de las histonas, diferencia estructural que es muy posible que se refleje en un distinto cometido funcional.

Para tener una idea, al menos teórica, de en qué estructura las histonas se pueden unir al DNA con mayor contribución a establecer un complejo estable, se construyeron modelos moleculares (23) de la fracción  $F_{2a1}$  en diversas conformaciones. Si la proteína se encuentra en estado globular, sus grupos hidrofóbicos estarían hacia el interior de la molécula, y los residuos básicos al exterior. El diámetro sería en todos los casos menor que 40 Å, y si se une al DNA en esta conformación, no ocuparía más que de una a tres vueltas de la doble hélice, y el número de interacciones electrostáticas sería pequeño debido a esta disposición espacial. Será, pues, difícil, al menos teóricamente, que la proteína en esta estructura contribuya a la superhélice. Sin embargo, si se construye el modelo tal como se encuentra en disolución, con una zona (la carboxilo-terminal) con alta proporción en  $\alpha$ -hélice, y el resto de la molécula en cadena estadística, las regiones básicas de esta última zona pueden unirse fácilmente al DNA. Es la estructura más apropiada para dar lugar a la superhélice. El mecanismo, en cambio, por el cual se forma esta estructura es desconocido.

Johns ha sugerido (24) que la configuración superhelicoidal no permite la acción de la RNA polimerasa y, por tanto, inhibe la transcripción. Esta sugerencia viene apoyada por el hecho de que es precisamente la fracción  $F_1$ , la cual veíamos que era incapaz de formar superhélice, la que menos inhibe la transcripción en experimentos «in vitro». Esto no quiere decir ni mucho menos que esta razón de superhelicoidalidad sea la única a tener en cuenta, sobre todo si extrapola a las condiciones «in vivo», donde el fenómeno ha de tener, sin duda, una mayor complejidad, aunque se puede postular que, cuando es necesaria la transcripción, en el núcleo celular ocurre una relajación de la estructura superhelicoidal

del complejo, no necesariamente separándose la histona, pero sí, por ejemplo, ocurriendo una transición de su conformación a un estado en que su contribución a la superhélice sea mínima. Por tanto, según este modelo, la fracción  $F_1$  tendría fundamentalmente un papel estructural, mientras que el resto de las fracciones intervendrían de una forma más directa en la regulación de la transcripción.

#### 4. Naturaleza de las interacciones

Parece bastante evidente que las fuerzas electrostáticas juegan un importante papel. Aparte de los hechos vistos, que nos inducen a realizar la anterior afirmación, existen otros que hay que tener en cuenta:

a) En la nucleohistona nativa, el número de fosfatos pertenecientes al DNA es aproximadamente igual que el número de residuos básicos de la histona unida a él (25).

b) Los residuos básicos de la histona  $F_1$  neutralizan los fosfatos del DNA. El 80 por 100 de los residuos básicos de histona no se neutralizan en experimentos potenciométricos cuando están unidas al DNA (26).

c) El entrecruzamiento producido por las histonas puede ser debido a la existencia de puentes salinos, pues es un hecho que, al disminuir la fuerza iónica, decrece la precipitación.

Hay otros hechos, en cambio, que parecen demostrar la participación de interacciones de tipo hidrofóbico:

a') La proporción de residuos apolares es muy grande en la fracción  $F_{2a1}$ . La  $\alpha$ -hélice se puede acoplar muy bien al surco ancho del DNA.

b') El descenso considerable de la temperatura de desnaturalización del complejo  $F_1$ -DNA, cuando la curva de transición se hace en presencia de metanol.

Parece, pues, bastante probable la existencia de una cooperación de distintas clases de fuerzas para la estabilización del complejo. Hasta ahora ninguna por sí sola nos resuelve el problema de la especificidad. La represión por histonas es un hecho comprobado por numerosos experimentos realizados «in vitro». La diferente capacidad represora de las distintas fracciones está también de sobra comprobada. También las implicaciones estructurales que su unión al DNA trae consigo. Sin embargo, parece ser que las histonas no nos van a resolver por sí

solas el problema de la especificidad; no hay todavía ninguna razón que nos induzca a pensar que vayan a unirse a una parte determinada y no a otra de la molécula de DNA. Sin embargo, hay que tener en cuenta que tanto la separación de histonas en el complejo como la variación de sus conformaciones se han llevado a cabo con cambios profundos de la fuerza iónica, del pH o de otros factores. En el propio medio fisiológico de la célula es muy extraño que esto pueda suceder. Pero existe otra posibilidad de modificación que todavía no hemos apuntado, tal como es la propia modificación química de la histona, induciendo esta modificación a otros cambios, bien de naturaleza estructural, bien sobre las propias interacciones de las histonas al DNA. «In vivo», las histonas pueden estar sometidas a dos fundamentales modificaciones químicas, habiendo sido detectados inclusive los sistemas enzimáticos que intervienen (27). La fosforilación de los grupos hidroxilo de la serina o treonina y la acetilación de los grupos  $\alpha$  y  $\epsilon$ -amino son fenómenos muy extendidos, especialmente en algunas fases del desarrollo celular, como en la sustitución de histonas por protaminas que tiene lugar en el esperma de salmón, donde estos dos procesos se encuentran profundamente intensificados.

En la histona  $F_{2a1}$ , cuya secuencia es conocida, los sitios de fosforilación y acetilación residen en la región amino terminal de la molécula. En el caso de que ocurriera la modificación química a que nos estamos refiriendo, tendría lugar una variación de la carga neta, disminuyendo, y, por tanto, la posibilidad de interacción electrostática sería menor; como consecuencia, se debilitaría su unión al DNA, al mismo tiempo que probablemente cambiaría la estructura de la histona, ya que, al ser suprimidas las repulsiones electrostáticas, se estabilizaría la  $\alpha$ -hélice. Por otra parte, en experimentos llevados a cabo con polilisina acetilada en diversas proporciones, se ha observado que las curvas de transición de los complejos resultantes de reasociar estos polimeros con DNA sufren considerables modificaciones dependientes del grado de acetilación del polipéptido (28), indicándonos que se ha modificado sensiblemente la región de íntima interacción entre los componentes y afirmándonos en la idea de que el estudio de las modificaciones químicas referidas han de ser, en el futuro, punto fundamental de atención en la investigación que hacia tal propósito se dirija.



## BIBLIOGRAFIA

1. E. STEDMAN y E. STEDMAN: *Nature* 152,546 (1943).
2. K. MURRAY: *Ann. Rev. Biochem.*, 34,20 (1965).
3. E. W. JOHNS, en *Histones and Nucleohistones*, ed. por D. M. P. Phillips (Plenum Press, London and New York 1971), p. 1.
4. D. M. P. PHILLIPS, en *Histones and Nucleohistones*, ed. por D. M. P. Phillips (Plenum Press, London and New York 1971), p.47.
5. J. M. KINKADE y R. D. COLE: *J. Biol. Chem.*, 221,5798 (1966).
6. E. W. JOHNS y S. FORRESTER: *Biochim. Biophys. Acta* 209,54 (1970).
7. M. SLUYSER: *Biochim. Biophys. Acta* 199,490 (1970).
8. M. BOUBLIK y E. M. BRADBURY: *Eur. J. Biochem.* 14,486 (1970).
9. R. J. DE LANGE y J. BONNER: *J. Biol. Chem.* 224,319 (1969).
10. E. M. BRADBURY y R. M. STEPHENS: *J. Mol. Biol.* 29,507 (1967).
11. H. J. CRUFT y E. STEDMAN: *Nature* 180,1107 (1957).
12. V. C. LITTAW y V. G. ALLFREY: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54,1204 (1965).
13. B. JIGERSONS y L. S. HNILICA: *Biochim. Biophys. Acta* 109,241 (1965).
14. E. FREDERIQ y C. HOUSSIER: *Eur. J. Biochem.* 1,51 (1967).
15. E. FREDERIQ, en *Histones and Nucleohistones*, ed. por D. M. P. Phillips (Plenum Press, London and New York 1971), p.135
16. D. FAMBROUGH y J. BONNER: *Biochim. Biophys. Acta* 154,601 (1968).
17. K. MURRAY: *J. Mol. Biol.* 39,125 (1969).
18. E. OLINS: *J. Mol. Biol.* 43,439 (1969).
19. E. REID y I. H. GOLDBERG: *Nature* 196,743 (1962).
20. E. REICH y I. H. GOLDBERG, en *Progress in Nucleic Acid Research*, ed. por J. N. Davidson y W. E. Cohn, vol.3 (Academic Press, New York 1964), p.183.
21. J. B. LE PECQ y C. PAOLETTI: *J. Mol. Biol.* 27,87 (1967).
22. J. FARBER y E. J. GARBAY: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 43,675 (1971).
23. B. M. RICHARDS y JOHN F. PARDON: *Exp. Cell Research* 62,184 (1970).
24. E. W. JOHNS: *Ciba Foundation Symposium on Homeostatic Regulators* (Churchill, London 1969), p.128
25. J. BONNER y J. WIDHOLM, en *Methods in Enzymology XII: Nucleic Acids*, part B. Ed. por L. Grossman y K. Malvade (Academic Press Inc., New York and London 1968), p.3.
26. I. O. WALKER: *J. Mol. Biol.* 14,381 (1965).
27. V. G. ALLFREY, en *Histones and Nucleohistones*, ed. por D. M. P. Phillips (Plenum Press, London and New York 1971), p.241
28. A. DI MEO y M. SAVINO: *Biochim. Biophys. Acta* 240,326 (1967).
29. T. Y. SHIH y G. D. FASMAN: *Biochemistry* 11 (3) 398 (1972).
30. G. D. FASMAN y A. J. ALDER, *Biochemistry* 10 (20) 3795 (1971).



## CAPÍTULO X

### *INTERACCIONES MOLECULARES ENTRE CONSTITUYENTES DE CROMOSOMAS*

L. FRANCO

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN . . . . .	560
I. COMPOSICIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO . . . . .	560
II. INTERACCIONES DNA-RNA . . . . .	565
III. INTERACCIONES DNA-PNH . . . . .	567
IV. INTERACCIONES HISTONA-RNA . . . . .	569
V. INTERACCIONES HISTONA-PNH . . . . .	569
VI. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA CROMATINA . . . . .	570
VII. ESTRUCTURA DE CROMOSOMAS . . . . .	574

## INTRODUCCION

Como se ha demostrado en numerosas ocasiones, las histonas son capaces de reprimir la transcripción (1), pero los datos obtenidos hasta la fecha no dan cuenta de la especificidad con que esta represión debe tener lugar en los seres vivos. Pero las histonas no constituyen el único tipo de sustancias asociadas al DNA en el material genético, por lo que habrá que buscar entre los demás componentes de este material o en su propia organización la razón de la represión específica, que no puede atribuirse a las histonas por sí solas.

De esta manera puede centrarse el contenido de la presente revisión. Aunque su objeto primario sean las interacciones entre los componentes del material genético, tales interacciones se estudiarán en íntima concomitancia con el problema, aún no resuelto, de la represión genética. Buscar esta relación íntima entre una cuestión de índole puramente fisicoquímica — como pueden ser las interacciones moleculares en el caso presente — y sus implicaciones biológicas es una actitud común a casi todos los estudios de biología molecular y es, quizá, una de las razones que más han contribuido al desarrollo de esta última.

### I. Composición del material genético

Partiendo de esta base, será necesario comenzar por considerar cuáles son los componentes que, junto con el DNA nuclear, forman parte del material genético. Ya que éste se condensa en estructuras discretas, constantes para cada especie, en el momento de la división nuclear, el estudio de los cromosomas parece la vía más inmediata para investigar los componentes asociados al DNA. Es posible, mediante centrifugación diferencial, aislar cromosomas de células en metafase (2, 3) pero, evidentemente, esto ha de hacerse a partir de células cuya división esté sincronizada o bien a partir de cultivos tratados con sustancias antimitóticas, como la colchicina, que detienen el ciclo celular al llegar a la metafase. Esto limita la obtención de cromosomas al caso de células eucarióticas que puedan cultivarse «in vitro».

TABLA I

## COMPOSICION QUIMICA DE CROMOSOMAS AISLADOS DE CELULAS EN METAFASE

Material biológico	DNA	RNA	Proteínas			Ref.
			Histona	PNH	Total	
Tumor ascítico L2.....	13.5	13.5			68.3	(4)
HeLa S3.....	15.7	10.4	31.4	42.5	73.9	(5)
Los resultados se expresan en tanto por ciento en peso de cada componente.						

El análisis de cromosomas aislados (Tabla I) denota la existencia de DNA, RNA y proteínas. Los datos obtenidos por análisis químico son compatibles con los que arrojan las técnicas citoquímicas (6). La naturaleza del RNA presente en el material genético ha sido objeto de numerosas controversias. Aunque más adelante se vuelva sobre esta cuestión, puede adelantarse que, en principio, sólo una parte reducida de él podría considerarse como RNA cromosomal específico. El resto está asociado al DNA como consecuencia de la transcripción y será mRNA y, fundamentalmente, rRNA. Sin embargo, la presencia de rRNA en cromosomas en metafase no es el resultado de una agregación casual, ya que la relación RNA/DNA en cromosomas es siempre constante. Hearst y Botchan (7) han sugerido recientemente que debe existir alguna relación entre la desaparición del nucleolo antes de la metafase y el paso de rRNA a la estructura cromosomal, aunque su papel exacto en ésta última no se conozca.

Algo menos de la mitad de las proteínas cromosomales son histonas, y el resto está constituido por una serie muy heterogénea de especies moleculares que, a lo largo de esta revisión, se agrupará bajo el nombre genérico de proteína no histona (PNH)(\*)).

La segunda posibilidad de estudio del material genético se basa en el hecho de que el tiempo que transcurre entre dos mitosis sucesivas es mucho mayor que el empleado en una división nuclear. Por ello, en una colección numerosa de células no sincronizadas (como puede ser un

(\*) Se prefiere esta denominación a la de «proteínas ácidas».

cultivo normal o un tejido de un organismo pluricelular), la probabilidad de encontrar células en mitosis es, de ordinario, despreciable frente a la de hallarlas en interfase.

El material genético en las células en interfase se distribuye de una forma más o menos uniforme a lo largo del núcleo, aunque puede presentar estados diferentes de compacidad, fácilmente distinguibles por microscopía electrónica. Estos estados suelen designarse con los nombres de heterocromatina y eucromatina o, simplemente, cromatina densa y difusa respectivamente (\*). La cromatina se puede aislar con relativa facilidad por centrifugación diferencial, ya que, debido a su asociación con el DNA, el conjunto de materiales que la constituyen exhibe un elevado coeficiente de sedimentación.

La composición química de la cromatina aislada es menos regular que la de cromosomas (tabla II). La relación histona/DNA es aproxi-

TABLA II

## COMPOSICION QUIMICA DE CROMATINA DE DIVERSOS MATERIALES BIOLÓGICOS

Material biológico	RNA		Proteínas			Ref.
	Asociado	Total	Histonas	PNH	Total	
Hígado de rata . . . . .		0.053	0.65	0.53	1.18	(8)
HeLa . . . . .		0.02	1.30	0.50	1.80	(9)
P 815 . . . . .		0.05	1.12	1.27	2.39	(9)
Planococcus citri ♀ . . . . .			1.18	5.09	6.27	(10)
Planococcus citri ♂ . . . . .			1.36	4.82	6.18	(10)
Oncopeltus dasciatus						
Embrión 68 horas . . . . .	0.140	0.430	0.91	4.70	5.61	(11)
Embrión 92 horas . . . . .	0.096	0.290	1.02	3.20	4.22	(11)
Embrión 140 horas . . . . .	0.062	0.062	1.11	1.65	2.76	(11)
Cromosomas (valores medios).		0.60	1.90	2.60	4.50	(3)

Los resultados se expresan como mg de cada componente por mg de DNA.

(\*) Se adopta en este trabajo la corriente más generalizada, que aplica el término de cromatina para designar al material genético del núcleo en interfase.

madamente de 1 : 1, inferior a la hallada en cromosomas, y varía poco a lo largo del desarrollo (véanse, por ejemplo, los datos obtenidos en *O. dasciatus* recogidos en la tabla II), mientras que la proporción de PNH es más irregular y varía notablemente con la diferenciación celular. Los datos relativos al RNA son de interpretación más difícil, porque, contrariamente a lo que ocurre en cromosomas, la asociación de mRNA o rRNA a la cromatina puede ser casual. De todas formas, es posible distinguir en ocasiones un RNA minoritario, más íntimamente asociado, que quizá pueda considerarse como específicamente cromosomal.

La cromatina densa es diferente, también desde un punto de vista funcional, de la difusa. Es en esta última donde tiene lugar preferentemente la síntesis de RNA, como se puso de manifiesto por autorradiografía (12) y, recientemente, se ha comprobado utilizando técnicas de centrifugación de equilibrio de densidad en  $\text{CsSO}_4$  (13). Puede estar relacionado con este hecho el que el DNA satélite, que no se transcribe (14), se encuentre preferentemente en la heterocromatina (15). Pero, por otra parte, en la cromatina densa tampoco tiene lugar la replicación del DNA (16). Ya que todo el DNA nuclear ha de replicarse en un momento u otro del ciclo celular, el hecho que se acaba de apuntar sugiere que no cabe una distinción permanente entre cromatina densa y difusa, sino que todo el material genético habrá de pasar en algún momento por el estado de eucromatina y será preciso encontrar el mecanismo por el que tienen lugar las transiciones entre cromatina densa y difusa. Estas transiciones se han detectado experimentalmente y así, por ejemplo, Kernell y col. (17) han comprobado recientemente que, durante la maduración de eritrocitos de pato, la cromatina nuclear se condensa progresivamente, al tiempo que deja de tener lugar la transcripción del DNA.

Así, pues, las interacciones entre los diversos componentes del material genético —DNA, RNA, histonas y PNH— se estudiarán, a la luz de estos requerimientos funcionales, que son la necesidad de una represión específica de la transcripción y los cambios estructurales en el seno de dicho material. El planteamiento de la presente revisión se esquematiza en la figura 1, en la que, en todos los casos, se representa un fragmento imaginario de DNA (cinco genes). Las histonas podrían dar cuenta de una represión parcial como la que tiene lugar «in vivo», pero, en principio, la probabilidad de represión es idéntica para todos los genes, dada la no especificidad de la interacción DNA-histona (1).

Las interacciones que condujeran a una represión específica podrían ser de dos tipos:

- 1) Sin intervención de histonas.
- 2) Con participación de histonas.

En el primer caso sería necesaria la existencia de unas interacciones DNA-RNA o DNA-PNH que inhibieran la transcripción y fueran

MODELOS DE REPRESION ESPECIFICA	INTERACCION REQUERIDA	PROPIEDADES
<p>1</p>	<p>DNA - RNA DNA - PNH</p>	<p>a Específicas. b Estables en presencia H c Inh. transcripción</p>
<p>2</p> <p>A</p>	<p>DNA - RNA DNA - PNH</p>	<p>a Específicas b Estables en presencia H c Transcripción permitida</p>
<p>B</p>	<p>H - RNA H - PNH</p>	<p>a Específicas b Estabilidad frente a DNA c Conservación de represión</p>

Figura 1.—Modelos teóricos de represión específica. Véase la explicación en el texto.

específicas y estables en presencia de histonas. En el segundo, la especificidad podría deberse:

a) Al bloqueo selectivo y no represor de los genes que han de transcribirse por parte de RNA o PNH, de modo que las histonas pudieran interaccionar libremente con el resto.

b) A la combinación previa de las histonas con RNA o PNH de modo que se originara un represor específico.

La figura 1 recoge los requerimientos que tales interacciones habrían de cumplir, y en los apartados siguientes se revisarán los datos actuales a la luz de dichos requerimientos.

## II. Interacciones DNA-RNA

De todos los componentes de la cromatina, el RNA es el que podría interactuar de un modo más específico con el DNA. Desde luego, es posible una interacción «in vitro» que dé lugar a hibridación, pero es menester estudiar si una interacción de ese tipo tiene realmente importancia «in vivo». La mayor parte de los trabajos sobre la significación biológica del RNA presente en la cromatina han sido realizados por el grupo de Bonner, que en 1965 describió la presencia, en cromatina de yemas de guisante, de un «RNA cromosomal» específico (18). Este RNA tiene unos 40 nucleótidos, es rico en ácido dihidrouridílico y, al parecer, está unido a proteínas mediante enlace covalente (18, 19). Posteriormente se describieron preparados semejantes de RNA en hígado de rata (20), embrión de pollo (21), timo de ternera (22) y células ascíticas de rata (23).

Recientemente, sin embargo, se ha puesto en duda la existencia de «RNA cromosomal» específico. Von Heyden y Zachau (24), después de preparar RNA por uno de los métodos utilizados por Bonner (22), no han sido capaces de detectar ninguna fracción unida específicamente a la cromatina; antes bien, opinan que el RNA de 40 nucleótidos descrito por Bonner corresponde a fragmentos de tRNA, lo que explica su alto contenido en ácido dihidrouridílico. Artman y Roth (25) tampoco han encontrado un RNA específico en cromatina de hígado de pollo y llegan a la conclusión de que la mayor parte del RNA aislado junto con el material genético en condiciones que minimizan la acción de nucleasas, es rRNA. No obstante, más recientemente aún, Bonner y Jacobson (26) estiman haber encontrado nuevas pruebas en favor de la existencia de un RNA específico, unido mediante enlace covalente a una proteína ácida. Este RNA tiene un coeficiente de sedimentación homogéneo, es decir, no es el resultado de una hidrólisis de tRNA o rRNA por nucleasas inespecíficas, aunque los experimentos realizados no descartan la posibilidad de que sea un producto de fragmentación debido a la acción de alguna nucleasa específica.

Es obvio que, dadas las discrepancias de opinión en cuanto a la naturaleza del RNA presente en la cromatina, los estudios de interacciones DNA-RNA sean en extremo difíciles de interpretar. Así, por ejemplo, Sivolap y Bonner (27) han realizado experiencias de hibridación de «RNA cromosomal» aislado de cromatina de yemas de plantas de guisante con diversas fracciones de DNA del mismo tejido. Sus expe-

riencias se apoyan, en parte, en el estudio cinético de la reasociación del DNA desnaturalizado y degradado a pequeños fragmentos (de unos 400 nucleótidos). En estas condiciones, el grado de reasociación en medios adecuados depende del tiempo de reacción ( $t$ ) y de la concentración inicial ( $C_0$ ) de DNA desnaturalizado. En condiciones ideales, la reasociación de DNA sigue una cinética de segundo orden que puede expresarse en la forma  $C/C_0 = 1/(1 + KC_0t)$  (28), en la que  $C$  representa la concentración de DNA que sigue sin reasociar a tiempo  $t$ . Si el DNA está fragmentado uniformemente, el valor de  $C_0t$  para el que se produce una reasociación del 50 por 100 ( $C_0t_{50}$ ) es proporcional al tamaño del genoma (28). En el caso de asociación entre poliA y poliU se obtiene un valor de  $C_0t_{50}$  de  $2 \cdot 10^{-6}$  moles  $\cdot$  seg  $\cdot$  l $^{-1}$  (29), que correspondería al de reasociación de un genoma hipotético compuesto por un solo par de nucleótidos. Britten y Kohne (28) interpretan este resultado teniendo en cuenta que todo encuentro entre estos dos homopolinucleótidos es eficaz en cuanto al establecimiento de enlaces de hidrógeno tipo Watson-Crick.

Sivolap y Bonner (27) han encontrado que la reasociación del DNA aislado de yemas de guisante sigue una cinética compleja. La representación de  $C/C_0$  frente a  $C_0t$  es una curva trifásica, en la cual cada uno de sus elementos sigue aproximadamente una cinética de segundo orden. Sólo la fracción de DNA que se reasocia más lentamente lo hace con un valor de  $C_0t_{50}$  compatible con el tamaño real del genoma de guisante. Las otras fracciones corresponden a fragmentos de DNA procedentes de genes repetidos, caso frecuente en los organismos superiores (28). Es posible separar, haciendo uso de su distinta velocidad de reasociación, tres fracciones de DNA de guisante: DNA altamente repetido, DNA de repetición intermedia y DNA procedente de genes únicos. En tal separación se hace uso de cromatografía en columna de hidroxapatito, capaz de adsorber diferencialmente al DNA monocatenario y al de doble hélice.

El «RNA cromosomal» hibrida preferentemente con la fracción muy repetida de DNA, ya que satura a un 9 por 100 de este último, mientras que sólo llega a saturar un 1 por 100 del DNA no repetido. El experimento no es, sin embargo, concluyente a la hora de decidir si tales interacciones son viables «in vivo» y, además, dada la abundancia de rRNA en cromatina (25), cabe la posibilidad de que la mayor parte del RNA aislado de cromatina sea rRNA (intacto o degradado), y de ahí la homología entre su secuencia y las del DNA repetido, ya que es sabido

que los genes correspondientes al rRNA se encuentran altamente repetidos (28).

En resumen, las interacciones DNA-RNA, aunque posibles, no están demostradas realmente en cromatina. Lo que sí parece lógico es que, de tener lugar, no sean responsables de una represión específica según el modelo 1 de la figura 1, ya que, admitiendo la existencia de un RNA específico en cromatina, éste estaría presente en cantidad reducida (24, 25) y no daría cuenta de la represión, al menos en el nivel con que ésta debe tener lugar «in vivo».

Recientemente, Kanehisa y col. (30) han conseguido aislar, a partir de cromatina de hígado de pollo, una fracción de RNA de coeficiente de sedimentación 7-10 S, aunque el rendimiento es muy bajo (100  $\mu$ g por 100 g de hígado). Esta fracción inhibe la síntesis de RNA dirigida por DNA, pero la activa cuando se utiliza cromatina como *template*. La activación parece deberse a una interacción de este RNA con algún componente de la cromatina, ya que tiene lugar sólo cuando se preincuba con la cromatina antes de iniciar la transcripción mediante la adición de RNA polimerasa, y no cuando la reacción se comienza por adición de cromatina a una mezcla preincubada de RNA-enzima.

Si la existencia de este RNA se confirma y se demuestra su especificidad y capacidad de interactuar con el DNA, podría, en principio, justificar la selectividad de la represión mediante un mecanismo semejante al 2A de la figura 1.

### III. Interacciones DNA-PNH

Para que las PNH fueran responsables de la selectividad de la represión en la cromatina por alguno de los mecanismos 1 ó 2A (figura 1), se requeriría que dichas proteínas fueran capaces de interactuar con el DNA de un modo específico. Pero, si bien es fácil pensar que un RNA pueda reconocer una secuencia de DNA, no lo es tanto que las cadenas laterales de una proteína puedan hacerlo.

Existe, desde luego, la posibilidad de una interacción proteína-DNA que implique enlaces de hidrógeno, iónicos o hidrófobos. Estos últimos —entre residuos aromáticos de la proteína y los anillos de las bases del DNA— se han apuntado recientemente como una posible causa de especificidad en las interacciones proteína-DNA (31).

Las PNH interactúan «in vitro» con el DNA, pero lo hacen de un modo preponderantemente inespecífico (32). La interacción se da

realmente en el seno de la cromatina y no es puramente iónica, ya que en presencia de NaCl 2.0 M —cuando se han disociado la totalidad de las histonas y RNA— todavía queda una cantidad apreciable de PNH asociada al DNA (33). Aun en presencia de NaCl 2.0 M y urea 5.0 M queda algo de PNH unida al DNA (33), lo que sugiere que, si bien las interacciones iónicas y los enlaces de hidrógeno son los principales responsables de la asociación DNA-PNH, pueden existir además otros factores.

Una fracción muy pequeña de PNH parece exhibir, sin embargo, una elevada selectividad en su interacción con el DNA. Kleinsmith y col. (34) han obtenido PNH de núcleos de hígado de rata. La mayor parte de este preparado, marcado con  $^{131}\text{I}$ , eluye en una columna de DNA retenido sobre celulosa con NaCl 0,14 M, pero una pequeña fracción requiere mayor fuerza iónica (NaCl 0,60 M) para separarse del DNA. Esta fracción se ha purificado recromatografiándola en las mismas condiciones, y representa sólo el 0,1 por 100 del total de la PNH. Sin embargo, su interacción con el DNA es específica, ya que sólo se retiene en columnas cargadas con DNA de rata y eluye con el frente en columnas de DNA procedente de espermatozoos de salmón o de *Escherichia coli*.

Poco se sabe, sin embargo, acerca de las consecuencias funcionales de la interacción DNA-PNH. Wang ha demostrado recientemente (35) que la adición de PNH activa la transcripción de cromatina. La activación no se debe a un desbloqueo inespecífico de los complejos DNA-histona, ya que las PNH, al contrario que las histonas, presentan especificidad de tejido y es precisamente con la cromatina aislada del mismo tejido cuando dan origen a una activación mayor.

Con los datos expuestos hasta el momento no hay suficiente para decidir si las interacciones PNH-DNA pueden motivar «in vivo» una represión específica. Puede descartarse la posibilidad de que lo hagan por bloqueo selectivo del DNA (fig. 1,1), pero tanto las experiencias de Kleinsmith y col. (34) como las de Wang (35) son compatibles con un proceso como el 2A de la figura 1. Paul y Gilmour (8) se inclinaron en 1968 por una posibilidad semejante, aunque apoyándose en hechos diferentes. De todas formas, es evidente que la experimentación en este campo es aún insuficiente para que las teorías elaboradas puedan apoyarse sobre bases suficientemente firmes.

Queda por discutir la posibilidad de que, bien el RNA, bien las PNH, mediante interacciones con las histonas, confieran a éstas la especificidad

de que, por sí mismas, carecen. Este será el objeto de los apartados siguientes.

#### **IV. Interacciones histona-RNA**

Kruh y Labie (36) demostraron en 1968 que la adición de histonas a un sistema acelular aislado de reticulocitos inhibe la biosíntesis de hemoglobina, y que dicha inhibición se debe a la acción de las histonas sobre el mRNA. Pero los datos obtenidos no permitieron decidir si se trataba de un bloqueo del RNA por interacción con las histonas o de una destrucción del mRNA por parte de nucleasas que pudieran contaminar el preparado de histonas. Posteriormente, investigadores del mismo grupo pusieron de manifiesto que la histona F1 es capaz de interactuar con RNA, dando lugar a la precipitación de un complejo F1-RNA mantenido tanto por enlaces de hidrógeno como por interacciones iónicas entre los restos aniónicos del RNA y los grupos básicos de la histona (37). Sin embargo, la interacción no parece ser específica, por lo que es incapaz de justificar una disposición selectiva de las histonas sobre el DNA, y, por otra parte, el RNA empleado en las experiencias de Kruh y col. (37) es RNA total de hígado, por lo que queda sin demostrar la existencia de interacciones definidas RNA-histonas en la cromatina. Además, los complejos RNA-histona se disocian casi totalmente en presencia de DNA nativo o desnaturalizado (38) y también, aunque menos, en presencia de PNH (37), lo que sugiere que no deben tener lugar de modo estable en la cromatina nativa.

#### **V. Interacciones histona-PNH**

Las histonas precipitan «in vitro» a disoluciones de PNH, aunque el comportamiento de las distintas fracciones, tanto de histona como de PNH, es diferente (39). Las interacciones deben ser exclusivamente iónicas, ya que los precipitados se redisuelven en NaCl 0,5 M, lo que hace pensar que deben tener escasa importancia «in vivo», ya que no serán estables en presencia de DNA. Así, pues, como consecuencia de estos dos últimos apartados, puede concluirse que no existen datos que permitan atribuir la especificidad de la represión a la formación de un complejo previo entre las histonas y algún otro componente de la cromatina antes de bloquear al DNA.

## VI. Organización estructural de la cromatina

Como se apuntaba en la introducción, la represión puede ser consecuencia de una interacción específica o bien de la propia organización estructural del material genético. En realidad, ambos factores pueden estar relacionados entre sí y puede concebirse que, como consecuencia de una interacción DNA-histona, el DNA adopte una configuración que impida la transcripción. Está demostrada la existencia de superhelicidad en complejos DNA-histona (1), y este hecho podría ser causa suficiente de represión al impedir la acción de la RNA polimerasa, posiblemente por factores meramente estéricos (40).

Sea como fuere, el estudio estructural de la cromatina constituye una vía de acceso al problema de la represión distinta de la seguida hasta ahora en la revisión presente, al tiempo que puede arrojar luz sobre la naturaleza de las interacciones que tienen lugar realmente en la cromatina nativa.

Los estudios de reconstitución han sido con frecuencia de gran utilidad para el estudio de asociaciones estructurales complejas, por cuanto pueden dar idea del modo de ensamblamiento de los distintos componentes. Un claro ejemplo de aplicación de esta metodología ha tenido lugar en el estudio de la estructura ribosomal (41).

El caso de la cromatina es, sin embargo, más complejo, no sólo porque el número de componentes sea mayor y más diverso, sino también porque, al no presentar rasgos estructurales peculiares a nivel superior al molecular, se hace difícil el seguimiento inequívoco de la reconstitución de la cromatina.

Los experimentos más completos de reconstitución de cromatina han sido realizados por Bonner y col. (33). La cromatina de cotiledón de guisante, disociada en NaCl 2,0 M, puede reasociarse mediante diálisis en gradiente. La cromatina reasociada presenta una actividad de síntesis de RNA idéntica a la nativa, pero, sin embargo, el RNA sintetizado es diferente del transcrito a partir de la cromatina nativa (que, a su vez, coincide con el RNA propio del cotiledón) extremo comprobado por hibridación competitiva con DNA. La diálisis posterior a la disociación en NaCl da origen, pues, a una cromatina en la que la reasociación tiene lugar al azar, o, dicho de otro modo, el componente de la cromatina responsable de la especificidad de la represión no se disocia en NaCl 2,0 M, o no es capaz de reconocer la secuencia adecuada de DNA durante la diálisis subsiguiente.

Pero cuando la disociación se efectúa en NaCl 2,0 M-urea 5.0 M y la reasociación se efectúa por diálisis, primero frente a urea 5.0 M, luego frente a agua, la cromatina reconstituida no sólo conserva el mismo nivel de represión, sino que el RNA sintetizado por ella es idéntico al sintetizado por la nativa. La cromatina reconstituida en presencia de urea presenta, además de la semejanza funcional, una curva de desnaturalización térmica casi idéntica a la de la cromatina nativa (fig. 2). Ambos criterios permiten decidir que la reconstitución en las condiciones indicadas es aceptable.

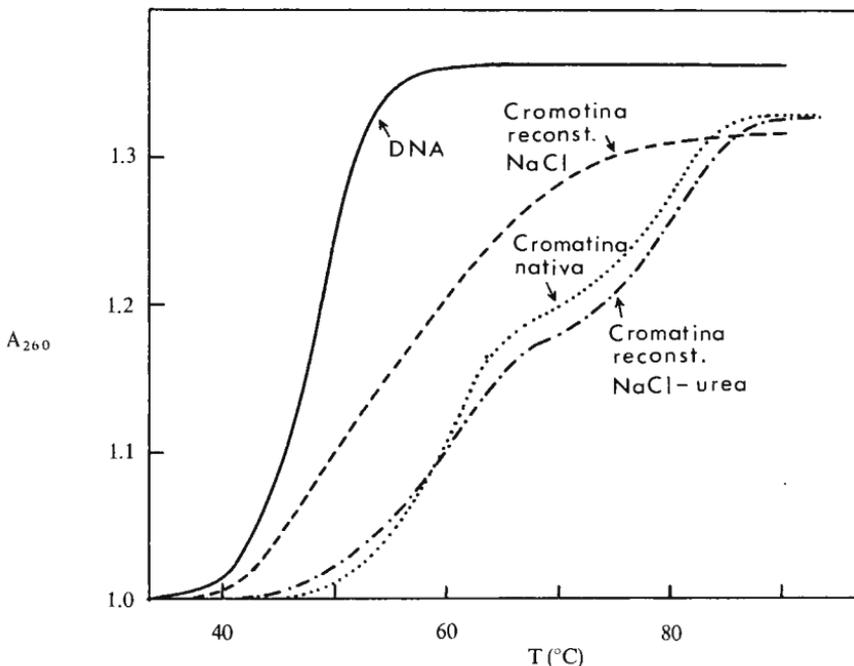


Figura 2.—Curvas de desnaturalización térmica de: DNA de cotiledón de guisante (—); cromatina nativa del mismo tejido (.....); cromatina disociada en NaCl 2.0 M y reconstituida por diálisis (-----) y cromatina disociada en NaCl 2.0 M-urea 5.0 M y reconstituida por diálisis (-·-·-·-·-). Datos obtenidos de Bekhor, Kung y Bonner (33).

Por otra parte, si la cromatina disociada en NaCl-urea se trata con ribonucleasa, la cromatina reconstituida en la diálisis posterior se comporta, tanto en síntesis de RNA como en su desnaturalización térmica, como la reconstituida a partir de NaCl 2,0 M en ausencia de urea.

De estos hechos, Bonner concluye que el «RNA cromosomal» juega un papel preponderante en la especificidad de la represión, y que su asociación con el DNA es causa determinante de la disposición adecuada de las histonas a lo largo del DNA y, por consiguiente, de la estructura y funcionalidad de la cromatina.

Gilmour y Paul estudiaron posteriormente la reasociación de la cromatina utilizando técnicas semejantes (42), pero las conclusiones de su trabajo son distintas, por cuanto atribuyen a una fracción de PNH el papel que Bonner y col. asignan al «RNA cromosomal». Una cosa está clara, y es que las interacciones iónicas DNA-histona no pueden ser responsables exclusivos de un ordenamiento estructural específico de la cromatina. Dada la incertidumbre que existe en torno al «RNA cromosomal», no es posible, por el momento, llegar a conclusiones definitivas, si bien la presencia de un RNA específico —quizá distinto del preparado por Bonner, al menos en parte— descrita por Kanehisha y col. (30) y la posibilidad de que dicho RNA esté unido a una fracción de PNH (26), y no a histonas, como se pensó en un principio (18,19), hace posible suponer que, tanto una fracción de PNH como algún RNA sean necesarios para que las histonas reconozcan las secuencias de DNA con que han de combinarse.

Otra posibilidad de investigar la participación de los distintos componentes de la cromatina en la estructura del material genético consiste en la aplicación de técnicas que, como el dicroísmo circular o la dispersión rotatoria óptica, permiten el estudio de las conformaciones de dichos componentes y pueden conducir a la adquisición de datos valiosos sobre las interacciones entre ellos.

Simpson y Sober (43) estudiaron por dicroísmo circular la cromatina de hígado de ternera, obteniendo un espectro complejo con un mínimo a 300 nm, de elipticidad ( $\theta$ ) de  $-400$  grados  $\cdot$   $\text{cm}^2/\text{dmol}$ , dos máximos a 280 y 272 nm ( $\theta = +5.500$  y  $+6.000$ , respectivamente) y tres nuevos mínimos a 245 nm ( $\theta = -6.000$ ), 223 nm ( $\theta = -11.500$ ) y 207 nm ( $\theta = -13.500$ ). Las bandas obtenidas a longitudes de onda menores de 250 nm corresponden casi totalmente a las proteínas, aunque se da una ligera participación del DNA. Simpson y Sober asignan el máximo de 272 nm a RNA, y el de 280 nm al DNA. Sin embargo, la elipticidad correspondiente al DNA en la cromatina es sólo el 70 por 100 de la que tiene el DNA libre a esa misma longitud de onda. Esta disminución se debe a la estructura superhelicoidal del DNA, que se traduce en una disminución del paralelismo entre los planos de las bases adyacentes. El

TABLA III

VARIACION DE  $\theta_{280}$  DE LA CROMATINA DE HIGADO DE TERNERA CON LA FUERZA IONICA DEL MEDIO (43)

Concentración de NaCl (M)	$\theta_{280}/\theta_{280}$ máximo
0	0
0.6	0.10
0.8	0.20
1.0	0.80
1.2	0.94
1.6	0.93
2.0	1.00

efecto de la fuerza iónica del medio sobre el valor de  $\theta_{280}$  (tabla III) es interesante, ya que permite estudiar la influencia de la disociación de histonas en la estructura superhelicoidal del DNA. Como puede verse por los resultados de la tabla III, la histona F1 —que se disocia en NaCl 0,1 M— tiene poca o ninguna influencia en la estructura del DNA en la cromatina. El aumento de elipticidad que tiene lugar entre concentraciones de 0,8 y 1,0 M, es decir, en el momento en que se disocian las histonas moderadamente ricas en lisina, indujo a Simpson y Sober a pensar que la interacción entre estas histonas y el DNA es la causa de la superhelicidad del DNA. Recientemente, Wagner y Spelsberg (44), después de unas experiencias similares, concluyen, sin embargo, que la histona F2A1 es responsable de la conformación del DNA en la cromatina. Esta conclusión es compatible con el hecho de que la fracción F2A1 sea la que requiere mayor fuerza iónica para disociarse, ya que la adición de sal provoca más efectos sobre la cromatina que la sola disociación de histonas. Así, y a la luz del hecho de que la conformación de la histona F2A1 depende en gran medida de la fuerza iónica del medio (45), Wagner y Spelsberg llegan a la conclusión de que el incremento observado en la elipticidad entre NaCl 0,8 y 1,0 M se debe precisamente a modificación de la interacción DNA-F2A1 motivada por cambios conformacionales de la histona, aunque ésta se disocie más tarde.

Esta conclusión está de acuerdo con los datos obtenidos por difracción de rayos X (46), según los cuales son precisamente las histonas ricas en arginina las responsables de la estructura superhelicoidal del DNA. Los mismos resultados se han obtenido estudiando la cromatina

de *Saccharomyces cerevisiae*. La cromatina de esta levadura representa un sistema relativamente simple, ya que carece de histonas muy ricas en lisina (47), aunque existen dos fracciones moderadamente ricas en lisina (48). El tratamiento con NaCl 0,40 M, que elimina las histonas moderadamente ricas en lisina (48), no tiene ningún efecto sobre el comportamiento hidrodinámico de la cromatina soluble de *S. cerevisiae* ni sobre su curva de desnaturalización térmica (49), lo que indica que son las histonas ricas en arginina las responsables de la organización estructural de la cromatina.

En general, puede admitirse que las histonas ricas en arginina, y en especial la fracción F2A1, son causantes de la represión, quizá como consecuencia de la especial disposición espacial que resulta de su interacción con el DNA (40). Estas interacciones, cuyas consecuencias en sistemas «in vitro» han sido estudiadas ampliamente (1,46), deben tener lugar realmente «in vivo», como se deduce de las experiencias reseñadas en este último apartado. La especificidad de tal interacción es, sin embargo, algo que aún permanece oscuro y que, por el momento, no puede explicarse plenamente a partir de interacciones entre los componentes de la cromatina. La modificación de histonas —fosforilación, acetilación, metilación— que tiene lugar «in vivo» (50,54) y la interacción de hormonas con los constituyentes de la cromatina (55,56) dejan ver una serie de posibilidades que, al menos en parte, pueden justificar la especificidad de la represión, aunque quedan fuera del objeto de la presente revisión.

## VII. Estructura de cromosomas

Como se indicaba al principio, el cromosoma representa el estado que adopta el material genético en el momento de la división celular. Ya que supone un grado mayor de agregación, se ha sugerido en ocasiones que la aparición de cromosomas es un paso más en la transición cromatina difusa-cromatina compacta. La fracción de histona F1, que parece ser responsable de la transición de eucromatina a heterocromatina (1), podría serlo también de la agregación final que implica la aparición de cromosomas. Puede citarse, en apoyo de esta opinión, el hecho ya comentado de que no exista F1 en *S. cerevisiae* (47), ya que en este organismo no se encuentran cromosomas definidos en el momento de la división nuclear (57).

El estudio de la estructura de cromosomas arroja poca luz sobre

la naturaleza de las interacciones y asociaciones entre sus componentes. La extrapolación de los datos obtenidos en cromatina no es siempre permisible y es necesario aplicar otras técnicas al estudio de la estructura cromosomal.

La microscopía electrónica ha permitido la obtención de ciertos indicios, como es la existencia de fibrillas cromosomales de 120-150 Å de diámetro que, recientemente se han interpretado como hélices de DNA superhelicoidal (58).

También la disociación de componentes cromosomales constituye una vía de acceso al problema que se ha utilizado frecuentemente (59-61), pero la integración de los resultados experimentales en teorías coherentes es altamente especulativa y, aunque se hayan elaborado varios modelos de estructura cromosomal (62-64), parece evidente la necesidad de obtener nuevos datos que confirmen algunos de los modelos propuestos o bien permitan la elaboración de otros más probables.

## BIBLIOGRAFIA

1. F. MONTERO, en este volumen, p. 559.
2. J. BONNER, G. R. CHALKLEY, D. FAMBROUGH, F. FUJIMURA, R. C. C. HUANG, J. HUBERMAN, K. MARUSHIGE, H. OHLENBUSCH, B. OLIVERA y J. WIDHOLM, *Methods in Enzymology*, vol.12 p.3 (Academic Press, New York 1967).
3. V. G. ALLFREY, en *Aspects of Protein Biosynthesis* (ed. C. B. Anfinsen). Parte A p. 247 (Academic Press, London y New York, 1970).
4. K. P. CANTOR y J. E. HEARST: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55,642 (1966).
5. J. A. HUBERMAN y G. ATTARDI: *J. Cell. Biol.* 31,95 (1966).
6. H. RIS: *Proc. Roy. Soc., Ser. B* 164,246 (1966).
7. J. E. HEARST y M. BOTCHAN: *Ann. Rev. Biochem.* 39,171 (1970).
8. J. PAUL y R. S. GILMOUR: *J. Mol. Biol.* 34,305 (1968).
9. R. HANCOCK: *J. Mol. Biol.* 40,457 (1969).
10. M. W. LOEWUS: *Nature* 218,474 (1968).
11. S. E. HARRIS y H. S. FORREST: *Develop. Biol.* 23,324 (1970).
12. V. C. LITTAU, V. G. ALLFREY, J. H. FRENSTER y A. E. MIRSKY: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52,93 (1965).
13. F. H. WILT, y E. EKENBERG: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44,831 (1971).
14. W. G. FLAMM, P. M. B. WALKER y M. MCCALLUM: *J. Mol. Biol.* 40,423 (1969).
15. J. D. DUERKSEN y B. J. MCCARTHY: *Biochemistry* 10,1471 (1971).
16. E. D. HAY y J. P. REVEL: *J. Cell. Biol.* 16,29 (1963).
17. A. M. KERNELL, L. BOLUND y N. R. RINGERTZ: *Exptl. Cell Res.* 65,1 (1971).
18. R. C. C. HUANG y J. BONNER: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 54,960 (1965).
19. J. BONNER y R. C. C. HUANG, en *Histones. Their Role in the Transfer of Genetic Information* (eds. A. V. S. de Reuck y J. Knight) *Ciba Found. Study Group N.24*, p.18 (J. & A. Churchill, London 1966).
20. W. BENJAMIN, O. A. LEVANDER, A. GELHORN y R. H. DEBELLIS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55,858 (1966).
21. R. C. C. HUANG y P. C. HUANG: *J. Mol. Biol.* 39,365 (1969).
22. T. Y. SHIH y J. BONNER: *Biochim. Biophys. Acta* 182,30 (1969).
23. I. BEKHOR, J. BONNER y G. K. DAHMUS: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 62,271 (1969).
24. H. W. VON HEYDEN y H. G. ZACHAU: *Biochim. Biophys. Acta* 232,651 (1971).
25. M. ARTMAN y J. S. ROTH: *J. Mol. Biol.* 60,291 (1971).
26. R. A. JACOBSON y J. BONNER: *Arch. Biochem. Biophys.* 146,557 (1971).
27. SIVOLAP, YU. y J. BONNER: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 68,387 (1971).
28. R. J. BRITTON y D. E. KOHNE: *Science* 161,529 (1968).
29. P. D. ROSS y J. M. STURTEVANT: *J. Am. Chem. Soc.* 84,4503 (1962).
30. T. KANEHISA, H. FUJITANI, M. SANO y T. TANAKA: *Biochim. Biophys. Acta* 240,46 (1971).
31. C. HÉLÈNE: *Nature, New Biol.* 234,120 (1971).

32. K. MARUSHIGE, D. BRUTLAG y J. BONNER: *Biochemistry* 7,3149 (1968).
33. I. BEKHOR, G. M. KUNG y J. BONNER: *J. Mol. Biol.* 39,351 (1969).
34. L. J. KLEINSMITH, J. HEIDEMA y A. CARROLL: *Nature* 226,1025 (1970).
35. T. Y. WANG: *Exptl. Cell Res.* 69,217 (1971).
36. J. KRUH y D. LABIE: *Biochim. Biophys. Acta* 161,518 (1968).
37. B. DASTUGUE, L. TICHONICKY, J. HANOUNE y J. KRUH: *FEBS Lett.* 8,133 (1970).
38. T. C. SPELSBERG, P. E. KIZER y L. S. HNILICA: *Experientia* 26,136 (1970).
39. T. Y. WANG y E. W. JOHNS: *Arch. Biochem. Biophys.* 124,176 (1968).
40. E. W. JOHNS, en *Ciba Foundation Symposium on Homeostatic Regulators* (eds. G. E. W. Wolstenhohme y J. Knight) p.128 (J. & A. Churchill, Ltd. London 1969).
41. J. MODELELL, en este volumen, p. 579.
42. R. S. GILMOUR y J. PAUL: *J. Mol. Biol.* 40,137 (1969).
43. R. T. SIMPSON y H. A. SOBER: *Biochemistry* 9,3103 (1970).
44. T. WAGNER y T. C. SPELSBERG: *Biochemistry* 10,2599 (1971).
45. T. WAGNER: *Nature* 227,65 (1970).
46. B. M. RICHARDS y J. F. PARDON: *Exptl. Cell Res.* 62,184 (1970).
47. G. J. M. TONINO y T. H. ROZIJN, en *The Cell Nucleus. Metabolism and Radiosensitivity* p.125 (Taylor & Francis, London 1966).
48. E. W. JOHNS, L. FRANCO y J. M. NAVLET: *Eur. J. Biochem.* (en prensa).
49. P. C. VAN DER VLIET, G. J. M. TONINO y T. H. ROZIJN: *Biochim. Biophys. Acta* 195,473 (1969).
50. V. G. ALLFREY, en *Histones and Nucleonistones* (ed. D. M. P. Phillips) p.241 (Plenum Press, London y New York 1971).
51. R. M. GUTIÉRREZ- CERNOSEK y L. S. HNILICA: *Biochim. Biophys. Acta* 247,348 (1971).
52. G. R. SHEPHERD, B. J. NOLAND y J. M. HARDIN: *Exptl. Cell Res.* 67,474 (1971).
53. L. C. BOFFA, E. L. GERSHEY y G. VIDALI: *Biochim. Biophys. Acta* 254,135 (1971).
54. R. H. BUCKINGHAM y L. A. STOCKEN: *Biochem. J.* 117,509 (1970).
55. M. SLUYSER: *Biochem. Soc. Symposia* No. 32,31 (1971).
56. B. W. O'MALLEY, T. C. SPELSBERG, W. T. SCHRADER, F. CHYTIL y A. W. STEGGLES: *Nature* 235,141 (1972).
57. P. MATILE, H. MOOR y C. F. ROBINOW, en *The Yeasts* (eds. A. H. Rose y J. S. Harrison) vol.1 p.219. (Academic Press, London y New York 1969).
58. F. LAMPERT: *Nature, New Biol.* 234,187 (1971).
59. V. SORSA y M. SORSA: *Chromosoma* 31,346 (1970).
60. E. J. DUPRAW: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 53,161 (1965).
61. C. A. HILGARTNER: *Exptl. Cell Res.* 49,520 (1968).
62. E. STUBBLEFIELD y W. WRAY: *Chromosoma* 32,262 (1971).
63. H. RIS: *Proc. Roy. Soc., Ser. B* 164,246 (1964).
64. E. M. BRADBURY y C. CRANE-ROBINSON, en *Histones and Nucleohistones* p.85 (cf. cita 50).



## CAPÍTULO XI

### *RIBOSOMAS. INTERACCIONES, DISGREGACION Y RECONSTITUCION*

J. MODELELL

Instituto de Biología Celular. Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INTRODUCCIÓN.....	580
I. INTERACCIONES ENTRE LOS COMPONENTES DEL RIBOSOMA.....	580
II. ESTRUCTURA DEL RNA RIBOSÓMICO.....	583
III. RECONSTITUCIÓN DE LAS SUBUNIDADES 30S.....	583
IV. RECONSTITUCIÓN INTERESPECÍFICA.....	585
V. ORDEN DE RECONSTITUCIÓN.....	586
VI. RECONSTITUCIÓN DE LA SUBUNIDAD 50S.....	589

## INTRODUCCION

Los ribosomas son los orgánulos celulares donde se lleva a cabo la síntesis de las proteínas. En *Escherichia coli* y en los demás organismos procarióticos, así como en las mitocondrias, los ribosomas tienen un peso molecular de aproximadamente  $2,6 \times 10^6$ . Poseen en su forma más compacta un coeficiente de sedimentación de alrededor de 70 unidades Svedberg (70S). Están compuestos de dos subunidades desiguales: una mayor, que sedimenta a 50S y contiene el centro catalítico formador de los enlaces peptídicos (la peptidil transferasa), y una menor, que sedimenta a 30S y fija el RNA mensajero. Ambas subunidades son agregados de proteína y RNA. Una molécula de 16S RNA se encuentra en la subunidad 30S y una de 23S más otra de 5S en la subunidad 50S. Estas tres moléculas de RNA constituyen aproximadamente las dos terceras partes de la masa del ribosoma. Los trabajos recientes del grupo de Wittmann (1,2) han caracterizado, mediante técnicas de electroforesis bidimensional, 21 proteínas en la subunidad 30S y 34 en la 50S. Todas ellas son diferentes y sus pesos moleculares oscilan entre  $1,0 \times 10^4$  y  $6,5 \times 10^4$ , siendo los más comunes de alrededor de  $1,5 \times 10^4$ . Parece haber solamente una copia por subunidad, a excepción de unas pocas proteínas de la subunidad 30S que al parecer no se hallan en todas las subunidades 30S de una determinada población ribosomal (3). Esta heterogeneidad de las partículas 30S puede tener un significado funcional, ya que es posible que sólo se necesiten las proteínas fraccionales durante ciertas etapas de la síntesis de proteínas (4). Los datos de la composición de los ribosomas resaltan su extrema complejidad, así como el elevado grado de asimetría existente en su organización molecular.

### I. Interacciones entre los componentes del ribosoma

La mayoría de las proteínas ribosómicas son básicas. Como el RNA es fuertemente ácido, se pensó, hace algún tiempo, que las fuerzas iónicas entre los grupos amino de las proteínas y fosfato del RNA ribosómico podrían ser de gran importancia en el mantenimiento de la

estructura del ribosoma. Estudios más recientes han mostrado que esto no es así: fuerzas de tipo de enlaces de hidrógeno, hidrofóbicas y también iónicas (pero no entre grupos amino y fosfato), parecen ser las más importantes.

Ya en 1959, Tissieres, Watson, Schlessinger y Hollingworth (5) observan que la estructura del ribosoma está muy influenciada por la concentración de  $Mg^{++}$  en la solución. A 10 mM  $Mg^{++}$ , la mayoría de ribosomas sedimentan a 70S, pero al bajar esta concentración a entre 1 y 0,1 mM, éstos se disocian en sus subunidades. El proceso parece reversible, pues al restituir la concentración inicial de  $Mg^{++}$  las partículas 70S vuelven a formarse. La exposición de los ribosomas o sus subunidades a concentraciones de  $Mg^{++}$  por debajo de 0,1 mM provoca un desdoblamiento o apertura de las subunidades, ya que éstas se convierten en partículas con coeficientes de sedimentación muy por debajo de 30S ó 50S. Así, pues, el  $Mg^{++}$  es esencial para mantener las dos subunidades unidas en su estructura compacta y funcional. Este efecto es propio de este catión, pues no puede ser reemplazado por otros cationes divalentes o monovalentes. Watson y sus colaboradores observan, además, que el  $Mg^{++}$  por sí solo es suficiente para mantener la estructura compacta. Sin embargo, el  $K^+$  o el  $NH_4^+$  son asimismo indispensables para la actividad de las partículas.

Tanto el  $Mg^{++}$  como el  $K^+$  o el  $NH_4^+$  pueden asociarse con los grupos fosfato del RNA ribosómico. Sin embargo, dada la estructura compacta del ribosoma, puede preguntarse si todos o solo parte de estos grupos son asequibles a estos cationes. Para resolver este problema Choi y Carr han estudiado recientemente la fijación de iones  $Mg^{++}$  a ribosomas y RNA ribosómico mediante la técnica de diálisis hasta equilibrio (6). Estos autores han encontrado que cuando el  $Mg^{++}$  es el único catión presente, puede neutralizar todos los grupos fosfato del RNA, tanto si éste se encuentra libre como si forma parte de ribosomas 70S. En ambos casos, la saturación completa se consigue a concentraciones de  $Mg^{++}$  de alrededor de 10 mM, es decir, en las condiciones en que los ribosomas muestran su forma compacta. En condiciones similares, las proteínas aisladas no fijan el  $Mg^{++}$ . La igualdad en la capacidad de fijación de  $Mg^{++}$  del RNA y del ribosoma sugieren que las proteínas ribosómicas no están asociadas con los grupos fosfato del RNA.

El  $Mg^{++}$  fijado a los ribosomas puede ser desplazado por otros iones divalentes como el  $Ca^{++}$ , o monovalentes como el  $Na^+$ ,  $K^+$  o  $NH_4^+$ , pudiendo de hecho decirse que el ribosoma actúa como un

intercambiador de cationes (6). Sin embargo, la estructura o configuración del ribosoma cambia según cuáles sean los iones que neutralizan las cargas del RNA y solamente ciertas combinaciones de cationes, a concentraciones apropiadas, permiten la configuración adecuada para la actividad de la partícula.  $Mg^{++}$ , entre 5 y 15 mM y  $K^+$  o  $NH_4^+$  entre 30 y 150 mM son condiciones que permiten «in vitro» actividades óptimas. Los valores exactos varían según el sistema de ensayo considerado, pero la máxima fidelidad en la traducción de mensajeros naturales —lo que permite sintetizar enzimas activas «in vitro» (7, 8)— se ha conseguido con concentraciones de  $Mg^{++}$  entre 7 y 11 mM y de  $NH_4^+$  o  $K^+$  entre 50 y 100 mM. Ciertas cantidades de  $Ca^{++}$  o poliaminas orgánicas como la espermidina, no alteran la actividad e incluso pueden ser beneficiosas para expresar algunas propiedades ribosómicas (9).  $Na^+$  o  $Li^+$  son, en cambio, inhibidores.

Las concentraciones altas de cationes monovalentes inducen el desdoblamiento de los ribosomas e incluso el desprendimiento de las proteínas ribosómicas. De acuerdo con los estudios de Spitnik-Elson (10), el orden de efectividad es:  $Li^+ > Na^+ > Cs^+ > K^+ > NH_4^+$ . Así, en presencia de 2 mM  $MgCl_2$ , 1M  $NH_4Cl$  prácticamente no induce el desprendimiento de proteínas, mientras que 1M  $LiCl$  desprende más de una tercera parte de ellas. Hay que señalar que el desprendimiento es específico para un grupo de proteínas, pues las que permanecen fijas al ribosoma son distintas de las desprendidas. Los iones monovalentes son mucho más eficaces en el desprendimiento de proteínas a concentraciones bajas de  $Mg^{++}$  o en su ausencia, ya que éstas son condiciones que favorecen la apertura de la estructura ribosómica. Así 1M  $NaCl$ , en ausencia de  $Mg^{++}$ , desprende más del 80 por 100 de las mismas, mientras que en presencia de 2 mM  $Mg^{++}$  sólo desprende alrededor de un 30 por 100. También se han observado diferencias en la cinética del desprendimiento según la conformación del ribosoma: en ausencia de  $Mg^{++}$  (estructura abierta), el desprendimiento es mucho más rápido que en su presencia (estructura compacta). Como veremos más adelante, las condiciones más utilizadas para el desprendimiento completo de las proteínas comprenden el tratamiento con  $LiCl$  y urea, lo cual indica que no sólo las fuerzas iónicas juegan un papel importante en la estructura ribosómica, sino que también otras fuerzas antagonizables por la urea, como las debidas a puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos, etc., son importantes. La especificidad de las interacciones de las proteínas ribosómicas con el RNA ribosómico, así como las

condiciones en que ocurre la reconstitución de las subunidades 30S y 50S (cf. más adelante) también refuerzan esta interpretación.

## **II. Estructura del RNA ribosómico**

Estudios encaminados al esclarecimiento de la estructura del RNA ribosómico han mostrado que tanto el 16S como el 23S RNA contienen, aproximadamente, un 60 por 100 de la molécula en forma doble helicoidal (11). Gratzer ha observado además (11) que no hay diferencia entre los efectos hipercrómicos que tienen lugar durante la fusión de los ribosomas y la del RNA ribosómico, lo cual indica que hay poca diferencia entre el contenido en porciones dobles helicoidales del RNA libre o del incorporado en el ribosoma. Basándose en estos y otros datos, Gratzer ha propuesto un modelo para el ribosoma en el cual las proteínas se asociarían principalmente con las regiones del RNA de cadena sencilla. (Ello facilitaría el reconocimiento por las proteínas de los sitios específicos para su interacción con el RNA.) Además, según este modelo, parte del RNA ribosómico se hallaría en la superficie del ribosoma, ya que éste es asequible a la acción degradativa de varias ribonucleasas. Estudios recientes con el agente intercalante bromuro de etidio (12) muestran, sin embargo, que la asociación de proteínas de la subunidad 30S con el 16S RNA induce algunos cambios en la estructura doble helicoidal del mismo, lo que puede interpretarse como evidencia positiva para una cierta interacción entre las proteínas y las regiones dobles helicoidales del RNA. Puede decirse, en general, que el estudio de la topología del ribosoma está en fase muy preliminar.

## **III. Reconstrucción de las subunidades 30S**

En 1968 Traub y Nomura anunciaron la reconstitución de partículas 30S funcionalmente activas partiendo de 16S RNA y proteínas (13). Su sistema de reconstitución, además de demostrar que toda la información necesaria para la organización y el ensamblaje de la subunidad 30S se halla contenida en sus componentes, ha permitido avanzar mucho en el conocimiento de las interacciones que tienen lugar entre el RNA y las proteínas de esta subunidad. En líneas generales, la reconstitución de las partículas 30S se lleva a cabo del modo siguiente. Partículas 30S se tratan con 4M urea y 2M LiCl. Al cabo de uno o dos días, el RNA precipita, mientras que las proteínas se mantienen en solución. Esta solución de

proteínas, tras haberse eliminado el LiCl y la urea por diálisis, se mezcla en condiciones iónicas adecuadas con una cantidad equivalente de 16S RNA obtenido de partículas 30S mediante extracción fenólica. La mezcla se mantiene durante unos diez minutos a 37° C, tras lo cual las partículas reconstituidas se pueden sedimentar en la ultracentrífuga. Estas partículas no se distinguen de las partículas originales en cuanto a composición, sedimentación y actividad.

Traub y Nomura han estudiado detalladamente las condiciones de reconstitución (13, 14). La fuerza iónica es óptima alrededor de 0,33 M. Por debajo de 0,1 M, la reconstitución es casi nula. Al parecer, la fuerza iónica relativamente alta impide las interacciones iónicas no específicas entre las proteínas y el RNA. El  $Mg^{++}$  y el  $K^+$  o  $NH_4^+$  son esenciales. El pH es relativamente poco importante, observándose la máxima eficiencia entre pH 6,5 y 8. La temperatura, en cambio, es crítica. Por debajo de 10° C no se observa reconstitución. Entre 20° y 40° C, la eficiencia sube rápidamente, siendo máxima a 40° C. La formación de las subunidades 30S sigue una cinética de primer orden, con una fuerte entalpía de activación (unas 38 kcal/mol). La cinética sugiere que la reacción limitante en todo el proceso de reconstitución es unimolecular. Basados en observaciones experimentales (14), Traub y Nomura explican este resultado proponiendo que, durante la reconstitución, sólo una parte de las proteínas se une rápidamente al RNA, formándose así un complejo intermedio. Este complejo debe entonces sufrir un cambio de conformación para ser activado (de ahí la necesidad del calentamiento) y poder fijar el resto de las proteínas.

El grupo de Nomura ha utilizado el sistema de reconstitución para clasificar las proteínas de la subunidad 30S de acuerdo con un criterio de requerimiento para la función o para la reconstitución de la subunidad (15). Esto ha sido posible mediante la purificación individual de las proteínas de la partícula y llevando a cabo la reconstitución con mezclas de todas las proteínas menos una. El requerimiento para la reconstitución se ha determinado midiendo el coeficiente de sedimentación de las partículas obtenidas. Así se ha visto que la ausencia de las proteínas 4a, 4b, 5, 8 y 9 hace que las partículas sedimenten entre 20 y 25S, en lugar de 30S. La ausencia de otras (3, 4, 5, 6, 11 y 13) modifica en menor grado el coeficiente de la partícula reconstituida, y, finalmente, el resto (1, 2, 3a, 3b, 3c, 10, 10a, 12, 14 y 15) no lo modifica apreciablemente. Ensayando la actividad de las partículas deficientes en una proteína, se ha visto que todas las proteínas que modifican apreciablemente el

coeficiente de sedimentación son imprescindibles para el funcionamiento de la partícula, con excepción, quizás, de la proteína 4, para la cual sólo se observa un requerimiento parcial. Por otra parte, la proteína 10 muestra un requerimiento absoluto para la actividad, pero no para la reconstitución. Todas las demás proteínas, excepto la 1 y la 3a, son requeridas en mayor o menor grado para obtener máxima actividad. Este tipo de experimento también ha permitido demostrar inequívocamente el que las proteínas 4 y 10 son las que confieren la sensibilidad o la resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina, respectivamente (15-17), y que la proteína 7 con toda probabilidad controla la fidelidad de la traducción (es la proteína codificada por el locus *ram*, ref. 18).

#### IV. Reconstrucción interespecífica

Un abordaje distinto al problema de las interacciones entre las proteínas y el RNA de las partículas 30S, llevado a cabo también por el grupo de Nomura (19), ha consistido en reconstituir partículas 30S a partir de proteínas y RNA pertenecientes a distintas especies bacterianas. Se han utilizado las especies poco relacionadas *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus stearothermophilus* y *Micrococcus lysodeikticus*. Los 16S RNA de estos organismos tienen muy marcadas diferencias a juzgar por la relativamente poca capacidad mostrada para competir entre ellos por los sitios de hibridación con el DNA. Asimismo, las proteínas 30S son diferentes, ya que muestran distintas movilidades en electroforesis. A pesar de estas diferencias, el grupo de Nomura ha obtenido buenas reconstituciones con las proteínas de *Escherichia* y el RNA de cualquiera de los cuatro microorganismos ensayados. También las proteínas de *Bacillus* o *Azotobacter* dan partículas híbridas activas con el RNA de *Escherichia*. Estos resultados indican que en el curso de la evolución se han conservado ciertas propiedades funcionales del 16S RNA y de las proteínas que permiten las interacciones interespecíficas. Obviamente, esta conservación funcional puede reflejar una conservación de secuencia. En el caso de los 16S RNA, sin embargo, ya hemos indicado que existen entre ellos muchas regiones heterólogas. Es, por tanto, posible que una buena parte de la secuencia del 16S RNA pueda variar sin impedir el reconocimiento de las proteínas ribosómicas y sin dejar de formar partículas activas. Consecuentemente, puede sugerirse que solamente algunas regiones del RNA ribosómico, con secuencias co-

munes o muy parecidas en las distintas especies estudiadas, tienen interacciones con las proteínas. No puede excluirse, sin embargo, el hecho de que las regiones con secuencias que han variado durante el transcurso de la evolución interaccionen también con las proteínas, ya que pueden haber conservado, si no la secuencia, por lo menos la conformación necesaria para sus interacciones funcionales.

Otros experimentos del grupo de Nomura (19) indican que al parecer la mayor parte de la secuencia del 16S RNA es importante para su funcionalidad. Así, han observado que el tratamiento suave del 16S RNA con ácido nitroso (el cual desamina la citosina en uracilo, la adenina en hipoxantina y la guanina en xantina) rápidamente lo inactiva, haciéndolo incapaz de reconstituir partículas funcionales. De hecho, la inactividad completa se observa cuando no más de 6 a 8 bases del 16S RNA (que contiene aproximadamente unas 2.000) han sido alteradas. Aunque no se conoce si ciertas regiones críticas son preferentemente sensibles al ácido nitroso, o si éste induce algún entrelazamiento en regiones doble helicales tal como puede hacer con el DNA, los resultados, ciertamente, sugieren que la mayor parte de la secuencia puede ser importante para la interacción funcional. Cabe destacar que el 16S RNA inactivado es todavía capaz de fijar todas las proteínas de la subunidad 30S, pero las partículas reconstituidas poseen coeficientes más bajos de 30S. Parece pues, que el tratamiento ha destruido la capacidad del RNA de adquirir su estructura compacta indispensable para la actividad de la partícula.

## V. Orden de reconstitución

El sistema de reconstitución de la subunidad 30S ha permitido también el estudio del orden de agregación de las proteínas al 16S RNA, revelando, al mismo tiempo, el alto grado de cooperatividad del proceso. Así, Mizushima y Nomura (20) han ensayado la fijación al 16S RNA (en condiciones de reconstitución) de cada una de las proteínas de la subunidad 30S en ausencia de las demás. Los resultados han mostrado que solamente las proteínas 4a y 4b se fijan fuertemente y en cantidades estequiométricas al RNA. La proteína 14 se fija en menor proporción (un 50 por 100), las 5, 9 y 10a en todavía menor grado (alrededor de un 20 a un 40 por 100), y el resto no muestra una afinidad significativa. Parece ello indicar que en el RNA no existen más que dos, o a lo sumo tres, sitios de fijación no dependientes de efectos cooperativos. Mizushima y Nomura han estudiado el efecto de las proteínas 4a y 4b en la fijación

de la proteína 14 y han observado que, en presencia de aquéllas, la proteína 14 se fija en proporción estequiométrica. Asimismo han observado que, para la fijación máxima de la proteína 9, es necesaria la presencia de las proteínas 4a y 14, pero no la 4b. Prosiguiendo este tipo de estudio, han podido construir el mapa de los efectos cooperativos durante la reconstitución, o mapa de ensamblaje, que se muestra en la figura 1. Las flechas entre las proteínas indican que una proteína

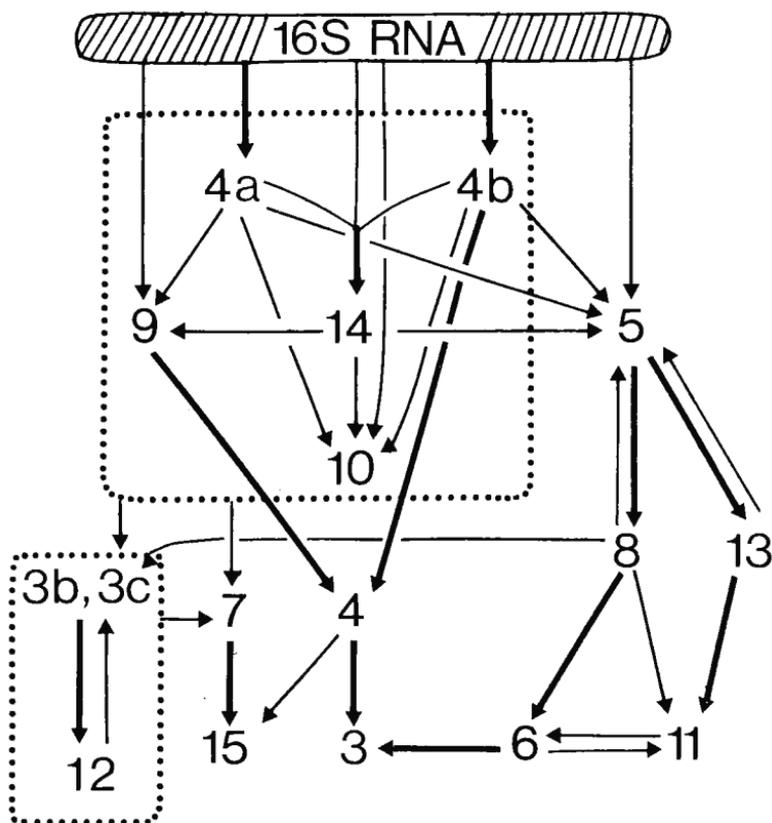


Figura 1.—Mapa de ensamblaje de las proteínas de la subunidad 30S al 16S RNA, según Mizushima y Nomura (20).

estimula la incorporación de otra. Las flechas gruesas indican los efectos fuertes mientras que las finas muestran los efectos débiles. Vemos así, por ejemplo, que la proteína 5 se fija débilmente al RNA, pero las

proteínas 4a, 4b, 14, 8 y 13 cooperan en su fijación máxima. La fijación de la proteína 4 depende fuertemente de la presencia de la 9 y la 4b. La flecha dirigida del rectángulo grande a la proteína 7 indica que la fijación de ésta depende de la presencia de algunas de las proteínas en el rectángulo, aunque no se sabe cuáles. Por razones técnicas no se conocen con exactitud los requerimientos para la fijación de las proteínas 2 y 10; tampoco los de la 1 y la 3a, ya que estas dos proteínas no se fijan en las condiciones de los experimentos.

Hay que advertir que el hecho de que una proteína no se fije hasta que lo haya hecho otra, no implica que la primera no tenga una interacción directa con el RNA. El RNA puede tener un sitio específico para aquella proteína, pero su fijación es tan débil, que interacciones con otras proteínas son necesarias para estabilizarla. También es posible que el sitio de fijación de una proteína se cree mediante un cambio de conformación del RNA inducido por la fijación de otras proteínas, o que incluso algunas proteínas no tengan interacción física con el RNA. Evidentemente, el mapa no aclara la naturaleza de los sitios de fijación de cada proteína.

Mizushima y Nomura (20) proponen que la «secuencia» de efectos representada en el mapa debe coincidir aproximadamente con la secuencia temporal de adición de las proteínas al RNA durante la reconstitución. Esta conclusión se basa simplemente en el supuesto de que, si la proteína B no se fija fuertemente hasta que lo ha hecho la proteína A, lógicamente la proteína B debe fijarse al complejo después de la A. Varias líneas de evidencia, que veremos seguidamente, están de acuerdo con esta suposición y subrayan, además, la validez del mapa de ensamblaje para la síntesis «in vivo» de las subunidades 30S.

Puede verse en primer lugar que las proteínas previamente clasificadas como «esenciales para la reconstitución» (p. 584), es decir, la 4a, 4b, 5, 8 y 9 ocupan posiciones «tempranas» en el mapa. Asimismo, estas proteínas están situadas en enclaves principales del mismo: es decir, de su fijación depende la fijación de muchas otras, lo que explica su carácter de «esenciales para la reconstitución».

En segundo lugar, el grupo de Nomura (20) ha llevado a cabo reconstituciones con 16S RNA, inactivado con reactivos, tal como el ácido monoperftálico. Este compuesto reacciona con las bases del RNA en regiones de cadena sencilla. Utilizando en el sistema de reconstitución RNA inactivado de esta forma, se han obtenido partículas que carecen de las proteínas 1, 2, 3, 6, 11, 15 y probablemente de la 8. Este resultado

es perfectamente compatible con el mapa de la figura 1, ya que en este caso ninguna proteína «distal» se ha incorporado si las más «proximales» y necesarias para su fijación tampoco lo han hecho.

En tercer lugar, el tratamiento de las subunidades 30S con altas concentraciones de CsCl fácilmente separa las proteínas 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 11 (20). El mapa muestra que todas estas proteínas pueden quitarse de la subunidad 30S sin afectar la retención de las restantes (exceptuando la retención de la proteína 15, que puede debilitarse), tal como se observa experimentalmente.

Otra línea de evidencia que resalta la validez del mapa para la síntesis de las subunidades 30S «in vivo» se ha obtenido analizando las partículas 21S defectivas que se acumulan en mutantes que a temperaturas bajas no pueden llevar a cabo la síntesis completa de dichas subunidades (20). Además de una proteína del grupo 3 no bien identificada (1a, 3a, 3b, o 3c), estas partículas contienen las proteínas 4a, 4b, 5, 8, 9, 10a, 13 y 14. Todas estas proteínas se localizan en la parte «temprana» de la secuencia del mapa, estando su presencia en las partículas defectivas de acuerdo con el orden de ensamblaje.

Finalmente, otra confirmación de la validez del mapa ha sido obtenida muy recientemente por Craven y Gupta, así como por Chang y Flaks (21, 22). Los primeros han tratado partículas 30S con tres reactivos de proteínas muy dispares: iodoacetato, que reacciona con los grupos sulfhidrilo; 2-metoxi-5-nitrotrona, que reacciona con grupos amino; y tripsina. Se han clasificado como proteínas «externas» de la subunidad, las que reaccionan por lo menos con uno de estos reactivos, e «internas» las que no reaccionan con ninguno. Según este criterio aparecen como internas la 4a, 4b, 5, 8, 9, 10a y 14, todas ellas situadas sobre el mapa en la fase temprana del ensamblaje. Chang y Flaks (22) han determinado además las proteínas que se van desprendiendo al tratar las subunidades 30S con concentraciones crecientes de tripsina. Así han observado que, en general, las proteínas clasificadas como «tardías» en el mapa son las que se desprenden más fácilmente. Es aparente que estos estudios pueden extenderse a otros reactivos y a la subunidad 50S y permitir la exploración topológica del ribosoma.

## VI. Reconstitución de la subunidad 50S

El grupo de Nomura ha logrado también, muy recientemente, la reconstitución completa de la subunidad 50S (23) con ribosomas de

*Bacillus stearothermophilus*, aunque no ha sido posible con los de *Escherichia coli*. El sistema de reconstitución es prácticamente el mismo que para la subunidad 30S, pero el calentamiento debe hacerse durante más tiempo y a 60° C. En igualdad de condiciones, la reconstitución de la subunidad 50S aparece como unas trescientas veces más lenta que la de la subunidad 30S. Como en las células, ambas subunidades se sintetizan en proporciones equivalentes, parece claro que el sistema «in vitro» carece de algún componente esencial, como, por ejemplo, la falta de condiciones iónicas adecuadas, la ausencia de algún enzima o factor que acelere el proceso, o el uso del 23S RNA de subunidades 50S maduras que se diferencia del 23S RNA naciente en un mayor grado de metilación. Es de esperar que en los próximos años se aclaren estos puntos y se consigan con la subunidad 50S avances tan notables como los obtenidos hasta ahora con la 30S.

## BIBLIOGRAFIA

1. E. KALTSCHMIDT y H. G. WITTMANN: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67,1276 (1970).
2. M. DZIONARA, E. KALTSCHMIDT y H. G. WITTMANN: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 67,1909 (1970).
3. P. VOYNOW y C. G. KURLAND: Biochemistry 10,517 (1971).
4. C. G. KURLAND: Science 169,1171 (1970).
5. A. TISSIERES, J. D. WATSON, D. SCHLESSINGER y B. R. HOLLINGWORTH: J. Mol. Biol. 1,221 (1959).
6. Y. S. CHOI y C. W. CARR: J. Mol. Biol. 25,331 (1967).
7. W. SALSER, R. F. GESTELAND y A. BOLLE: Nature 215,588 (1967).
8. L. M. GOLD y M. SCHWEIGER: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 62,892 (1969).
9. T. E. LIKOVER y C. G. KURLAND: J. Mol. Biol. 25,497 (1967).
10. P. SPITNIK-ELSON y A. ATSMON: J. Mol. Biol. 45,113 (1969).
11. R. I. COTTER, P. MCPHIE y W. B. GRATZER: Nature 216,864 (1967).
12. A. BOLLEN, A. HERZOG, A. FAVRE, J. THIBAUT y F. GROS: FEBS Letters 11,49 (1970).
13. P. TRAUB y M. NOMURA: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 59,777 (1968).
14. P. TRAUB y M. NOMURA: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34,63 (1969).
15. M. NOMURA, S. MIZUSHIMA, M. OZAKI, P. TRAUB y C. V. LOWRY: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34,49 (1969).
16. M. OZAKI, S. MIZUSHIMA y M. NOMURA: Nature 222,333 (1969).
17. A. BOLLEN, J. DAVIES, M. OZAKI y S. MIZUSHIMA: Science 165,85 (1969).
18. L. C. GORINI: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34,101 (1969).
19. M. NOMURA, P. TRAUB y H. BECHMANN: Nature 219,793 (1968).
20. S. MIZUSHIMA y M. NOMURA: Nature 226,1214 (1970).
21. G. R. CRAVEN y V. GUPTA: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67,1329 (1970).
22. F. N. CHANG y J. G. FLAKS: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67,1321 (1970).
23. M. NOMURA y V. A. ERDMANN: Nature 228,744 (1970).



## CAPÍTULO XII

### *MECANISMO DE ACCION DE ANTIBIOTICOS Y OTROS COMPUESTOS QUE INTERACCIONAN CON DNA*

D. VÁZQUEZ

Instituto de Biología Celular. Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INTRODUCCIÓN .....	594
I. MITOMICINAS .....	594
II. AGENTES INTERCALANTES .....	601
III. ACTINOMICINAS .....	609

## INTRODUCCION

Inhibición de síntesis de ácidos nucleicos puede tener lugar por compuestos que o bien interaccionan con el DNA molde, o afectan síntesis de nucleótidos precursores, o bloquean por acción directa la enzima polimerizante. De hecho se conocen antibióticos y otros diversos compuestos representativos de cada uno de estos grupos (tabla 1) (figs. 1 y 2), pero solamente nos referimos aquí a los que bloquean síntesis de DNA y RNA como consecuencia de su interacción con el DNA. Como puede observarse en la tabla 1, son muy numerosos los compuestos de este tipo conocidos, y por ello nos referiremos separadamente a los principales grupos de compuestos cuyo mecanismo de interacción con DNA ha sido estudiado más detalladamente. Por ello consideraremos separadamente tres grupos de inhibidores: 1) mitomicinas; 2) agentes intercalantes, y 3) actinomicinas.

### I. Mitomicinas

Las mitomicinas son un grupo de antibióticos muy estrechamente relacionados entre sí y producidos por distintas especies de *Streptomyces*. De estos antibióticos, los mejor conocidos son la mitomicina C (fig. 3) y la porfiromicina, que es una metil-mitomicina. Puesto que son muy similares entre sí y parecen tener el mismo mecanismo de acción, denominaremos genéricamente mitomicinas a estos antibióticos.

Existe abundante evidencia de que el tratamiento de bacterias con mitomicina C da lugar a la formación de enlaces covalentes entre las dos bandas de DNA complementarias. El DNA extraído de células tratadas con mitomicina contiene una fracción que no muestra los cambios irreversibles que normalmente tienen lugar en la desnaturalización por el calor. Cuando se calienta una solución de DNA normal, no se observan efectos hasta que se alcanza una temperatura crítica (dependiente de la concentración salina), en la cual los puentes de hidrógeno entre las bandas complementarias de DNA comienzan a descomponerse. Si se continúa elevando la temperatura, la destrucción de las fuerzas estabilizadoras

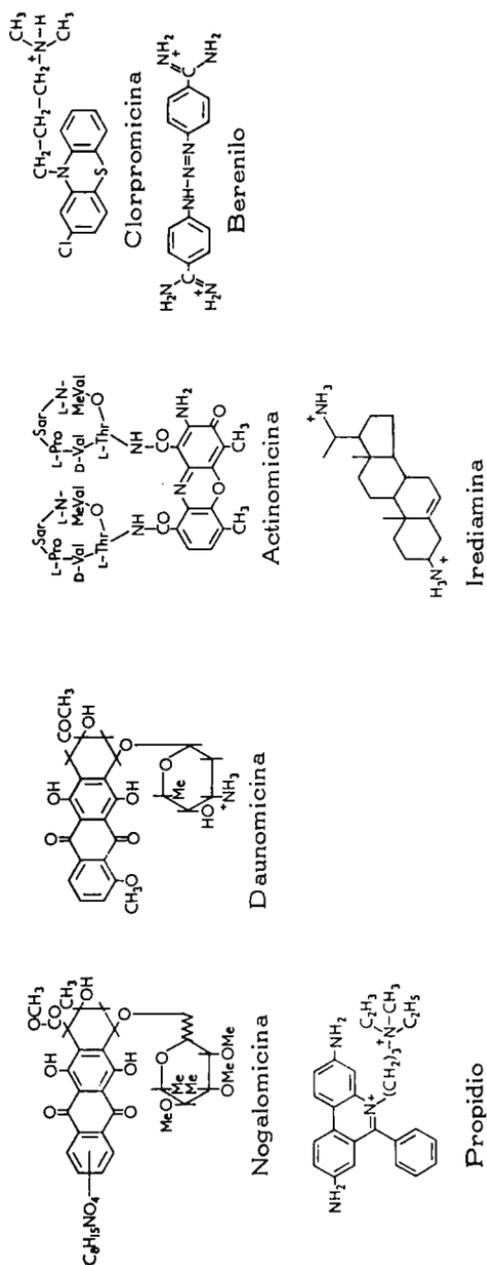


Figura 1

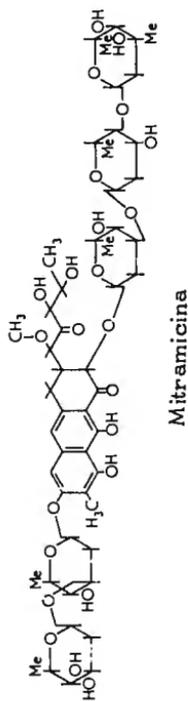
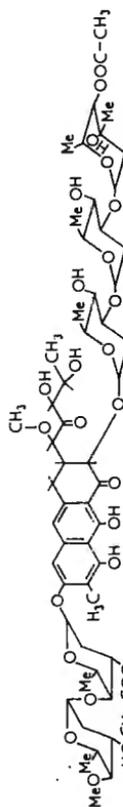
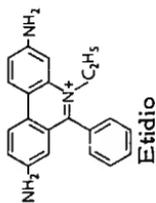
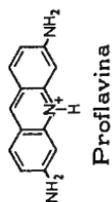
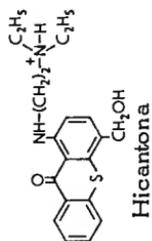
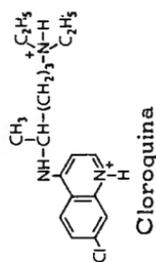
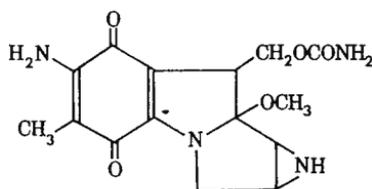


Figura 2

continúa hasta que, finalmente, el DNA se desnaturaliza, separándose las dos bandas (fig. 4; parte superior). La rotura de la estructura helicoidal es evidente, porque se observan cambios drásticos en las propiedades físicas del DNA, observándose un sustancial efecto hipercrómico a 260 m $\mu$ . Una vez separadas, las bandas de DNA se pueden volver a unir por puentes de hidrógeno, recobrando la estructura nativa, conociéndose este proceso con el nombre de renaturalización; evidentemente, la reformación de todos los puentes de hidrógeno es prácticamente imposible, y por ello la renaturalización del DNA, de hecho, nunca es total. Por otra parte, esta renaturalización depende de la temperatura, y



Mitomicina C

Figura 3

se inhibe si el DNA desnaturalizado se enfría rápidamente (fig. 4, parte superior). En la figura 5 se muestran las curvas de densidad óptica, dependiente de temperatura para DNA procedente de *E. coli*, que ha sido crecido o bien en ausencia o en presencia de mitomicina. El DNA de células no tratadas muestra cambios normales de absorbancia al calentar (---), y posteriormente al enfriar rápidamente (.....). Por el contrario, el DNA de bacterias tratadas con mitomicina muestra la curva de absorbancia casi normal al calentar (—), pero hay una gran proporción de renaturalización al enfriar (-.-.-.-), y posteriores ciclos de calentamiento y enfriamiento dan lugar a repetición de esta curva. La presencia de material similar a DNA nativo después de enfriamiento ha sido mostrado examinando la densidad de este DNA por flotación en gradiente de cloruro de cesio. También se mostró que la capacidad transformante del DNA de *Bacillus subtilis* tratado con mitomicina era menor que en el caso del DNA de células no tratadas, pero que aquella actividad residual era altamente termoestable.

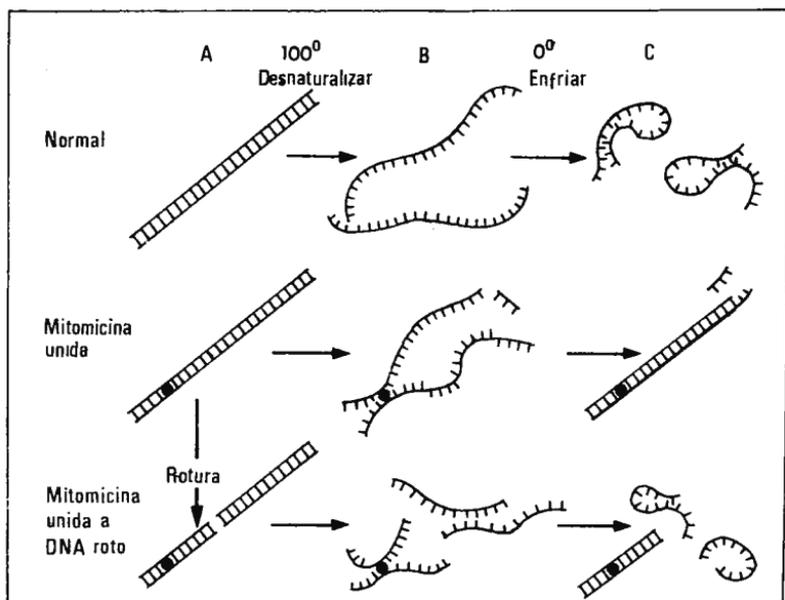


Figura 4

Los resultados anteriormente expuestos indican que el DNA de células tratadas con mitomicina contienen enlaces covalentes que evitan la separación completa de las bandas complementarias de DNA durante la desnaturalización térmica (fig.4; parte central). Manteniendo el alineamiento natural, los enlaces covalentes permiten un retorno muy rápido a la estructura nativa con puentes de hidrógeno en el enfriamiento posterior. Rotura de los enlaces covalentes entre las bandas del DNA por fuerzas de cizalla reduce la cantidad de DNA renaturalizado espontáneamente, liberando las partes de las bandas que no contienen enlaces covalentes (fig.4; parte inferior). La frecuencia de los enlaces covalentes de DNA extraído de *B. subtilis* tratado con 12  $\mu\text{g/ml}$  de mitomicina durante quince minutos, se estimó es de uno por cada 20.000 pares de desoxirribonucleótidos, que corresponde a un peso molecular de  $1,2 \times 10^7$ ; en estas condiciones solamente un  $10^{-4}$  por 100 de las células sobrevivieron al tratamiento.

Los enlaces covalentes inducidos por la mitomicina son causados por fijación covalente del antibiótico al DNA como resultado de alqui-

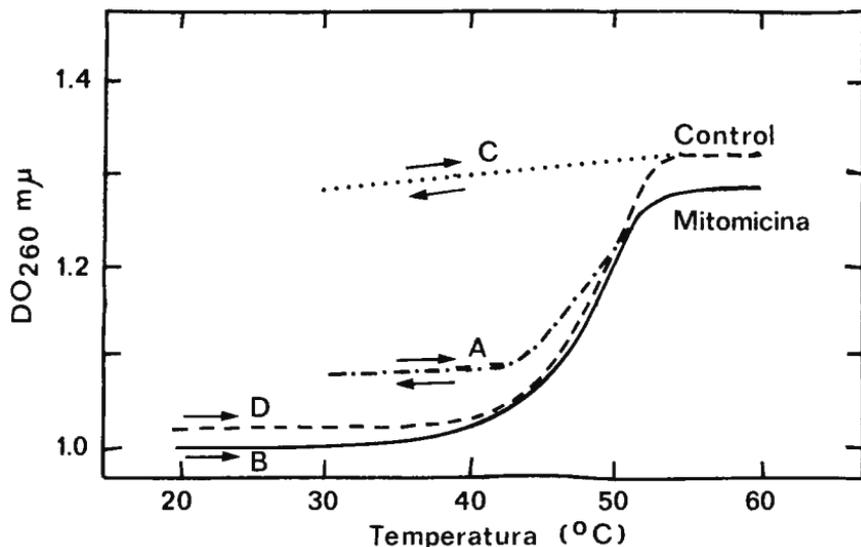


Figura 5.—Curva de transición térmica de DNA de *E. coli* procedente de células no tratadas (-----) o tratadas con mitomicina (———). Se incluyen las curvas obtenidas en el ulterior enfriamiento rápido del DNA desnaturalizado procedente de *E. coli* no tratado (.....) o tratado con mitomicina (- - - - -).

lación bifuncional de grupos de cada una de las bandas complementarias del DNA. No obstante, las mitomicinas son activas en células intactas, pero no en sistemas acelulares trabajando con DNA purificado. Ello es debido a que la mitomicina ha de ser previamente activada para actuar en el DNA. Esta activación del antibiótico requiere una reducción del mismo, que en células intactas es catalizada por diversas enzimas. El proceso de activación enzimática más probable representa una reducción de mitomicina a su derivado hidroquinónico catalizada por una quinona reductasa. El producto activo entonces formado es inestable. En sistemas acelulares puede reducirse la mitomicina, simplemente, añadiendo agentes químicos reductores, como hidrosulfito sódico, borhidrato sódico o hidrógeno molecular, en presencia de paladio como agente catalítico, o enzimáticamente, añadiendo extractos celulares. El resultado de un experimento típico demostrando la formación de enlaces covalentes en el DNA en presencia de mitomicina en sistemas acelulares está representado en la figura 6. La mezcla de la reacción consta de mitomicina, DNA de *Clostridium johnsonii* o *Sarcina lutea* e

hidrosulfito sódico, que inicia la reacción, llevada a cabo en condiciones anaeróbicas en presencia de nitrógeno. La reacción termina precipitando el DNA con alcohol; disolviéndolo, desnaturalizándolo y llevando a cabo centrifugación en gradiente de cloruro de cesio, puede entonces observarse que el DNA que se trató con mitomicina se renaturaliza espontáneamente (áreas rayadas en la figura), lo cual no ocurre con el DNA no tratado. El porcentaje de DNA que se renaturaliza es proporcional al porcentaje de bases G-C del DNA tratado, como puede observarse en la figura 6, lo cual está de acuerdo con experimentos de fijación de ( $^3\text{H}$ ) mitomicina C y ( $^{14}\text{C}$ ) porfiromicina, cuya fijación al DNA también es proporcional al contenido G-C de dicho DNA.

Prueba directa de formación de enlace covalente entre porfiromicina reducida y DNA se tuvo trabajando con ( $^{14}\text{C}$ ) porfiromicina. DNA aislado después de incubación con el antibiótico radiactivo en condiciones reductoras en sistemas acelulares contenía una cantidad de radiactividad correspondiente a una molécula de porfiromicina por cada 500 desoxinucleotidos, y aproximadamente en la misma proporción tiene lugar la alquilación de DNA. Estas medidas, por otra parte, muestran una desproporción entre los niveles de fijación observados (1 : 500 nucleotidos) y la frecuencia de enlaces covalentes anteriormente citada (1 : 20.000 nucleotidos). De estas relaciones se concluye que solamente una de cada diez o veinte moléculas de antibiótico participa en la formación de enlaces covalentes, mientras que otras reaccionan con una banda del DNA solamente. Se ha demostrado que la guanina es más susceptible a alquilación que otras bases, lo cual está de acuerdo con la observación de que los enlaces covalentes son proporcionales al contenido en C + G del DNA.

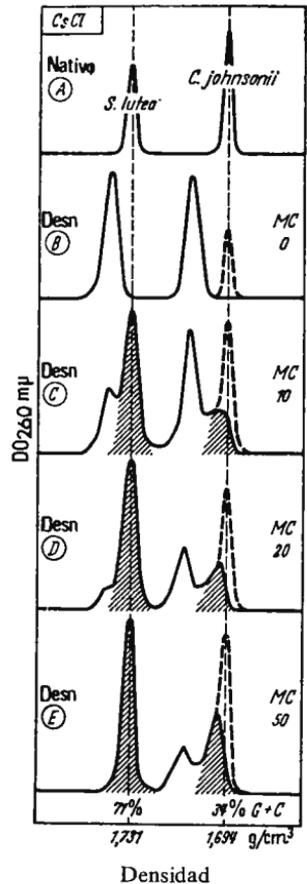


Figura 6.—MC (mitomicina); tratamiento por 0, 10, 20 y 50 min.

Sin embargo, la alquilación por mitomicinas en sistemas acelulares no está restringida al DNA nativo, pues estos antibióticos también son alquilantes de tRNA, polirribonucleótidos sintéticos, ribosomas, RNA ribosómico y DNA desnaturalizado. En vista del amplio espectro de alquilación en sistemas acelulares, es importante conocer dónde se fija la mitomicina que penetra en células vivas, y en particular cuando se asocia con DNA. Se ha comprobado que, en éstas, un 5 por 100 de la mitomicina C se fija al DNA, un 70 por 100 se fija a las proteínas y un 25 por 100 se localiza en la fracción ribosómica. A pesar de la fijación de mitomicina C a distintas fracciones celulares, se ha podido comprobar que, a bajas concentraciones, la mitomicina tiene muy poco efecto en la síntesis de RNA o proteína, pero produce una inhibición inmediata de síntesis de DNA (tabla 2). De la misma manera, en sistemas acelulares se ha observado que la mitomicina no tiene efecto en síntesis de RNA ni proteínas, y tiene un drástico efecto inhibitorio de DNA polimerasa. Esta fuerte inhibición de replicación es de esperar, puesto que replicación de DNA en bacterias requiere replicación de la molécula entera acompañada de separación de las bandas de DNA, y un solo enlace covalente entre las bandas de DNA pararía este proceso. Sin embargo, a pesar de los enlaces covalentes, quedan suficientes regiones del DNA molde sin afectar para permitir que la mayor parte del proceso de transcripción tenga lugar, y quizá, por otra parte, RNA polimerasa sobrepasa de alguna manera la zona del DNA con enlaces covalentes sin interrumpirse la síntesis del RNA.

## II. Agentes intercalantes

Estos compuestos se caracterizan por intercalarse entre las bases consecutivas del DNA nativo helicoidal, fijándose, mediante puentes de hidrógeno, a los fosfatos de desoxirribosa. Son muy numerosos los compuestos que actúan de esa manera, pudiéndose clasificar la mayor parte de los conocidos en los grupos de las acridinas (euflavina y proflavina), antraciclinas (los antibióticos daunomicina, nogalomicina y adriamicina), quinacinas (cloroquina y quinina) y fenantridinas (bromuro de etidio y yoduro de propidio) (figs. 1 y 2).

La hipótesis de la intercalación propone que, mediante desenrollamiento localizado de la doble hélice de DNA en el sitio de fijación de los intercalantes, se producen espacios entre los pares de bases apiladas, permitiendo que una molécula planar (el compuesto intercalante) pueda

TABLA I

<i>Inhibidores de síntesis de DNA</i>	<i>Inhibidores de síntesis de DNA y RNA</i>		<i>Inhibidores de síntesis de RNA</i>	
<i>Afectan síntesis de desoxirribonucleótidos</i>	<i>Se fijan al DNA molde</i>		<i>Afectan síntesis de ribonucleótidos</i>	<i>Interaccionan con RNA polimerasa</i>
Azaserina Diazo-oxo-norleucina	Actinomicinas Mitomicinas Acridinas Antraciclinas Olivomicina Equinomicina Cromomicina Bleomicina Fleomicina Estreptonigrina Luteosquirina	Berenilo Irediamina A Quinacrina Bromuro de etidio Mitramicina Kanchanomicina Hicantona Berberina Distamicina Sibiromicina Hidroxiurea	Cordicepina	Rifamicinas Estreptovaricinas Estreptolidiginas $\alpha$ -amanitina $\beta$ -amanitina

TABLA 2  
PROPIEDADES GENERALES DE COMPUESTOS QUE INTERACCIONAN CON DNA

<i>Reacción con DNA</i>				
<i>Tipo de compuesto</i>	<i>Tipos de enlace</i>	<i>Grupos reactivos en el DNA</i>	<i>Efecto sobre DNA</i>	<i>Inhibición de la enzima en sistema acelar DNA polimerasa</i> <i>RNA polimerasa</i>
Mitomícinas	Covalentes	Guanina	Unión de las dos bandas covalentemente	++ --
Intercalantes	Interacciones electrónicas y puentes de hidrógeno	Pentosa fosfato y bases adyacentes	Disminución coeficiente sedimentación Aumento de viscosidad Alargamiento Desenrollamiento DNA superenrollado Distorsión y estabilización de la doble hélice	++ ++
Actinomícinas	Puentes de hidrógeno	Desoxiguanosina y pentosa fosfato	Estabilización y oclusión del «bucle» menor del DNA. Aumento coeficiente sedimentación Desenrollamiento DNA superenrollado	+ ++

insertarse. En este proceso, los puentes de hidrógeno entre las bases permanecen inalterados, y los pares de bases mantienen su orientación perpendicular al eje de la hélice. La molécula intercalada permanece en un plano perpendicular a dicho eje, y el espacio que ocupa corresponde a una distancia de unos 3,4 Å a lo largo del eje, que es la distancia normal entre dos pares de bases sucesivos en la hélice. Como resultado de ello los pares de bases superior e inferior a la molécula del compuesto intercalado quedan separados el doble de la distancia normal. Para el intercalamiento de distintos compuestos se ha calculado que se necesita un desenrollamiento (hacia la izquierda) de  $12^{\circ}$ - $36^{\circ}$  (según los distintos intercalantes y según las técnicas usadas para esta estimación). El enrollamiento normal del DNA es sabido que es de unos  $36^{\circ}$  hacia la derecha. La figura 7 muestra esquemáticamente la alteración que resulta en la estructura del DNA como consecuencia de la intercalación. El

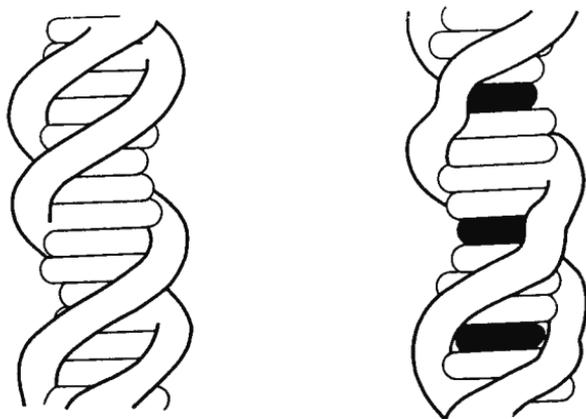


Figura 7.—DNA normal (izquierda) y DNA con moléculas de proflavina (en negro, derecha) intercaladas.

complejo formado se estabiliza por fuertes interacciones electrónicas entre los anillos del compuesto intercalante y los pares de bases superior e inferior. Estabilización adicional puede ser proporcionada por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos del compuesto intercalante (muchos de ellos tienen grupos amino) y los oxígenos cargados de los fosfatos de ambas bandas polinucleotídicas.

Las principales líneas de evidencia en favor de que el modelo de

intercalación anteriormente esquematizado es correcto son las que indicaremos a continuación:

*Alargamiento.*—Se observó, efectivamente, mediante autorradiografía (usando DNA marcado con  $^3\text{H}$ -timidina) que, al tratar con proflavina hay un notable aumento de longitud del DNA, que es proporcional al número de moléculas de proflavina fijadas. Es evidente que, según el modelo anteriormente indicado, al fijarse el intercalante separando los pares de bases adyacentes, resulta en un alargamiento de la molécula del DNA.

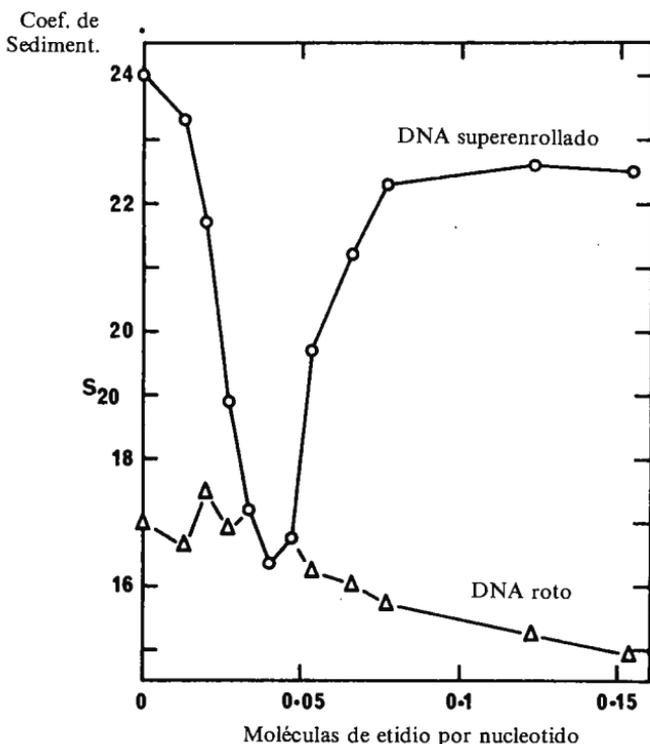


Figura 8.—Efecto de etidio en sedimentación de DNA superenrollado (○) y DNA no circular (Δ).

*Coefficiente de sedimentación.*—Complejos de DNA no circular con compuestos intercalantes dan lugar a una disminución en el coeficiente de sedimentación (fig. 8; Δ—Δ). Ello era de esperar según el modelo de

intercalación, pues, aunque cada molécula de intercalante contribuye al aumento en longitud lo mismo que un par de bases, su masa es generalmente menos de la mitad de la de dicho par de bases, y por ello hay una disminución en la proporción de masa por unidad de longitud del DNA, disminuyendo con ello el coeficiente de sedimentación.

*Viscosidad.*—Formación de complejos de compuestos intercalantes con DNA da lugar a un aumento en la viscosidad de hasta tres veces. Esto es perfectamente compatible con el modelo de intercalación, según el cual al intercalarse el compuesto hay una notable extensión de la estructura helicoidal, resultando una estructura difícil de extenderse ulteriormente, permitiendo, como ocurre en el DNA normal, un arrollamiento o disposición irregular de la molécula lineal en una forma más compacta.

*Difracción de rayos X.*—Mediante esta técnica se observa que, en el caso de DNA que ha fijado agentes intercalantes, desaparecen las manchas características de una doble hélice con distribución regular, lo cual está en favor de que la fijación de aquellos compuestos no tiene lugar simplemente en la parte superficial de las moléculas de DNA.

*Dicroísmo e intensidad de la fluorescencia.*—Mediante estas técnicas se ha demostrado que se cumplen dos premisas necesarias en el modelo de intercalación: *a)* la orientación de los pares de bases relativa al eje de la hélice permanece sin afectar por la presencia del intercalante, y *b)* los anillos planares de las moléculas intercaladas también son perpendiculares al eje de la doble hélice del DNA.

*Estabilización de la hélice.*—Como puede observarse en la figura 9, el punto medio de la transición térmica del DNA que ha fijado un intercalante (ejemplo, bromuro de etidio) sube un número de grados correspondiente a la energía adicional necesaria para disociar las moléculas fijadas, además de separar las dos bandas del DNA, lo cual es de esperar según el modelo de intercalación.

*Espectrofotometría.*—Mediante estas técnicas se ha demostrado que los complejos formados por intercalantes con DNA son metacromáticos e isobésticos (fig.10), fijándose hasta una molécula de intercalante por cada cinco nucleótidos (2,5 pares de bases) del DNA con una fijación

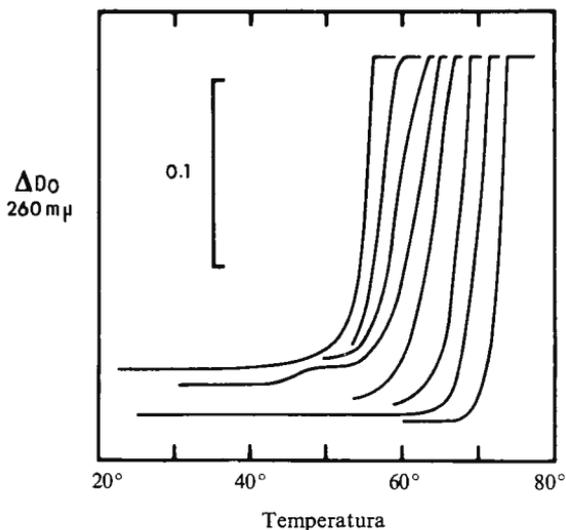


Figura 9.—Transición térmica del DNA en presencia de cantidades crecientes de bromuro de etidio (izquierda a derecha).

primaria y más fuerte, que parece ser corresponde a las moléculas que se intercalan, mientras que a más elevadas concentraciones del intercalante hay un segundo tipo de fijación de estas moléculas planares que se unen al DNA y se disponen una sobre otra como las cartas de una baraja. Para la fijación de estos compuestos se requiere la estructura de la doble hélice del DNA, pero no se requieren bases específicas en el mismo. Se requiere que la molécula intercalante sea planar, y cualquier modificación que se haga en su molécula que la haga menos planar reduce o elimina la fijación por no ser posible la intercalación.

*Desenrollamiento del DNA superenrollado.*—El DNA circular superenrollado se descubrió inicialmente en virus del polio, y posteriormente en mitocondrias y en bacteriófagos  $\phi X 174$  y  $\lambda$ . El DNA superenrollado se caracteriza porque, al cerrarse el círculo, el número de pares de bases ( $n$ ) por cada vuelta de la hélice es menor que el valor que debería tener para cerrarse el DNA, y por ello hay una tensión que tiende a enrollarlo hacia la derecha una vez cerrado. Por este motivo, un tratamiento que conduzca a un aumento de  $n$  o una situación equivalente (por ejemplo, adición de compuestos intercalantes) disminuye

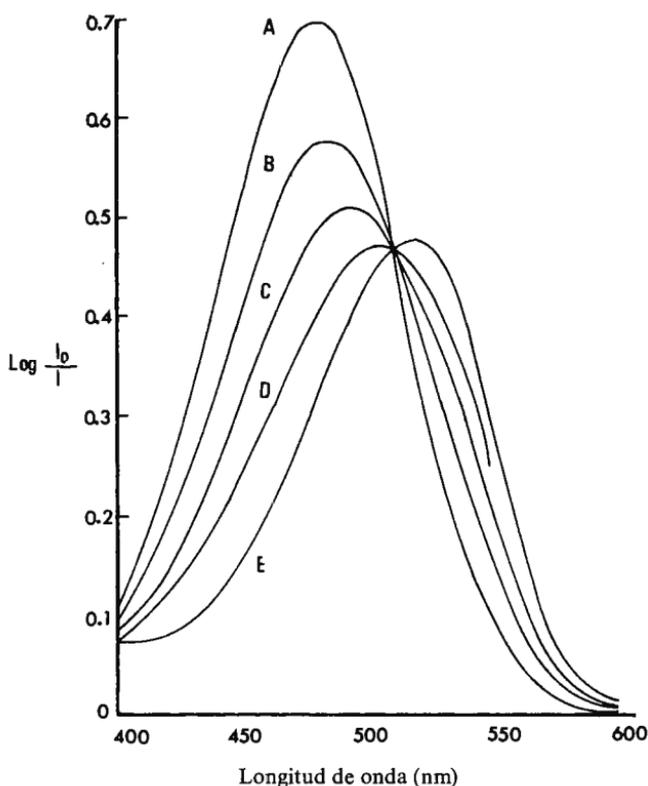


Figura 10.—A = espectro de bromuro de etidio; B - E = cambios en espectro de bromuro de etidio con cantidades crecientes de DNA.

el número de vueltas de superenrollamiento hacia la derecha del DNA circular superenrollado (fig.11).

Si se continúa la fijación de intercalante, llegará un momento en que el DNA circular perderá el superenrollamiento, porque, aunque  $n$  era deficiente, ha sido complementado con las moléculas intercaladas hasta alcanzarse el  $n$  correspondiente a un DNA circular sin necesidad de superenrollarse. Si aún se continúa la fijación de intercalante, el DNA circular se superenrollará hacia la izquierda (fig. 11). Estos cambios pueden detectarse por ultracentrifugación, pues mientras que el DNA circular tiene un coeficiente de sedimentación similar al DNA no circular.

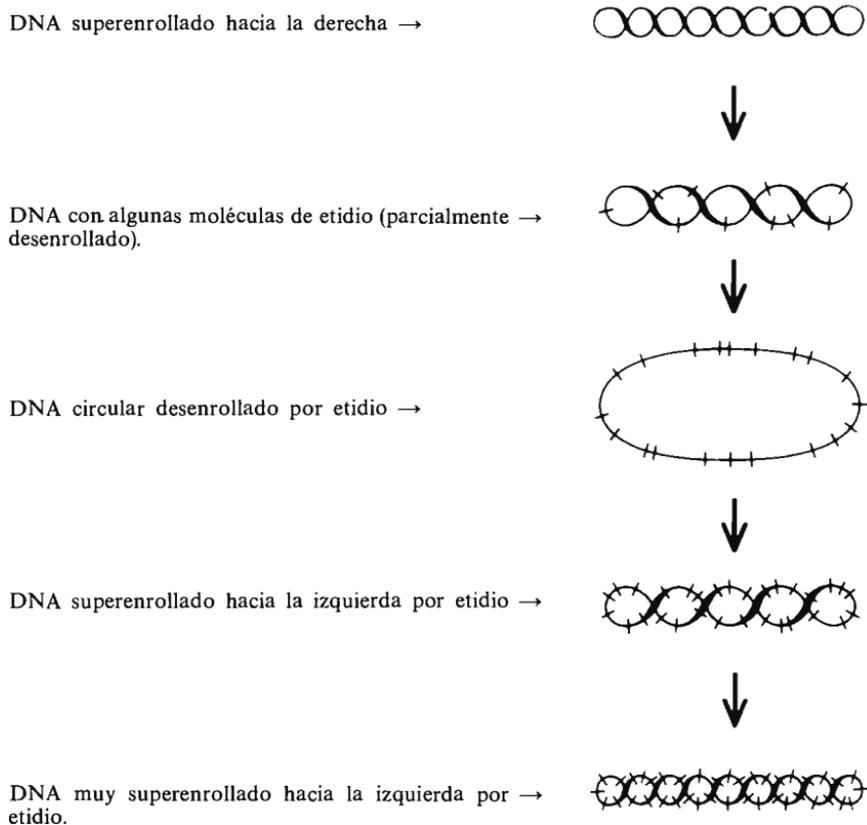


Figura 11.—Efecto de intercalación de bromuro de etidio en DNA superenrollado.

el DNA circular superenrollado, por ser más compacto, tiene un coeficiente de sedimentación más elevado. Por este motivo, al estudiar el coeficiente de sedimentación de un DNA superenrollado parcialmente roto (fig. 8), tenemos dos coeficientes de sedimentación, correspondiendo uno de ellos al DNA circular superenrollado (O), y el otro al DNA no circular ( $\Delta$ ), pues al romperse el círculo desaparece el superenrollamiento. Si a esta mezcla añadimos diferentes concentraciones de un intercalante (por ejemplo, bromuro de etidio o proflavina), disminuirá el coeficiente de sedimentación del DNA lineal, como ya anteriormente

hemos indicado, y de una manera mucho más brusca decrece el coeficiente de sedimentación del DNA superenrollado. De esta manera llega un momento en que los puntos de ambas curvas coinciden; estos puntos de coincidencia corresponden a la pérdida total de superenrollamiento del DNA circular. Si se continúa la adición de intercalante, mientras seguirá disminuyendo el coeficiente de sedimentación del DNA no circular, aumentará el del DNA circular por superenrollamiento hacia la izquierda debido al aumento de moléculas intercaladas.

Por toda la evidencia anteriormente expuesta es aceptado como correcto el modelo de intercalación de numerosos compuestos que se fijan al DNA, aunque aún se perfilan detalles muy concretos del modelo y se estudian las diferencias específicas de acción de los distintos compuestos intercalantes.

Como consecuencia de su interacción con el DNA, todos los intercalantes anteriormente mencionados son inhibidores de DNA- y RNA-polimerasa (tabla 2). En algunos casos hay un efecto diferencial inhibitor, y así bromuro de etidio inhibe mucho mejor RNA polimerasa de mitocondrias que RNA polimerasa citoplasmática, mientras que los antibióticos del grupo de las antraciclinas (daunomicina, adriamicina y nogalomicina) parecen inhibir DNA polimerasa de células tumorales ligeramente mejor que DNA polimerasa de células normales.

### III. Actinomicinas

Las actinomicinas son producidas por varias especies de *Streptomyces* y figuran entre los primeros antibióticos descubiertos; pero, debido a su toxicidad, pronto se desechó su uso en terapéutica. No obstante, estos antibióticos adquirieron un notable interés bioquímico en los últimos diez años cuando se conoció su interacción con el DNA; por otra parte, tienen un uso muy limitado como agentes antitumorales. Diversas líneas de evidencia sugieren que los antibióticos mitramicina y cromomicina pueden tener un mecanismo de interacción con DNA muy similar al de las actinomicinas (figs. 1 y 2).

Dos modelos se han construido para explicar la interacción de las actinomicinas con el DNA, que son el de Reich y el de Müller.

De acuerdo con el modelo de Reich, actinomicina se fija en el bucle menor de la doble hélice de DNA, formando posiblemente hasta siete puentes de hidrógeno (figs. 12, 13 y 14), dos de ellos con guanina, uno con

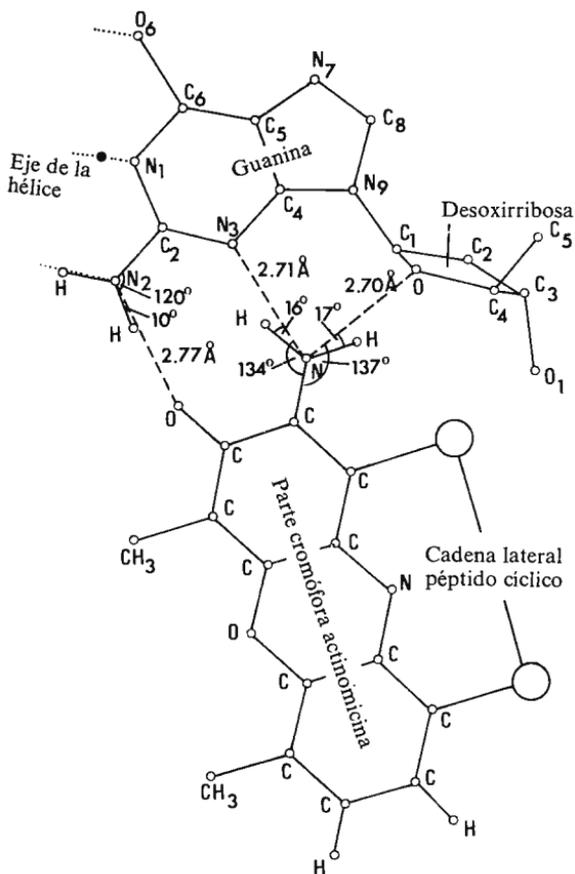


Figura 12.—Modelos de intercalación de Reich mostrando los puentes de hidrógeno entre desoxiguanosina y actinomicina.

desoxirribosa y otros cuatro entre los grupos  $-NH$  de los péptidos de las actinomicinas y los oxígenos del fosfodiéster de la banda diferente a la que contiene la guanina, que interacciona con la parte cromófora de las actinomicinas. Este modelo se basa en el conocimiento experimental de que para la acción de las actinomicinas se requiere en su molécula (1) los pentapéptidos cíclicos y (2) el  $-NH_2$  del C-3, pero diversas sustituciones en el C-7 apenas afectan su actividad. Por otra parte, en el DNA se requiere la presencia de guanina y la estructura helicoidal.

Reich propone el modelo indicado y no cree que las actinomicinas puedan intercalarse sobre la base de las siguientes líneas de evidencia en el estudio del DNA:

*Alargamiento.*—No se observa alargamiento en presencia de actinomicinas.

*Coefficiente de sedimentación.*—Aumenta en presencia de actinomicina, y, como hemos visto anteriormente, esto parece excluir intercalación (fig. 15;  $\Delta - \Delta$ ).

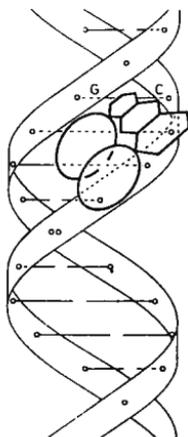


Figura 13.—Representación esquemática de la interacción de DNA y actinomicina. Las cadenas peptídicas de actinomicina se muestran ocupando el bucle menor por una distancia que ocupa tres pares de bases.

*Viscosidad.*—Aumenta sólo muy ligeramente en presencia de actinomicina.

*Difracción de rayos X.*—En presencia de actinomicina no se observó desaparición de las manchas características de una doble hélice con distribución regular.

*Dicroísmo.*—Se observó que, en presencia de actinomicina, su cromóforo tiene una desviación de  $23^\circ$  de la perpendicular al eje del DNA.

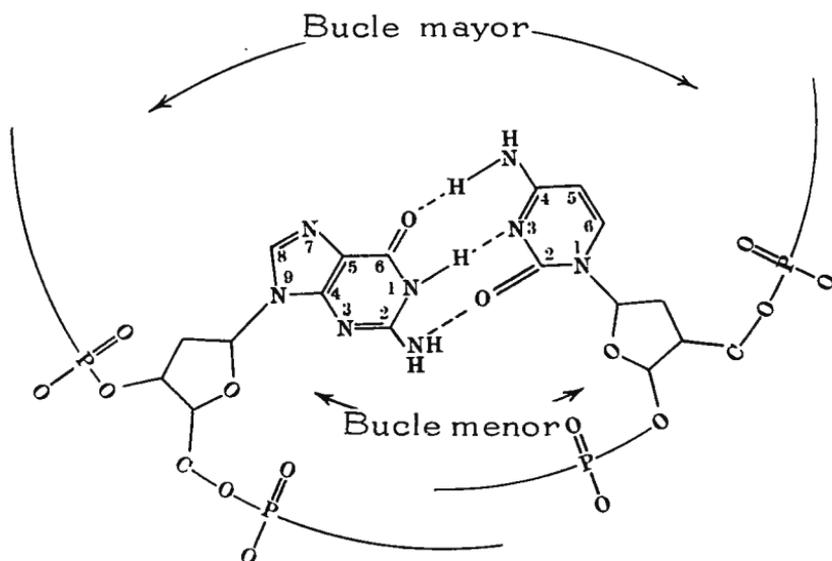


Figura 14.—Estructura del par de bases guanina-citosina en el DNA, mostrando en primer plano el bucle menor en que actúa la actinomicina.

*Espectrometría.*—La fijación de actinomicina apenas es dependiente de  $Mg^{++}$  y es muy sensible a urea. Esto sugiere la poca importancia en la fijación de actinomicinas a DNA de las interacciones electrónicas y la más probable implicación de los puentes de hidrógeno.

Por todos los motivos anteriormente expuestos, se aceptó en principio el modelo de Reich, hasta que, como consecuencia de estudios llevados a cabo por otros investigadores, Müller postuló un nuevo modelo, según el cual, actinomicina se intercala adyacente a los pares de bases G-C del bucle menor del DNA, disponiéndose los péptidos de la actinomicina unidos por puentes de hidrógeno a los oxígenos del fosfodiéster de las bandas del DNA. No obstante, la intercalación de actinomicina ha de ser diferente de los otros modelos intercalantes, y así admite el modelo de Müller que las actinomicinas se intercalan con una desviación de  $23^\circ$  de la perpendicular al eje del DNA, lo cual puede admitirse si las bases adyacentes también se mueven de su posición normal y no quedan totalmente perpendiculares al eje. Este modelo se basa no sólo en los estudios anteriormente mencionados, sino en posteriores trabajos, demostrando que la viscosidad del DNA aumenta

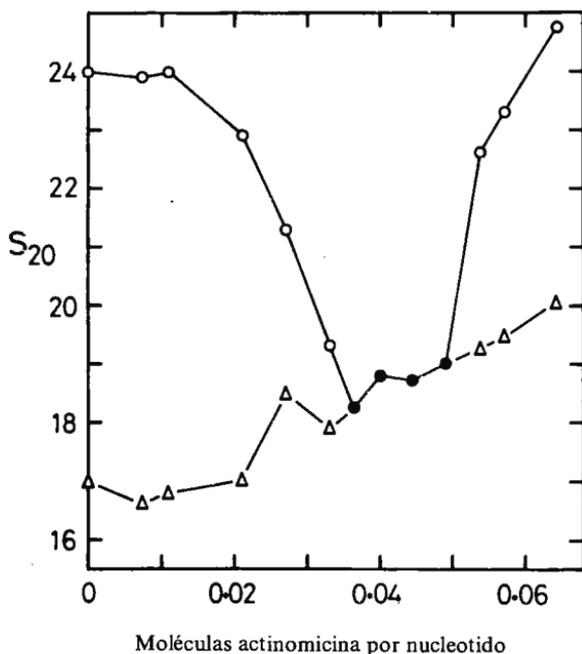


Figura 15.—Efecto de actinomicina en sedimentación de DNA superenrollado (O) y DNA no circular (Δ).

considerablemente en presencia de actinomicina cuando se emplea DNA roto por fuerzas de cizalla, y el coeficiente de sedimentación con este tipo de DNA no aumenta en presencia de actinomicina. Müller sugiere que los resultados obtenidos previamente por otros investigadores sobre viscosidad y coeficiente de sedimentación en presencia de actinomicinas son debidos a usar DNA muy grandes con los cuales forman ojales los péptidos de las actinomicinas.

Refuerzan el modelo de Müller los resultados obtenidos cuando una mezcla de DNA lineal y DNA superenrollado se tratan con actinomicina D (fig.15), pues se obtienen resultados similares a los obtenidos cuando se emplea un conocido intercalante (fig.8); hay inicialmente un desenrollamiento del DNA, y, a más elevadas concentraciones de actinomicina, un superenrollamiento hacia la izquierda, lo cual da lugar a la subida en el coeficiente de sedimentación.

Como consecuencia de su interacción con el DNA, las actinomicinas inhiben preferencialmente RNA polimerasa y, en mucha menor pro-

porción, DNA polimerasa. Se ha sugerido que ello es debido a que RNA polimerasa se fija o desliza a lo largo del bucle menor de la hélice y que la molécula de actinomicina da lugar a obstrucción estérica al contacto entre la enzima y el DNA molde; por otra parte, el efecto inhibitor de actinomicinas sobre DNA polimerasa (mucho menor que sobre RNA polimerasa, según ya se indicó anteriormente) parece ser debido a que, al estar ligado el antibiótico por puentes de hidrógeno a las dos bandas del DNA, presenta un gran obstáculo a su separación, que es necesaria para la replicación.

## BIBLIOGRAFIA

1. W. SZYBALSKI y V. N. IYER, *The mitomycins and porfiromycins*, en *Antibiotics I: Mechanism of action*. Editado por D. Gottlieb y P. D. Shaw (Springer-Verlag 1967).
2. M. J. WARING, *Cross-linking and intercalation in nucleic acids*, en *Biochemical studies of antimicrobial drugs*. Sixteenth symposium of the Society for General Microbiology. Editado por B. A. Newton y P. E. Reynolds (Cambridge, University Press, 1966).
3. M. J. WARING, *Drugs which affect the structure and function of DNA*: Nature 219, 1320 (1968).
4. E. REICH, A. CERAMI y D. C. WARD, *Actinomycin*, en *Antibiotics I: Mechanism of action*. Editado por D. Gottlieb y P. D. Shaw (Springer-Verlag, 1967).
5. M. J. WARING, *Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: Evidence for molecular models involving intercalation*: J. Mol. Biol. 54,247 (1970).
6. W. MÜLLER y D. M. CROTHERS, *Intercalation of closed circular DNA with intercalative dyes. II: The free energy of superhelix formation in SV40 DNA*: J. Mol. Biol. 47,419 (1970).
7. H. J. LI y D. M. CROTHERS, *Relaxation studies of the proflavine-DNA complex: The kinetics of an intercalation reaction*: J. Mol. Biol. 39,461 (1969).
8. N. M. SOBELL, S. C. JAIN, T. D. SAKORE y C. E. NORDMAN, *Stereochemistry of actinomycin-DNA binding*: Nature New Biol. 231,200 (1971).
9. J. H. GOLDBERG y P. A. FRIEDMAN, *Antibiotics and nucleic acids*: Annual Rev. Biochem. 40,775 (1971).
10. E. F. GALE, E. DUNDLIFFE, P. E. REYNOLDS, M. H. RICHMOND y M. J. WARING, *The molecular basis of antibiotic action* (John Wiley and Sons, 1972).



## OTRAS PUBLICACIONES DE LA FUNDACION JUAN MARCH

### COLECCION ENSAYOS

Once ensayos sobre la ciencia, por Benzo, Caro Baroja, Cencillo, Díez Nicolás, Fernández Carvajal, Garigue, Jiménez Blanco, Lain Entralgo, Linz, Rafael Morales, Rof Carballo.

En prensa:

Doce ensayos sobre el lenguaje, por Castro Cubells, Lázaro Carreter, López Aranguren, Liedó Iñigo, Lluís Ninyoles, Marías, Michelena Allisalt, Pinillos, Poyatos, Rodríguez Adrados, Trujillo Carreño, Ynduráin Hernández.

### COLECCION MONOGRAFIAS

Fermín Arteta (*La anticipación de un tecnócrata*), de D. Julio Trenas.

La búsqueda de Dios en el Antiguo Testamento, de D. Olegario García de la Fuente.

Función social de la poesía, de D. Ricardo Molina.

La certeza del yo dubitante en la Filosofía prekantiana, de D. José María Arias Azpiazu.

Estudios médicos y biológicos, de los Dres. Rico Irlés, Rodríguez Torres, Abadía-Fenoll, García García y Llorente.

El músculo cardíaco, del Dr. D. Francisco Torrent Guasp.

Especialización funcional y dominación en la España urbana, de D. Juan Díez Nicolás.

El haiku japonés, de D. Fernando Rodríguez-Izquierdo Gavala.

Ramón Pérez de Ayala, de D. Miguel Pérez Ferrero.

De Tono a Perich (*El chiste gráfico en la Prensa española de la posguerra: 1939-1969*), de D. Iván Tubau.

Estadística matemática y control de calidad, de D. Vicente Martín Valero.

La revolución islámica, de D. Ignacio Olagüe.

En prensa:

Religiosidad y sexualidad, de D. Efigenio Amezcua.

### COLECCION COMPENDIOS

La música española en el siglo XX, de D. Antonio Fernández-Cid.

En prensa:

El derecho agrario, de D. Juan José Sanz Jarque.

### COLECCION ENCUENTROS

Planificación cerebral del hombre futuro, por Rodríguez Delgado, con la participación de los señores: Álvarez Bolado, Gómez Caffarena, González Sastre, González Seara y Pinillos Díaz.

### COLECCION FUENTES LITERARIAS DE LAS LENGUAS HISPANICAS

En prensa:

Deleytar aprovechando, de Tirso de Molina. Edición crítica de D.<sup>a</sup> Pilar Palomo.