

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA-FISICA

**ESTUDIO TERMODINAMICO DE LA UNION DE  
ACTIVADORES A GLUCOGENO-FOSFORILASA**

CARMEN FRANCISCA BARON BRAVO

Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
1983

~~PROV. T. 168~~  
T 3-36



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

DON ENRIQUE F. HITA VILLAVERDE, PROFESOR ADJUNTO  
NUMERARIO Y SECRETARIO DE LA FACULTAD DE CIEN---  
CIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

Núm. \_\_\_\_\_

C E R T I F I C O: Que la presente Tesis  
Doctoral corresponde a la presenta  
da por D<sup>a</sup> Carmen Francisca Barón -  
Bravo que fué calificada con Sobre  
saliente "Cum Laude" el día 21 de  
Mayo de 1.983 por el Tribunal co--  
rrespondiente, que fué aprobado en  
Junta de Facultad celebrada el día  
5 de Mayo de 1.983, siendo el tema:  
"Estudio Termodinámico de la Unión  
de Activadores a Glucógeno-Fosfori  
lasa".

Y para que conste y surta los efectos -  
correspondientes se extiende la presente certifi  
cación con el visto bueno del Ilmo. Sr. Decano  
de esta Facultad en Granada a treinta de Mayo de  
mil novecientos ochenta y tres.



Vº. Bº.

EL DECANO,

*[Firma manuscrita]*

*[Firma manuscrita]*

La presente Memoria corresponde a la Tesis Doctoral defendida por D<sup>a</sup>. Carmen Francisca Barón Bravo ante el Tribunal constituido por:

Presidente: Prof. Dr. D. FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

Vocales: Prof. Dr. D. ANTONIO ROIG MUNTANER

Prof. Dr. D. MANUEL CORTIJO MÉRIDA

Prof. Dr. D. EDUARDO GARCIA PEREGRIN

Secretario: Prof. Dr. D. PEDRO LUIS MATEO ALARCON

Miembros Honorarios: D. JULIAN M. STURTEVANT

D. SHAMUEL SHALTIEL

el día 21 de Mayo de 1983, obteniendo la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE.

R.55.257

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUIMICA-FISICA**

**ESTUDIO TERMODINAMICO DE LA UNION DE  
ACTIVADORES A GLUCOGENO-FOSFORILASA**

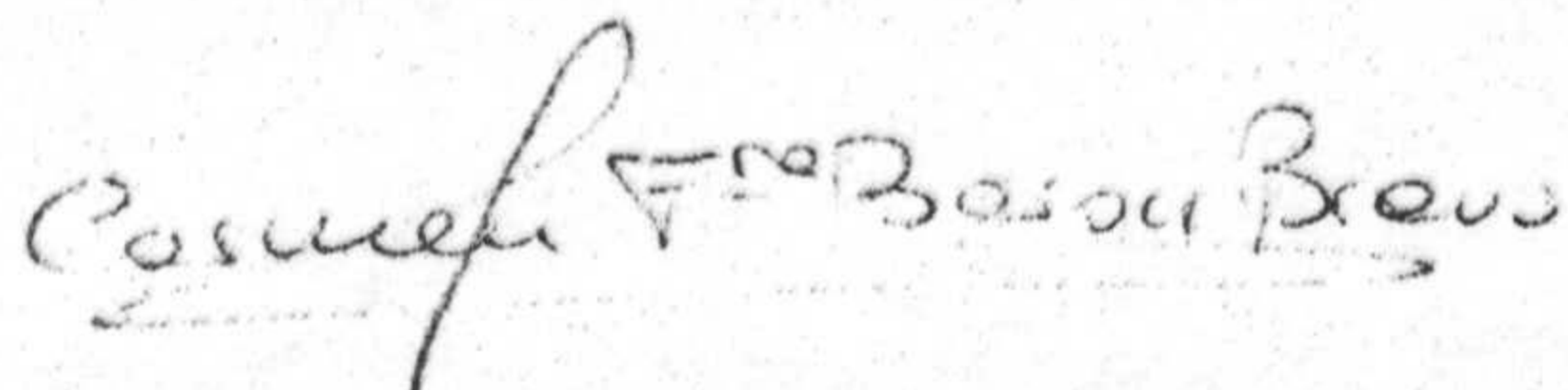
**CARMEN FRANCISCA BARON BRAVO**

**Tesis Doctoral**

<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>
<b>GRANADA</b>
N.º Documento <u>613441607</u>
N.º Copia <u>15398262</u>

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**1983**

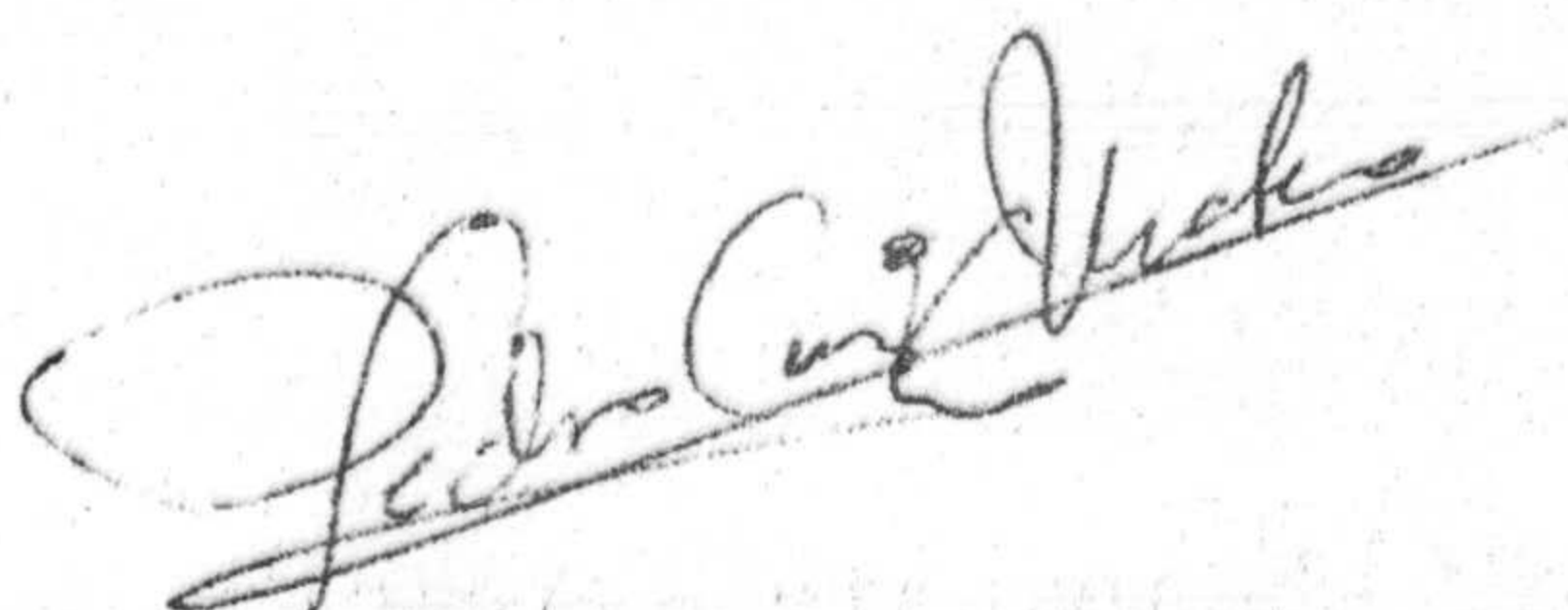
Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor en  
Ciencias, Sección de Químicas.



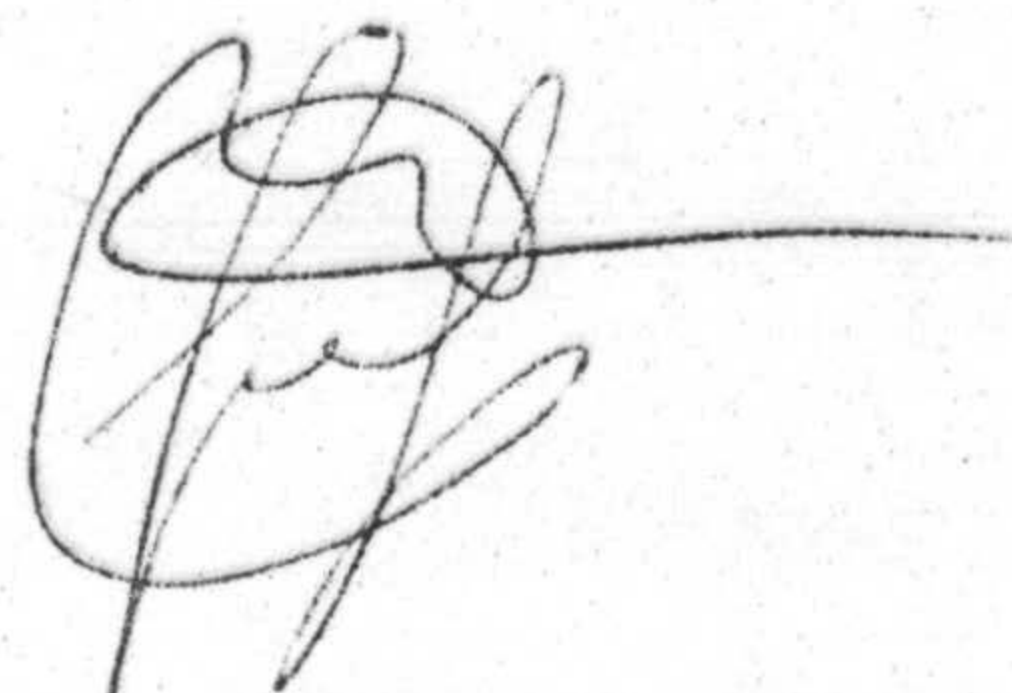
Firmado: Carmen Francisca Barón Bravo, Licenciada en  
Ciencias, Sección de Químicas.

Visado en Granada, a 14 de Abril de 1983

LOS DIRECTORES DE LA TESIS.



Fdo. Dr. D. Pedro Luis  
Mateo Alarcón, Prof.  
Adjunto Numerario de  
Química Física de la  
Facultad de Ciencias  
de la Universidad de  
Granada.



Fdo. Dr. D. Juan S. Ji-  
menez Martínez, Prof.  
Agregado Interino de Qui-  
mica Física de la Facul-  
tad de Ciencias de la  
Universidad Autónoma de  
Madrid.



A mi padre

A Carmela y Miguel





### Mi agradecimiento

Al Dr. D. Pedro Luis Mateo y al Dr. D. Juan S. Jiménez que dirigieron esta Memoria, por su valiosa ayuda.

Al Dr. D. Manuel Cortijo, por su continua orientación y ayuda.

Al P.F.P.I. por la beca que he disfrutado a lo largo de la realización de este trabajo. A todos mis compañeros del Departamento, por su colaboración y estímulo, en especial a Obdulio López, Antonio Parody y José M. Sanchez.

A Miguel A. Castillo, por sus dibujos; a Mercedes Amézcua y Angeles Castillo que escribieron a máquina la presente Memoria.



INDICE GENERAL

Página

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	ANTECEDENTES HISTORICOS.....	9
	1. INTRODUCCION.....	10
	2. EL GLUCOGENO.....	11
	3. EL METABOLISMO DEL GLUCOGENO MUSCULAR Y SU REGULACION.....	14
	4. REGULACION DE LA FOSFORILASA.....	16
	5. ESTUDIOS EN ESTADO CRISTALINO.....	18
	6. ESTUDIOS EN DISOLUCION.....	25
III.	MATERIALES.....	32
	1. OBTENCION DE FOSFORILASA $\bar{b}$ .....	34
	2. OBTENCION DE FOSFORILASA $\bar{b}$ QUINASA.....	38
	3. OBTENCION DE FOSFORILASA $\bar{a}$ .....	41
	4. PREPARACION DE MEMBRANAS DE DIALISIS.....	44
	5. PRODUCTOS.....	45
	6. INSTRUMENTACION.....	46

IV.	METODOS.....	48
1.	MEDIDAS DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.....	50
1.1	<u>Fosforilasa b</u> .....	50
1.2	<u>Fosforilasa a</u> .....	51
1.3	<u>Fosforilasa b quinasa</u> .....	52
2.	PURIFICACION DE FOSFORILASA CON ALUMINA $C\gamma$ . ELIMINACION DE ACTIVIDAD DE AMP-AMINOHIDROLASA.....	54
3.	DIALISIS EN EL EQUILIBRIO.....	56
3.1	<u>Instrumentación</u> .....	58
3.2	<u>Experimentos de diálisis</u> .....	62
3.3	<u>Análisis de datos</u> .....	65
4.	MICROCALORIMETRIA.....	75
4.1	<u>Calibración</u> .....	79
4.2	<u>Experimento de calorimetría</u> .....	80
4.3	<u>Análisis de datos</u> .....	86
V.	RESULTADOS.....	93
1.	PURIFICACION DE FOSFORILASA <u>b</u> DE ACTIVIDAD DE AMP-AMINOHIDROLASA.....	95
1.1	<u>Evidencia de trazas de AMP-aminohidrolasa en preparaciones de fosforilasa b</u> .....	96
1.2	<u>Eliminación de trazas de AMP-aminohidrolasa de las preparaciones de fosforilasa b</u> .....	112
2.	ESTUDIO DEL EQUILIBRIO PROTEINA-LIGANDO.....	119
2.1	<u>Modelos</u> .....	120
2.2	<u>Interacción fosforilasa b - AMP</u> .....	131

2.3	<u>Interacción fosforilasa a - AMP</u> .....	143
2.4	<u>Interacción fosforilasa b - IMP</u> .....	151
3.	ESTUDIO CALORIMETRICO DE LA INTERACCION PROTEINA - LIGANDO.....	160
3.1	<u>Interacción fosforilasa b - AMP</u> .....	161
3.2	<u>Interacción fosforilasa a - AMP</u> .....	178
3.3	<u>Interacción fosforilasa b - IMP</u> .....	187
VI.	DISCUSION .....	193
VII.	CONCLUSIONES .....	252
VIII.	BIBLIOGRAFIA .....	257
IX.	APENDICES .....	268
1.	TABLAS DE DATOS EXPERIMENTALES .....	269
2.	METODO DE GAUSS-NEWTON .....	288
3.	PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL MODELO DE MONOD .....	293
4.	CONVERSION DE LA SEÑAL CALORIMETRICA .....	298

## TABLA DE SIMBOLOS

ADP	adenosín 5'-difosfato
AMP	adenosín 5'-monofosfato
ATP	adenosín 5'-trifosfato
C	sitio catalítico en la molécula de fosforilasa
EDTA	etilen diamino tetraacético
G	sitio de almacenamiento de glucógeno en la molécula de fosforilasa
G <sub>n</sub>	glucógeno con n restos de glucosa
G1P	glucosa-1-fosfato
G6P	glucosa-6-fosfato
Hepes	ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-etanosulfónico
I	sitio de unión del nucleósido ó del inhibidor en la molécula de fosforilasa
IMP	inosín 5'-monofosfato
N	sitio de unión del nucleótido ó del activador en la molécula de fosforilasa
n <sub>H</sub>	índice de Hill
P <sub>i</sub>	ortofosfato
PLP	fosfato de piridoxal
R	conformación activa de la fosforilasa según la terminología de Monod et al.
T	conformación inactiva de la fosforilasa según la terminología de Monod et al.
Tris	tris hidroximetil amino metano
UDP	uridín 5'-difosfato
UDPG	uridín 5'-difosfato glucosa
UTP	uridín 5'-trifosfato
V	número de moles de ligando unido por mol de proteína
Y	fracción de saturación

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 .....	13
2 .....	19
3 .....	20
4 .....	40
5 .....	57
6 .....	59
7 .....	60
8 .....	70
9 .....	71
10 .....	73
11 .....	77
12 .....	78
13 .....	82
14 .....	92
15 .....	97
16 .....	98
17 .....	99
18 .....	103
19 .....	104
20 .....	108
21 .....	111
22 .....	114
23 .....	115
24 .....	132
25 .....	133
26 .....	136
27 .....	139
28 .....	144
29 .....	145
30 .....	146
31 .....	152
32 .....	153
33 .....	162
34 .....	163
35 .....	164
36 .....	169
37 .....	171
38 .....	177
39 .....	179
40 .....	182
41 .....	183
42 .....	188



INDICE DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Página</u>
I .....	142
II .....	150
III .....	186
IV .....	192
V .....	244
VI .....	270
VII .....	271
VIII .....	272
IX .....	273
X .....	273
XI .....	274
XII .....	275
XIII .....	276
XIV .....	277
XV .....	278
XVI .....	279
XVII .....	280
XVIII .....	281
XIX .....	282
XX .....	283
XXI .....	284
XXII .....	285
XXIII .....	286
XXIV .....	287

I. INTRODUCCION



El estudio de los mecanismos que controlan los procesos celulares ha llegado a ser de suma importancia en años recientes. Los controles genético, hormonal y alostérico presentan una propiedad básica en común; la interacción de un ligando con un receptor específico, generalmente una macromolécula, lo que da lugar a un cierto "acontecimiento biológico". Se acepta hoy día que las interacciones ligando-receptor inducen o provocan cambios conformacionales que afectan la zona de la macromolécula o de la subunidad responsable de la función biológica. Los procesos de regulación mejor conocidos y que implican interacción entre subunidades son los relativos a las enzimas reguladoras solubles en comparación con aquellas que presentan receptores embebidos o unidos a una membrana (control hormonal) o los que implican interacción entre proteína y ácidos nucleicos (control genético). Un aumento en la comprensión de las propiedades de las proteínas alostéricas puede ser así un camino para elucidar los fenómenos que tienen lugar en sistemas reguladores más complejos.

Dentro de este tercer tipo de control, el término "alostérico" se acuñó para denominar la inhibición por retroalimentación descubierta en diversas rutas metabólicas en los primeros años cincuenta, ya que el inhibidor se unía en un sitio distinto al del sustrato. La unión de este efector alostérico a su sitio origina la transición alostérica, que no es sino un cambio conformacional específico producido en el

sitio activo (y quizás otras zonas de la proteína) modulando así su actividad. Estos efectores alostéricos no tienen por qué ser a su vez necesariamente inhibidores, pueden también funcionar como activadores. En sus trabajos clásicos de los primeros sesenta Monod y colaboradores proponían precisamente el ejemplo de la activación de la fosforilasa b por el AMP. Aunque las proteínas alostéricas se definieron originalmente como aquellas que poseían sitios reguladores distintos de los activos (catalíticos), se acepta actualmente que cualquier proteína que exhibe interacción entre sitios, aunque sean idénticos, es una proteína alostérica.

Las enzimas reguladoras suelen poseer varias subunidades que interaccionan entre sí via la interfase de contacto por medio de interacciones no covalentes. Cualquier "información estructural" que pase de una a otra subunidad para originar una respuesta o comportamiento cooperativo en la unión de un cierto ligando, lo hará a través de esta superficie de contacto cuya estructura y propiedades serán así cruciales para que dicho fenómeno tenga lugar.

El término de cooperatividad es de uso amplio en sistemas bioquímicos, refiriéndose a una variedad de interacciones o procesos. Quizás la primera utilización del término fué para las transiciones intramoleculares en biopolímeros en las que una multitud de enlaces no covalentes se reorganizan (rompen y/o forman) de forma cooperativa y prácticamente simultánea durante el paso,

por ejemplo, de una hélice a una cadena al azar en polipéptidos, o en la "fusión" de un DNA, al variar la temperatura. En estos casos la transición ocurre en un rango mucho más estrecho de temperatura (pH, fuerza iónica, etc.) que si el proceso fuera no cooperativo. En nuestro contexto la cooperatividad haría referencia a procesos de cinética enzimática o unión de ligandos a macromoléculas, pudiendo ser ésta positiva o negativa. La cooperatividad tanto homotrópica como heterotrópica implica interacciones en el proceso de unión de ligandos, pero hoy día se sabe por muchos estudios en disolución y cristalográficos que estas interacciones ocurren a través de la propia estructura de la proteína (cambios conformacionales) y no directamente entre los ligandos, lo que usualmente requiere una estructura oligomérica para la misma, como se comentó anteriormente. En los fenómenos de cooperatividad de enzimas es una propiedad importante y ampliamente estudiada (más del 50% de las enzimas conocidas muestran algún tipo de cooperatividad) cuya evidencia y significado ha venido aumentando durante los últimos 15-20 años.

La fosforilasa b ha servido como un arquetipo de enzima alostérica por su característica activación por AMP. Sin embargo, la fosforilasa, como también ocurre a muchas enzimas reguladoras, está regulada por un sistema complejo de interacciones alostéricas homotrópicas y heterotrópicas presentando además una regulación peculiar por modificación covalente (fosforilasa a  $\rightleftharpoons$  fosforilasa b). Se conocen hoy día

un gran número de efectores que afectan su actividad en zimática por unión a sitios diferenciados de la estructura, situación que se complica al situarla en su contexto in vivo. No obstante, en los últimos 15 años se han realizado un gran número de trabajos tanto en disolución como por rayos X que han permitido, si no conocer su comportamiento intimo, tener al menos una idea más clara de la complejidad del sistema en estudio. Precisamente la información estructural que se posee gracias a los brillantes trabajos por rayos X de la escuela de Oxford (fosforilasa b) y la de Alberta (fosforilasa a), y la de Seattle en el análisis de la estructura primaria, hacen tentador el estudio termodinámico directo de algunas de las interacciones y propiedades esenciales de la enzima. Así, existen ya algunos estudios calorimétricos de la fosforilasa que han abordado aspectos parciales de estas interacciones y propiedades pero sin llegar a un análisis cuantitativo total de los experimentos ni a la interpretación molecular de los mismos. Además, en algunos de estos estudios aparecen discrepancias importantes en los propios resultados experimentales que dificultan aún más la racionalización de los mismos.

El hecho de que en el Departamento de Química Física se posea una larga experiencia con esta enzima y, por otra parte, el haberse creado en los últimos años una Sección de Microcalorimetría Biológica en este Departamento, ha cristalizado en un proyecto de investigación sobre los aspectos más controvertidos y ac-

tuales del estudio termodinámico de esta enzima. El contenido de esta Memoria encierra gran parte de lo realizado hasta la fecha en esta línea de trabajo, que sigue desarrollándose actualmente.

Cronológicamente el trabajo que aquí se presenta comenzó con el intento de caracterizar termodinámicamente (incluyendo el número de sitios de unión, constantes microscópicas y parámetros termodinámicos asociados) la unión de la fosforilasa b al activador alostérico AMP a 25°C. Puesto que esta unión es fuertemente cooperativa fué necesario realizar estudios paralelos a los de valoración microcalorimétrica por otra técnica, diálisis en el equilibrio, capaz de detectar el número de sitios y constantes de unión.

En este trabajo, tras superar una serie de dificultades inesperadas de interpretación y repetir innumerables experimentos, fué posible detectar y caracterizar una impureza enzimática presente en las preparaciones de fosforilasa b, cuya presencia produce artefactos de transcendencia potencialmente dramática. Tras su identificación se puso a punto un método de eliminación simple y eficaz que era inócuo a su vez hacia la propia fosforilasa.

Aunque la fosforilasa a presente actividad por sí misma, también se une al AMP lo que origina un aumento adicional en dicha actividad. Comoquiera que hoy día se conoce con resolución aceptable la estructura de ambas formas de la enzima, a y b, y, por lo tanto, sus diferen



cias, se planteó y realizó un estudio paralelo al anterior pero referido ahora a la unión del AMP a la enzima fosforilada en la serina-14. Esta investigación paralela ha permitido estimar la termodinámica del cambio conformacional que se produce en la fosforilasa b tras su unión alostérica al AMP. También se ha utilizado el modelo concertado de Monod y colaboradores para el estudio de dicha unión, proponiéndose valores indicativos de los parámetros termodinámicos implicados en dicho modelo en el que se postula y analiza la unión del activador no sólo al estado R sino también al T.

Es hoy día todavía un tema polémico el de si es en realidad el AMP o quizás el IMP el efector realmente responsable de la activación in vivo de la fosforilasa b dados los niveles intracelulares de ambos nucleótidos. A este respecto, se realizó también a título comparativo el estudio termodinámico de la unión del IMP a la fosforilasa b lo que ha permitido caracterizar las diferencias en la unión de ambos ligandos a los diversos tipos de sitios a los que en realidad se unen en la fosforilasa b.

Estudios comparativos sobre la influencia postulada en la Bibliografía de diversos tampones sobre algunas de estas uniones y el efecto del sustrato en la valoración calorimétrica de la fosforilasa b con el AMP cierran el conjunto del trabajo experimental desarrollado.

Finalmente esta Memoria debe enmarcarse en el contexto más amplio del trabajo que sobre este campo de Química Física Enzimática viene desarrollándose en este Departamento.



## II. ANTECEDENTES HISTORICOS



## 1. INTRODUCCION

La glucógeno fosforilasa ( $\alpha$ -1,4-glucan ortofosfato glucosiltransferasa, EC.2.4.1.1), enzima objeto de nuestro estudio, se viene investigando desde cerca de medio siglo (1) y más concretamente viene siendo objeto de estudio en el Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de Granada desde hace diez años (2-6). Sobre ella existen multitud de trabajos y revisiones (7-12) de los que sólo comentaremos aquellos más recientes. Por ello en las páginas que siguen no se pretende hacer una exposición exhaustiva, ni siquiera detallada, acerca del conocimiento actual que sobre esta enzima se posee, pues ésto caería obviamente fuera de los límites y de los fines de este apartado, limitándonos sólo a una presentación casi esquemática de la misma y dedicando un mayor detalle a aquellos aspectos que presentan una mayor incidencia sobre el trabajo descrito en esta Memoria.

## 2. EL GLUCOGENO

El glucógeno constituye la reserva energética de los animales superiores. En éstos, prácticamente todo (más del 95%) se encuentra tanto en las células hepáticas como en las musculares, desempeñando diferentes funciones.

En el músculo, la conversión de glucógeno a ácido láctico a través de la fase anaeróbica de la glucolisis provee la mayor parte del ATP necesario para mantener la contracción muscular. Al no existir en el músculo la enzima glucosa-6-fosfatasa la degradación del glucógeno no conduce a una formación significativa de glucosa. La carencia, además, de las enzimas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, esenciales para la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato, hace que en músculo, la conversión del glucógeno a lactato sea unidireccional. Gran parte del lactato producido en la glucolisis muscular difunde a la sangre y de ésta al hígado. En el hígado es convertido o bien de nuevo a glucógeno o bien a glucosa, que pasa a la sangre.

El glucógeno hepático por tanto, juega un importante papel de reserva en el control de la concentración de glucosa en la sangre. Esta regulación es crítica en tejidos como el cerebro, que utiliza como fuente de energía exclusivamente a la glucosa. Parte de la glucosa de la sangre es utilizada por el músculo para sintetizar de nuevo glucógeno.

El proceso anteriormente descrito recibe el nombre de Ciclo de Cori, en honor a sus descubridores (13).

El glucógeno es un homopolisacárido de residuos de  $\alpha$ -D-glucosa unidos por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucosídicos que forman cadenas largas que se ramifican por la formación de enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  aproximadamente cada 8-10 restos de glucosa (ver figura 1). La presencia de estos últimos enlaces hace que el glucógeno sea soluble en agua, propiedad esencial de un material de reserva que ha de ser metabolizado rápidamente en muchos organismos. Si sólo existiesen enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  las largas cadenas resultantes tendrían una gran tendencia a formar puentes de hidrógeno entre sí; con la ramificación, los segmentos resultantes, más cortos, se separan y forman puentes de hidrógeno con el agua del medio. Además, E. Smith ha demostrado (14) que la proporción del 8 al 12% de enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  en el glucógeno hacen de él el mejor sustrato para la actuación de las enzimas responsables de su síntesis y su degradación, la sintetasa y la fosforilasa del glucógeno, respectivamente.

El glucógeno carece de una estructura molecular definida en cuanto al número de restos de glucosa que contiene y a la posición relativa de éstos dentro de la molécula. Su masa molecular oscila entre  $10^6$  y  $10^8$  daltons.



extremos no reductores

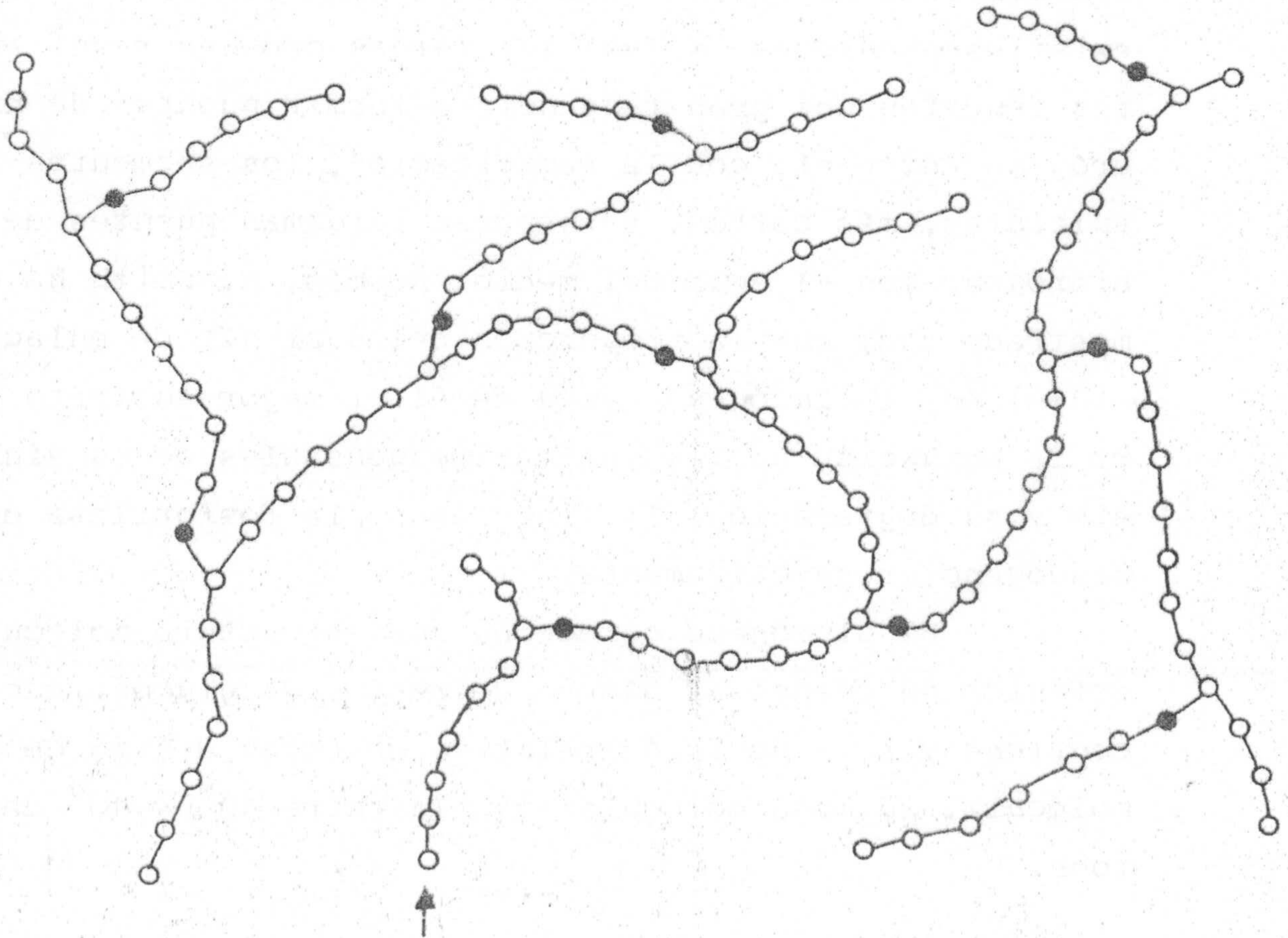
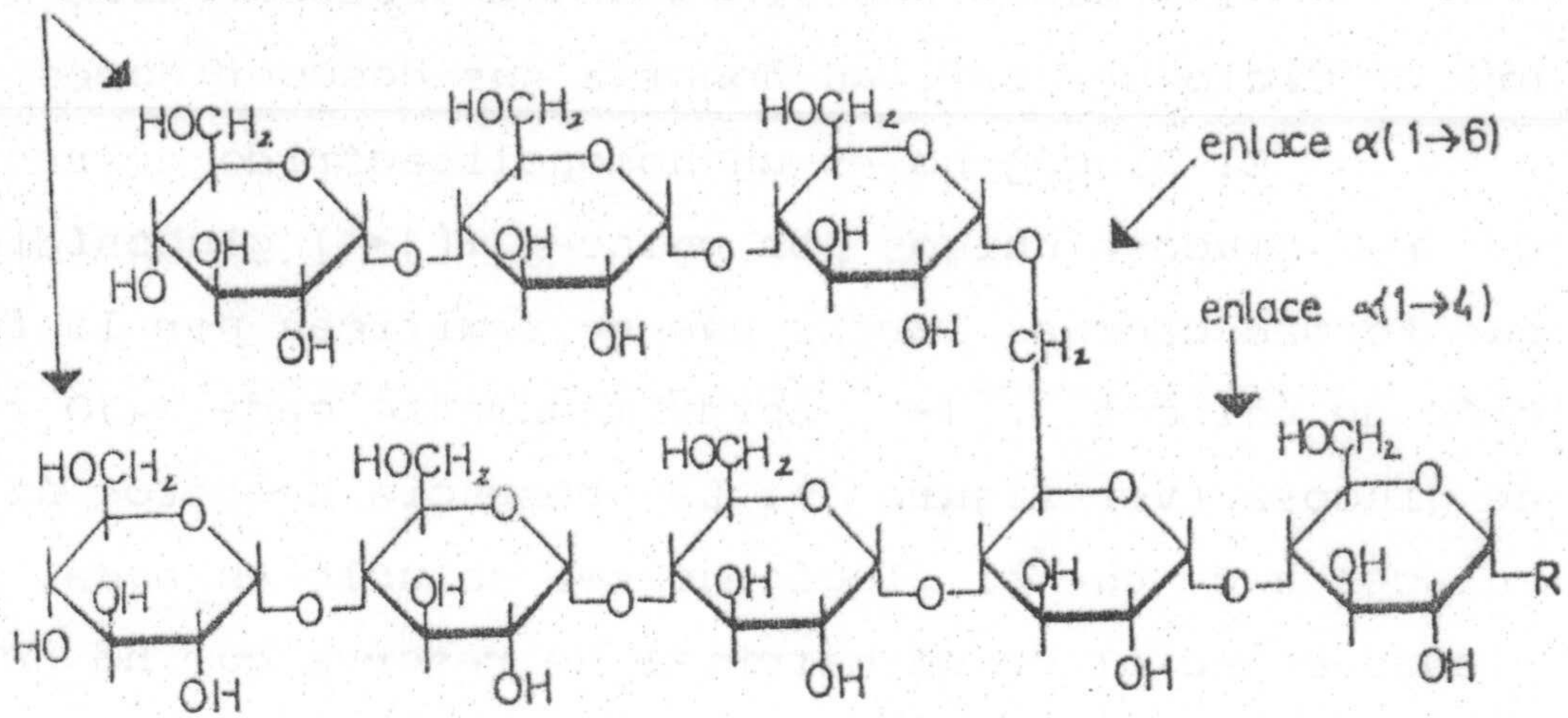
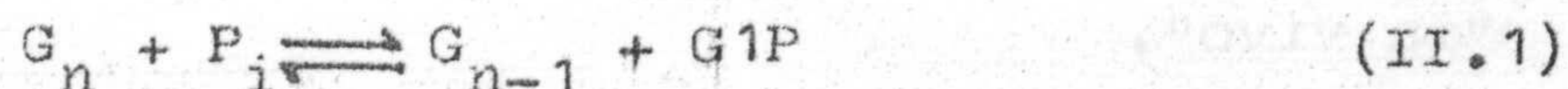


Figura 1. Estructura del glucógeno a diferentes niveles de ampliación. La flecha indica un extremo reductor.

### 3. EL METABOLISMO DEL GLUCOGENO MUSCULAR Y SU REGULACION

El conjunto de reacciones que constituyen el metabolismo del glucógeno es quizás el sistema bioquímico que más haya contribuido a la comprensión de los fenómenos de regulación enzimática. El descubrimiento por los esposos Cori (15) en el año 1938 de la activación de la fosforilasa b por el AMP fué el primer caso conocido de activación enzimática por un efector sin relación estructural con el sustrato. Asimismo, Krebs y Fischer (16), en 1956, demostraron que la fosforilasa b se convertía en a mediante un fenómeno de fosforilación catalizado por una enzima que requería para su actividad ATP-Mg<sup>++</sup>: fué el primer caso en que se describía la regulación de una enzima mediante una modificación covalente (fosforilación) reversible.

La degradación del glucógeno se inicia con la rotura por el ortofosfato del enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) de la glucosa de un extremo no reductor, produciéndose una molécula de glucosa-1 $\rightarrow$ fosfato. Esta reacción:



está catalizada por la fosforilasa y continúa hasta la formación de una dextrina límite de estructura simétrica con cuatro residuos de glucosa a partir de cada punto de ramificación  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) (dextrina límite de Walker y Whelan) (17). Esta dextrina límite pierde su simetría

por la acción de la actividad oligo-1',4→1,4-glucoantrans-ferasa (18) de la enzima desramificante que transfiere tres residuos de glucosa desde la cadena lateral a la principal (dextrina límite de Cori y Larner) (19). Queda entonces un solo residuo de glucosa (puntos negros de la figura 1, página 13) expuesto que es hidrolizado por la acción amilo-1→6-glucosidasa de la enzima desramificante (20). A partir de este momento, la degradación continúa de nuevo con la fosforilasa.

El hecho de que la reacción (II.1) tenga un  $\Delta G^{\circ}$  de 0,5 kcal/mol (21) hace que sea fácilmente reversible "in vitro" y durante mucho tiempo se pensó que ésto es lo que ocurría "in vivo", es decir, que la fosforilasa, con la ayuda de una enzima ramificante, era la responsable de la biosíntesis de glucógeno. Sin embargo, cuando se pudo medir la relación  $[G1P] / [P_i]$  en la célula se encontró un valor de 0,003 frente al valor teórico de 0,4 que da la constante de equilibrio (suponiendo que la relación  $[G_{n-1}] / [G_n]$  vale aproximadamente 1) (22). Esto nos indica que la anterior reacción de degradación catalizada por fosforilasa es esencialmente irreversible "in vivo".

Por tanto, la síntesis del glucógeno en la célula ha de ocurrir por un camino alternativo en el que se utiliza como donador de grupos glucosa el UDPG (uridín difosfato glucosa) (23). Este se forma a partir del UTP y la G1P mediante la acción de la enzima UDPG-pirofosforilasa (24).

#### 4. REGULACION DE LA FOSFORILASA

La actividad de la fosforilasa en la célula es el resultado de dos formas de control diferentes:

- no covalente o alostérico, en el que la actividad enzimática es modificada en función de las concentraciones en el medio intracelular de diferentes metabolitos específicos (AMP, ATP, G6P, etc.).
- covalente, que actúa a través de reacciones de fosforilación-defosforilación en respuesta a una señal hormonal o nerviosa.

La fosforilasa puede existir en dos formas: a y b. La a tiene fosforilado el residuo Ser-14 (12, 25, 26) presenta valores apreciables de actividad (unas 60 unidades) en ausencia de AMP y su actividad sólo aumenta ligeramente por adición de este nucleótido (30%) (10). Sin embargo, la b no tiene la Ser-14 fosforilada, es prácticamente inactiva en ausencia de AMP y llega a valores comparables a los de la a en presencia de AMP por la acción de este nucleótido (10).

La fosforilasa b se puede transformar en fosforilasa a mediante una reacción de fosforilación catalizada por la fosforilasa quinasa, enzima que requiere para su actividad  $\text{ATP-Mg}^{++}$  (la fosforilasa quinasa a su vez, puede existir en dos formas: una defosforilada, la b, prácticamente inactiva en las condiciones metabólicas intracelulares en ausencia de calcio, y otra fosforilada, la a, activa). La reconversión de la fosforilasa a

en fosforilasa b es catalizada por la fosforilasa fosfatasa (8,9).

A concentraciones del orden del mg/ml y temperatura ambiente la forma b es fundamentalmente un dímero y la a un tetrámero, aunque ambas formas son diméricas en las condiciones en que usualmente se determina su actividad catalítica fundamentalmente en presencia de glucógeno y a baja concentración de proteína (27). El monómero está constituido por una única cadena polipeptídica de 841 restos de aminoácidos, peso molecular 97412 daltons y estructura primaria conocida (28).

## 5. ESTUDIOS EN ESTADO CRISTALINO

Ambas formas han sido muy estudiadas por difracción de rayos X en la última década, la a por el grupo dirigido por Madsen en Canadá (12, 29-41) y la b por el dirigido por Johnson en Oxford (42-49). La resolución a que están hechos estos estudios es todavía limitada (2.5 Å) aunque se espera que muy pronto se dispondrá de una mayor resolución (1.9 Å). A continuación resumimos el conocimiento estructural de esta enzima obtenido a partir de esta técnica.

En las figuras 2 y 3 se dan dos esquemas del dímero y monómero de la fosforilasa tomados de las referencias (46) y (12). En el de la figura 2 se ve que cada monómero interacciona con el otro a través de una estructura en forma de torre de unos 20 aminoácidos que encajan en la otra subunidad. La cadena de aminoácidos terminales entre los que se encuentra la Serina-14 se extiende a lo largo de la superficie del otro monómero aunque el grupo fosfato unido a la Ser-14 está formando un enlace de hidrógeno con la hélice  $\alpha$  de su propia subunidad. También un segmento de la cadena de aminoácidos (del 36 al 44) se pliega sobre el sitio del activador alostérico (marcado sitio N en las figuras 2 y 3) de la otra subunidad. Otras zonas de la cadena de aminoácidos interaccionan en la zona de contacto entre subunidades.

Gran cantidad de moléculas de agua están rete-

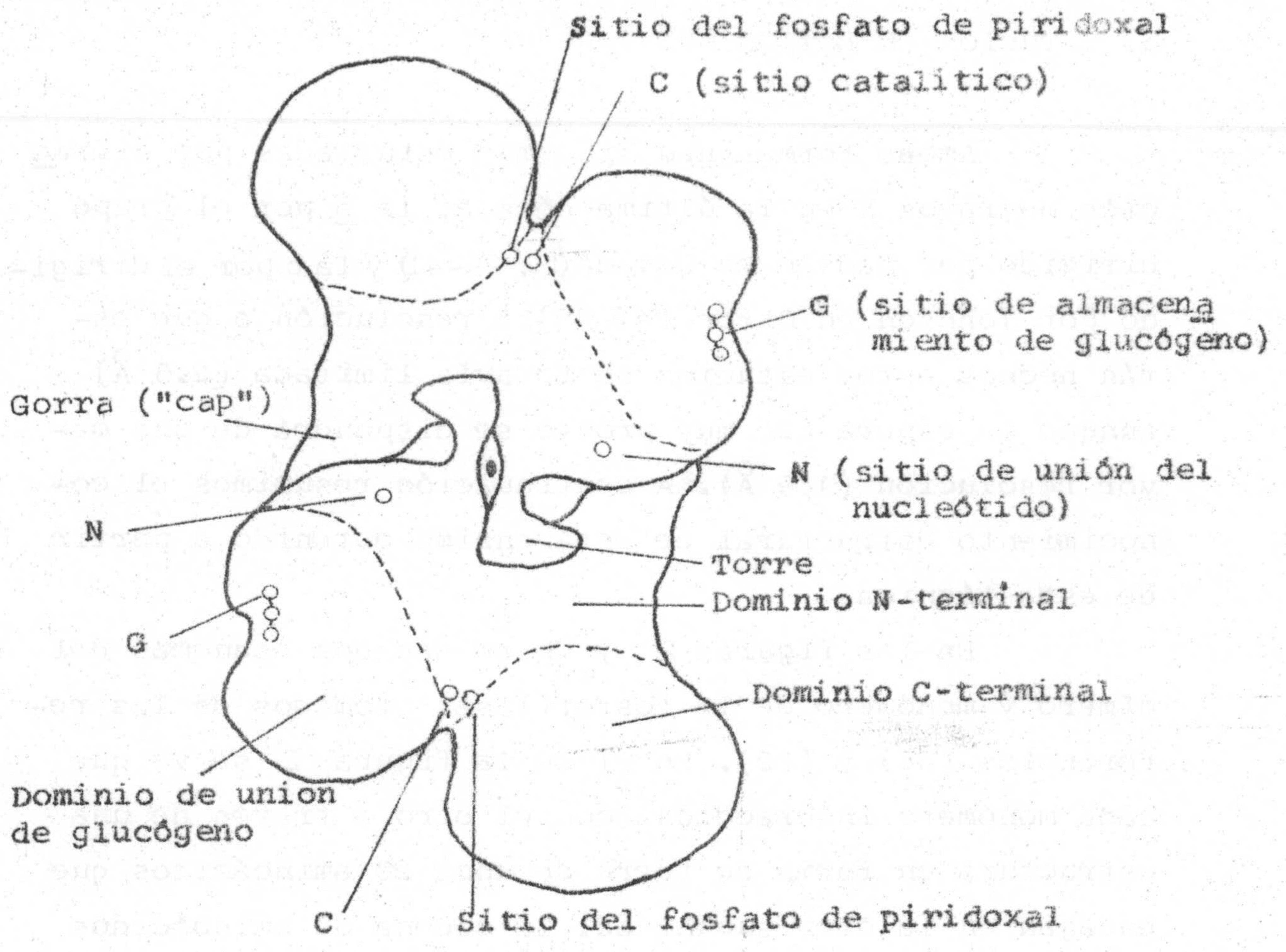


Figura 2. Esquema del dímero de fosforilasa b. Se ha tomado dicho esquema de la referencia ( 46). En él se señalan los diferentes dominios de cada subunidad así como los sitios de unión de sustratos y activador.

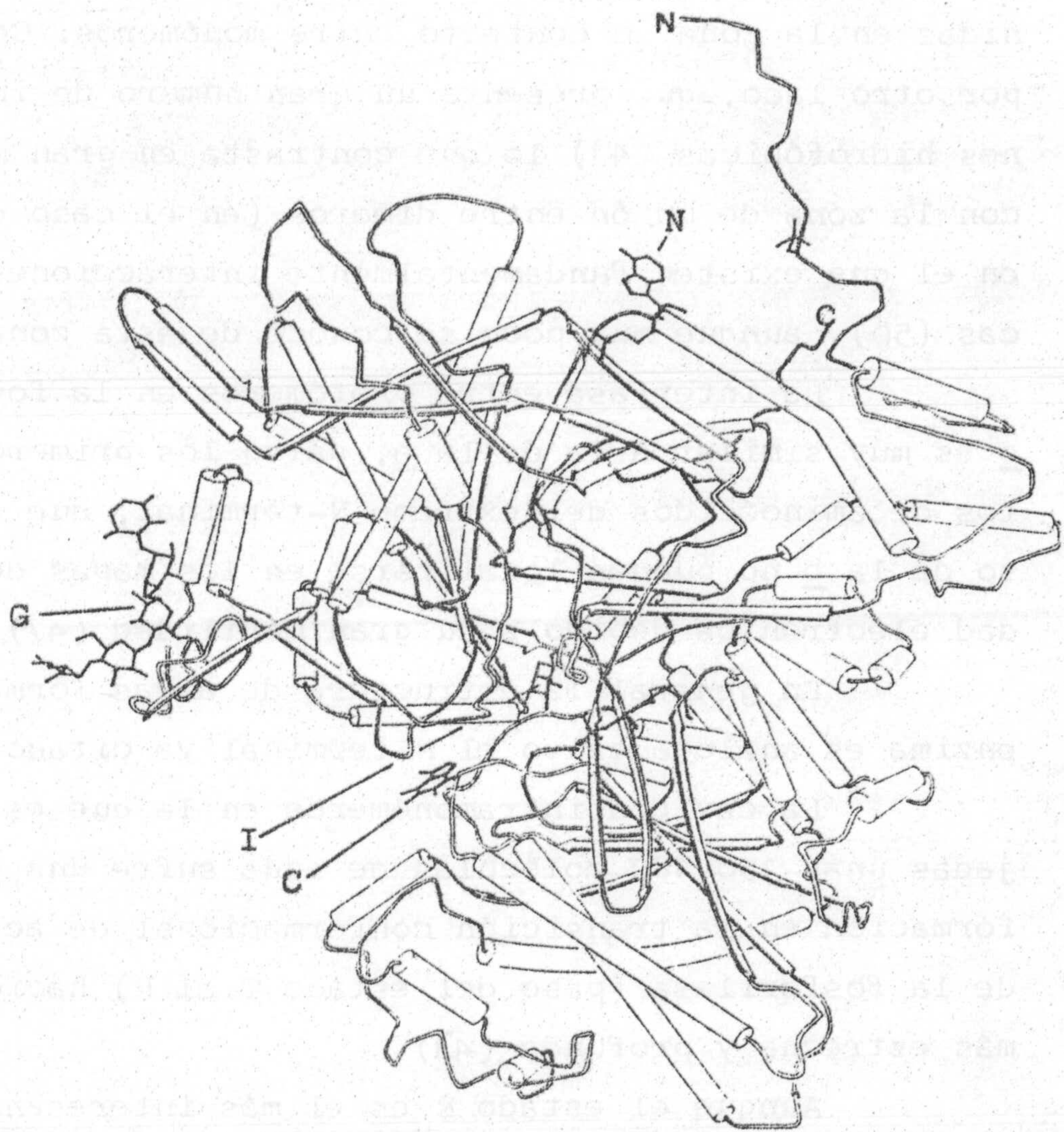


Figura 3. Esquema en perspectiva del monómero de fosforilasa  $\alpha$ . Se ha tomado de la referencia (12). Los cilindros y flechas representan helices  $\alpha$  y estructuras  $\beta$  respectivamente. Se han señalado los sitios de unión de sustratos (C) activadores (N) e inhibidores (I) y sitio de almacenamiento de glucógeno (G).



nidas en la zona de contacto entre monómeros. Contacto, por otro lado, que presenta un gran número de interacciones hidrofóbicas (41) lo que contrasta en gran manera con la zona de unión entre dímeros (en el caso de la a) en el que existen fundamentalmente interacciones iónicas (50), aunque muy poco se conoce de esta zona.

La interfase entre protómeros en la fosforilasa b es muy similar a la de la a, salvo los primeros 19 restos de aminoácidos del extremo N-terminal, que en el caso de la b no pueden localizarse en los mapas de densidad electrónica debido a su gran movilidad (47).

En general la estructura de ambas formas de la enzima es análoga salvo el N-terminal ya citado.

La cavidad intramonómeros en la que están alojadas unas 150-180 moléculas de agua sufre una gran transformación en la transición conformacional de activación de la fosforilasa (paso del estado T al R) haciéndose más estrecha y profunda (41).

Aunque el estado R es el más interesante para estudiar la enzima, sólo ha podido cristalizarse la misma en los estados T (en presencia de glucosa en el caso de la a y en presencia de IMP en el caso de la b). Ello limita la información que se obtiene de los diagramas de difracción de rayos X, aunque en algunos casos se han podido realizar estudios parciales de algún sitio en el estado R (32).

Volviendo a los esquemas dados en las figuras 2 y 3 se observan una gran cantidad de "sitios" por

monómero. Así el glucógeno (uno de los sustratos) además de unirse al sitio activo (sitio C) se une al sitio G, o sitio de almacenamiento, incluso más eficientemente que al sitio activo. Este, además de enlazar al otro sustrato (glucosa 1-P o fosfato), incluye al cofactor, fosfato de piridoxal (PLP), lo que hace muy plausible que este cofactor esté implicado en la catálisis enzimática, hecho sobre el que parecen existir hoy en día evidencias (51) aunque no esté taxativamente demostrado. El sitio C está en el fondo de una profunda bolsa hidrofóbica de la que parece ser que el agua está excluida, con lo que la fosforólisis (en vez de la hidrólisis) está favorecida (52). Aunque gran parte de los restos aminoácidos alrededor del sitio activo están localizados, la baja resolución a que están hechos los estudios por rayos X por un lado y la ya mencionada existencia del estado T en los cristales hace que su utilidad sea aún limitada.

En cuanto al sitio (o sitios) de unión de los nucleótidos se ha encontrado que el AMP se une fuertemente a dos sitios denominados sitio del activador (N) y del inhibidor (I)(47,53). Se admite hoy día que el sitio N es el responsable de la activación de la fosforilasa (47). Aunque "reconoce" muy bien el AMP, este sitio es bastante indiscriminado en cuanto que se unen a él diversos ligandos fosforilados, tales como ADP, ATP, IMP, glucosa 1-P, glucosa 6-P, UDPG, etc.

Aunque la tirosina 155 está localizada en las

proximidades del sitio N, es la tirosina 75 el aminoácido que puede estar interaccionando con el nucleótido (47). También se ha encontrado que el Glu-72 está formando un enlace de hidrógeno con el grupo 2'OH de la ribosa y las argininas 308 y 309 interaccionan con el grupo fosfato del AMP (47). El sitio I se conoce también como sitio de los nucleósidos, puesto que a él se unen fundamentalmente estos compuestos, aunque también reconoce bases púricas y nucleótidos. Su estructura es de una simple ranura hidrofóbica en la superficie de la proteína cerca de la entrada a la cavidad del sitio activo. Está constituido fundamentalmente por sólo dos restos aminoacídicos, Phe-285 y Tyr-612 (40).

Aunque estos resultados están continuamente mejorándose por la activa investigación que ambos grupos de científicos están realizando y la técnica utilizada es indiscutiblemente la más apropiada para la investigación estructural, es conveniente recordar que los estudios en disolución son de alguna forma tan importantes como aquellos, en cuanto que abordan otros aspectos de la dinámica macromolecular que complementan la información puramente estructural. Así, estudios encaminados a la caracterización y función de restos de aminoácidos en sitios significativos de la enzima, la investigación del mecanismo catalítico, su activación e inhibición, y en general la caracterización energética (termodinámica) de cualquier proceso de interés en el sistema tal como la

unión de ligandos varios (activadores, inhibidores, sustratos, etc.), cambios conformacionales inducidos en la macromolécula, desnaturalización-renaturalización, etc., son característicos de sistemas macromoleculares en disolución. Por último, resulta a veces conflictivo el equiparar literalmente estructuras cristalinas con aquellas existentes en disolución; baste citar en nuestro contexto que la distancia estimada entre sitios N del dímero por rayos X es  $\approx 45 \text{ \AA}$  (47), mientras que en disolución el valor aportado es de  $\approx 15 \text{ \AA}$  (54).

## 6. ESTUDIOS EN DISOLUCION

Como es natural, la mayoría de los estudios realizados con fosforilasa lo han sido en disolución. Durante los últimos diez años dichos trabajos han estado encaminados fundamentalmente a dos objetivos: a) Mecanismo catalítico y papel desempeñado por el PLP; b) Cambios conformacionales en la enzima y regulación alostérica.

Respecto al primero ya hemos dicho que no nos referiremos a él por ser poco relevante al estudio realizado en este trabajo, aunque puede encontrarse abundantemente pormenorizado en la referencia (11) y trabajos posteriores (51, 55).

Referente al segundo aspecto, conviene señalar que aunque la existencia de fuertes interacciones heterotrópicas (por ejemplo, aumento de la  $K_m$  de unión del AMP por efecto de los sustratos y viceversa) y homotrópicas es conocida desde los últimos cincuenta y principio de los sesenta, su estudio se intensificó tras la publicación del modelo alostérico de Monod, Wyman y Changeux (56). Gran parte de estos estudios han sido realizados por la escuela francesa del Prof. Buc (57-69) y relacionado con ella la del grupo español del Prof. García Blanco, también dedicado al estudio de la fosforilasa. Una exposición detallada de dichos estudios y otros relevantes a la unión de ligandos a la enzima y el estudio de su regulación alostérica queda fuera de los límites de esta Memoria, por lo que nos referiremos sólo a los as-

pectos pertinentes al estudio aquí realizado remitiendo al lector a las referencias de revisiones para todos los demás aspectos (7-12).

La fosforilasa b es una enzima que presenta un complicado sistema de regulación de su actividad catalítica. Uno de los elementos de este sistema está constituido precisamente por la interacción con la molécula de AMP, la cual es capaz de transformar una especie casi catalíticamente inactiva en una enzima que cataliza la fosforolisis del glucógeno. La unión de este nucleótido a la enzima afecta tanto la  $V_{max}$  como la  $K_m$  del sustrato, glucosa-1-fosfato, ajustándose así a un sistema tipo K.V (70). El efecto regulador del AMP se ha interpretado en términos de un cambio conformacional producido en la enzima por la unión del nucleótido (53,57,71). Sin embargo, otros trabajos indican que es una enzima solamente del tipo K (57), quizás porque estos autores sólo la examinaron en el sentido de degradación del glucógeno.

El péptido del N-terminal que incluye la Ser-14 que se fosforila en el paso de la forma b a la a puede eliminarse de la proteína por proteólisis limitada (72). La fosforilasa así obtenida, llamada fosforilasa b', puede activarse todavía por la presencia del AMP, aunque las interacciones homotrópicas (cooperatividad positiva en la unión del AMP) han desaparecido, por lo que puede pensarse que éstas ocurren a través de este péptido de gran movilidad (30) que, como ya hemos dicho,

está muy próximo a la zona de contacto entre los dos monómeros.

La interacción entre el activador y la fosforilasa b se ha estudiado bajo una gran variedad de condiciones experimentales por medidas de actividad (57,70), diálisis en el equilibrio (53,57), resonancia de spin electrónico (71,73), calorimetría (74,75), fluorescencia (66), etc. Dicha interacción presenta dos características especialmente notables: a) La interacción es de naturaleza alostérica heterotrópica (1). b) La unión del AMP al dímero de fosforilasa es cooperativa, de manera que la unión de la primera molécula a una subunidad de dímero de la enzima influye en la afinidad con la que una segunda molécula de nucleótido se une a la otra subunidad. Una medida cuantitativa de la cooperatividad la proporciona el coeficiente de Hill (76). En la unión de AMP a fosforilasa b el coeficiente de Hill obtenido a partir de medidas de actividad (9), resonancia de spin electrónico (71), diálisis en el equilibrio (68,77,78) tiene un valor que oscila alrededor de 1,4, el cual indica que existe cooperatividad positiva entre los sitios de unión.

Kastenchmidt et al. (79,80) estudiaron la unión de AMP a fosforilasa b a 23°C. De sus resultados dedujeron que se unía una molécula de activador por monómero de enzima. Este mismo estudio lo realizaron Morange et al. (53) a baja temperatura (4°C), encontrando que en

el monómero de fosforilasa b había dos sitios con distinta afinidad para la unión del AMP, los que hemos llamado en el apartado anterior sitios N e I.

Los únicos datos en disolución y a 25°C que indican la existencia de estos dos sitios diferentes para la unión del AMP han sido aportados por Wang et al. (74,75) y Merino et al. (81-84) a partir de medidas calorimétricas. Las conclusiones referentes a la existencia de dicho segundo sitio se obtuvieron como consecuencia del perfil bifásico que presentaban las curvas calorimétricas obtenidas por estos autores. Sin embargo, los dos grupos diferían claramente en los valores de calor obtenidos y en el rango de saturación del segundo sitio. Una razón argumentada por Ho y Wang (75) para justificar la existencia de este sitio fué que la saturación de la enzima por AMP por medidas calorimétricas se alcanzaba a una concentración de nucleótido superior a 1 mM, concentración a la cual la enzima presenta máxima actividad. Debido a que a la concentración de 1 mM ya se ha alcanzado el primer plateau de la curva calorimétrica, éste lo interpretaron como saturación del primer sitio y el segundo plateau de dicha curva lo interpretaron como saturación del segundo sitio, indicando así que estos segundos sitios no deberían influir en la actividad. Sin embargo, en estos dos tipos de medidas (de actividad y calorimétricas) el sistema no se encuentra en las mismas condiciones, por lo que esta comparación en cuanto al rango de saturación de la enzima por AMP no es totalmen-



te correcta. En las medidas de actividad la enzima se encuentra en presencia de sustratos, los cuales aumentan considerablemente la afinidad de la misma hacia el AMP (57) (ver Discusión).

En sistemas simples el análisis de los datos calorimétricos de interacción ligando-proteína permite obtener el número de sitios en la macromolécula para la unión del ligando (85). Sin embargo, en un sistema de unión cooperativa no es posible tal determinación a partir de datos exclusivamente calorimétricos por lo que no se puede establecer ninguna afirmación respecto del número de sitios de unión y mucho menos realizar el cálculo de los parámetros termodinámicos de unión correspondientes a cada sitio.

Además del AMP otro nucleótido, el IMP, puede también activar la fosforilasa b. La concentración intracelular del IMP es superior a la del AMP y este hecho ha llevado a manifestar a Aragón et al. (86) que aunque el IMP es un activador de la fosforilasa b más débil que el AMP (70) puede desempeñar un importante papel fisiológico, siendo quizás el principal activador en un ejercicio continuado.

El comportamiento cinético del IMP difiere de la activación por AMP al menos en dos aspectos: a) Incrementa la  $V_{max}$  sin afectar la afinidad de la enzima por la glucosa-1-fosfato. b) La cooperatividad homotrópica de la glucosa-1-fosfato en presencia de IMP es grande e independiente de la concentración de nucleótido.

En base a estas diferencias Black y Wang (70) sugirieron que el cambio conformacional inducido por IMP es distinto del que produce el AMP. Esta sugerencia se confirmó posteriormente por estudios con diferentes técnicas, resonancia de spin electrónico (10), calorimetría (75), fluorescencia (66) y reactividad de grupos SH (53). La cooperatividad homotrópica del IMP es menor que la del AMP (87).

Por otra parte, estudios cristalográficos de fosforilasa p en presencia de IMP muestran que este nucleótido se une a los dos mismos sitios del monómero de enzima que el AMP (47).

Morange et al. (53) realizaron estudios de unión de análogos del AMP a la enzima, determinando de esta manera las partes de la molécula del nucleótido requeridas para que dicha unión fuera efectiva. Obtuvieron que el grupo 5'fosfato y la naturaleza púrica de la base son críticos para que la unión se realice en el sitio correcto del AMP. Estudios de difracción de rayos X han confirmado la intervención de esta parte de la molécula en la unión del nucleótido a la enzima (47). Previamente a estos estudios Mott y Bieber (88) habían indicado que no existe una correspondencia directa entre la especificidad estructural requerida para la unión del compuesto al sitio del activador y la formación de una especie catalíticamente activa. Estos autores obtuvieron que la integridad del grupo fosfato es esencial para la actividad y sugirieron que el hidrógeno de este grupo estaría

formando un enlace de hidrógeno con algún resto de la fosforilasa b. El cambio conformacional producido por el AMP según estos autores podría originar un cambio suficiente en el entorno del PLP para justificar el "quenching" de la fluorescencia a 522 nm (88). Además del grupo fosfato parecen ser necesarios para la actividad el grupo 2'OH de la ribosa y el grupo amino en posición 6 de la base (66).

La fosforilasa a se une al AMP con una afinidad mucho mayor que la forma b (68,89,90). Aunque la forma a presenta actividad en ausencia del nucleótido su unión al mismo incrementa la actividad original en un 30% adquiriendo una actividad comparable a la forma b en presencia de AMP (10) Este aumento es el resultado de una disminución de la  $K_m$  para los sustratos sin alterarse la  $V_{max}$ . Estudios de diálisis en el equilibrio de la interacción fosforilasa a-AMP mostraron que se une una molécula de AMP por monómero de enzima (89,90). Posteriormente, mediante estudios cristalográficos se han detectado dos sitios distintos para dicha unión (35). Un análisis combinado del comportamiento cinético de fosforilasa a y de los diagramas de difracción de rayos X permitió a Kasvinsky et al. ( 35 ) identificar el segundo sitio donde se une el activador como el sitio del inhibidor, I, o de los nucleósidos.

III. MATERIALES



En este Capítulo se indican los materiales e instrumentos que se utilizaron en la realización de la presente Memoria. Las enzimas usadas, fosforilasa b quinasa y fosforilasa a y b, se obtuvieron a partir de músculo de conejo. Se describen a continuación los métodos seguidos en la obtención de cada uno de ellas.

## 1. OBTENCION DE FOSFORILASA b

La glucógeno fosforilasa b (EC2.4.1.1) se ha obtenido a partir de músculo de conejo según el método descrito por Fischer et al. (91) modificado por Krebs et al. (92) y con algunas variantes introducidas en nuestro laboratorio. En todas las preparaciones se ha partido de 2 a 6 conejos, es decir, entre 1 y 3 kg de músculo. El rendimiento ha estado siempre comprendido entre 0,8 y 1 g de fosforilasa b por kg de músculo. A continuación se exponen en forma resumida las principales etapas de la obtención y purificación de la enzima.

### Obtención del homogeneizado

Una vez muertos y desangrados los conejos, se diseccionan los músculos, se trituran con ayuda de una máquina de picar carne y se homogeniza durante 25 segundos en una Turmix con 2,5 volúmenes de disolución compuesta por EDTA 4 mM y 2-mercaptoetanol 30 mM a pH 7 y temperatura ambiente (250 ml de disolución por cada 100 g de carne).

### Obtención del extracto

El homogeneizado se centrifuga durante 45 minutos a 3500xg y 4°C. El sobrenadante de la centrifugación se pasa a través de lana de vidrio y constituye el extracto.

### Precipitación ácida de otras enzimas

Al extracto se le ajusta el pH a 5,2 mediante lenta adición de ácido acético 1 M e inmediatamente se

centrifuga a 10.000xg durante 40 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasa entonces a través de papel de filtro para eliminar los posibles lípidos que aún quedan en suspensión, y se le ajusta el pH a 6,8 por adición de  $\text{CO}_3\text{HK}$  sólido.

#### Precipitación con sulfato amónico

El extracto neutralizado se lleva al 41% de saturación con sulfato amónico a pH 6,8-7,0 (800 ml de disolución de sulfato amónico al 91% de saturación por litro de extracto), para conseguir la precipitación de la fosforilasa. El precipitado se recoge mediante centrifugación a 6.000xg durante 15 minutos a 4°C y se disuelve en el mínimo volumen posible de una disolución tampón compuesta por Tris 2 mM y 2-mercaptoetanol 30 mM, a pH 6,8. Se introduce en un tubo de diálisis y se deja dializar al menos durante 24 horas frente al mismo tampón, el cual se renueva varias veces hasta que no se detecta en él la presencia de sulfato amónico evidenciada por un precipitado al añadir disolución de  $\text{Cl}_2\text{Ba}$ . Esta operación se realiza en la cámara fría a 4°C.

#### Eliminación de otras proteínas presentes por elevación del pH y la temperatura.

La disolución de proteína se incuba durante una hora a 30°C en presencia de 30 mM de 2-mercaptoetanol para proteger a la enzima de una posible oxidación de los restos cisteínas por el oxígeno del aire. Posteriormente se ajusta el pH de la disolución enzimática a 8,8 con una disolución de Tris 2 M y se incuba una hora a 37°C



en presencia de EDTA 0,5 mM. A continuación se reajusta el pH a 7 con ácido acético 1 M y se clarifica la disolución mediante centrifugación a 15.000xg durante 15 minutos a 4°C.

#### Cristalización y recristalización

A la disolución centrifugada de enzima se le añade 1/100 volúmenes de disoluciones neutras de AMP 0,1 M y acetato de magnesio 1 M y se conserva a 0°C en un baño de hielo para que cristalice. Posteriormente se realiza una recristalización. Los cristales de fosforilasa b se recogen por centrifugación a 15.000xg durante 5 minutos a 4°C y se disuelven a 30°C en una disolución compuesta por Tris 2 mM y 2-mercaptoetanol 30 mM, pH 6,9. Se le añade AMP y acetato de magnesio hasta una concentración final  $10^{-3}$  M y  $10^{-2}$  M respectivamente. Se conserva a 0°C en un baño de hielo para que cristalice. Este proceso de recristalización se realiza al menos tres veces. En la última recristalización, antes de añadir las disoluciones de AMP y acetato de magnesio, la disolución enzimática se centrifuga a 15.000xg durante 10 minutos a 4°C para eliminar la enzima desnaturalizada que pudiera quedar en suspensión.

La fosforilasa b utilizada en todos los experimentos descritos en esta Memoria se recristalizó al menos tres veces y sólo se usó durante un período de diez días posterior a la última recristalización.

### Preparación de disoluciones de fosforilasa b para medidas experimentales

Los cristales de enzima se separan de la disolución en la que están en suspensión mediante centrifugación a unos 15.000xg durante 5 minutos a 4°C. Una vez eliminado el sobrenadante se disuelve el precipitado a 30°C en el tampón que se utilizará en los experimentos. La disolución de fosforilasa b se pasa a través de una columna de Sephadex G-25 previamente equilibrada en el mismo tampón. Para 100 mg de enzima en disolución, a una concentración comprendida entre 20 y 25 mg/ml, se utiliza una columna de 50 cm de longitud por 2 cm de diámetro. De esta forma se consigue eliminar el AMP de la fosforilasa.

El criterio que se sigue para considerar que la enzima está libre de AMP es que la razón de absorbanancias  $A_{260}:A_{280}$  sea menor que 0,53 (59), condición que se ha cumplido en todas las disoluciones de fosforilasa utilizadas en los experimentos. La concentración de proteína se determinó a partir de su absorbanancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción de  $1,32 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$  (58). El peso molecular de monómero que se ha utilizado es 97.412 (28).

La actividad catalítica de la enzima se determinó por el método de Hedrick y Fischer (93) como se describirá en Métodos (IV.-1.1). Todas las preparaciones utilizadas tenían una actividad específica de 80 a 90 unidades  $\text{mg}^{-1}$ .

## 2. OBTENCION DE FOSFORILASA b QUINASA

La fosforilasa b quinasa (EC2.7.1.38) de músculo de conejo se preparó según el método descrito por Krebs (94) con algunas modificaciones introducidas por Cohen (95). La extracción y purificación de la enzima consta de las siguientes etapas:

### Obtención del extracto

La obtención del extracto a partir del músculo de conejo se realiza de la misma forma que en las preparaciones de fosforilasa b.

### Precipitación ácida

Al extracto se le ajusta el pH a 6,1 con ácido acético 1 M a 4°C, apareciendo una moderada turbidez. Después de permanecer en un baño de hielo durante 15 minutos se centrifuga a 6.000xg durante 45 minutos a 4°C.

El precipitado se resuspende en un volumen de disolución compuesta por 2-glicerofosfato 0,1 M, EDTA 4 mM a pH 8,2 usando un homogeneizador para dispersar el precipitado finamente, y se diluye en tres volúmenes del mismo tampón a pH 7. El pH de la mezcla está comprendido entre 7 y 7,2.

### Ultracentrifugación

La suspensión se centrifuga a 78.000xg durante 100 minutos a 4°C y el sobrenadante se decanta cuidadosamente a través de lana de vidrio.

### Precipitación con sulfato amónico

El sobrenadante de la anterior centrifugación

se lleva al 30% de saturación con una disolución saturada y fría de sulfato amónico neutro (500 ml de disolución de sulfato amónico al 91% de saturación por litro de disolución enzimática). La adición se realiza gota a gota y con agitación continua. Después de permanecer 10 minutos en un baño de hielo se centrifuga a 10.000xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se elimina y el precipitado se disuelve en un pequeño volumen de 2-glicerofosfato 50 mM y EDTA 20 mM a pH 6,8. La disolución se introduce entonces en un tubo de diálisis y se deja dializar frente al mismo tampón durante dos horas para eliminar el sulfato amónico arrastrado en la precipitación. El tampón se renueva hasta que no se detecta la presencia de sulfato amónico utilizando  $\text{Cl}_2\text{Ba}$ . Esta operación se realiza en la cámara fría a 4°C. El dializado se clarifica centrifugándose durante dos minutos a 15.000xg.

#### Cromatografía sobre Sepharosa 4B

El sobrenadante se somete a cromatografía en una columna de Sepharosa 4B equilibrada en el mismo tampón. Las dimensiones de la columna son 150 cm de longitud por 2 cm de diámetro. De las fracciones recogidas de la columna las más activas se almacenan congeladas a -20°C. En la figura 4 se puede ver la densidad óptica a 280 nm así como la actividad enzimática de fosforilasa quinasa que presentan las fracciones de elución de la columna.

Las cinco etapas de este proceso se pueden rea-

lizar en un tiempo aproximado de 24 horas, siendo conveniente no interrumpir el proceso en ninguna etapa. Si fuera necesario interrumpirlo, lo más conveniente es guardar a 0°C la disolución enzimática antes de la cromatografía sobre Sepharosa 4B.

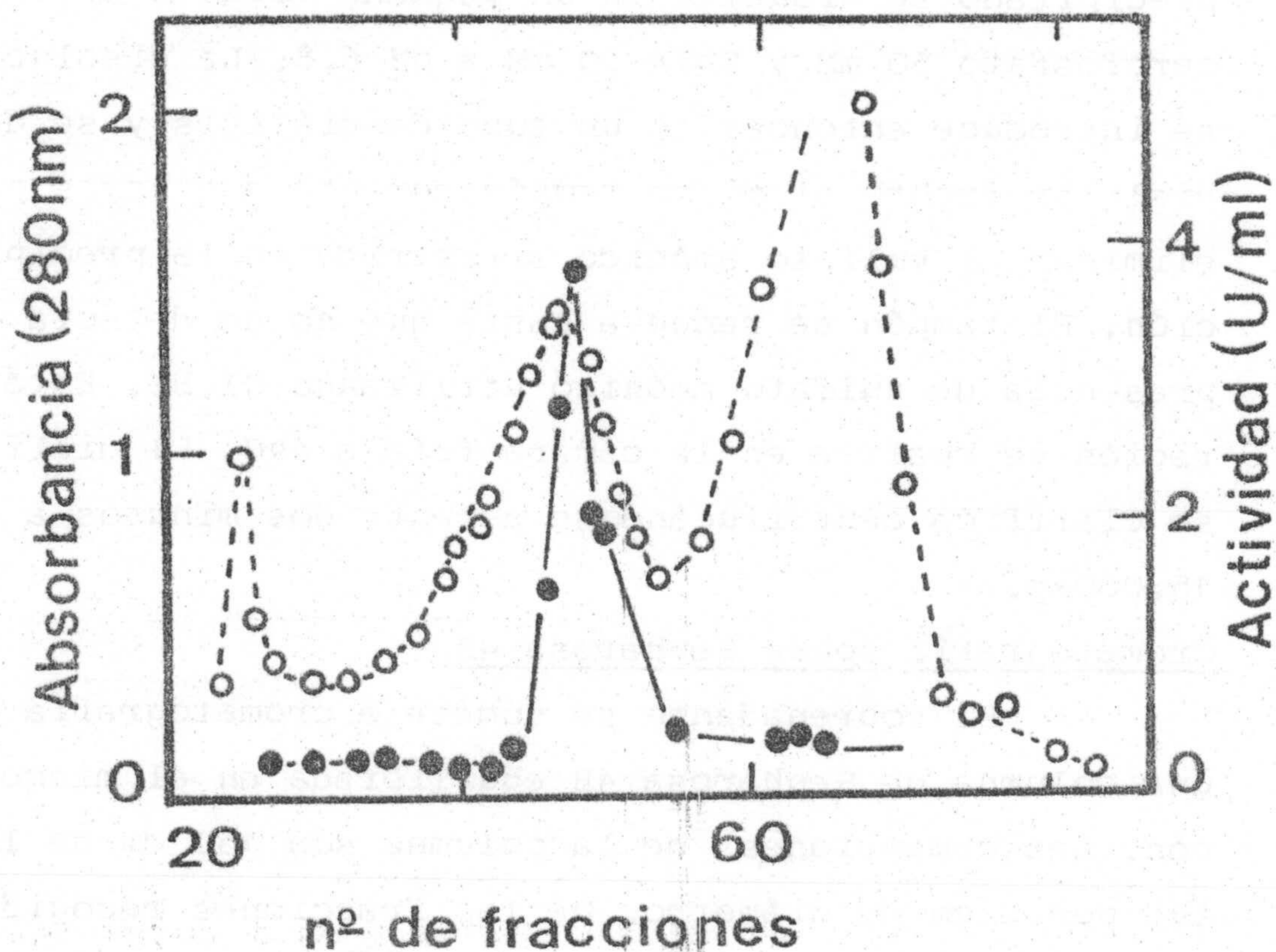


Figura 4. Perfil de elución de fosforilasa b quinasa. Se midió la Absorbancia a 280 nm (o) de cada una de las fracciones de 5 ml de elución de la columna, detectando cuales tienen proteína. Se midió la actividad de fosforilasa b quinasa (●) (según se describe en Métodos IV.-1.2) a cada una de las fracciones reconociendo así las que contienen fosforilasa b quinasa.

### 3. OBTENCION DE FOSFORILASA a

La fosforilasa a (EC2.4.1.1) puede obtenerse directamente de músculo de conejo (96) o bien a partir de la forma "b" de la enzima por fosforilación con fosforilasa b quinasa en presencia de ATP e iones  $Mg^{2+}$  (97). En nuestro caso hemos utilizado este último método por ser éste el método usual de obtención en la Bibliografía y disponer nosotros de fosforilasa b purificada.

Etapas del proceso de preparación de fosforilasa a:

#### Preparación de la fosforilasa b para la reacción de conversión

Los cristales de fosforilasa b, purificada según se indicó anteriormente y recristalizada al menos tres veces, se recogen por centrifugación a 15.000xg durante 5 minutos a 4°C. Se disuelven a 30°C en un tampón de Tris 50 mM a pH 7 y se pasa a través de una columna de Sephadex C-25 (50x2 cm), previamente equilibrada con el mismo tampón, con el fin de eliminar el AMP.

#### Conversión de la forma b en a

A un volumen de la disolución de fosforilasa b se le añaden las siguientes disoluciones: un volumen de una disolución de Tris 125 mM, 2-glicerofosfato 125 mM a pH 8,6; 1/5 volúmenes de  $Cl_2Ca$  3 mM; 2/5 volúmenes de una disolución de  $Cl_2Mg$  75 mM y ATP 22,5 mM a pH 7; la reacción se inicia por adición de 2/5 volúmenes de disolución de fosforilasa b quinasa. La concentración de es-

ta disolución suele estar comprendida en un rango de 80 a 400  $\mu\text{g/ml}$  (dependiendo de la actividad de la fosforilasa quinasa) lo que da lugar a una concentración que oscila entre 10 y 50  $\mu\text{g/ml}$  en la mezcla de reacción.

La conversión se realiza a 30°C durante 40-50 minutos. Pasado este tiempo se añade un volumen igual de una disolución saturada y neutra de sulfato amónico a 4°C. Se deja la mezcla en un baño de hielo durante 15 minutos y el precipitado que aparece se recoge por centrifugación a 10.000xg durante 15 minutos, a 4°C.

El precipitado se redisuelve en una disolución de Tris 50 mM y ácido mercaptoacético 30 mM a pH 7 y se pasa a través de una columna de Sephadex G-25 (50x2 cm), equilibrada en el mismo tampón, para separar las sales. Las fracciones recogidas que contienen fosforilasa a se guardan en un baño de hielo para que cristalice la enzima. Aproximadamente en cinco minutos empiezan a aparecer los cristales.

#### Recristalización

Cuando han pasado de 4 a 6 horas se hace la primera recristalización. Los cristales de fosforilasa a se extraen por centrifugación a 15.000xg durante 20 minutos a 4°C y se disuelven en una disolución de Tris 50 mM y ácido mercaptoacético, pH 7 y a 30°C. Si la disolución no es transparente se centrifuga durante 2 minutos a unos 15.000xg a temperatura ambiente. La disolución transparente se introduce en un tubo de diálisis y se deja cristalizar dializándose frente al mismo tampón en el

que se ha disuelto; esta operación se hace en la cámara fría a 4°C, durante toda una noche. El tampón se cambia al menos dos veces.

En nuestro caso la obtención de fosforilasa a a partir de la forma b de la enzima se realizó el día anterior a su utilización.

#### Preparación de disoluciones de fosforilasa a para medidas experimentales

Los cristales de fosforilasa a en suspensión se dializan durante 24 horas a 4°C frente al tampón en el que se realizarán los experimentos, cambiándose tres veces el baño de diálisis. Posteriormente se centrifuga la suspensión a 15.000xg durante 20 minutos a 4°C. Los cristales de la centrifugación se disuelven entonces a 30°C en el mismo tampón.

La razón de absorbancias  $A_{260}:A_{280}$  en todos los casos fué menor de 0,55, indicando la ausencia de nucleótidos (89).

La concentración se determinó espectrofotométricamente de igual forma que en el caso de fosforilasa b.

Todas las preparaciones de fosforilasa a tenían una actividad específica entre 50 y 60 unidades  $\text{mg}^{-1}$  cuando se realizaban las medidas en ausencia de AMP y entre 80 y 90 unidades  $\text{mg}^{-1}$  para las medidas en presencia del nucleótido.



## 5. PREPARACION DE LAS MEMBRANAS DE DIALISIS

Las membranas (Visking size 8-32/32) utilizadas en los experimentos de diálisis en el equilibrio, así como en algunas etapas de obtención de enzimas, se prepararon previamente como se indica a continuación.

Las membranas se introducen en una disolución a 100°C de carbonato potásico 180 mM, manteniéndose durante 15 minutos a ebullición. Este proceso se realiza tres veces sucesivas. Posteriormente las membranas se lavan con agua desionizada, con el fin de eliminar los iones  $\text{CO}_3^{2-}$ , y se conservan a 4°C en una disolución de EDTA 0,1 mM y azida sódica 0,1 mM (98).

## 6. PRODUCTOS

Los reactivos heptamolibdato amónico, naftaleno, dioxano, metanol, ácido cítrico, EDTA, 2-mercaptoetanol y 2-glicerofosfato fueron suministrados por Merck.

El AMP, UDP, IMP, glucógeno de ostra, Tris, hepes, glicil-glicina, alúmina C $\gamma$  envejecida, y L-cisteína ClH se obtuvieron de Sigma.

El ácido amino naftalen sulfónico lo fué de BDH, el maleato sódico de F.E.R.O.S.A., el ATP de Fluka, la glucosa-1-fosfato de Boehringer, la albúmina de suero de vaca de Calbiochem y el Sephadex G-25 y la Sepharosa 4B de Pharmacia. El imidazol se obtuvo de Fluka y previo a su utilización se cristalizó al menos 5 veces de la siguiente manera. Se disuelve en la mínima cantidad posible de acetato de etilo a una temperatura alrededor de 50°C; una vez disuelto, se deja unos minutos en un baño de hielo para que cristalice y posteriormente se filtra en placa porosa del nº 4. Después de la última cristalización se deja secar a 50°C en una estufa a vacío.

Los productos radioactivos utilizados, IMP y AMP, fueron suministrados por Radiochemical Center, Amersham (U.K.).

Todos éstos, además de otros productos usados fueron de la más alta pureza posible. Se utilizó siempre agua destilada y desionizada para la preparación de las diversas disoluciones.

## 7. INSTRUMENTACION

En la realización de la presente memoria se han utilizado los instrumentos que a continuación se indican.

Tres centrifugas, Janetzki K-26 para las centrifugaciones de volúmenes comprendidos entre 0,5 y 3 l que requieren menos de 3.500xg, ultracentrifugas Beckman L5-40 y Heraeus Christ HC-B utilizadas cuando es necesario centrifugar volúmenes comprendidos entre 0,1 y 20 ml.

Para la realización de espectros, así como medidas puntuales de absorbancia se utilizaron dos espectrofotómetros con células termostatizadas Cary 210 y Beckman 25.

Las medidas radioactivas se realizaron en un contador de centelleo Beckman LS 7.500, con un error en la determinación de las cpm del 1%.

El pH siempre se determinó con un electrodo combinado Jena Glas tipo N-61 y PH-metro CRISON 501.

Además de los instrumentos mencionados se utilizó un microcalorímetro de reacción y un sistema para realizar experimentos de diálisis en el equilibrio. Ambos se describirán detalladamente en su correspondiente apartado en el capítulo de Métodos, en el que también se indican las partes de dichos instrumentos realizadas en nuestro laboratorio así como las mejoras introducidas en los mismos.

Los estudios realizados en la presente Memoria están basados principalmente en las técnicas de diálisis

en el equilibrio y microcalorimetría de reacción, siendo ésta última una técnica reciente en el campo del estudio termodinámico de macromoléculas biológicas. Por estas causas hemos considerado de interés hacer un estudio más detallado de los instrumentos de medida que en ellas se utilizan.



#### IV. METODOS



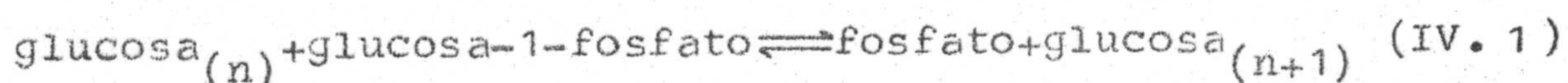
Se describen en este Capítulo los métodos usados a lo largo de este trabajo. Se comienza indicando los métodos seguidos en la determinación de la actividad de las diferentes enzimas utilizadas. Después se describen las técnicas de diálisis en el equilibrio y microcalorimétrica, así como un análisis de los datos que se obtienen por estas dos técnicas.



## 1. MEDIDAS DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

### 1.1. Fosforilasa b

Las medidas de actividad de fosforilasa b se hicieron según el método de Hedrick y Fischer (93). La reacción catalizada por la enzima se siguió en la dirección de síntesis de glucógeno.



donde n representa el nº de grupos glucosídicos en el glucógeno.

Los ensayos se realizaron a 30°C y pH 6,5 con el siguiente medio de reacción: maleato sódico 0,1 M; 2-mercaptoetanol 20 mM; albúmina 0,5 mg/ml; glucosa-1-fosfato 75 mM; glucógeno 1%; AMP 1 mM y fosforilasa b entre 15 y 30 µg/ml. El volumen de la mezcla en los ensayos fué siempre 0,4 ml y el tiempo de reacción 5 minutos, pasados los cuales se detiene la reacción añadiendo 8,2 ml de reactivo "parador", compuesto de ácido sulfúrico 30 mM y heptamolibdato amónico al 0,30%.

El heptamolibdato es un reactivo de fosfatos, que transforma todo el fosfato liberado en la reacción enzimática en ácido fosfomolibdico, el cual se convierte en azul de molibdeno mediante adición de 0,9 ml de sulfúrico 2,5 M, 0,5 ml de una disolución de ácido amino naftalen sulfónico 10 mM, bisulfito sódico 1,4 M y

sulfito sódico 4/ mM. Se deja reaccionar esta mezcla 5 minutos a temperatura ambiente y se determina su absorbancia a 700 nm. Las medidas de absorbancia se convierten en moles de fosfato mediante una recta patrón obtenida previamente.

El ensayo en blanco se realiza de forma similar excepto que en este caso el reactivo parador se añade antes que la disolución de fosforilasa b con el fin de que la reacción no comience.

La actividad de fosforilasa b se expresa en micromoles de fosfato liberado por minuto y por mg de enzima. La unidad de actividad enzimática se define como el nº de micromoles de fosfato liberado por minuto.

Ocasionalmente se determinó la actividad en ausencia de AMP para verificar que toda la enzima se encuentra en la forma b inactiva.

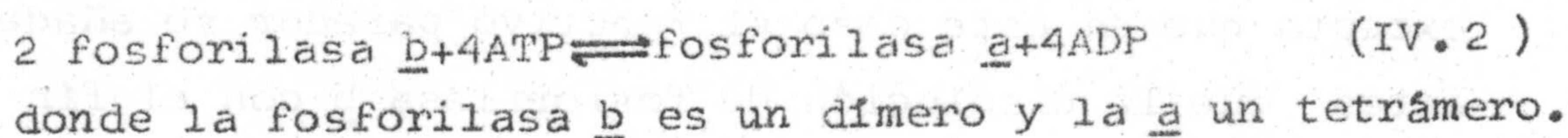
## 1.2. Fosforilasa a

Las medidas de su actividad enzimática se hicieron según el método de Hedrick y Fischer (93), siguiendo la aparición de fosfato inorgánico de la misma manera que en la fosforilasa b. Los experimentos se realizaron rutinariamente en presencia y ausencia de AMP a fin de comprobar la posible existencia de forma b de la enzima.

La actividad de fosforilasa a se expresa de igual forma que en la fosforilasa b.

### 1.3. Fosforilasa b quinasa

La fosforilasa b quinasa cataliza la conversión de fosforilasa b en fosforilasa a (99), según la reacción:



Las medidas de actividad se realizaron según describe Cohen (95). Los ensayos se hicieron a 30°C y todas las disoluciones utilizadas se termostataron a esta temperatura antes de iniciarse la reacción.

La mezcla de incubación para el ensayo de actividad contiene los siguientes componentes: 50  $\mu$ l de fosforilasa b libre de AMP a una concentración de 15 mg/ml en un tampón de Tris 50 mM a pH 7; 50  $\mu$ l de una disolución de Tris 125 mM y 2-glicerofosfato 125 mM a pH 8,6; 10  $\mu$ l de disolución de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  3 mM; 20  $\mu$ l de una disolución de fosforilasa b quinasa a una concentración aproximada de 2 mg/ml en un tampón de 2-glicerofosfato 50 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM; 20  $\mu$ l de una disolución de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  75 mM y ATP 22,5 mM a pH 7. Este último componente inicia la reacción. Pasados 5 minutos se para la reacción por dilución, es decir, se toman 20  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se diluye 40 veces en una disolución de maleato 0,1 M, albúmina al 0,1% y 2-mercaptoetanol 50 mM a pH 6,5. Se realiza a continuación el ensayo de actividad de fosforilasa a (93).

El ensayo en blanco se realiza de igual forma, excepto que la adición de fosforilasa b quinasa se hace después de la dilución.

La unidad de actividad de fosforilasa b quinasa se define como el número de micromoles de monómero de fosforilasa b convertido a monómero de fosforilasa a por minuto, considerando la actividad específica de fosforilasa a en ausencia de AMP como 54 unidades/mg (100).

## 2. PURIFICACION DE FOSFORILASA CON ALUMINA C $\gamma$ . ELIMINACION DE ACTIVIDAD AMP-AMINOHIDROLASA

Los microcristales de fosforilasa b se recogen por centrifugación a 15.000xg durante 5 minutos a 4°C y se disuelven a 30°C en una disolución de Tris 50 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM a pH 6,9. La disolución de fosforilasa b se pasa a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada en el mismo tampón.

La alúmina C $\gamma$  envejecida se prepara mezclándola con el mismo tampón citado anteriormente y reajustando el pH de la suspensión a 6,9. El ajuste se realiza lentamente y con agitación continua para conseguir una mayor homogenización de la alúmina en el tampón. Posteriormente se centrifuga durante 5 minutos a 15.000xg. El sobrenadante de la centrifugación se elimina por decantación y el precipitado se añade a la disolución de fosforilasa b libre de AMP. La mezcla se mantiene durante 15 minutos en un baño de hielo con agitación suave e ininterrumpida. Después se centrifuga a 15.000xg durante 5 minutos a 4°C, para separar la alúmina C $\gamma$ . La proporción en que se añade la alúmina C $\gamma$  es de 0,05 a 0,1 mg de peso seco por mg de proteína.

El sobrenadante de la última centrifugación con tiene fosforilasa b libre de actividad AMP-aminohidrolasa (ver Resultados V.-1.2).

Si se incuba la alúmina C $\gamma$  recogida de la última centrifugación con una disolución 1 M de PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> a

25°C y se centrifuga para separar la alúmina, en el sobrenadante aparece actividad AMP-aminohidrolasa (101).

Con el fin de que las preparaciones de fosforilasa b estén libres de la posible actividad AMP-aminohidrolasa se propone en esta Memoria su purificación con alúmina  $C\gamma$  como una etapa adicional en la purificación de fosforilasa b, que se realiza antes de la última recristalización.

### 3. DIALISIS EN EL EQUILIBRIO

La diálisis en el equilibrio es un método frecuentemente empleado para estudiar la unión de moléculas pequeñas e iones a una macromolécula. Este método hace uso del equilibrio a través de una membrana semipermeable que permite el paso a su través de partículas en función de su tamaño (peso molecular). Así, partículas tales como pequeños iones o ligandos pasarán libremente a través de dicha membrana, mientras que aquellas de elevado peso molecular, macromoléculas, no lo harán. La condición de equilibrio para un sistema así definido (a presión y temperatura constantes) es que el potencial químico de todo componente que puede atravesar la membrana a un lado de la misma sea igual al potencial químico de ese mismo componente al otro lado. Así, cada componente de bajo peso molecular atravesará libremente la membrana y en el equilibrio su actividad será igual a ambos lados de la misma. En este hecho podemos basarnos para el estudio de la unión de una molécula pequeña o un ión, en general un ligando, a una macromolécula. Las disoluciones que se encuentran a cada lado de la membrana suelen ser suficientemente diluidas y similares como para poder considerar los correspondientes coeficientes de actividad iguales, con lo que las concentraciones de los componentes que pueden atravesar la membrana serán también iguales a ambos lados de la misma (102).

En un caso general se colocaría inicialmente a

un lado de la membrana la disolución de macromolécula y al otro lado la del ligando (figura 5A). En el equilibrio (figura 5B) la concentración de ligando libre a ambos lados de la membrana será la misma y cualquier exceso de ligando en la disolución de la macromolécula se considera como ligando unido a la misma.

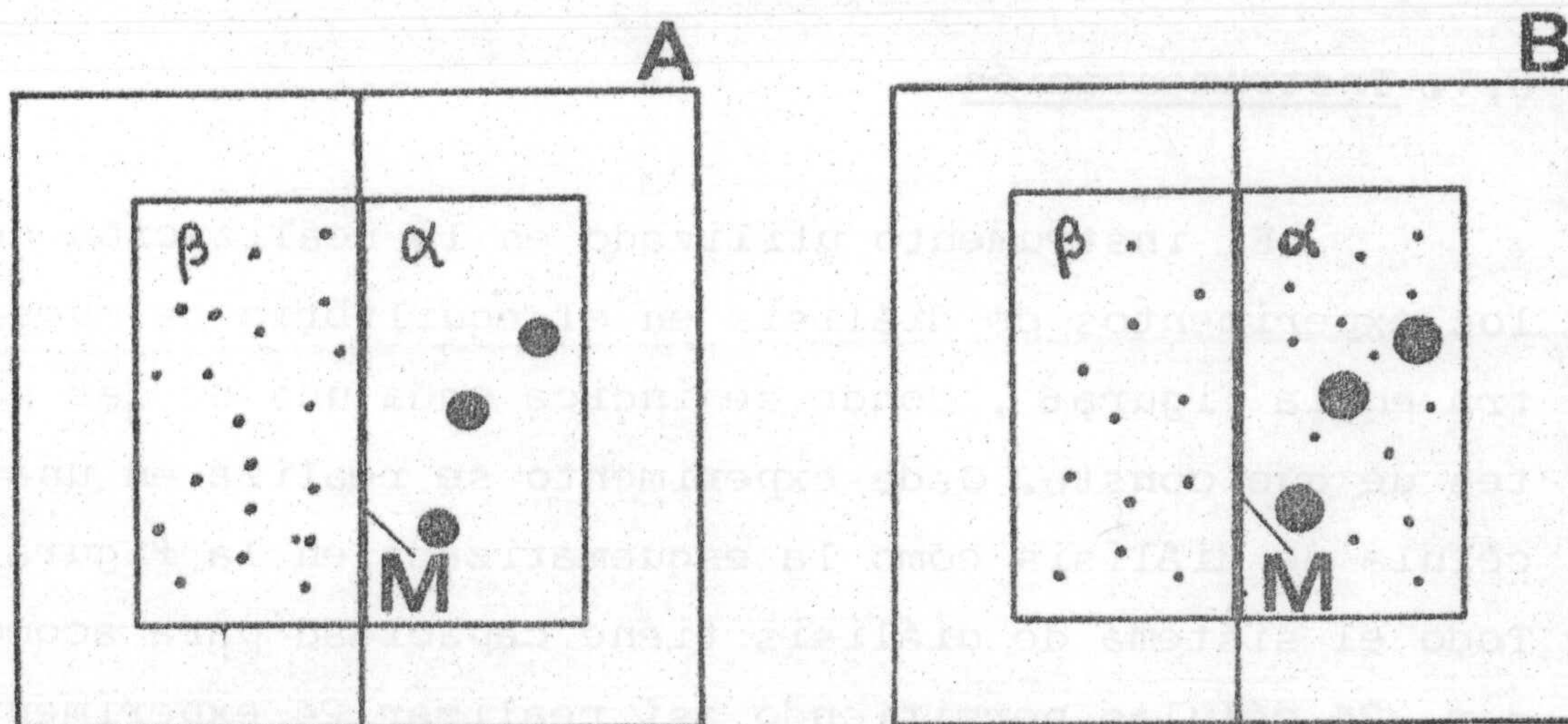


Figura 5. Esquema de un sistema de diálisis. El sistema está formado por dos compartimentos,  $\alpha$  y  $\beta$ , separados por una membrana semipermeable M. (A) Situación inicial, en la cual la macromolécula está en el compartimento  $\alpha$  y el ligando en el  $\beta$ . (B) Situación de equilibrio en la diálisis, en la cual la macromolécula permanece en la parte  $\alpha$ , ya que no puede atravesar la membrana. Sin embargo, el ligando ha pasado a través de la membrana hasta conseguir que su potencial químico sea el mismo en los dos compartimentos.

Las determinaciones, a una concentración constante de macromolécula y a distintas concentraciones iniciales de ligando, de las concentraciones de ligando li-



bre y unido a la macromolécula que existen en el equilibrio nos proporcionan los datos suficientes para estudiar y caracterizar la unión de un ligando a una macromolécula, o concretamente a una proteína como es el caso que nosotros estudiaremos.

### 3.1. Instrumentación

El instrumento utilizado en la realización de los experimentos de diálisis en el equilibrio se muestra en la figura 6, donde se indica cada una de las partes de que consta. Cada experimento se realiza en una célula de diálisis como la esquematizada en la figura 7. Todo el sistema de diálisis tiene capacidad para acomodar 24 células permitiendo así realizar 24 experimentos simultáneos. Las células se sitúan en una rueda (figura 6) que gira impulsada por un motor a una velocidad de 3 rpm. Este instrumento fué construido en el taller mecánico de la Facultad de Ciencias de Madrid bajo el diseño del Prof. Garcia Blanco. En todas las células de diálisis utilizadas en los experimentos se comprobó que el cierre era hermético y por lo tanto sólo podía pasar material de un compartimento al otro a través de la membrana. Esta comprobación se efectuó mediante experimentos con albúmina en uno de los compartimentos de la célula y tampón en el otro. Después de permanecer la célula 24 horas girando en la rueda (figura 6) se extrajo

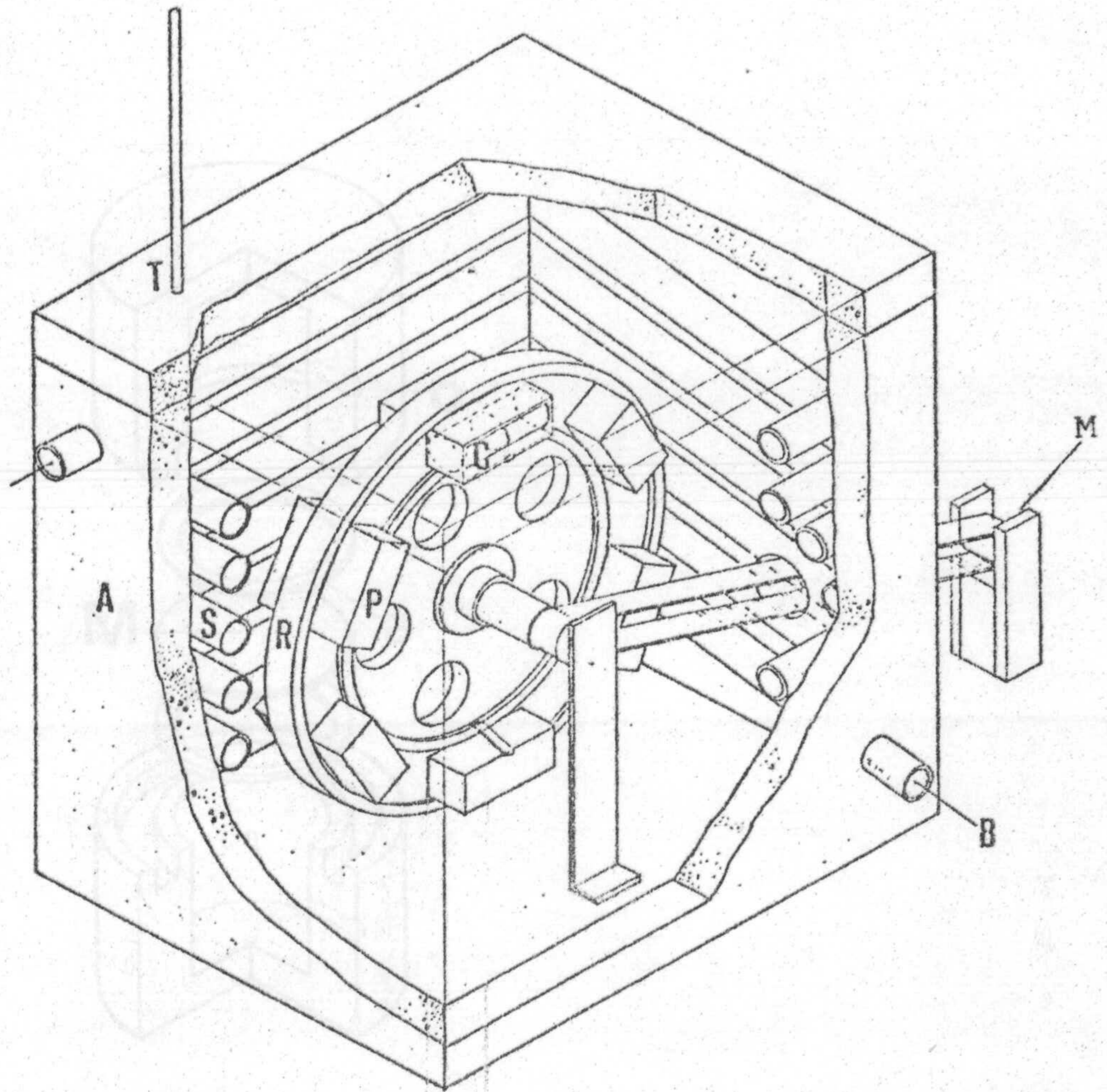


Figura 6. Esquema del sistema en el que se han realizado los experimentos de diálisis en el equilibrio. Básicamente consta de una rueda de aluminio, R, que gira impulsada por un motor, M. La rueda de 30cm de diámetro puede albergar 12 portacélulas, P, en cada uno de los cuales se sitúan dos células de diálisis, C, como las representadas en la figura 7. El conjunto de rueda y portacélulas está dentro de una caja de poliestireno expandido (80cm de lado), A. Sobre las paredes de la caja hay un serpentín de aluminio, S, por el que circula agua que proviene de un baño termostático, B. Para comprobar la temperatura interior hay un termómetro, T, en la parte superior.

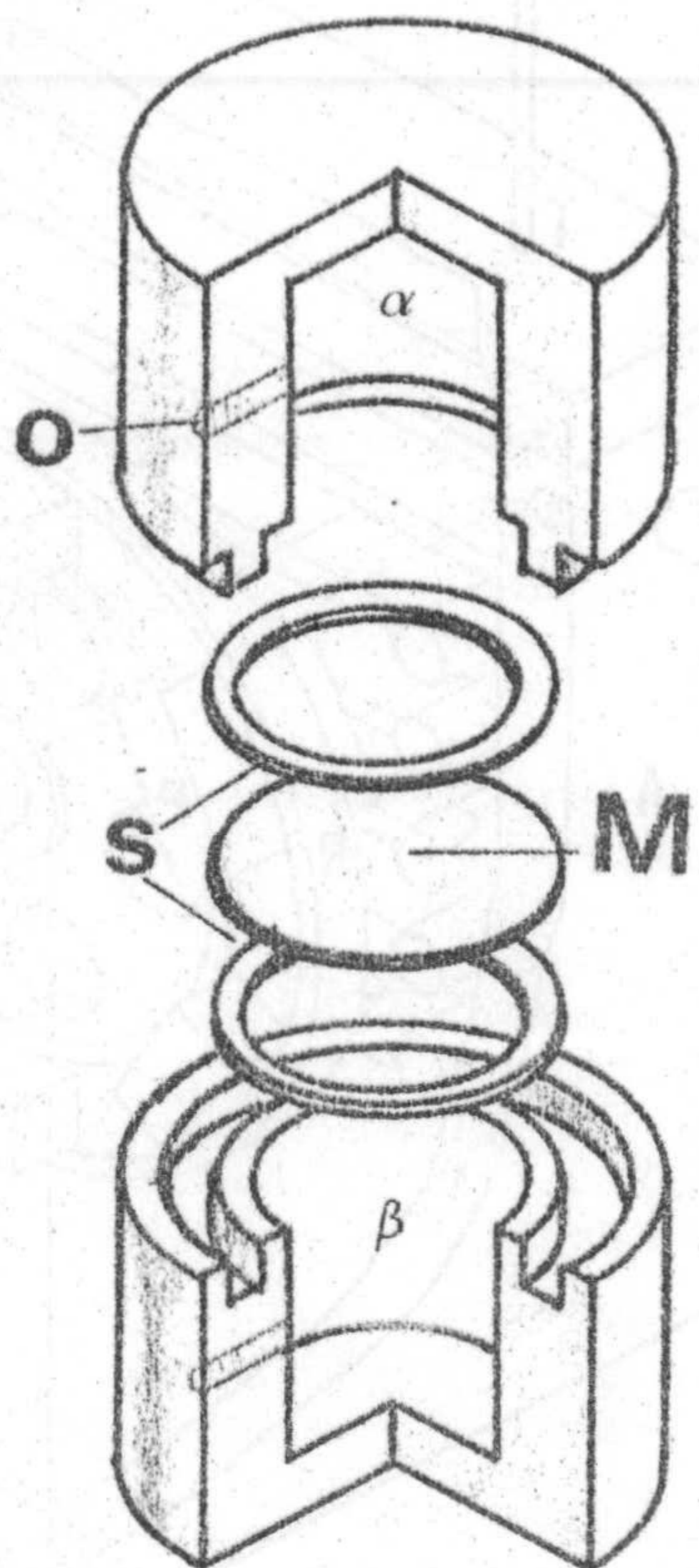


Figura 7. Esquema de las células de diálisis. Las células de diálisis que se han utilizado son de plexiglás y constan de dos compartimentos cilíndricos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de un volumen ligeramente superior a 1 ml cada uno y separados por una membrana semipermeable, M, (preparada como se indicó en Materiales III.-5). A ambos lados de la membrana se coloca una arandela de silicona, S, con el fin de que las células queden herméticamente cerradas y el paso de material de un compartimento al otro sólo se realice a través de la membrana. El acceso a cada una de las cámaras de las células para colocar los reactivos y para la extracción de las muestras se efectúa con micropipetas a través de dos orificios, O, posteriormente cerrados por tornillos de Teflón.

una fracción del compartimento que se había llenado con tampón. A esta muestra se le midió la absorbancia a 280 nm verificándose la inexistencia de albúmina.

El equilibrio que se alcanza en la unión de un ligando a una proteína depende de la temperatura, por lo tanto es necesario mantenerla constante durante la realización de los experimentos. Para ello, se instaló un sistema de termostatación por aire. Todos los experimentos de diálisis en el equilibrio que se describen en esta Memoria se realizaron a 25°C; se buscaron por tanto las condiciones óptimas para mantener la temperatura estable a 25°C durante cada experimento. Así, todo el sistema de diálisis se instaló en una habitación acondicionada a una temperatura entre 23 y 25°C. Como se puede observar en la figura 6 el conjunto de la rueda con todos los portacélulas se encuentra dentro de una caja cerrada de poliestireno expandido de paredes gruesas ( $\approx 10$  cm) para un mayor aislamiento del exterior. Sobre las paredes interiores hay un serpentín de aluminio por el que circula agua a 25°C que proviene de un baño de agua termostatación. El motor que hace girar la rueda está situado en el exterior de la caja para que no altere la estabilidad interna de la temperatura. Con el procedimiento de termostatación que se ha descrito se consiguió que durante todo el tiempo que dura el experimento se mantuviera la temperatura a  $25 \pm 0,1$ °C.

### 3.2. Experimentos de diálisis

Debido a las características del instrumento se realizaron simultáneamente 24 experimentos, cada uno de ellos en una célula (figura 7). El procedimiento seguido en la realización de los mismos se describe a continuación: Se llenó el compartimento  $\alpha$  de cada una de las células con 1 ml de la misma disolución de fosforilasa y el compartimento  $\beta$  con 1 ml de disolución de AMP conteniendo AMP radioactivo. La concentración de AMP de cada compartimento fué distinta (aunque se hicieron algunos duplicados). Todos ellos contenían sin embargo la misma concentración de AMP radioactivo que es obviamente despreciable frente a los de AMP inerte. Las células de diálisis así preparadas y colocadas en los portacélulas, que van sujetos a la rueda (figura 6), se mantuvieron girando 24 horas. Se comprobó que este tiempo era suficiente para alcanzar el equilibrio de diálisis en nuestras condiciones de trabajo (25°C de temperatura y tipo de membrana). Una vez alcanzado el equilibrio se tomó una alícuota del compartimento  $\beta$  y se midió su absorbancia a 259 nm calculándose a partir de este dato la concentración de AMP en dicho compartimento. Esta concentración, como ya se ha indicado, debe coincidir con la concentración de AMP libre en el compartimento  $\alpha$ . A continuación se extrajo una alícuota de cada uno de los compartimentos y después de diluirlas en 10 ml de

líquido de centelleo Bray (103) se midieron las cpm de ca da una de ellas. Mediante la relación entre las cpm y la concentración de AMP obtenidas del compartimento  $\beta$  se puede calcular, a partir de las cpm de la muestra extraída en el compartimento  $\alpha$ , la concentración total de AMP en dicho compartimento. La diferencia entre las concentraciones de AMP total y libre en  $\alpha$  nos proporciona la cantidad de AMP unido a la enzima.

Simultáneamente a estos experimentos se realizó uno de control para comprobar que en el tiempo de permanencia de los reactivos en la célula se alcanzaba el equilibrio de diálisis. El experimento de control se realizó sin proteína, se llenó un compartimento de la célula con 1 ml de AMP conteniendo AMP radioactivo y el otro con 1 ml de tampón. A las 24 horas de diálisis se comprobó que la concentración de AMP era la misma a ambos lados de la membrana. Dicha concentración de AMP era mitad de la inicial, comprobándose así que la pérdida de AMP por adsorción a la membrana y paredes de la célula era despreciable.

Los experimentos se realizaron a una concentración salina suficientemente alta como para evitar las correcciones debidas al efecto Donnan (102).

Las disoluciones utilizadas en los experimentos de diálisis en el equilibrio fueron:

Líquido de centelleo. Se utilizó como líquido de centelleo el Bray (103) cuya composición es la siguiente: naftaleno 60 g, 2,5-difenil oxazol 4 g, 2,2'-p-fenilen-

bis-5-feniloxazol 0,2 g, metanol 100 ml, etilenglicol 20 ml y p-dioxano hasta completar 1 litro.

Tampón A compuesto de: Tris 50 mM, ClK 50 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 0,1 mM ajustado a pH 6,9 a 25°C.

Tampón B compuesto de: Hepes 50 mM, ClK 50 mM, ácido mercaptoacético 1 mM y EDTA 0,1 mM ajustado a pH 6,9 a 25°C.

Disolución de fosforilasa b. La enzima purificada con alúmina C<sub>γ</sub> según se ha descrito en otro apartado de Métodos (IV.-2) se disolvió en el tampón A y se preparó libre de AMP como se expone en Materiales (III.-1.7). El rango de concentración estuvo comprendido entre 12,0 y 12,2 mg/ml.

Disolución de fosforilasa a. La fosforilasa a se disolvió en el tampón B preparándose como se ha indicado en Materiales III.-3.4. El rango de concentración en este caso fué de 3,0 a 3,2 mg/ml. Se pudo utilizar un rango de concentración de enzima inferior al utilizado en el caso de la fosforilasa b porque experimentos de prueba mostraron que la afinidad por el AMP de la fosforilasa a era mayor que en el caso de la fosforilasa b. Se estimó que la concentración empleada era preferible al uso de concentraciones superiores ya que al ser la fosforilasa a un tetrámero en las condiciones de trabajo (104) tiende a cristalizar con facilidad, hecho que se favorece al aumentar la concentración.

La actividad enzimática de la fosforilasa a y

b se midió rutinariamente antes y después de los experimentos, comprobándose que no había inactivación durante los mismos.

Disoluciones de AMP. Se disolvió el AMP en el tampón A para los experimentos con fosforilasa b y en el tampón B para los experimentos con fosforilasa a y se reajustó después el pH a 6,9 a 25°C. En el caso de fosforilasa b la concentración de AMP estuvo comprendida entre  $10^{-5}$  M y  $2 \cdot 10^{-3}$  M, mientras que en el de fosforilasa a varió entre  $10^{-6}$  M y  $10^{-4}$  M. A las disoluciones de distinta concentración de AMP se le añadió la misma cantidad de AMP radioactivo marcado uniformemente con  $^{14}\text{C}$ . La concentración de AMP se determinó a partir de su absorbancia a 259 nm utilizando un coeficiente de extinción de  $15.400 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Disolución de IMP. Se disolvió este nucleótido en el tampón A y se reajustó posteriormente el pH a 6,9 a 25°C. La concentración de IMP estuvo comprendida entre  $10^{-5}$  M y  $4 \cdot 10^{-3}$  M. A las disoluciones de distinta concentración de IMP se les añadió la misma cantidad de IMP radioactivo marcado con  $^{14}\text{C}$ .

### 3.3. Análisis de datos

Una proteína puede poseer un número variable de sitios para interaccionar con pequeñas moléculas. Muchas de estas interacciones suponen una unión reversible de pequeños ligandos. En el caso general de una proteína,



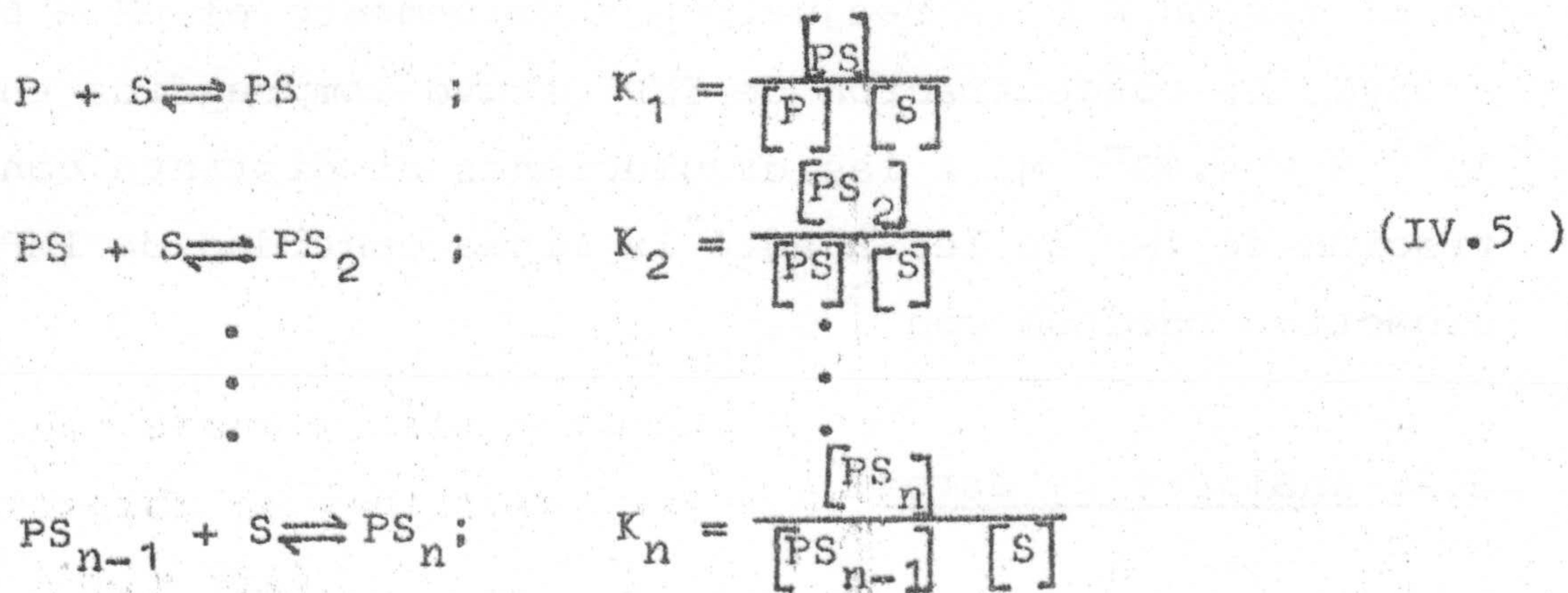
P, que posea n sitios de unión para un ligando, S, la situación de equilibrio viene descrita por la ecuación de Adair (22)

$$Y = \frac{K_1 [S] + 2K_1 K_2 [S]^2 + \dots + n(K_1 K_2 \dots K_n) [S]^n}{n(1 + K_1 [S] + K_1 K_2 [S]^2 + \dots + (K_1 K_2 \dots K_n) [S]^n)} \quad (\text{IV. 3})$$

donde Y es la fracción de saturación o fracción de sitios ocupados, definida por:

$$Y = \frac{[S]_n}{n [P]_t} \quad (\text{IV. 4})$$

donde  $[S]_n$  es la concentración de ligando unido,  $[P]_t$  es la concentración total de proteína y las constantes  $K_1, K_2, \dots, K_n$  corresponden a los equilibrios:



Los corchetes representan concentraciones molares. Las constantes  $K_1, K_2, \dots, K_n$  así definidas no son verdaderas constantes, sino que dependen del disolvente, concentración salina, etc. Las verdaderas constantes termodinámicas

cas, expresadas en términos de actividades de las especies combinantes, podrían ser obtenidas a partir de las constantes definidas en las ecuaciones anteriores (IV.5) por extrapolación a dilución infinita de todos los solutos (ésta es una condición bajo la cual las actividades se hacen por definición iguales a las concentraciones). Sin embargo, en este tipo de experimentos la exactitud de los datos experimentales raramente justifica este refinamiento (102). En esta Memoria se han utilizado concentraciones molares en sustitución de actividades por ser ésto lo usual en estudios con sustancias de naturaleza bioquímica, particularmente macromoléculas, por lo que, las constantes de equilibrio y los parámetros termodinámicos a ellas asociados deben estrictamente considerarse como "aparentes" (102). Las constantes  $K_1 K_2 \dots K_n$  en la situación más simple posible, donde los  $n$  sitios de unión son idénticos e independientes, pueden expresarse en función de una constante de unión denominada intrínseca o microscópica,  $K_m$ . Esta constante corresponde a la unión del ligando a un sitio en la macromolécula, pero considerado éste como el único sitio de unión. Al ser los sitios idénticos e independientes la constante microscópica es la misma para cada uno de ellos. Las constantes  $K_1, K_2, \dots, K_n$ , denominadas aparentes o macroscópicas, dependen del número de sitios de unión para el ligando que están vacantes en la proteína. Obviamente existe una relación estadística entre las constantes macroscópicas y microscópicas (102) definida por la expresión:

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} K_m \quad (\text{IV. 6})$$

Así, por ejemplo, en el caso de una proteína tetramérica con  $n = 4$  la relación es:  $K_1 = 4K_m$ ,  $K_2 = 3/2 K_m$ ,  $K_3 = 2/3 K_m$  y  $K_4 = 1/4 K_m$ . Sustituyendo las constantes macroscópicas de la ecuación (IV. 3) en función de la constante microscópica para una macromolécula con sitios de unión idénticos e independientes, la ecuación general (IV. 3) para la fracción de saturación se simplifica extraordinariamente, quedando

$$Y = \frac{K_m [S]}{1 + K_m [S]} \quad (\text{IV. 7})$$

El método de diálisis en el equilibrio no permite obtener directamente la fracción de saturación,  $Y$ , sino el número de moles de ligando unido por mol de proteína,  $\nu$ . Esta magnitud está claramente relacionada con la fracción de saturación,  $Y$ , según la expresión:

$$Y = \frac{\nu}{n} \quad (\text{IV. 8})$$

de manera que la ecuación (IV.7) se convierte en:

$$\nu = nY = \frac{n K_m [S]}{1 + K_m [S]} \quad (\text{IV. 9})$$

La ecuación (IV.9) indica que, para  $n$  conoci-

do, una representación gráfica de  $v$  frente a  $[S]$ , a concentración de proteína constante, permite obtener de forma directa  $K_m$ . La dificultad de esta gráfica es que al no ser lineal, sino hiperbólica, es necesario obtener datos en un amplio rango de concentraciones de ligando con el fin de tener precisión en la determinación de  $K_m$ .

A fin de analizar los datos con mayor facilidad se puede linealizar la ecuación (IV. 9) obteniéndose la siguiente ecuación equivalente:

$$\frac{v}{[S]} = n K_m - K_m v \quad (\text{IV. 10})$$

La representación gráfica de  $v/[S]$  frente a  $v$  se denomina representación de Scatchard y constituye uno de los métodos gráficos más comúnmente utilizados en el análisis de datos de unión proteína-ligando. Esta representación conduce a una línea recta de pendiente  $-K_m$  (figura 8 ). La intersección con el eje de abscisas proporciona el valor de  $n$ , número de sitios de unión.

Hasta el momento se ha considerado que los sitios de unión son idénticos e independientes. En el caso de sitios idénticos pero no independientes existirá una constante de asociación microscópica distinta para cada uno de los sitios de unión que estará relacionada con su correspondiente constante macroscópica por la ecuación (IV. 6 ), es decir

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} K_{m_i} \quad (\text{IV. 11})$$

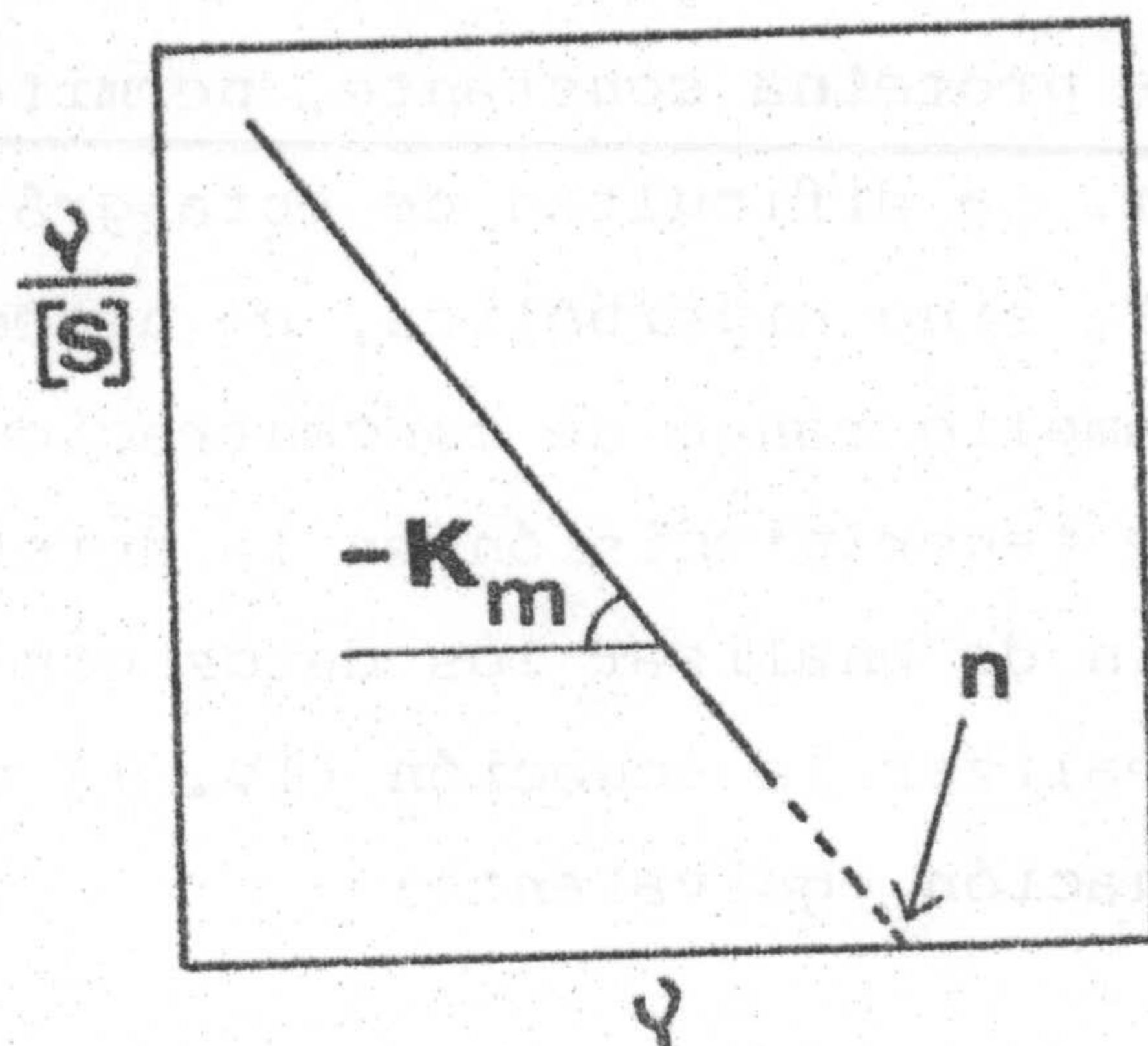


Figura 8 . Representación de Scatchard. Una representación de  $\nu/[S]$  frente a  $\nu$  dará una recta de pendiente  $-K_m$  y que corta al eje de abscisas en un valor igual a  $n$  para el caso de  $n$  sitios idénticos e independientes.

Al no existir una única constante microscópica no se puede simplificar la ecuación (IV.3) para obtener la ecuación (IV.7) como ocurría en el caso de sitios independientes, y como consecuencia, al hacer una representación de Scatchard no se obtiene una línea recta. Si la interacción corresponde a una cooperatividad positiva (lo que supone que los primeros ligandos se unen con una afinidad inferior a los ligandos subsiguientes), en una representación de Scatchard se obtendrá una curva (figura 9A) con un máximo que se desplaza a zonas de mayor saturación cuando la cooperatividad aumenta. En el caso de una cooperatividad negativa (lo que supone que los primeros ligandos se unen con una afinidad superior a

los ligandos subsiguientes) la forma de la curva de la representación de Scatchard varía su concavidad no presentando ningún máximo (figura 9B).

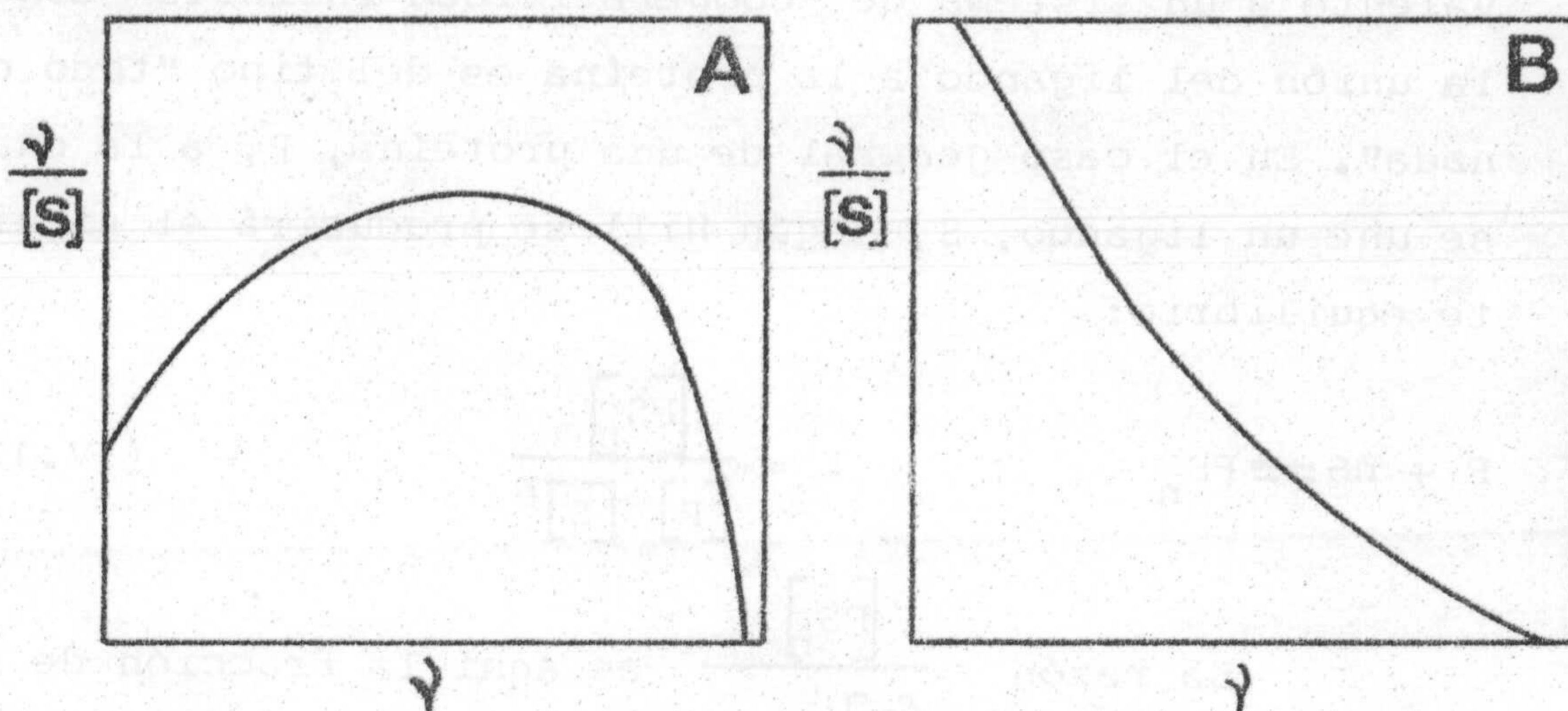
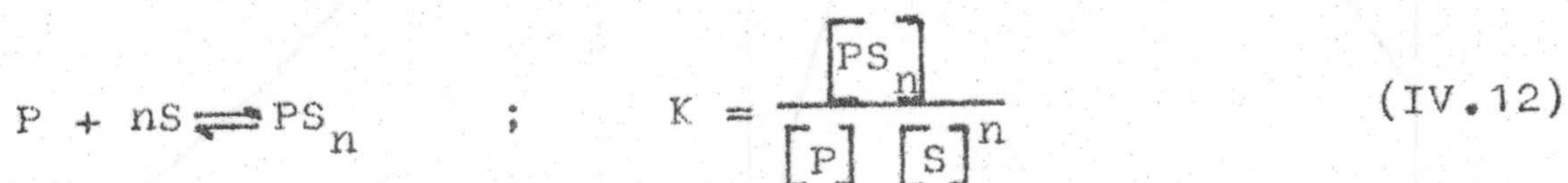


Figura 9 . Representación de Scatchard mostrando cooperatividad positiva (A) y cooperatividad negativa (B).

En el caso de sitios cooperativos existe otro método gráfico de gran interés que es el denominado representación de Hill. Obviamente, una determinada serie de datos de unión contiene la misma información independientemente del método usado en su interpretación. Sin embargo, la representación de Hill muestra algunos aspectos de dicha información con mayor claridad que otros métodos. Este tipo de representación surgió cuando en 1910 y 1913 Hill (105, 106) trató de analizar la unión del oxígeno a la hemoglobina. Hill sugirió que la hemoglobina estaría formada por un agregado de  $n$  moléculas de he-

moglobina, cada una de las cuales poseería un sitio de unión para el oxígeno. Estudió la unión del oxígeno a la hemoglobina en un único paso. Esta situación es equivalente a un sistema de "cooperatividad infinita" donde la unión del ligando a la proteína es del tipo "todo o nada". En el caso general de una proteína, P, a la cual se une un ligando, S, según Hill se producirá el siguiente equilibrio:



La razón  $\frac{[PS_n]}{[P]_{\text{total}}}$  es aquí la fracción de sa-

turación de sitios ocupados, Y. La fracción de sitios libres en la proteína será, en este caso, 1-Y. Sustituyendo estas expresiones en la ecuación (IV.12) se obtiene:

$$K = \frac{Y}{(1-Y)[S]^n} \quad (\text{IV.13})$$

en la que, tomando logaritmos, queda en la forma:

$$\log \frac{Y}{1-Y} = \log K + n \log [S] \quad (\text{IV.14})$$

La representación gráfica de  $\log Y/1-Y$  frente a  $\log [S]$  constituye la representación de Hill (figura 10). La pendiente, n, se conoce con el nombre de coeficiente de

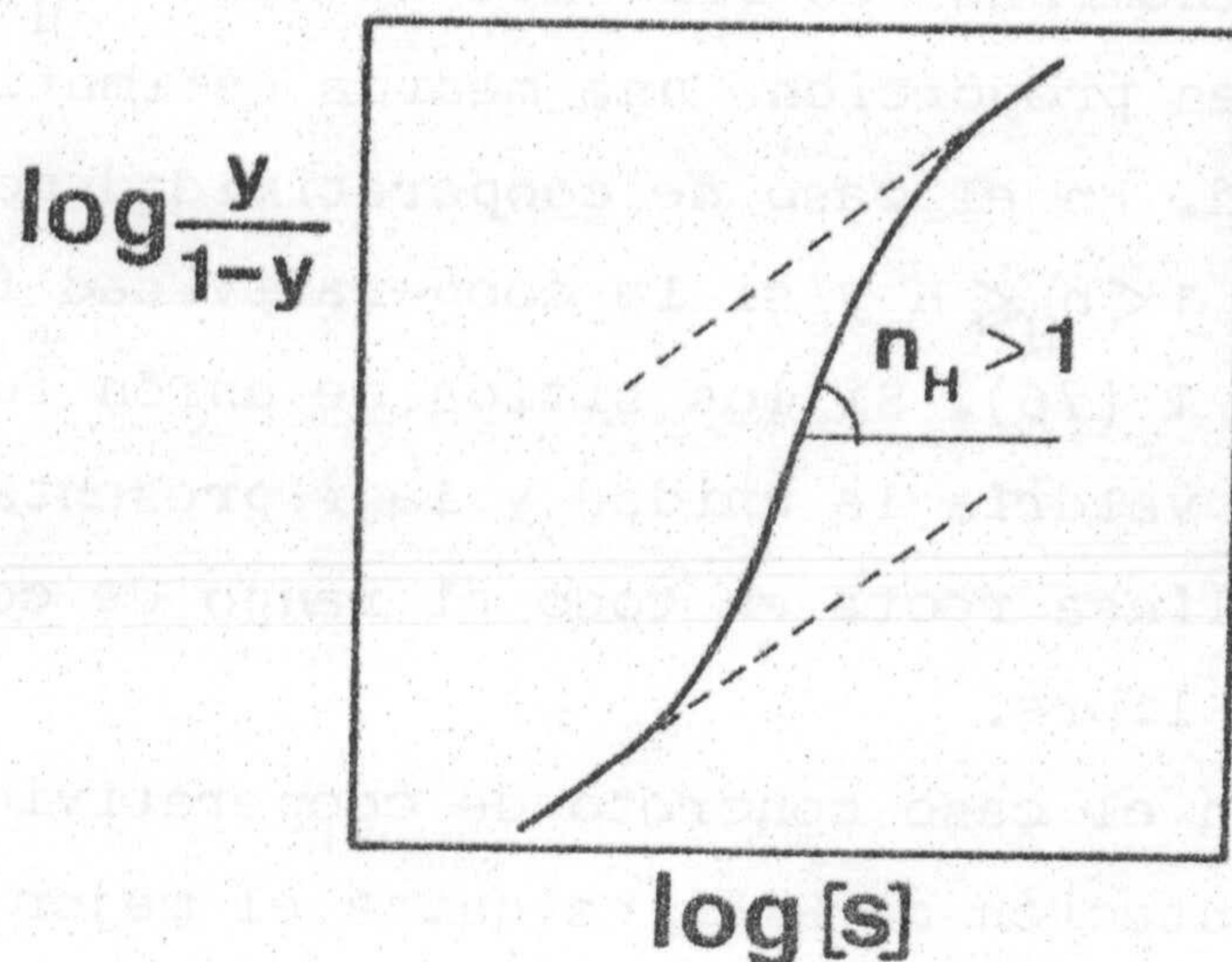


Figura 10. Representación de Hill mostrando cooperatividad positiva.

Hill ( $n_H$ ). De acuerdo con el esquema sugerido por Hill debería coincidir con el número de sitios de unión en la proteína para el ligando; sin embargo, siempre se obtiene un valor inferior, lo que nos indica que este esquema no es lógicamente correcto. Este hecho es consecuencia de que en la ecuación de Hill no se consideran las posibles especies intermedias ( $PS_1, PS_2 \dots PS_{n-1}$ ), que de existir originarían que la fracción de saturación fuera también función de dichas especies.

La representación de Hill es útil no obstante como un enfoque semiempírico para el análisis de sistemas cooperativos. Así, se encuentra que la gráfica de Hill (figura 10) no es recta en todo el rango de concentración de ligando libre, salvo en el entorno del 50% de



saturación (106). La pendiente de esta recta en el punto  $y = 1/2$ , denominada coeficiente de Hill ( $n_H$ ), es de gran interés pues proporciona una medida estimativa de la cooperatividad. En el caso de cooperatividad positiva se cumple que  $1 < n_H \leq n$  y si la cooperatividad fuese negativa,  $0 \leq n_H < 1$  (76). Si los sitios de unión fuesen independientes  $n_H$  valdría la unidad y la representación de Hill sería una línea recta en todo el rango de concentración de ligando libre.

En el caso concreto de cooperatividad positiva la representación de Hill es quizá el mejor método para analizar los datos de unión de un ligando a una macromolécula (76). En muchos casos, de esta gráfica es posible obtener las constantes de unión microscópicas (107) y a partir de éstas se obtendrían las macroscópicas.

#### 4. MICROCALORIMETRIA

La aplicación de la microcalorimetría constituye actualmente uno de los métodos experimentales más directos para la investigación termodinámica de sistemas biológicos moleculares (85, 108-113). El nombre de microcalorimetría proviene del hecho obvio de que los calores a determinar son muy pequeños, lo cual se debe a la limitación conocida en cantidades de material biológico de alta pureza y al elevado peso molecular de muchas de estas sustancias, macromoléculas. Esto último hace que la concentración molar de las disoluciones sea particularmente baja. Por estas razones los microcalorímetros deben presentar una sensibilidad térmica muy elevada y requerir pequeñas cantidades de muestra para las medidas. Así, los microcalorímetros pueden determinar cantidades de calor del orden de la mcal o unas pocas  $\mu\text{cal s}^{-1}$ , lo que usualmente corresponde al nivel del  $\mu\text{mol}$  de sustancia.

En la microcalorimetría de reacción se suele determinar la variación de calor que se produce en reacciones químicas de naturaleza biológica. Puesto que normalmente se trabaja a presión constante, lo que en realidad se está determinando son los incrementos de entalpía para dichos procesos.

A continuación se describe un tipo de microcalorímetro de reacción, denominado de flujo, que ha sido el utilizado para la realización de esta Memoria.

Un calorímetro de flujo (como el descrito en la figura 11 y 12) mide directamente el flujo de calor producido entre la célula de reacción, y un sumidero de calor, que siempre está a temperatura constante. La medida está basada en el uso pasivo de un sistema Peltier (o cualquier otro tipo de sensor diferencial de temperatura). El sistema produce una diferencia de potencial proporcional a la diferencia de temperatura entre la célula calorimétrica y el sumidero de calor. Esta diferencia de temperatura de acuerdo con la ley de Newton es directamente proporcional al flujo de calor entre la célula y el sumidero. Los incrementos de temperatura que se producen entre ambos son muy pequeños, del orden de  $10^{-4}$  K, por lo tanto es fundamental un gran equilibrio térmico previo a cualquier experimento.

La señal que produce el instrumento se recoge en un registro gráfico después de ser amplificada (según se describe en la figura 11) y es proporcional a un flujo continuo de calor en la célula ( $\mu\text{cal s}^{-1}$ ), el cual depende del flujo de los reactivos ( $\mu\text{moles s}^{-1}$ ).

La temperatura de la célula es la misma al principio y al final, pero cambia ligeramente durante la reacción, por lo tanto no es un calorímetro estrictamente isotérmico.

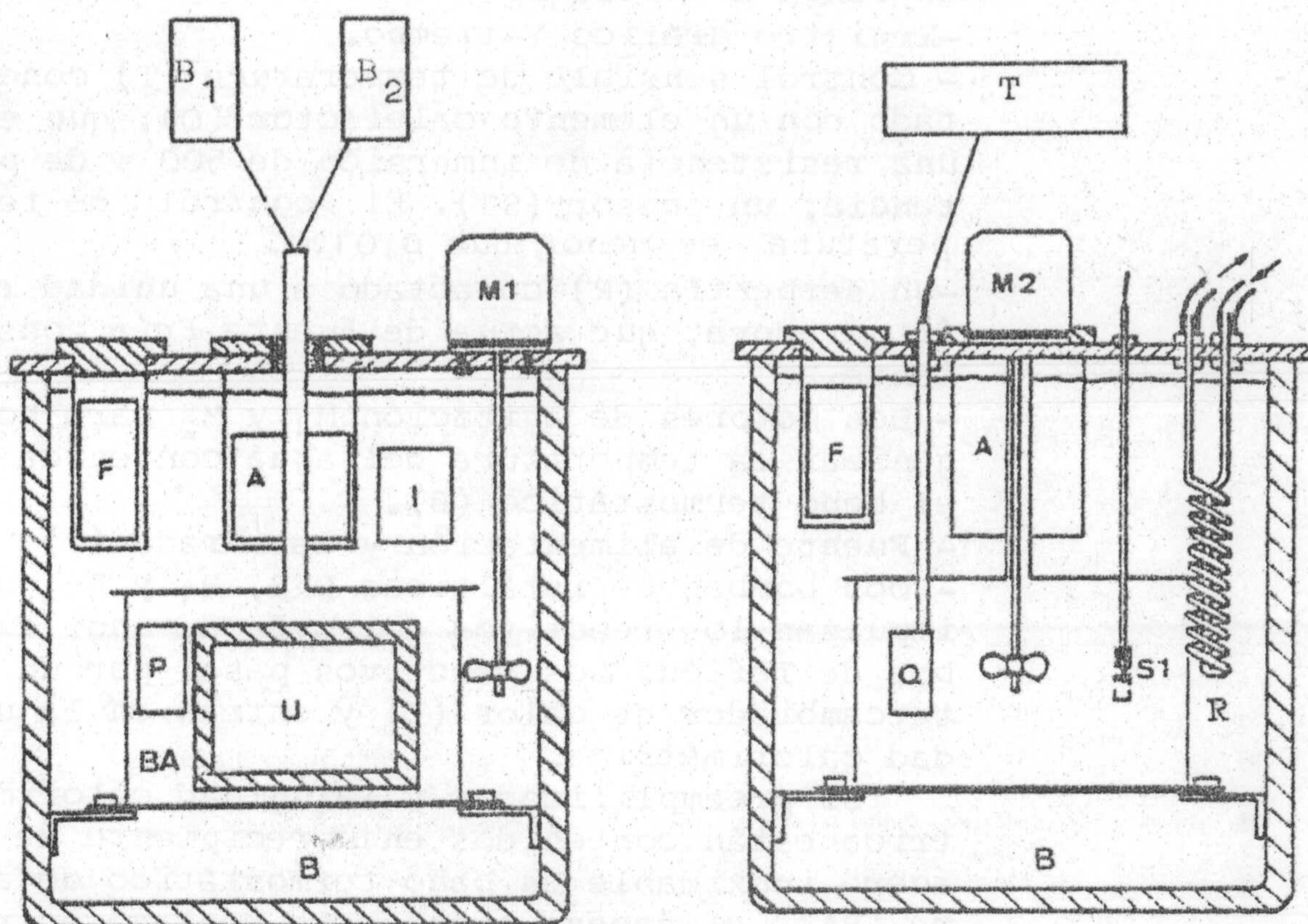


Figura 11. Esquema de un microcalorímetro de flujo. El sistema calorimétrico de flujo utilizado en la realización de los experimentos ha sido construido en nuestro laboratorio en base a una unidad microcalorimétrica de flujo LKB 2107-121 y está compuesto por:

- Unidad microcalorimétrica (U) que posee unos intercambiadores de calor por donde fluyen los reactivos antes de llegar a la célula calorimétrica (detallada en la figura 12).
- Sistema de amplificación de la señal, formado por un preamplificador (P), un amplificador (A) y filtrado. Es necesario este sistema de amplificación antes de registrar la señal obtenida, ya que ésta suele estar en

un rango de 1-100  $\mu$ V.

-Registro gráfico Y-tiempo.

- Control sensible de temperatura (T) conectado con un elemento calefactor (Q), que es una resistencia de inmersión de 500 w de potencia; un sensor (S1). El control de temperatura es menor que 0,01°C.

-Un serpentín (R) conectado a una unidad refrigeradora, que actúa de fuente fría constante.

- Dos motores de agitación  $M_1$  y  $M_2$  para homogenizar la temperatura del agua contenida en el baño termostático (B).

- Fuente de alimentación y calibrado (F)

- Dos bombas peristálticas LKB,  $B_1$  y  $B_2$ , que impulsan los reactivos a través de unos tubos de Teflón. Los reactivos pasan por un intercambiador de calor (I) y entran en la unidad calorimétrica.

El preamplificador y la unidad calorimétrica están contenidos en un recipiente de acero inoxidable en baño termostático de aire (BA), el acceso a ambos se realiza a través de un tubo cilíndrico de 3 cm. de diámetro.

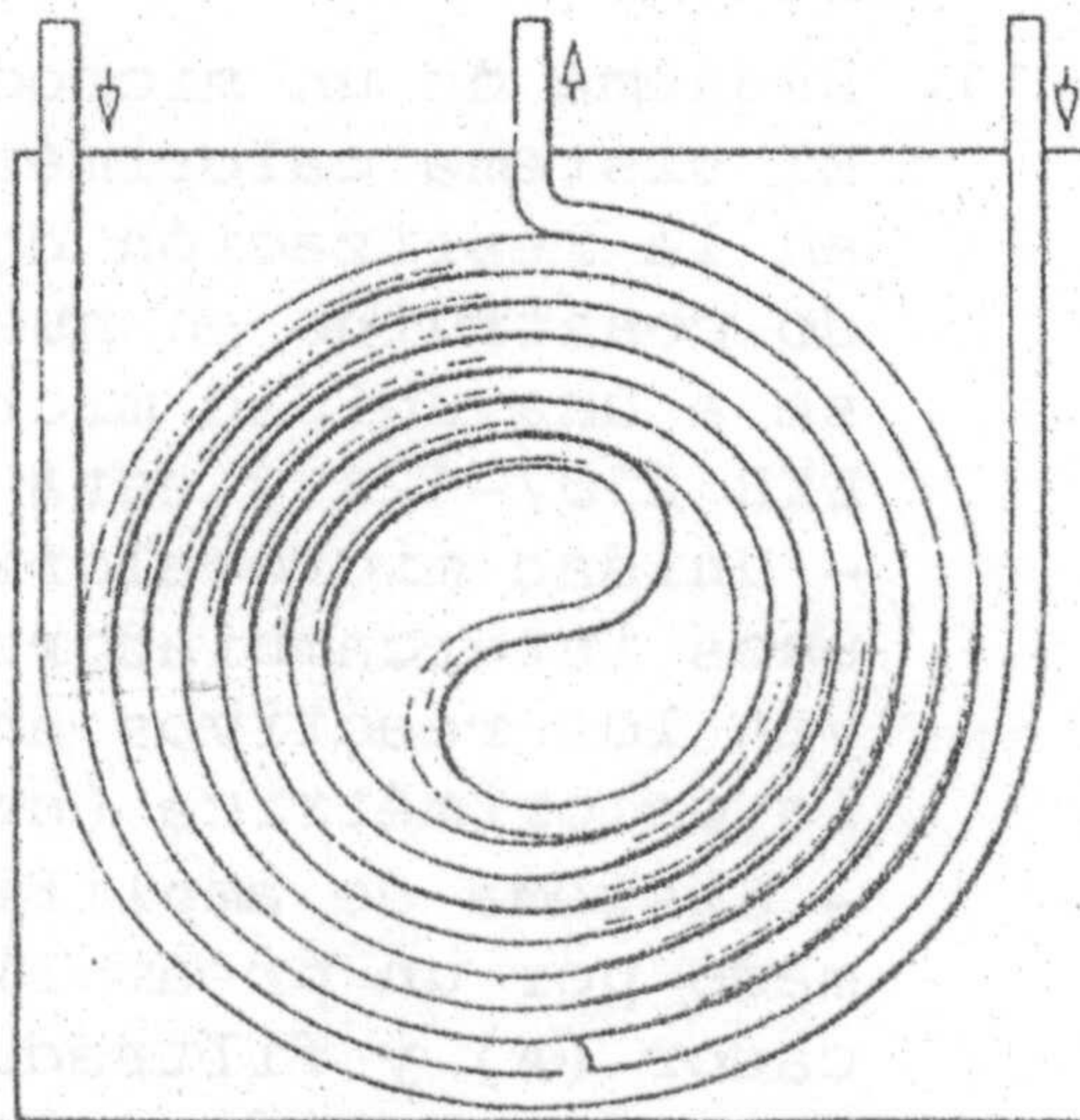


Figura 12. Detalle de una célula calorimétrica de un microcalorímetro de flujo LKB 2107-121.

#### 4.1. Calibración

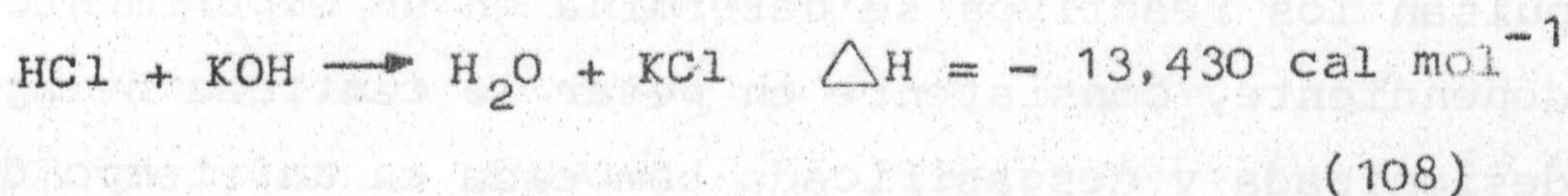
La señal registrada procedente de un microcalorímetro se obtiene expresada en voltios, para convertirla en calor es necesario un experimento previo de calibración, que puede ser de naturaleza eléctrica o química.

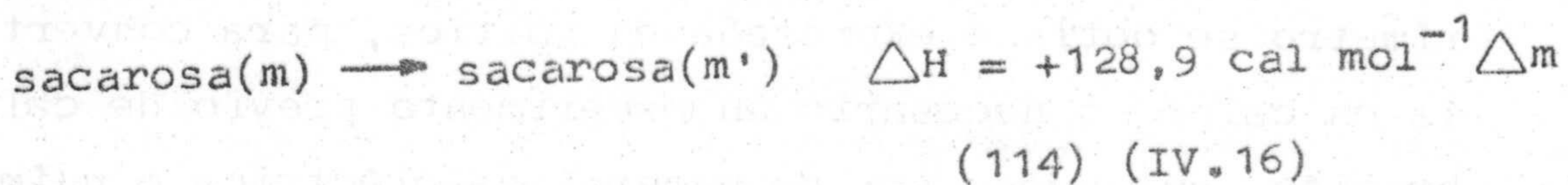
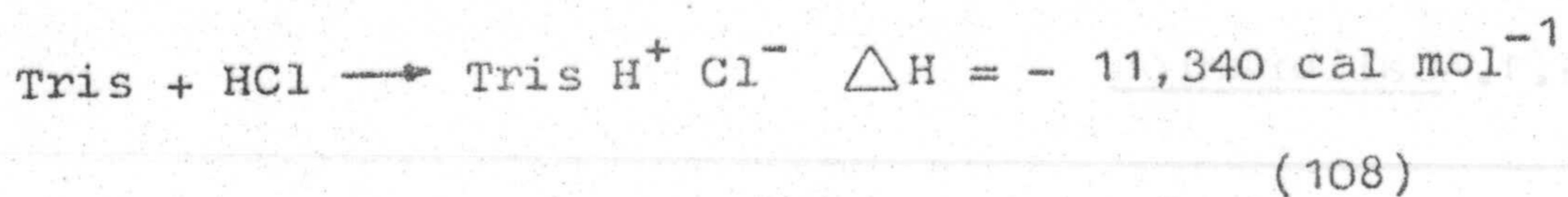
La calibración eléctrica se realiza mediante una resistencia conocida incluida en la célula calorimétrica. A través de esta resistencia fluye una corriente eléctrica de intensidad conocida,  $i$ , durante el tiempo deseado, por ejemplo unos 15 minutos. La corriente eléctrica la produce una fuente eléctrica, que permite seleccionar la intensidad en un rango de 0,1 a 10 mA. La potencia total disipada,  $P$ , vendrá dada por la relación:

$$P = i^2 R \quad (\text{IV.15})$$

donde  $P$  viene expresada en watios y  $R$  en ohmios.

La calibración química se hace realizando una reacción química cuyo cambio de entalpía sea perfectamente conocido. Generalmente se escoge algunas de las tres reacciones dadas a continuación (IV.16), en las que se incluye el cambio de entalpía a 25,00°C.





#### 4.2. Experimento de calorimetría

Un experimento calorimétrico básico consiste en la mezcla de dos disoluciones que contienen los reactivos. El flujo continuo de calor asociado con el proceso global viene dado por:

$$\frac{dQ}{dt} = f \Delta H [P] + \frac{dQ_d}{dt} + \frac{dQ_v}{dt} \quad (\text{IV.17})$$

donde  $f$  es el flujo total de reactivos a través de la célula del calorímetro,  $Q_d$  es el calor de dilución de los reactivos,  $Q_v$  es el llamado calor viscoso,  $\Delta H$  es el cambio de entalpía por mol de producto y  $[P]$  es la concentración de producto formado.

La velocidad de flujo a la que las bombas impulsan los reactivos se determina en un experimento independiente, consistente en pesar la cantidad de agua desionizada y desgasificada bombeada en un tiempo determinado. Dependiendo de la magnitud del flujo se escoge el tiempo del experimento, entre 20 y 30 minutos para

10 ml/hora, de esta manera el error en la pesada es mínimo. El experimento se realiza tres veces calculándose el promedio de los valores obtenidos.

Los valores de  $dQ_d/dt$  y  $dQ_v/dt$  se deben determinar en experimentos independientes. Parte de estos experimentos pueden eliminarse usando como línea base bien la mezcla disolvente-disolvente o la disolvente-reactivo.

En la figura 13 se representa la señal en un registro Y-tiempo de un experimento de flujo. El flujo de calor ( $dQ/dt$ ) es proporcional a la diferencia entre la señal C y la línea base, B, e incluye los calores de dilución de todos los reactivos y el calor de la propia reacción:

$$\frac{dQ}{dt} = f (c\Delta H + Q_{dil}) \quad (IV.18)$$

donde  $f$  es la velocidad de flujo,  $c$  la concentración molar de producto,  $\Delta H$  el calor por mol de producto formado de la reacción y  $Q_{dil}$  el calor de dilución de los reactivos por unidad de volumen de disolución. Según se ha descrito, este experimento calorimétrico de flujo se basa en la suposición de que la reacción es instantánea, lo cual no siempre ocurre. Normalmente, utilizando una velocidad de flujo total del orden de  $20 \text{ ml h}^{-1}$ , la muestra permanece en la célula del calorímetro durante un tiempo aproximado de 100 s. Si la reacción es suficientemente rápida para terminar en el tiempo de residencia de la muestra en la célula, la señal debe ser función



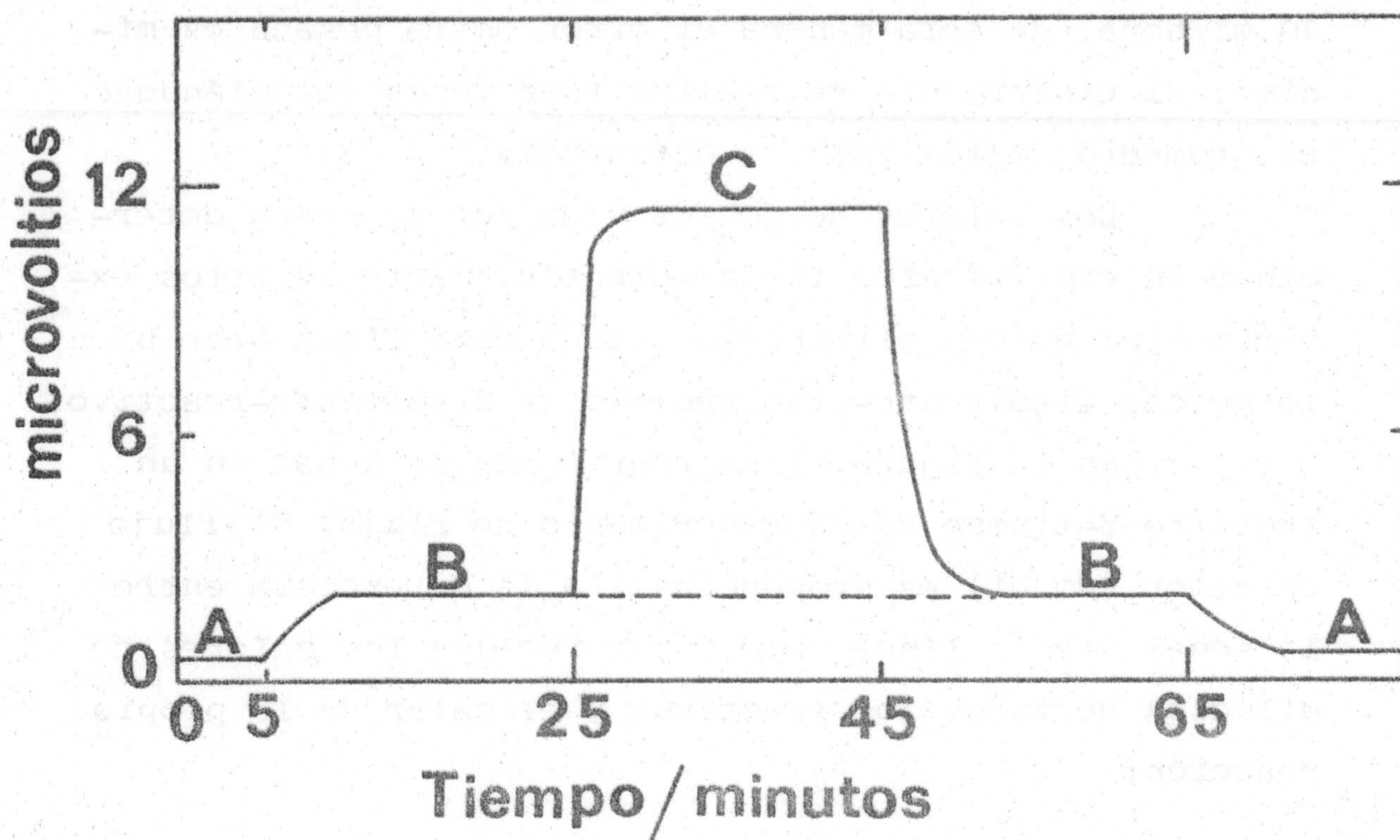


Figura 13. Señal típica en un registro Y - tiempo de un experimento de calorimetría de flujo. (A) señal sin flujo de líquido a través de la célula calorimétrica. (B) Señal correspondiente a la mezcla disolvente-disolvente cuando la velocidad total de flujo es  $10 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$  para cada reactivo. (C) Señal debida al estado estacionario que se alcanza cuando están reaccionando los reactivos. La diferencia de altura entre las líneas A y C es proporcional a  $dQ/dt$ , mientras que la diferencia de altura entre las líneas B y C es proporcional a los dos primeros sumandos de la ecuación(IV.17)

lineal del flujo como se muestra en la relación anterior. Sin embargo, si la reacción no se completa en el tiempo de residencia, el calor medido se refiere sólo a la extensión de la reacción que ocurre durante ese tiempo. La reacción se producirá entonces en mayor o menor extensión dependiendo del flujo al que se realice la experiencia. Una manera de conocer si la reacción se completa en la célula calorimétrica sería realizar el mismo experimento a distintos flujos y comprobar si la señal calorimétrica es función lineal del flujo.

Se realizaron experimentos de calorimetría de unión de AMP a fosforilasa en sus formas a y b. Los experimentos realizados con una enzima obtenida según se ha descrito en Materiales (III.-1) pusieron de manifiesto anomalías en el comportamiento de la enzima, que se describirán detalladamente en Resultados (V.-1), y que nos llevó a elaborar un proceso de purificación de esta enzima mediante un adsorbente, alúmina C $\gamma$ . Dicho proceso se describe en Métodos (IV.-2). Así, la enzima que se utilizó en los experimentos de calorimetría previamente había sido tratada con alúmina C $\gamma$  y sólo se utilizó dentro de la primera semana después de su obtención. La actividad de la enzima se verificó rutinariamente antes y después de cada experimento comprobándose que no hubo inactivación durante los mismos. Los valores de pH de todas las disoluciones utilizadas se controlaron a 25°C antes de iniciar la experiencia y ocasionalmente después de la misma.

Las medidas calorimétricas se hicieron a 25°C en el calorímetro descrito en la figura 11. Se realizaron calibrados eléctricos y químicos en el mismo rango de calor obtenido en los experimentos coincidiendo ambos. La calibración química se hizo mediante neutralización de Tris con ClH (108) y de HCl con NaOH.

El flujo de los reactivos (tampón, disoluciones de AMP y de fosforilasa) fué de 7 ml/hora en la mayor parte de los experimentos, cambiándose en algún caso para comprobar que la reacción se completaba en el interior de la célula calorimétrica.

En todas las medidas calorimétricas la línea base se hizo con Tampón-disolución de AMP. Por una de las bombas, previamente calibrada, fluye el tampón y por la otra la disolución de AMP, después de veinte minutos se sustituye el tampón por disolución de fosforilasa manteniendo la disolución de AMP en la otra bomba, se dejan fluir durante 20 minutos apareciendo la señal correspondiente a la unión fosforilasa-AMP. Sustituyendo posteriormente la disolución de fosforilasa de nuevo por tampón se vuelve a obtener línea base durante 20 minutos. La diferencia de altura entre la señal y la línea base es proporcional a un calor, que incluye al de unión AMP-fosforilasa y al de dilución de la enzima, que deberá ser determinado en un experimento independiente. El calor de dilución del AMP se encuentra ya incluido en este tipo de experimento en la línea base.

El calor de dilución de la fosforilasa se deterer

minó en un experimento independiente donde la línea base fué tampón-tampón y la señal fué tampón-fosforilasa. En estos experimentos la concentración de fosforilasa fué la misma que en la de los experimentos en los que se determinó el calor de unión al nucleótido.

Se realizaron así una serie de experimentos en los que se mantuvo constante la concentración de enzima y se varió la de AMP. Este conjunto de medidas da lugar a la denominada curva de valoración calorimétrica.

A lo largo de los experimentos calorimétricos se utilizaron las siguientes disoluciones:

- Tampón A: Tris 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM.

- Tampón B: 2-Glicerofosfato 50 mM; ClK 50 mM; EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM.

- Tampón C: Glicil-glicina 50 mM; ClK 50 mM; EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM.

- Tampón D: HEPES 50 mM; ClK 50 mM; EDTA 0,1 mM y ácido mercaptoacético 0,1 mM.

- Tampón E: Tris 50 mM; ClK 16 mM; EDTA 0,1 mM; Pi 20 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM.

- Disolución de fosforilasa b: La fosforilasa b libre de AMP se preparó en el tampón A, B, C o E según se ha indicado previamente (ver preparación general de la enzima en Materiales III.-1).

- Disolución de fosforilasa a: La fosforilasa a libre de AMP se preparó en el tampón D según se ha descrito anteriormente (ver preparación general de la

enzima en Materiales III.-3).

- Disolución de AMP: El AMP se disolvió en cada experimento en el mismo tipo de tampón que la enzima. La disolución se preparó de la manera descrita en (IV.-3.2) y su concentración estuvo comprendida entre  $10^{-4}$  M y  $2 \cdot 10^{-3}$  M en los experimentos de unión a fosforilasa b y en un rango de  $5 \cdot 10^{-5}$  M y  $6 \cdot 10^{-4}$  M en el caso de fosforilasa a.

- Disolución de IMP: El IMP se disolvió en el tampón C de la manera descrita en (IV.-3.2) La concentración de nucleótido estuvo comprendida en el rango de  $10^{-4}$  M a  $10^{-3}$  M.

Todas las disoluciones se ajustaron a pH 6,9 a 25°C y antes de ser introducidas en el calorímetro se filtraron a través de un filtro Millipore. El agua utilizada para preparar las disoluciones fué previamente desgasificada para evitar la posible formación de burbujas durante el experimento y su influencia térmica en el mismo.

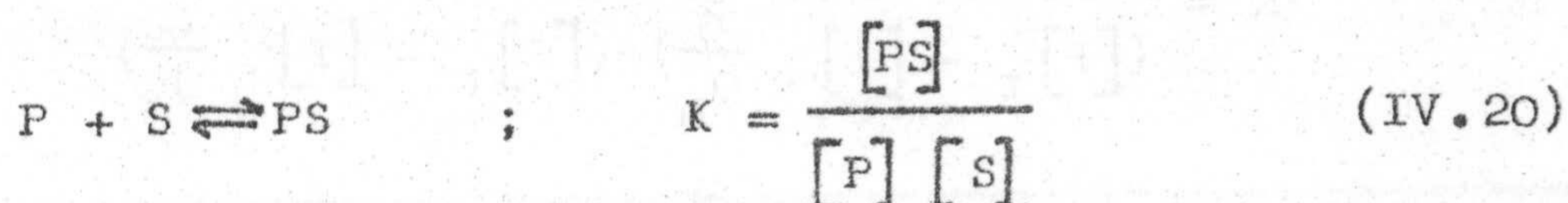
#### 4.3. Análisis de datos

Mediante datos calorimétricos es posible determinar el cambio de entalpía,  $\Delta H^{\circ}$ , y la constante de equilibrio, K, para un determinado proceso (85). Conocidos estos parámetros y utilizando las expresiones:

$$\Delta G^{\circ} = -R T \ln K \quad ; \quad \Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ} \quad (\text{IV.19})$$

pueden calcularse los incrementos de energía de Gibbs,  $\Delta G^0$ , y de entropía,  $\Delta S^0$ , quedando así caracterizado termodinámicamente el proceso. El método ha sido aplicado al estudio de sistemas biológicos y permite calcular los parámetros termodinámicos para la unión ligando-macromolécula (85, 115).

Veamos un caso simple de unión de un ligando (S) a una proteína (P):



Cuando K es moderadamente alta una variación en las concentraciones iniciales de los reactivos originará un cambio significativo en la extensión de la unión. El calor producido, Q, por la unión de la macromolécula y el ligando, en el caso simple descrito por la ecuación (IV.20), es proporcional al avance de la reacción.

$$Q = \frac{[PS]}{[P]_t} Q_m \quad (\text{IV.21})$$

o bien

$$[PS] = [P]_t \frac{Q}{Q_m} \quad (\text{IV.22})$$

donde  $Q_m$  es el calor por mol de P para la unión de macromolécula y ligando correspondiente al proceso hipotético en el que toda la proteína está unida al ligando

y  $[P]_t$  es la concentración total de proteína.

De las ecuaciones (IV.20) y (IV.22) se deduce que para una serie de experimentos calorimétricos donde la concentración total de proteína se mantiene constante, al variar la concentración total de ligando  $[S]_t$ , se tendrá:

$$K = \frac{[P]_t \frac{Q}{Q_m}}{([P]_t - [P]_t \frac{Q}{Q_m}) ([S]_t - [P]_t \frac{Q}{Q_m})} \quad (\text{IV.23})$$

Esta ecuación se transforma en:

$$\frac{[P]_t - [P]_t \frac{Q}{Q_m}}{[P]_t Q} = \frac{1}{Q_m ([S]_t - [P]_t \frac{Q}{Q_m}) K} \quad (\text{IV.24})$$

o bien

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_m} + \frac{1}{Q_m \cdot K} \frac{1}{[S]_t - [P]_t \frac{Q}{Q_m}} \quad (\text{IV.25})$$

quedando en la forma

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_m} + \frac{1}{Q_m \cdot K} \frac{1}{[S]} \quad (\text{IV.26})$$

donde

$$[S] = [S]_t - \frac{Q}{Q_m} [P]_t \quad (\text{IV}, 27)$$

$[S]$  es la concentración de ligando libre en la disolución final. Una representación gráfica de  $1/Q$  frente a  $1/[S]$  origina una línea recta de pendiente  $1/(Q_m \cdot K)$  y ordenada en el origen  $1/Q_m$ . Así, de estos valores es posible calcular  $K$  y  $Q_m$ , o lo que es lo mismo,  $\Delta H$  para la reacción. Los experimentos de calorimetría proporcionan los valores de  $Q$  a diferentes concentraciones de ligando total ( $[S]_t$ ), siendo desconocida la  $[S]$ . Por lo tanto, para el análisis de datos calorimétricos mediante este procedimiento se sigue un proceso iterativo, por ejemplo, partiendo inicialmente de  $[S] \approx [S]_t$ , o bien tomando para  $Q_m$  el valor aproximado a que tiende  $Q$  y a partir de la ecuación (IV.27) obtener una  $[S]$  aproximada. Una representación gráfica de  $1/Q$  frente a  $1/[S]$ , como ya hemos indicado permite obtener  $K$  y  $Q_m$ . Con estos valores es posible determinar las concentraciones de ligando libre correspondientes a las  $[S]_t$ . Así, una nueva representación gráfica proporcionará unos nuevos valores de  $K$  y  $Q_m$  y este proceso se repite hasta que se considere conveniente. Con los valores de la constante y el cambio de entalpía utilizando las expresiones dadas previamente (IV.19) se obtendrían las variaciones de la energía de Gibbs y de la entropía quedando así caracterizada termodinámicamente la reacción a la tem-



peratura de la experiencia.

Existe un procedimiento análogo para obtener  $\Delta H^\circ$ ,  $K$  y  $n$  cuando existen  $n$  lugares idénticos e independientes para el ligando (116). Para este sistema, al igual que en el caso anterior, el calor experimental,  $Q$ , es una medida directa de la cantidad de complejo ligando-proteína formado. En la figura 14 se muestra la gráfica de  $Q$  frente a la concentración de ligando libre,  $[S]$ , obtenida para una  $[P]_t$  constante y varias concentraciones totales de ligando,  $[S]_t$ .

Para este tipo de sistemas (ver ecuación (IV. 9)) se tiene que:

$$\nu = \frac{n K_m [S]}{1 + K_m [S]} \quad (\text{IV. 28})$$

o bien

$$\frac{1}{\nu} = \frac{1}{n K_m [S]} + \frac{1}{n} \quad (\text{IV. 29})$$

donde  $\nu =$  moles de  $[S]_{\text{unido}}/[P]_t$ ;  $[S]$  es la concentración de ligando libre y  $K_m$  es la constante de unión microscópica.

La relación entre  $\nu$  y  $Q$  es

$$\nu = n \frac{Q}{Q_m} \quad (\text{IV. 30})$$

donde  $Q_m$  análogamente al caso anterior es el calor de unión por mol de proteína a saturación de todos los sitios.

A partir de las ecuaciones (IV.29) y (IV.30) se deduce que:

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_m} + \frac{1}{Q_m K_m [S]} \quad (\text{IV.31})$$

donde

$$[S] = [S]_t - n \frac{Q}{Q_m} [P]_t \quad (\text{IV.32})$$

Por un proceso iterativo pueden obtenerse los valores óptimos de  $Q_m$  y  $K_m$  para valores supuestos de  $n$  a partir del ajuste de  $1/Q$  frente a  $1/[S]$ . Una comprobación del valor de  $n$  se puede hacer realizando la valoración del ligando con la proteína, es decir, fijando la  $[S]_t$  y variando la  $[P]_t$ . Así, mediante un ajuste matemático iterativo análogo se obtendría  $Q'_m$ , calor por mol de ligando unido. Es evidente que:

$$\frac{Q_m}{Q'_m} = n \quad (\text{IV.33})$$

Si los sitios de unión no fueran idénticos y/o independientes, como ocurre en sistemas cooperativos,

se necesita normalmente información adicional para la caracterización termodinámica del proceso. Esta información se puede obtener haciendo uso de técnicas adicionales como la fluorescencia (117), diálisis en el equilibrio (117,118) y cualesquiera otras que nos permitan calcular las constantes de equilibrio. En el apartado de Resultados (V.-3) de esta Memoria se desarrolla detalladamente el análisis de unos casos particulares para este tipo de sistemas, en los cuales hay sitios idénticos cooperativos y también sitios distintos, a fin de aplicarlo a los resultados experimentales de unión de una proteína, la fosforilasa, a ligandos tales como el AMP y el IMP.

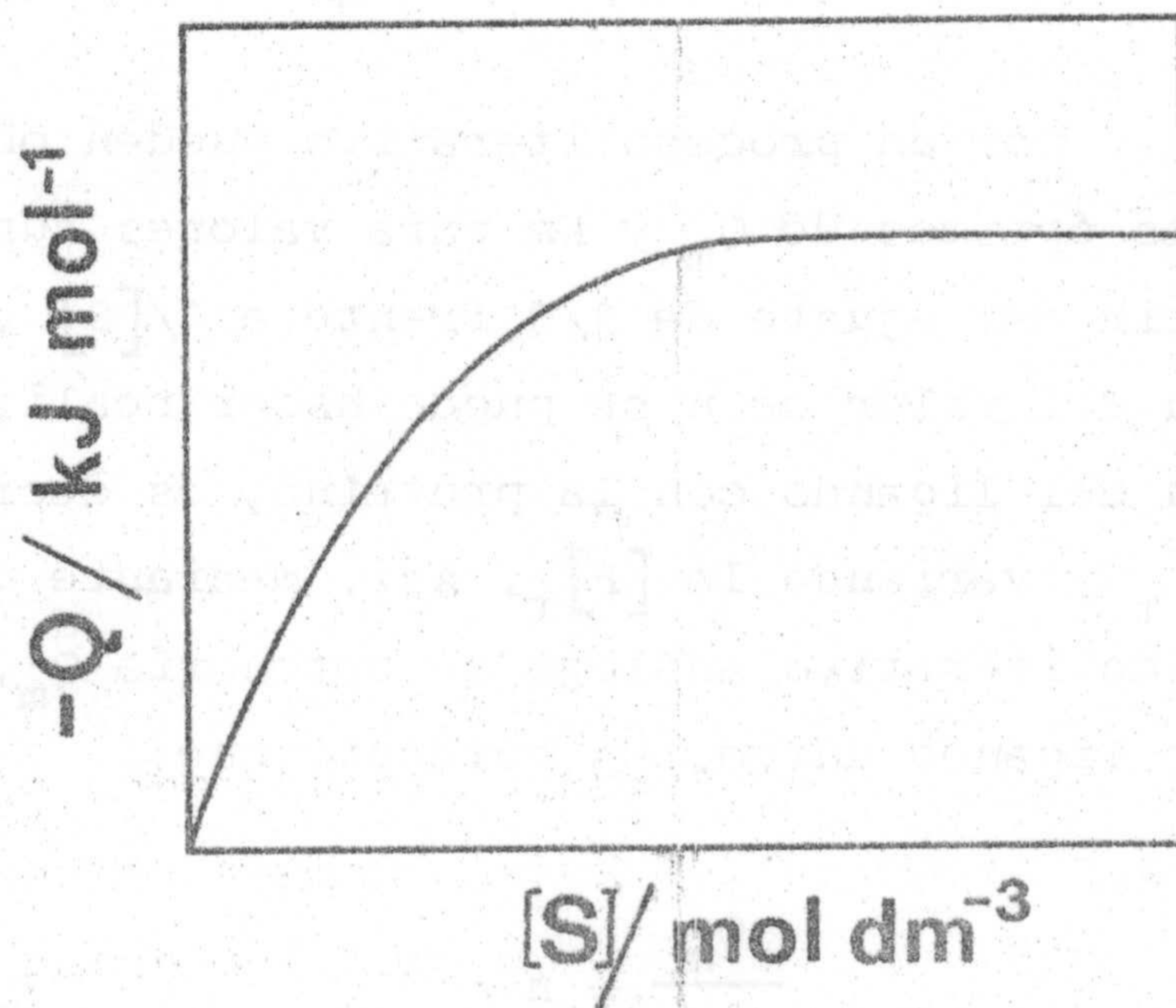


Figura 14. Curva de valoración calorimétrica de una proteína con un ligando. Se ha representado una gráfica típica de calor frente a concentración de ligando libre, obtenida para una concentración de proteína constante.

V. RESULTADOS

1000000000

Este capítulo se ha dividido en tres partes. En la primera se exponen los resultados que evidenciaron la presencia de una impureza enzimática en las preparaciones de fosforilasa b y un método encontrado que permite separar dicha impureza de la disolución de fosforilasa. En la segunda parte, se exponen los resultados de unión de activadores a la fosforilasa a y b mediante diálisis en el equilibrio. En un tercer apartado se realiza un estudio calorimétrico de los mismos sistemas estudiados por la técnica anterior.

## 1. PURIFICACION DE FOSFORILASA b DE ACTIVIDAD DE AMP-AMINOHIDROLASA

A continuación se describen cronológicamente los hechos que llevaron a detectar la presencia de una impureza en las preparaciones de fosforilasa b, así como los resultados de experimentos que se realizaron para identificar dicha impureza de naturaleza enzimática. Finalmente se describe un método original que de una forma simple y muy eficaz permite la eliminación de esta impureza de las preparaciones de fosforilasa, dejando inalterada esta última.

1. Evidencia de trazas de AMP-aminohidrolasa en preparaciones de fosforilasa b

En la figura 15 se incluyen las curvas de valoración calorimétrica de fosforilasa b a 5 mg/ml con AMP en glicil-glicina 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM, a pH 6,9 y 25°C. Como se puede ver en esta figura, dependiendo de la preparación de enzima utilizada se obtuvieron distintos valores de calor a altas concentraciones de AMP. Entre las curvas límite representadas se obtuvieron muchas curvas intermedias al usar diferentes preparaciones de enzima. Todas ellas coincidían en presentar un perfil bifásico, diferenciándose en los valores de calor máximo y en el rango de AMP al que se alcanza la saturación. Este carácter bifásico parece indicar que la saturación de la enzima por AMP ocurre en dos etapas. Experimentos similares se realizaron en otras disoluciones reguladoras, como Tris, 50 mM (figura 16) 2-glicerofosfato, 50 mM (figura 17), comprobándose en ambos el mismo carácter bifásico observado en glicil-glicina.

Como se muestra en la figura 15 el calor de reacción a concentraciones saturantes de AMP correspondiente a una misma preparación de enzima es distinto dependiendo del número de recristalizaciones que se le hayan hecho a la enzima. Los valores del calor de reacción AMP-fosforilasa b disminuyen al utilizar una enzima que posee una recristalización adicional. Este hecho hace



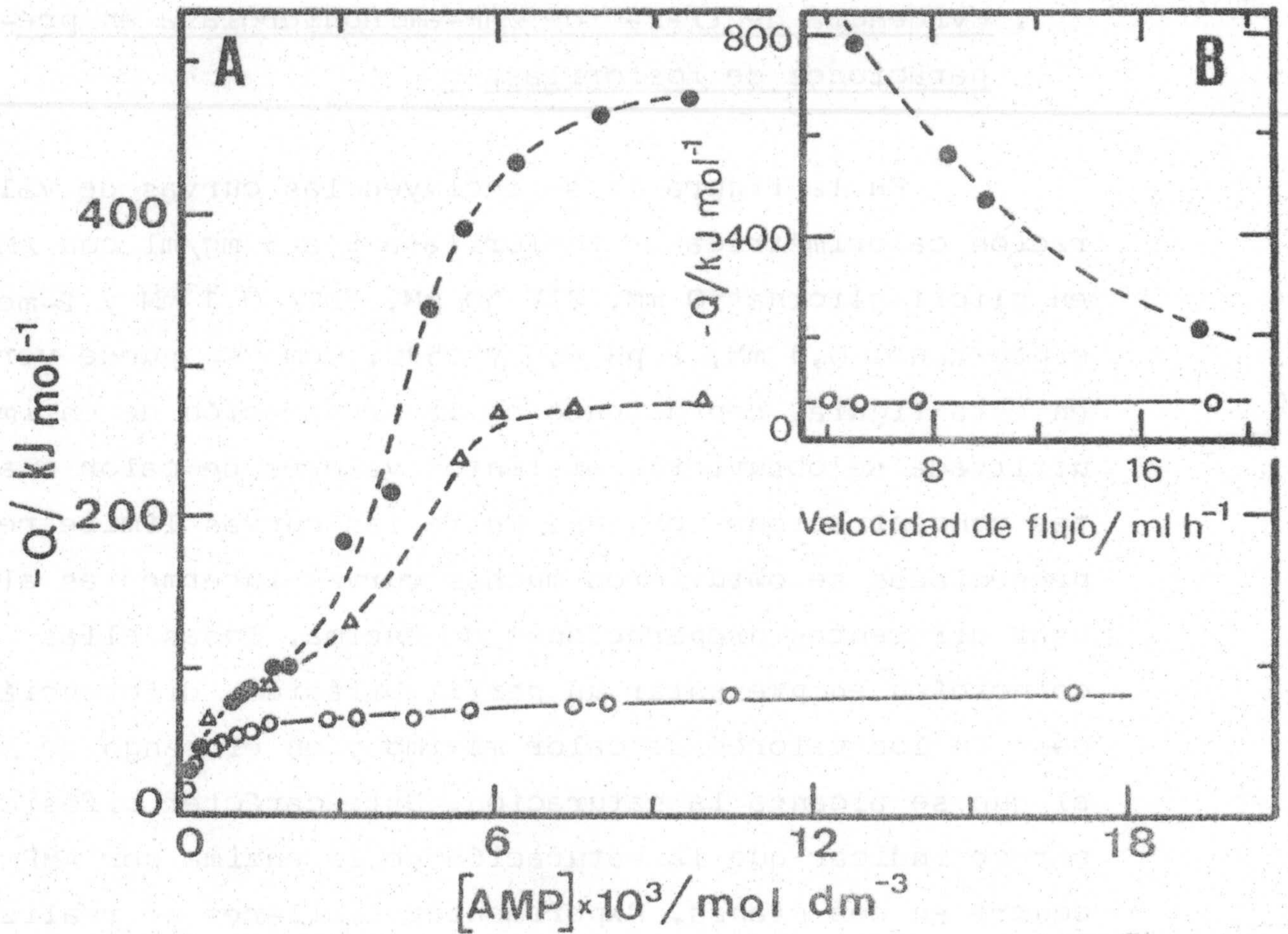


Figura 15. A Calor por mol de monómero de enzima producido por adición de disoluciones de AMP a disoluciones de fosforilasa b. La velocidad de flujo fué de 10 ml/hora. Las líneas discontinuas corresponden a preparaciones de enzima que al añadirle AMP mostraron cambios de pH y del espectro de absorción UV del nucleótido ( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ). Las líneas continuas son de preparaciones de enzima que no presentaron cambios en esos parámetros ( $\circ$ ). La enzima, a 5 mg/ml en la mezcla de reacción se encontraba en un tampón de glicil-glicina 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM a pH 6,9 y 25°C. B: Dependencia con la velocidad de flujo al añadir una disolución

de AMP a fosforilasa b. Los símbolos y las condiciones experimentales son como los de arriba. La concentración de AMP fué 9,7 mM.

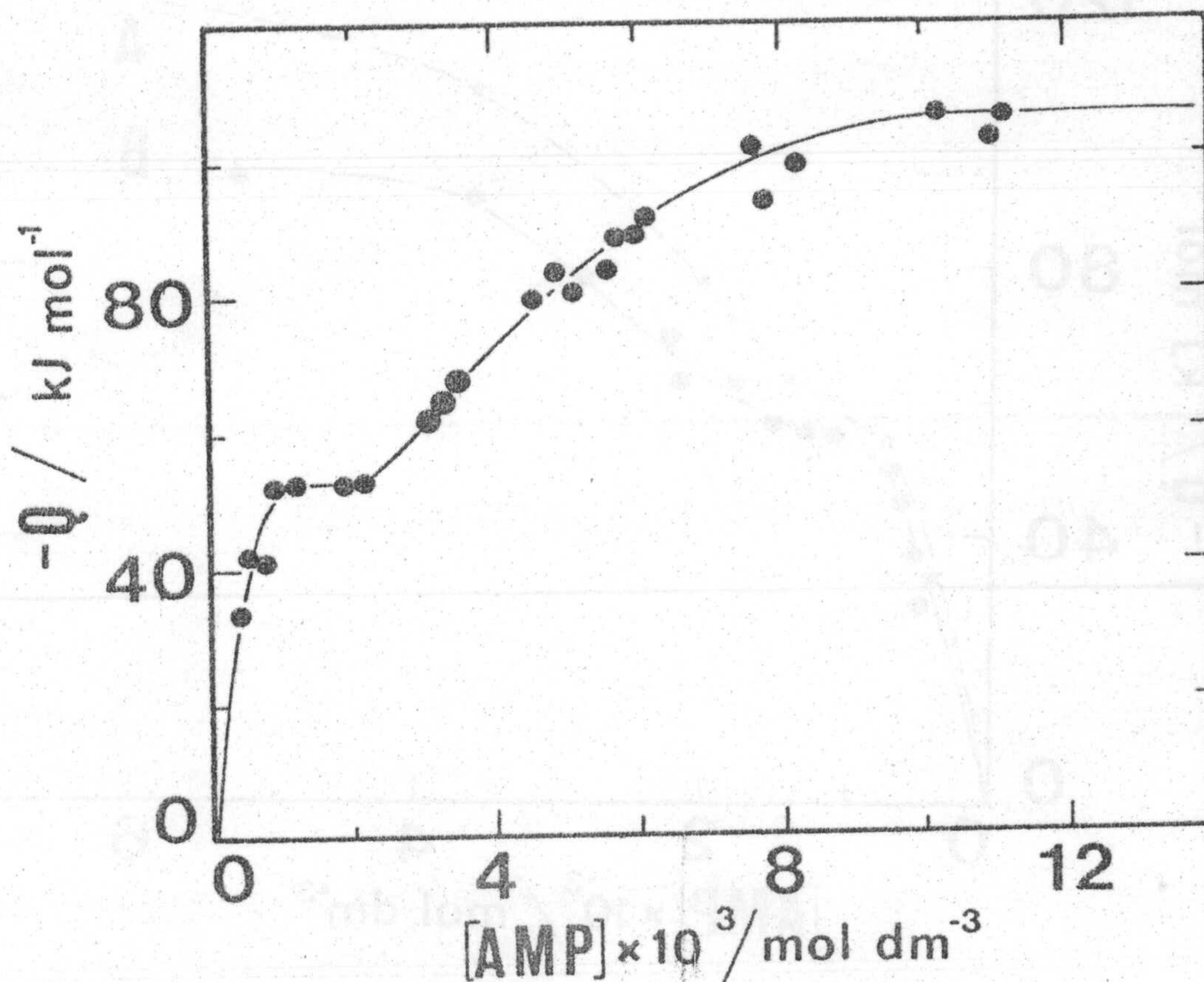


Figura 16. Calor por mol de monómero de enzima desprendido en la adición de disoluciones de AMP o disoluciones de fosforilasa b. Las condiciones experimentales son como las de la parte A de la figura 15 excepto la disolución reguladora que en este caso se substituyó la glicil-glicina por Tris 50 mM.

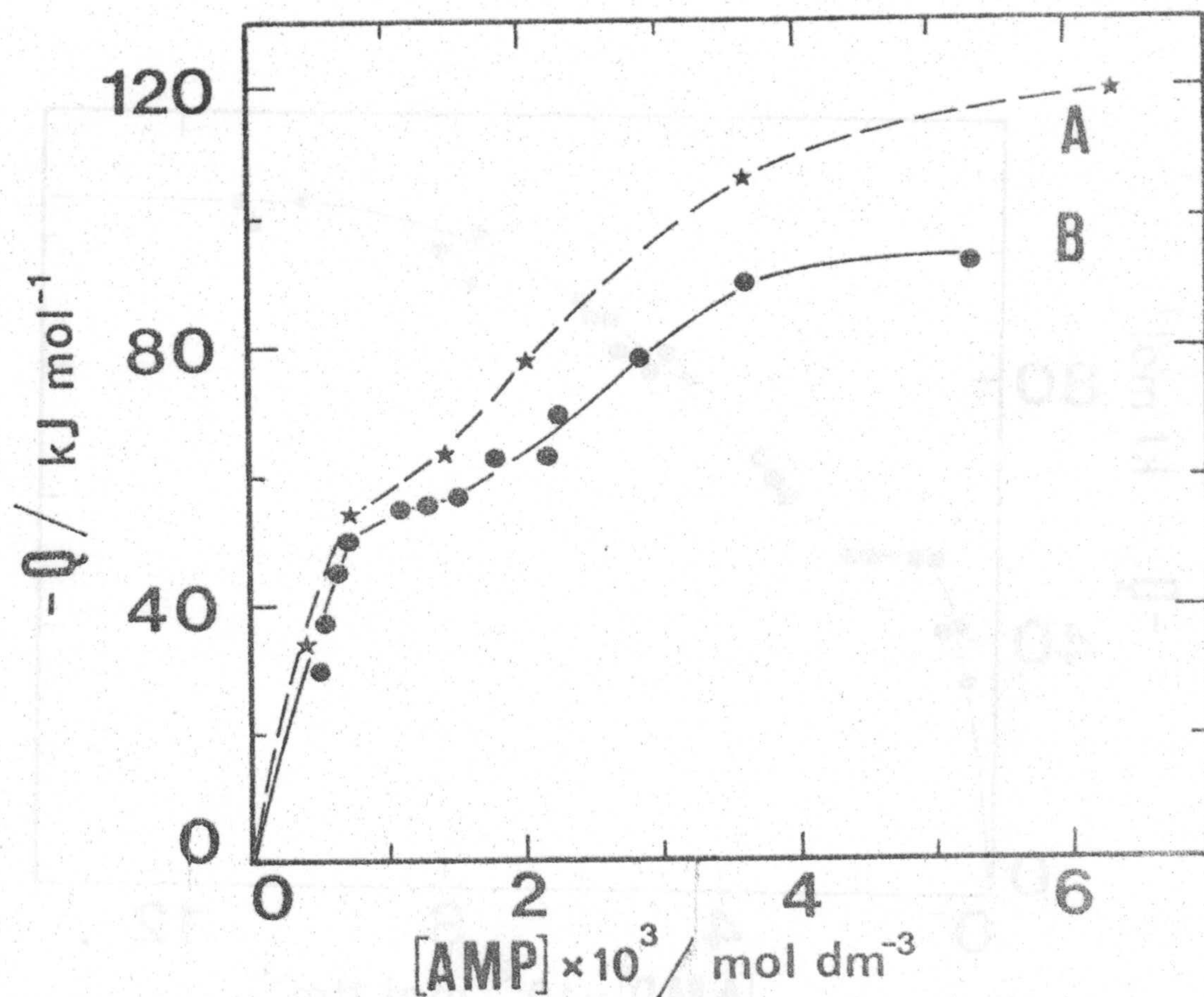


Figura 17. Influencia del número de recrystalizaciones de la fosforilasa b en el calor de la reacción AMP-fosforilasa b. La velocidad de flujo fué 10 ml/hora. La enzima y el AMP se prepararon en disoluciones de glicerofosfato 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercapto-etanol 0,1 mM. La concentración de enzima en mezcla de reacción fué de 5 mg/ml. La curva A corresponde a una enzima con cuatro recrystalizaciones (\*) y la B a la misma enzima con una recrystalizacion adicional (●).

sospechar que alguna sustancia acompaña a la fosforilasa b disminuyendo su cantidad al recrystalizar la enzima.

Puesto que la fosforilasa b se recrystaliza con AMP y  $Mg^{2+}$  y con objeto de comprobar si la falta de reproducibilidad de las curvas era debida a la presencia de pequeñas cantidades de  $Mg^{2+}$  (por no ser totalmente eliminado el  $Mg^{2+}$  en el paso de la enzima por la columna de Sephadex G-25), se hicieron experiencias a una concentración más elevada de EDTA (10 mM) con el fin de complejar todo el posible magnesio de la disolución enzimática. Los resultados obtenidos fueron similares a los que se dan en la figura 15, en presencia de EDTA 0,1 mM. También se realizaron experiencias en ausencia de EDTA. En ellas la disolución de fosforilasa contenía  $Mg^{2+}$  0,1 mM y tanto la disolución de AMP como de tampón no contenían  $Mg^{2+}$ . Se obtuvieron resultados análogos en estas valoraciones calorimétricas, quedando así demostrado que no era el magnesio la causa de obtener distintos valores de calor al utilizar distintas preparaciones de enzima o la misma preparación con distinto número de cristalizaciones.

Una serie de experiencias realizadas con una misma disolución enzimática, a 5 mg/ml, y la misma disolución de AMP, 9,7 mM, demostraron que el calor por mol de enzima medido dependía siempre de la velocidad de flujo a la que se introducían los reactivos en el calorímetro (figura 15). El calor por mol de fosforilasa

aumentaba al disminuir el flujo. Este hecho indica que a la velocidad de flujo de los experimentos la reacción que ocurría en la célula calorimétrica no alcanzaba el equilibrio en el tiempo de permanencia de los reactivos en dicha célula. Sin embargo, según se deduce de las publicaciones previas (64) la unión de AMP a fosforilasa b debe de ocurrir a una velocidad tal que el tiempo que en estos experimentos permanecen los reactivos en la célula es muy superior al necesario para que la reacción alcance el equilibrio. Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que simultáneamente a la unión de AMP a fosforilasa b está ocurriendo otra reacción más lenta que no finaliza en la célula calorimétrica. Con el fin de analizar esta reacción se estudió la unión de AMP a fosforilasa b por otras técnicas, como la espectroscopia y la potenciometría.

En el estudio potenciométrico se observó repetidamente que la adición de una disolución de fosforilasa b a disoluciones de AMP incrementaban el pH de la mezcla de 6,9 a 7,4-7,6 en un tiempo de unos 10-20 minutos, a pesar de la presencia de tampón, y seguía aumentando con el tiempo hasta alcanzar un valor estable. El cálculo de la concentración de protones consumidos en esta situación de pH estable conduce a un valor prácticamente coincidente con la concentración de AMP en la disolución, que era alrededor de 300 veces superior a la concentración de enzima. Una interpretación lógica de estos resultados sería que el nucleótido estaba sufrien-

do una reacción química en la que se consumían protones. En la figura 18 se ha representado el número de protones consumidos en función del tiempo al mezclar una disolución de fosforilasa b, 10 mg/ml, en 2-glicerofosfato 50 mM, ClK 50 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM a pH 6,9 con AMP 34 mM en el mismo tampón.

Se observó que la variación del pH con el tiempo era más rápida conforme aumentaba la concentración de enzima. El estudio se hizo en un rango de 2 a 6 mg/ml de concentración de fosforilasa, siendo la concentración de AMP 10 mM en todos los experimentos. Se comprobó que la concentración de protones consumidos en un tiempo de 10 minutos era doble al duplicar la concentración de enzima, por lo que el agente responsable de la reacción que sufría el AMP debía estar directamente relacionado con la concentración de fosforilasa de la mezcla. En todos los experimentos se alcanzó el mismo valor de pH estable, que correspondía a un número de protones consumidos del orden del número de moléculas de AMP presentes en la disolución.

Además de los cambios de pH descritos arriba se detectó una inesperada variación en el espectro UV del AMP cuando la fosforilasa b se añadía a las disoluciones de nucleótido. La figura 19 ilustra el espectro UV del AMP a distintos tiempos desde que se mezcla con una disolución tamponada de fosforilasa b, manteniéndose la temperatura a 25°C durante todo el experimento. Como puede observarse, el máximo de absorción a 259 nm caracte-

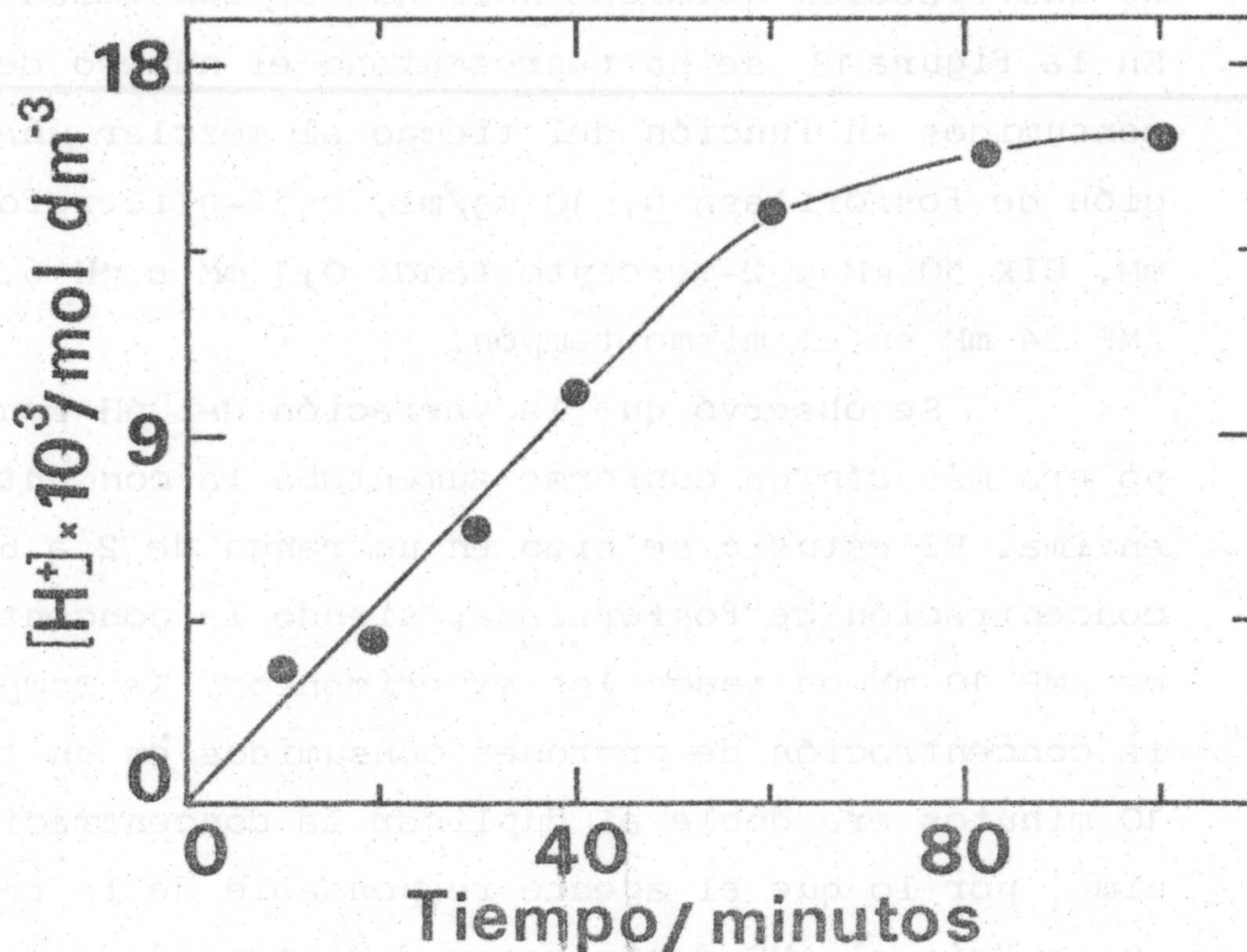


Figura 18. Variación con el tiempo de la concentración de protones consumidos al mezclar AMP con fosforilasa b. A 1 ml de una disolución con 10 mg/ml de fosforilasa b en glicerofosfato 50 mM, 2 - mercaptoetanol 0,1 mM a pH 6,9, en la que se había eliminado el AMP como se indica en Materiales, se le añadió 1 ml de una disolución 34 mM de AMP en el mismo tampón y pH. La reacción se realizó a 25°C. A partir de los valores de pH a distintos tiempos se calculó la concentración de protones consumidos (Ver Texto).

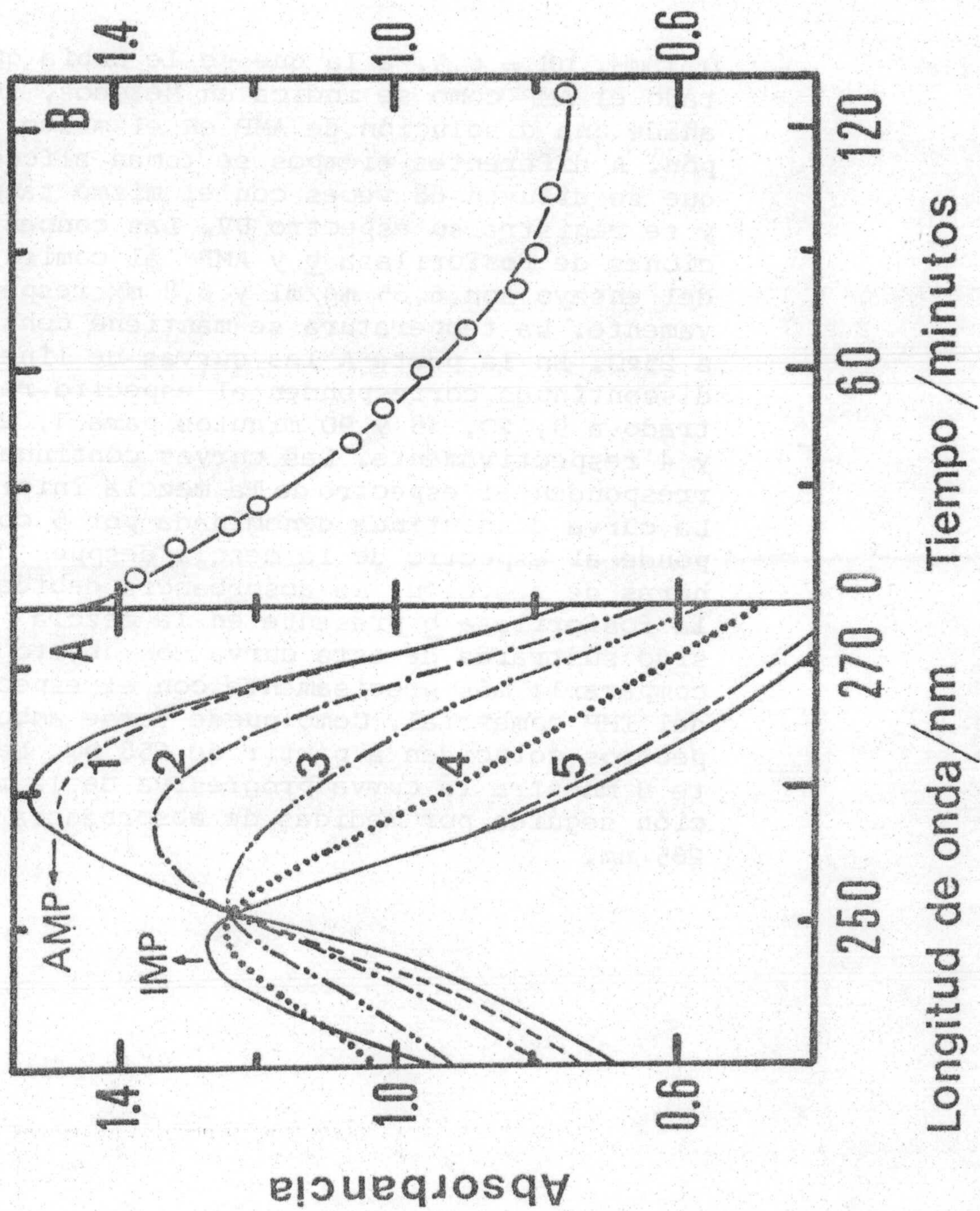


Figura 19. Cambio con el tiempo del espectro UV del AMP después de mezclarlo con fosforilasa b. A una disolución de fosforilasa b en Tris 50 mM, ClK 50 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM y EDTA.



0,1 mM, pH = 6,9, a la que se le había quitado el AMP como se indica en Métodos, se le añade una disolución de AMP en el mismo tampón. A diferentes tiempos se toman alícuotas que se diluyen 68 veces con el mismo tampón y se registra su espectro UV. Las concentraciones de fosforilasa b y AMP al comienzo del ensayo son 6,65 mg/ml y 6,8 mM respectivamente. La temperatura se mantiene constante a 25°C. En la parte A las curvas de líneas discontinuas corresponden al espectro registrado a 9, 20, 48 y 90 minutos para 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Las curvas continuas corresponden al espectro de la mezcla inicial. La curva discontinua denominada por 5 corresponde al espectro de la mezcla después de 24 horas de reacción. La absorbancia debida a la fosforilasa b presente en la mezcla ha sido sustraída de esta curva con objeto de compararla más precisamente con el espectro del IMP comercial. Como puede verse ambos espectros coinciden a partir de 258 nm. La parte B muestra la curva progresiva de la reacción seguida por medidas de absorbancia a 265 nm.

rístico del AMP se desplaza a menores longitudes de onda, llegando a estabilizarse a 250 nm. Este espectro, después de sustraerle la absorción debida a la fosforilasa de la disolución, prácticamente coincide con el espectro del IMP (figura 19). Este hecho también se comprobó separando la fosforilasa b de la mezcla mediante paso de la disolución por una columna de Sephadex G-25 y haciendo el espectro UV a las fracciones de elución en las que se encontraba el nucleótido y no contenían enzima. De los experimentos descritos hasta el momento se deduce que el AMP en presencia de fosforilasa b ~~se~~ modifica transformándose aparentemente en IMP.

Rutinariamente la fosforilasa b utilizada en estos experimentos se recristalizaba al menos 3 veces y mostraba una única banda en electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida. Todas las preparaciones utilizadas presentaban una actividad catalítica de 80 a 90 unidades por mg de fosforilasa comparable a la máxima obtenida en la Bibliografía (10). No obstante, el sorprendente cambio en el pH y espectro UV previamente descrito, así como la dependencia del calor de unión AMP-fosforilasa b con la velocidad de flujo y la falta de rigurosa reproducibilidad en cuanto el calor obtenido a concentraciones saturantes de AMP sugieren la existencia de una contaminación por trazas de alguna impureza en las preparaciones de fosforilasa b. Un análisis de las sustancias presentes en las disoluciones de fosforilasa b durante su proceso de obtención hizo sospechar que esta

impureza podría ser alguna enzima que no se hubiese conseguido separar totalmente de la fosforilasa b en dicho proceso. Así, viendo que una de las enzimas existentes en el músculo de conejo cataliza la conversión de AMP en IMP, la AMP-aminohidrolasa, se sospechó que ésta podría ser la impureza de nuestras preparaciones de fosforilasa b. Un factor que contribuyó a reafirmar esta sospecha fué el hecho de que Johnson et al., en un estudio de la estructura de fosforilasa b mediante difracción de rayos X, sugirieron que algunas de sus preparaciones podrían estar impurificadas, posiblemente por AMP-aminohidrolasa (42). Con el fin de confirmar que la impureza presente en las preparaciones de fosforilasa b era esta enzima se realizaron experimentos adicionales.

Se estudió el efecto producido por la adición de fosforilasa b en glicerofosfato 50 mM, ClK 50 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM, a pH 6,9 y 25°C, a disoluciones de diferentes nucleótidos, ATP, IMP y UDP en el mismo tampón. Estos resultados se muestran en la figura 20, donde se puede comprobar que no se han consumido protones en estas reacciones. En la misma gráfica (figura 20) se representan los protones consumidos en una experiencia análoga a las anteriores donde ahora el nucleótido es AMP. Al finalizar estas experiencias se realizaron los espectros UV de los cuatro nucleótidos comprobándose que el único que había sufrido alteración era el del AMP.

Se observó que la velocidad de reacción de transformación del AMP disminuía considerablemente por la pre-

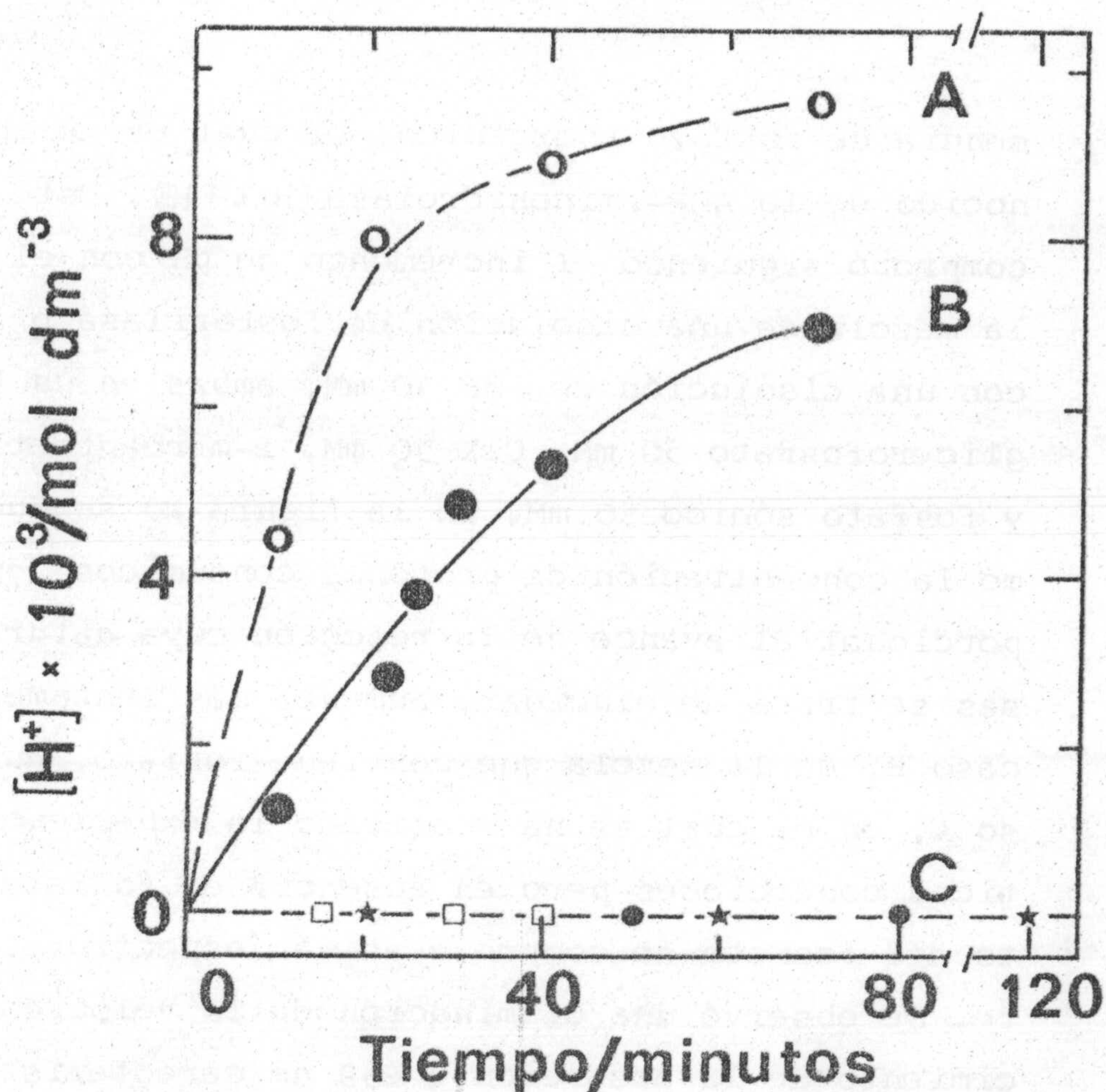


Figura 20. Variación con el tiempo de la concentración de protones consumidos en la mezcla de distintos nucleótidos con fosforilasa b. Efecto del fosfato. A: A 1 ml de una disolución de fosforilasa b a 18,9 mg/ml, en 2-glicero-fosfato 50 mM, CLK 50 mM 2-mercaptoetanol 0,1 mM a pH 6,9 se le añadió una disolución de AMP, 20 mM, en el mismo tampón y pH. La temperatura se mantuvo constante a 25°C. La concentración de protones consumidos en la reacción se calculó a partir del pH de la mezcla (O). B: La experiencia se realizó de la misma manera y en las mismas condiciones de la curva A, excepto que en este caso la mezcla de reacción contenía 50 mM de fosfato sódico. C: La experiencia es igual que la descrita para la curva A diferenciándose únicamente en el nucleótido utilizado: UDP 20 mM (\*), ATP 10mM (□), IMP 10 mM (●).

sencia de fosfato inorgánico, el cual es un inhibidor conocido de la AMP-aminohidrolasa (101,119). Este hecho se comprobó siguiendo el incremento de pH con el tiempo en la mezcla de una disolución de fosforilasa b a 18,9 mg/ml con una disolución de AMP 10 mM, ambas en un tampón de glicerofosfato 50 mM, ClK 50 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM y fosfato sódico 50 mM. En la figura 20 se puede ver cómo la concentración de protones consumidos, que es proporcional al avance de la reacción cuya naturaleza y causas se trata de elucidar, aumenta más lentamente en el caso B, de la mezcla que contiene fosfato, que en el caso A, en el cual se ha realizado la experiencia en idénticas condiciones pero en ausencia de fosfato. Este efecto del fosfato se comprobó además espectrofotométricamente. Se observó una disminución de la velocidad de decrecimiento de la absorción a 259 nm característica del AMP cuando la reacción se realizaba en presencia de fosfato.

Estos últimos experimentos confirmaron que efectivamente las preparaciones de fosforilasa b estaban impurificadas por trazas de AMP-aminohidrolasa que como ya hemos dicho cataliza la conversión de AMP en IMP y produce liberación de amoniaco. La actividad de esta enzima se determina siguiendo el decrecimiento de la absorción a 265 nm de una disolución que contiene AMP-aminohidrolasa y AMP (101,119). De igual forma se siguió la cinética de transformación de AMP en IMP en una disolución de fosforilasa b, a 6,65 mg/ml, y AMP, 6,8 mM, en Tris 50mM ClK 50mM, 2-mercaptoetanol 0,1mM y EDTA 0,1 mM, a pH 6,9 y

25°C (figura 19B). Para este estudio se escogió una preparación en la que la velocidad de la reacción era especialmente alta. A partir de los datos cinéticos se determinó la proporción de AMP-aminohidrolasa presente en las preparaciones de fosforilasa b. La reacción catalizada por la AMP-aminohidrolasa es de primer orden con respecto al AMP y la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de enzima (120). A partir de los datos de absorbancia a 265 nm (figura 19B) y de los coeficientes de extinción del IMP y AMP se obtuvieron las correspondientes concentraciones molares de AMP. Teniendo en cuenta que las muestras para medir la absorbancia se diluyeron 68 veces, se han calculado las concentraciones molares de AMP en el medio de reacción, las cuales se han representado frente al tiempo en la figura 21. La pendiente de la tangente a la curva a tiempo cero proporciona la velocidad inicial. Así, de la figura 21 se puede estimar una velocidad inicial,  $v_i$ , de  $1,7 \mu\text{Ms}^{-1}$ . Tomando una velocidad máxima,  $V_m$ , de  $3.000 \text{ s}^{-1}$  para la AMP-aminohidrolasa (121) la velocidad inicial estimada correspondería a una concentración de impureza de  $0,55 \text{ nM}$  ( $v_i = V_m [\text{impureza}]$ ). Usando un peso molecular de  $280.000 \text{ g/mol}$  para la AMP-aminohidrolasa (121), esa concentración corresponde a  $0,15 \mu\text{g/ml}$  los cuales, comparados con la concentración de fosforilasa b en esta experiencia en particular ( $6,65 \text{ mg/ml}$ ) corresponden a 23 ppm, que será la proporción de impureza en esta preparación de fosforilasa b. Esta cantidad de impureza

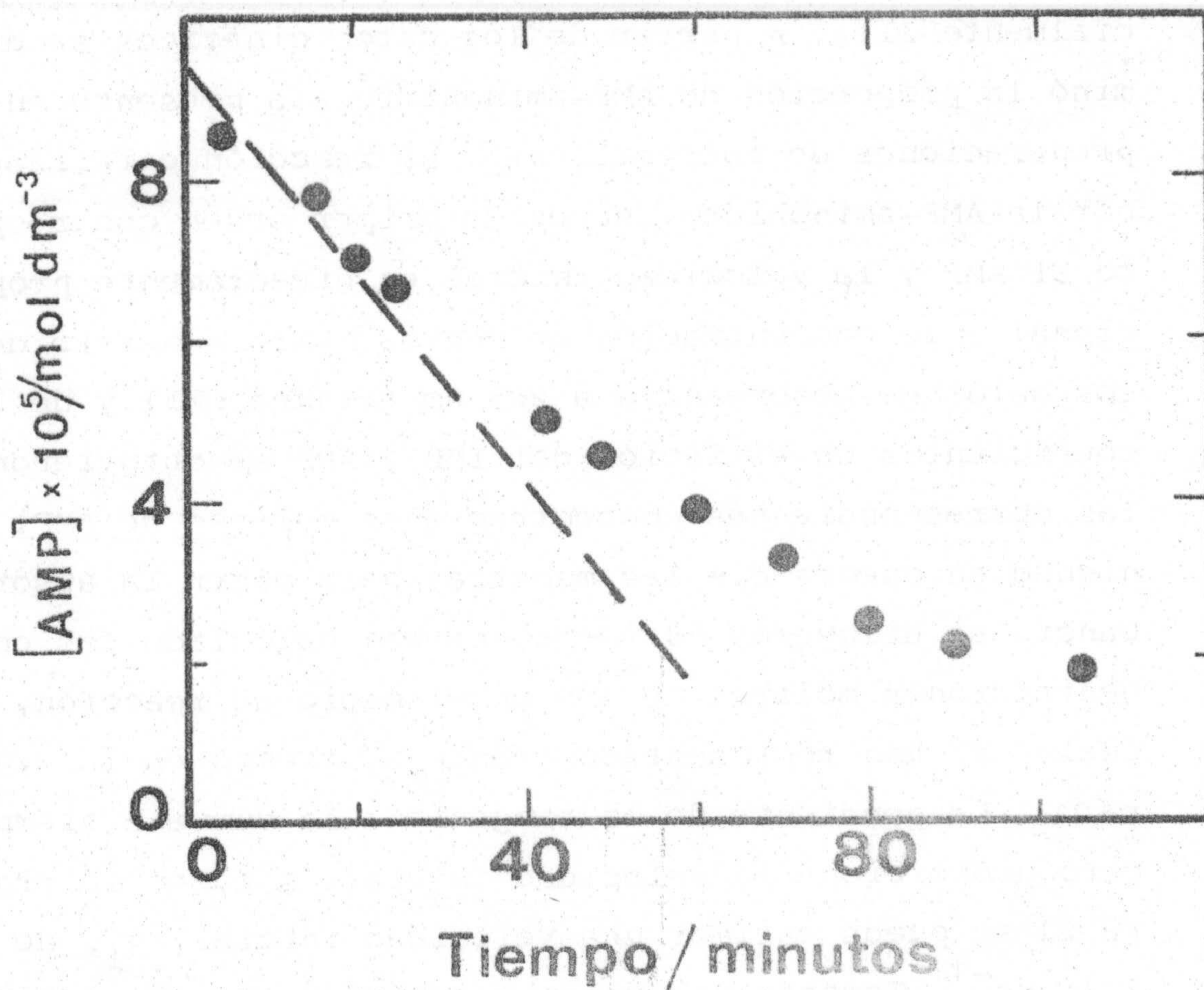


Figura 21. Cinética de transformación de AMP en IMP por AMP-aminohidrolasa. Se ha representado la  $[AMP]$  en función del tiempo en una reacción de hidrólisis de AMP catalizada por AMP-aminohidrolasa. Los puntos representados se obtuvieron de la figura 19B, convirtiéndose los valores de absorbancia en  $[AMP]$  de la manera descrita en el texto.

es suficientemente pequeña para no poder ser detectada su presencia mediante electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida, ya que esta técnica sólo permite detectar impurezas del orden del 1% y en nuestro caso el nivel de impureza es del  $2,3 \cdot 10^{-3}\%$ .

#### 1.2. Eliminación de trazas de AMP-aminohidrolasa de las preparaciones de fosforilasa b

Una vez confirmada la presencia de trazas de AMP-aminohidrolasa en las preparaciones de fosforilasa b se procedió a su eliminación. Esta enzima presenta propiedades quimicofísicas muy similares a las de fosforilasa b, el mismo punto isoeléctrico (8,119), precipitación con sulfato amónico por efecto "salting out" en el mismo rango de saturación (40-50%) (91,101), estabilidad en un rango de pH análogo etc. Todas estas semejanzas dificultan su eliminación y son la causa aparente de que su separación de la fosforilasa b en el proceso de obtención de esta última sea incompleta.

Se observó que de las distintas etapas del proceso de obtención de fosforilasa la forma de realizar la etapa de precipitación ácida afectaba sensiblemente los niveles de impureza de la preparación de enzima. Se obtuvieron proporciones menores de impureza cuando se ajustó el pH en dicha etapa a valores de 5,2-5,1. No es posible un ajuste del pH de la disolución a un valor inferior porque la fosforilasa b sería inestable. El ajuste a pH 5,1 debe realizarse con extremada precaución, muy



lentamente y manteniendo la disolución el mínimo tiempo posible a este pH. A pesar de estas precauciones puede producirse desnaturalización parcial de la enzima, por lo que normalmente se ajustó el pH a 5,2. La figura 22 ilustra la curva progresiva de reacción de hidrólisis del AMP seguida por medidas de absorbancia a 265 nm para el caso de fosforilasa b procedente de una preparación de enzima en la que se separaron dos fracciones en el proceso de obtención, a una fracción se le ajustó el pH a 5,4 (A) y a la otra a 5,2 (B). Todas las demás etapas del proceso de obtención se realizaron exactamente igual. Sin embargo, aunque ajustando el pH a 5,2 el nivel de impureza en fosforilasa es mucho menor que realizando el ajuste a 5,4 como se ve en la figura 22, no se consiguen así eliminar por completo las trazas de AMP-aminohidrolasa.

La cristalización es otra etapa del proceso de obtención de fosforilasa que se observó que condiciona los niveles de impureza de la preparación. Siempre la obtención de una proteína de elevada pureza es favorecida por la posibilidad de cristalizarla. Habitualmente la fosforilasa b se cristaliza cuatro veces. Como se ve en la figura 23, sucesivas cristalizaciones de la enzima proporcionan una disminución de la cantidad de impureza en la preparación. Sin embargo, como puede observarse en la misma figura, alguna cantidad de AMP-aminohidrolasa persiste incluso después de 5 cristalizaciones.

Johnson et al. (42) en su sugerencia sobre la

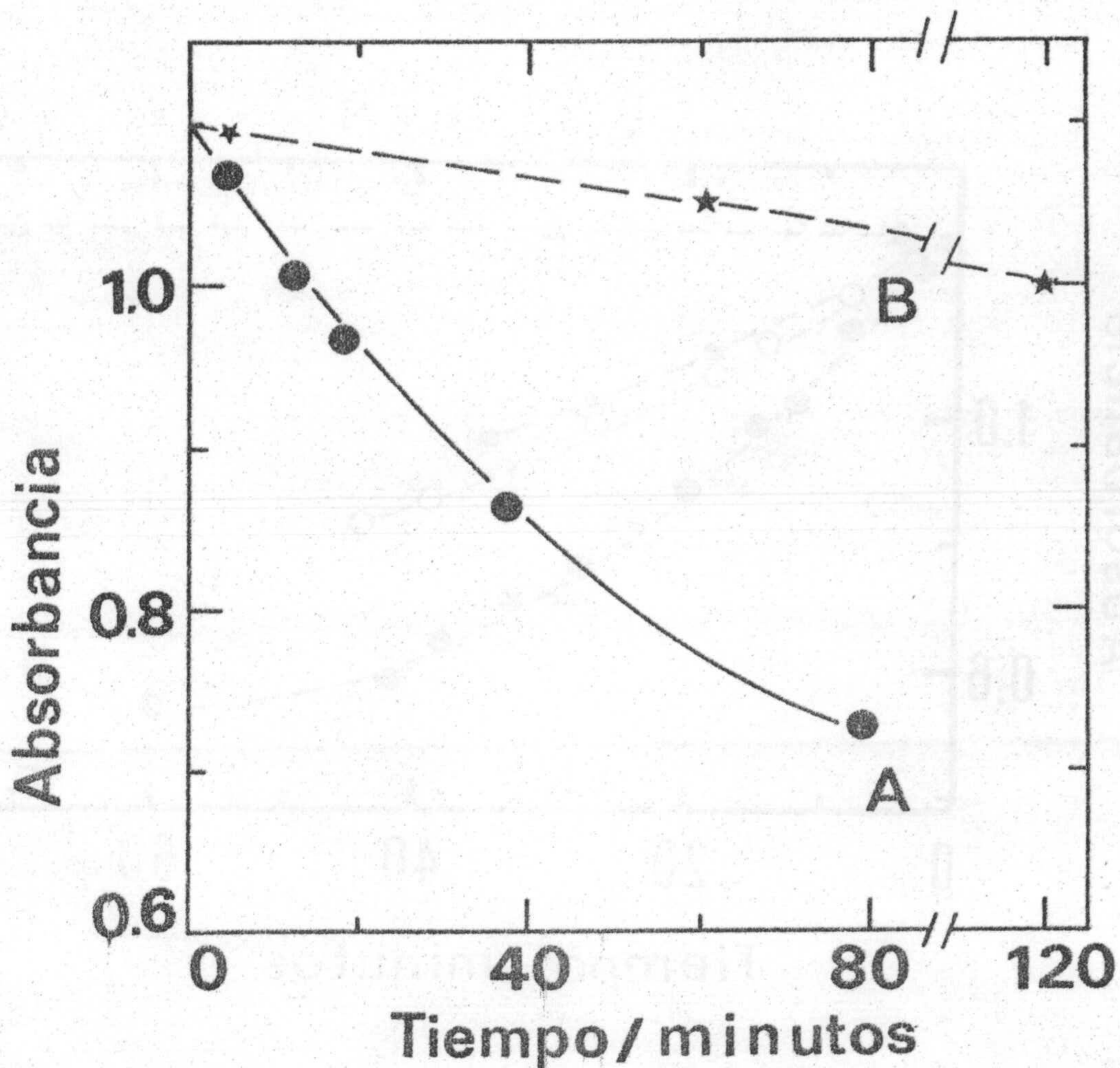


Figura 22. Cinética de hidrólisis del AMP por AMP-amino hidrolasa.

La reacción se inició añadiendo 0,25 ml de una disolución de fosforilasa b, 3,8 mg/ml, en Tris 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM, pH 6,9, a 0,25 ml de una disolución de AMP 10,5 mM en el mismo tampón y pH. La temperatura fué de 25°C. A distintos tiempos se tomaron alícuotas y se diluyeron 81 veces registrándose la absorbancia a 265 nm. Las curvas A y B corresponden a enzimas obtenidas de distintas fracciones de una misma preparación. Estas fracciones se separaron inmediatamente antes de realizar la etapa de precipitación ácida (ver Materiales), a una fracción se le ajustó el pH a 5,2 (B) y a la otra se le ajustó a 5,4 (A). Las demás etapas de la obtención se realizaron de igual forma en ambas fracciones (ver Texto).

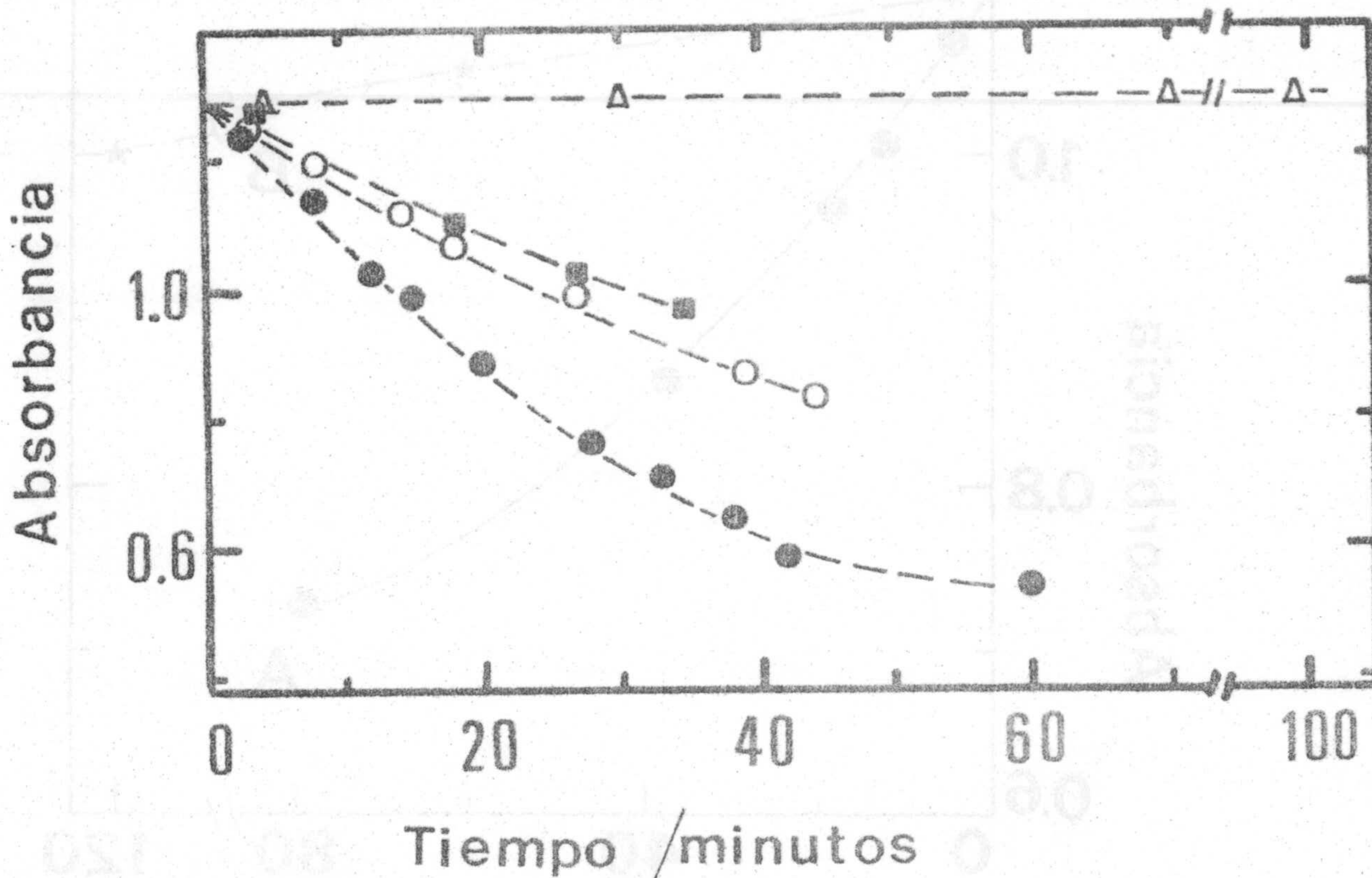


Figura 23. Curvas progresivas de la reacción de transformación del AMP a 25°C. Efecto de la alúmina  $C\gamma$ . Una disolución tamponada de AMP (6mM) se añade a una disolución de fosforilasa  $b$  (6 mg/ml) preparada como se describe en la leyenda de la figura 19. Se sacan alícuotas de la mezcla a diferentes tiempos, se diluyen 68 veces y se mide la absorbancia a 265 nm frente a una referencia que contiene el mismo tampón y a una concentración de enzima que es la misma de la célula de muestra ( $\bullet$ ). También se obtuvieron curvas progresivas para experimentos equivalentes usando fosforilasa  $b$  después de una ( $\blacksquare$ ) y dos ( $\circ$ ) recristalizaciones adicionales y también después de tratar la enzima con alúmina  $C\gamma$  ( $\Delta$ ) como se ha descrito en Métodos (IV, 2).

posible presencia de AMP-aminohidrolasa en sus preparaciones de fosforilasa b apuntan la posibilidad de que sea debido a una vigorosa extracción a partir del músculo. Con objeto de analizar si ésta era la causa de la presencia de trazas de esta enzima en nuestras preparaciones se obtuvo enzima utilizando el proceso de extracción seguido por Fischer et al. (91), menos enérgico que el seguido habitualmente por nosotros y descrito en Materiales. Se obtuvieron unos niveles de impureza del mismo orden a los obtenidos por nuestro método habitual, comprobándose así que no era ésta la causa.

Al comprobarse que no se conseguía eliminar totalmente esta impureza con las ligeras modificaciones en el proceso de obtención de fosforilasa descritas anteriormente (ajuste del pH a 5,2 y aumento del número de cristalizaciones) se pensó en encontrar un método para aislar la AMP-aminohidrolasa. Dicho método debería dejar inalterada la fosforilasa b. Así, analizando el proceso de obtención de AMP-aminohidrolasa descrito por Nikiforuk y Colowick (101) se encontró que en una de las etapas se utiliza un adsorbente de gran selectividad, la alúmina  $C\gamma$ . Se aplicó este adsorbente a nuestras preparaciones de fosforilasa b impurificadas con trazas de AMP-aminohidrolasa y se comprobó la eficacia de la alúmina  $C\gamma$  en la adsorción selectiva de dicha enzima. Así, se ideó un proceso para la eliminación de AMP-aminohidrolasa de las preparaciones de fosforilasa b totalmente original, que se describe detalladamente en Métodos.

Como se ve en la figura 23 la incubación de disoluciones de fosforilasa b con pequeñas cantidades de este adsorbente (0,05-0,1 mg por mg de fosforilasa en disolución) durante un tiempo de unos 15 minutos eliminó totalmente la actividad de AMP-aminohidrolasa que presentaba la preparación de fosforilasa b.

Con fosforilasa b purificada con alúmina  $C\gamma$  se hicieron curvas de valoración calorimétrica de unión al nucleótido, AMP, obteniéndose curvas monofásicas y plenamente reproducibles para distintas preparaciones de enzima. Se comprobó que ahora el calor de reacción era totalmente independiente de la velocidad de flujo a la que se introducían los reactivos en el calorímetro (figura 15), en contraste con la dependencia con la velocidad de flujo que presentaban las curvas hechas con enzima no purificada.

Al mezclar la enzima purificada con el adsorbente con disoluciones de AMP se comprobó que no se producía cambio en el pH de la mezcla.

El proceso de purificación con alúmina  $C\gamma$  tal como se describe en Métodos permite la recuperación de la fosforilasa b con un rendimiento en todos los casos mayor del 80%. La enzima conserva la misma actividad catalítica que poseía antes de añadirle la alúmina  $C\gamma$ .

Una vez comprobada la eficiencia de la alúmina  $C\gamma$  para eliminar la presencia de esta impureza de las preparaciones de fosforilasa b y teniendo en cuenta que dicha impureza se detectaba en más de un 50% de

las preparaciones de enzima se incorporó la purificación con este adsorbente como una etapa adicional en el proceso de obtención de fosforilasa b (ver Métodos). De esta forma se consiguieron obtener siempre las preparaciones de fosforilasa b libres de la actividad de AMP-aminohidrolasa. Esta fosforilasa así purificada mantiene su actividad durante períodos de tiempo análogos a los de preparaciones de la misma no tratadas con alúmina C $\gamma$ .

Una última experiencia se realizó para comprobar la eficiencia de este adsorbente en la eliminación de la impureza. Una disolución que contenía fosforilasa b tratada con alúmina C $\gamma$ , a 12,5 mg/ml, y AMP 17 mM en Tris 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM a pH 6,9, se mantuvo en condiciones estériles durante un mes, a 25°C. Pasado este tiempo se hizo un espectro de la disolución comprobándose que el AMP no había sufrido ninguna alteración. Una muestra idéntica se mantuvo 2 meses a 4°C, al cabo de este tiempo se observó que el espectro del AMP no había sufrido ningún cambio.

## 2. ESTUDIO DEL EQUILIBRIO PROTEINA-LIGANDO

En este apartado se describen los resultados de la unión del activador AMP a la fosforilasa a y b y del IMP a la fosforilasa b mediante diálisis en el equilibrio. Este estudio se realizó con el fin de obtener el número de sitios y las constantes de unión de los ligandos a las enzimas estudiadas y junto con los resultados calorimétricos descritos en el apartado (V.3) poder obtener los parámetros termodinámicos que caracterizan la unión de estos activadores a la enzima. Previo a la exposición de los resultados experimentales se plantea un estudio teórico basado en la ecuación general de Adair y en el modelo de Monod aplicados a la unión de un ligando a una proteína en los diferentes casos abordados en la presente Memoria.

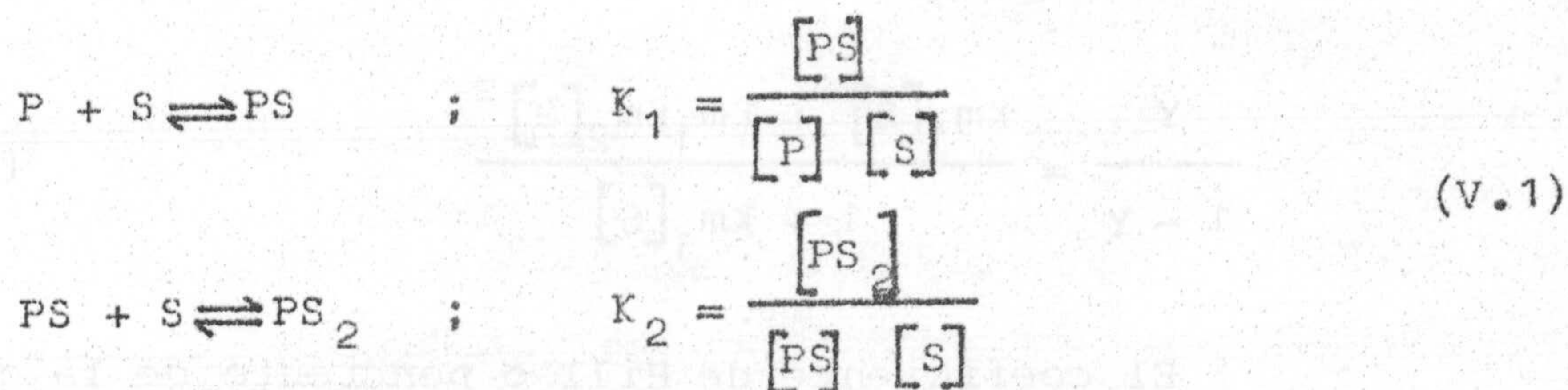
## 2.1. Modelos

Los datos obtenidos en los experimentos de diálisis en el equilibrio se han analizado en base a la ecuación general dada por Adair (22) y al modelo de Monod, Wyman y Changeux (56). Se describe a continuación el análisis teórico en base a estos modelos de los distintos casos de interacción proteína-ligando que se han planteado en el estudio de los diversos sistemas abordados en esta Memoria.

### Análisis basado en la ecuación general de Adair (22)

A) Estudio de la unión proteína-ligando para un dímero que presenta un sitio de unión por subunidad para el ligando, existiendo cooperatividad positiva entre los sitios.

Consideremos un dímero, P, interaccionando con un ligando, S, de acuerdo con los siguientes equilibrios:



donde  $K_1$  y  $K_2$  corresponden a las constantes de unión macroscópicas, que están relacionadas con las constantes de unión microscópicas ( $Km_1$  y  $Km_2$ ) mediante la relación de tipo estadístico dada en la ecuación (IV.11), de manera que:



$$K_1 = 2Km_1 \quad ; \quad K_2 = \frac{1}{2} Km_2 \quad (V.2)$$

En este caso la fracción de saturación según la ecuación (IV.3) viene dada por la expresión:

$$Y = \frac{K_1[S] + 2K_1K_2[S]^2}{2(1 + K_1[S] + K_1K_2[S]^2)} \quad (V.3)$$

que en función de las constantes microscópicas (ecuación V.2) adopta la forma:

$$Y = \frac{Km_1[S] + Km_1Km_2[S]^2}{1 + 2Km_1[S] + Km_1Km_2[S]^2} \quad (V.4)$$

de donde se deduce que:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{Km_1[S] + Km_1Km_2[S]^2}{1 + Km_1[S]} \quad (V.5)$$

El coeficiente de Hill o pendiente de la gráfica de Hill (definida en Métodos) viene dado por la expresión:

$$n_H = \frac{d \log \left( \frac{Y}{1-Y} \right)}{d \log [S]} \quad (V.6)$$

o bien

$$n_H = \frac{[S]}{Y} \left( \frac{1}{1-Y} \right) \frac{dY}{d[S]} \quad (V.7)$$

Como puede deducirse de las ecuaciones (V.6) y (V.7) el coeficiente de Hill no es una constante, sino que es función de la concentración de ligando libre. El coeficiente de Hill suele medirse al 50% de saturación de la proteína donde  $Y = 1/2$  (107). De esta forma el  $n_H$  al 50% de saturación vendrá dado por la ecuación siguiente (76):

$$n_H = 4 [S] \frac{dY}{d[S]} \quad (V.8)$$

La concentración de ligando libre al 50% de saturación,  $S_{0,5}$ , se obtiene de la ecuación (V.4) dando a Y el valor de 1/2, con lo que se obtiene

$$S_{0,5} = \frac{1}{\sqrt{K_{m_1} \cdot K_{m_2}}} \quad (V.9)$$

A partir de las ecuaciones (V.4), (V.8) y (V.9) se obtiene la expresión del coeficiente de Hill al 50% de saturación en función únicamente de las constantes de unión microscópicas  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$

$$n_H = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{K_{m1}}{K_{m2}}}} \quad (V.10)$$

Los valores de  $S_{0,5}$  y  $n_H$  se pueden obtener directamente de la gráfica de Hill. A partir de estos valores haciendo uso de las ecuaciones (V.9) y (V.10) se pueden calcular las constantes de unión microscópicas y por lo tanto las constantes de unión macroscópicas. Así, una representación de Hill de los datos experimentales de diálisis en el equilibrio permite calcular las constantes de unión cooperativa de un ligando a una proteína dimérica con un sitio por monómero.

B) Estudio de la unión proteína-ligando en un dímero que presenta por subunidad dos sitios de unión con distinta afinidad para el ligando.

En este caso la fracción de saturación será promedio de las fracciones de saturación correspondientes a cada uno de los sitios distintos (102). Cuando los sitios de mayor afinidad sean cooperativos, la fracción de saturación respecto de ellos vendrá dada por la ecuación (V.4). Si los sitios de menor afinidad no son cooperativos la fracción de saturación vendrá dada por la ecuación (IV.7). Por lo tanto, la fracción de saturación de este sistema particular será:

$$Y = \frac{1}{2} \frac{K_{m_1} [S] + K_{m_1} K_{m_2} [S]^2}{1 + 2K_{m_1} [S] + K_{m_1} K_{m_2} [S]^2} + \frac{1}{2} \frac{K_{m_3} [S]}{1 + K_{m_3} [S]} \quad (V.11)$$

donde el factor 1/2 hace referencia a la existencia en la proteína de dos conjuntos de igual número de sitios.

Según esta ecuación (V.11) si  $K_{m_3}$  es suficientemente inferior a  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$ , puede considerarse en principio que el valor de la fracción de saturación 1/2 corresponde a la saturación de los sitios de mayor afinidad, primer sumando del segundo miembro de la ecuación (V.11). Una representación gráfica de Hill de los datos experimentales que corresponden a una fracción de saturación inferior a 1/2 permitirá calcular las constantes de unión al sitio de mayor afinidad de manera análoga al estudio del caso anterior.

La constante al sitio de menor afinidad  $K_{m_3}$  puede ser entonces calculada a partir de la ecuación (V.11) por un proceso de optimización. En este proceso se utilizarán los valores de  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$  obtenidos previamente y se calcularía el valor de  $K_{m_3}$  que proporcione un mínimo de la suma de los cuadrados de las desviaciones entre los datos experimentales y la curva teórica definida por la ecuación (V.11).

La constante de unión al conjunto de sitios de menor afinidad por el ligando puede también obtenerse por un camino paralelo. Con los valores de  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$

inicialmente obtenidos puede calcularse la curva teórica que represente la unión del ligando al conjunto de sitios de mayor afinidad, dicha curva viene definida por el primer sumando del segundo miembro de la ecuación (V.11). Los valores experimentales correspondientes a una fracción de saturación muy baja se ajustan, dentro del error experimental, a la curva teórica calculada, pues a esas concentraciones de ligando la población de moléculas en los sitios de menor afinidad es prácticamente despreciable. Sin embargo, en el entorno de  $Y=1/2$  y para valores superiores, al estar llenándose el segundo conjunto de sitios, los datos experimentales de la fracción de saturación presentan valores superiores a sus correspondientes obtenidos para la curva teórica. Las diferencias entre estos datos experimentales y los teóricos proporcionarán los valores de la fracción de saturación correspondientes a la ocupación de los segundos sitios. Así, se dispondrá de las fracciones de saturación de los sitios de menor afinidad para distintas concentraciones de ligando. Una representación de Scatchard de estos datos proporciona el valor de la constante  $Km_3$ .

Este proceso descrito últimamente proporciona además información acerca de la posible existencia de cooperatividad entre los sitios de menor afinidad, ya que si los sitios fuesen cooperativos en la representación de Scatchard no se obtendría una recta. En una situación de cooperatividad positiva, una representación

de Hill de los datos obtenidos (fracción de saturación de los segundos sitios en función de las concentraciones de ligando) proporcionaría el valor de las constantes a los sitios cooperativos de menor afinidad mediante un análisis análogo al del caso A.

Los valores de las constantes obtenidos mediante estos análisis de datos serán los valores óptimos o muy próximos que ajusten los datos experimentales a la curva teórica definida por la ecuación (V. 11). Para obtener con mayor precisión los valores óptimos, así como para calcular sus errores se puede aplicar entre otros el método de Gauss-Newton (Ver Apéndice 2) tomando los valores obtenidos de  $K_{m1}$ ,  $K_{m2}$  y  $K_{m3}$  como valores de partida en el proceso iterativo, que utiliza dicho método.

Convendría insistir que el análisis de datos realizados para este modelo es solo aplicable cuando la afinidad del ligando por el primero y segundo conjuntos de sitios en la proteína sea suficientemente distinta.

c) Estudio de una proteína tetramérica con un sitio de unión por monómero mostrando cooperatividad positiva.

En este caso la fracción de saturación según la ecuación (IV. 3) vendrá dada por la expresión:

$$Y = \frac{K_1[S] + 2K_1K_2[S]^2 + 3K_1K_2K_3[S]^3 + 4K_1K_2K_3K_4[S]^4}{4(1 + K_1[S] + K_1K_2[S]^2 + K_1K_2K_3[S]^3 + K_1K_2K_3K_4[S]^4)}$$

(V.12)

Sustituyendo en esta ecuación las constantes macroscópicas ( $K_1 \dots K_4$ ) en función de sus correspondientes

constantes microscópicas ( $K_{m_1} \dots K_{m_4}$ ) según la ecuación (IV.11) la fracción de saturación queda de la forma:

$$Y = \frac{K_{m_1} [S] + 3K_{m_1}K_{m_2}[S]^2 + 3K_{m_1}K_{m_2}K_{m_3}[S]^3 + K_{m_1}K_{m_2}K_{m_3}K_{m_4}[S]^4}{1 + 4K_{m_1}[S] + 6K_{m_1}K_{m_2}[S]^2 + 4K_{m_1}K_{m_2}K_{m_3}[S]^3 + K_{m_1}K_{m_2}K_{m_3}K_{m_4}[S]^4} \quad (V.13)$$

Cuando la cooperatividad entre los sitios de unión es positiva una representación de los datos de unión en forma de gráfica de Hill permitirá obtener el valor de las cuatro constantes de unión del ligando a la proteína (122). Este método requiere poseer datos de la unión en un rango suficientemente amplio de concentraciones de ligando.

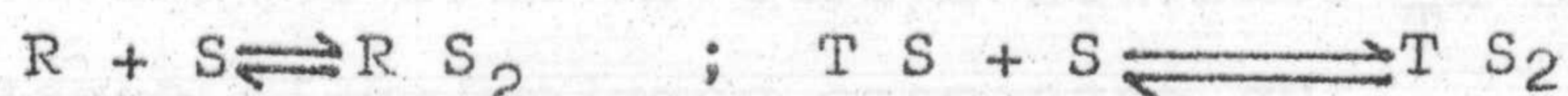
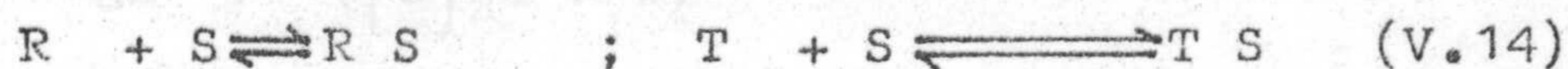
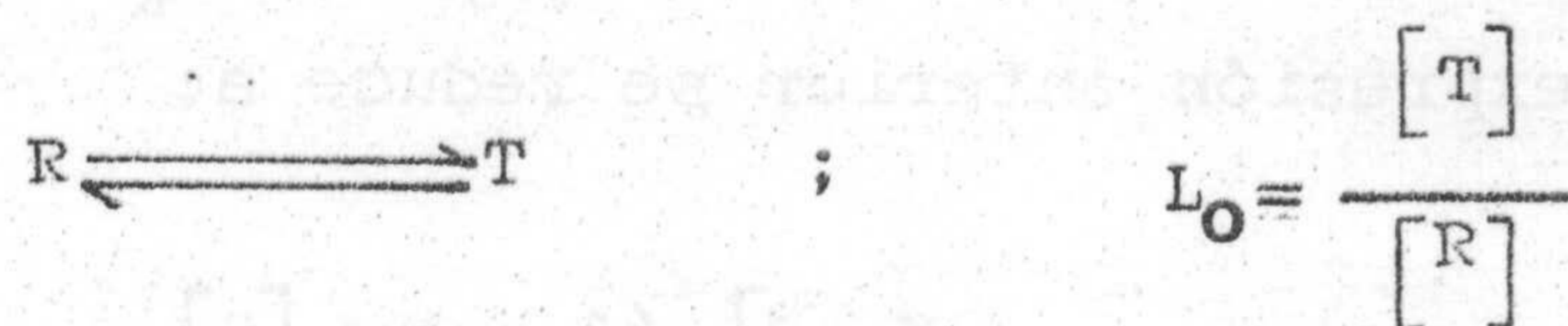
Los valores de las constantes de unión del ligando al primero y cuarto sitio de la proteína,  $K_1$  y  $K_4$ , se pueden obtener directamente de la representación de Hill a partir de la intersección con el eje de abscisas de las asíntotas a los extremos de la curva, las cuales deben tener pendiente unidad (122). De la representación de Hill también es posible obtener los valores del coeficiente de Hill,  $n_H$ , y de la concentración de ligando al 50% de saturación,  $S_{0,5}$ , con los que pueden calcularse las constantes de unión macroscópicas del ligando al segundo y tercer sitio de la proteína,  $K_2$  y  $K_3$ , (122).

Análisis basado en el modelo de Monod, Wyman y Changeux (56)

Según este modelo, una proteína, formada por

varias subunidades y que posea un sitio de unión idéntico para el ligando en cada subunidad, puede existir en dos estados conformacionales distintos, denominados T y R. Sólo son estables las formas de la proteína simétricas, así todas las subunidades deben estar en la misma forma (T o R). El ligando tiene mayor afinidad por la proteína en el estado R.

De acuerdo con este modelo en el estudio de unión de un ligando a una proteína dimerica con cooperatividad entre los sitios se plantean los siguientes equilibrios:



El equilibrio entre formas R y T está gobernado por la constante  $L_0$  denominada constante alostérica. Existen unas constantes de unión macroscópica que definen cada uno de los equilibrios anteriores y que están relacionada estadísticamente con las constantes de unión microscópica  $K_R$  o  $K_T$ . Estas constantes corresponden a la formación del complejo proteína-ligando en el estado R y T respectivamente y son las mismas para todos los



sitios de unión.

La fracción de saturación,  $Y$ , para este sistema en función de  $K_R$ ,  $K_T$ ,  $L_0$  y  $[S]$  vendría dada por (22).

$$Y = \frac{K_R[S] (1 + K_R[S]) + L_0 K_T[S] (1 + [S] K_T)}{(1 + [S] K_R)^2 + L_0 (1 + [S] K_T)^2} \quad (V.15)$$

Si se supone ahora que el ligando se une solamente a la forma de alta afinidad, R (suposición que ha sido posible aplicar en algunos casos(57,58) y que será tanto más aceptable cuanto mayor sea  $K_R$  en comparación con  $K_T$ , la expresión anterior se reduce a:

$$Y = \frac{K_R[S] (1 + K_R[S])}{(1 + K_R[S])^2 + L_0} \quad (V.16)$$

pues  $K_T$  tendería a cero en este supuesto.

En este caso particular la constante alostérica,  $L_0$ , está relacionada con el coeficiente de Hill mediante una ecuación simple (107).

$$n_H = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{1}{1+L_0}}} \quad (V.17)$$

Comparando este modelo con el de Adair se obtiene una relación entre las constantes obtenidas por ambos modelos (107).

$$K_{m_1} = \frac{K_R}{1 + L_O} \quad ; \quad K_{m_2} = K_R \quad (V.18)$$

donde  $K_{m_2}$  es la constante microscópica de unión de la segunda molécula de ligando según la ecuación de Adair.

En el caso general de unión del ligando a las formas R y T las ecuaciones (V.17) y (V.18) adoptan las formas:

$$K_{m_1} = \frac{K_T L_O + K_R}{1 + L_O} \quad ; \quad K_{m_2} = \frac{K_T^2 L_O + K_R^2}{K_T L_O + K_R}$$

$$n_H = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{(K_T L_O + K_R)^2}{(1 + L_O)(K_T^2 L_O + K_R^2)}}} \quad (V.19)$$

En cualquier caso se observa que  $1 < n_H \leq 2$  con lo que este modelo no explica la posibilidad de cooperatividad negativa ya que  $n_H$  no puede presentar valores menores de 1.

## 2.2. Interacción fosforilasa $\beta$ -AMP.

La unión de AMP a fosforilasa  $\beta$  se estudió a 25°C y pH 6,9 mediante diálisis en el equilibrio. En la figura 24 se ha representado el número de moles de de AMP unido por mol de dímero de enzima,  $\nu$ , frente a la concentración de nucleótido libre. Estos datos se muestran en la figura 25 en forma de una representación de Scatchard. La gráfica, no lineal presentando un máximo como se observa en esta última figura, es la esperada para un sistema que exhibe cooperatividad positiva.

La fosforilasa  $\beta$  a 25°C y en ausencia de activadores, sustratos o  $Mg^{2+}$  se encuentra en forma de dímero, no existiendo agregación a la forma de tetrámero a ninguna concentración de enzima (58,75,79,80,123,124). En presencia del activador alostérico AMP aparecen ciertas discrepancias en la Bibliografía, algunos autores indican que a 25°C no existe agregación alguna, aunque a temperatura <13°C aparezca un cierto porcentaje de tetrámero (58,75,79,80,123,124). Sin embargo, se ha indicado también la existencia de una cierta tetramerización incluso a esta temperatura aunque reflejando siempre un bajo tanto por ciento de tetrámeros (125). En el análisis de los datos de unión de AMP a fosforilasa  $\beta$  se consideró toda la enzima en forma de dímero (véase Discusión).

Una extrapolación de la curva de Scatchard (fig.25) para obtener la intersección con el eje de abscisas (la cual proporciona el número total de sitios

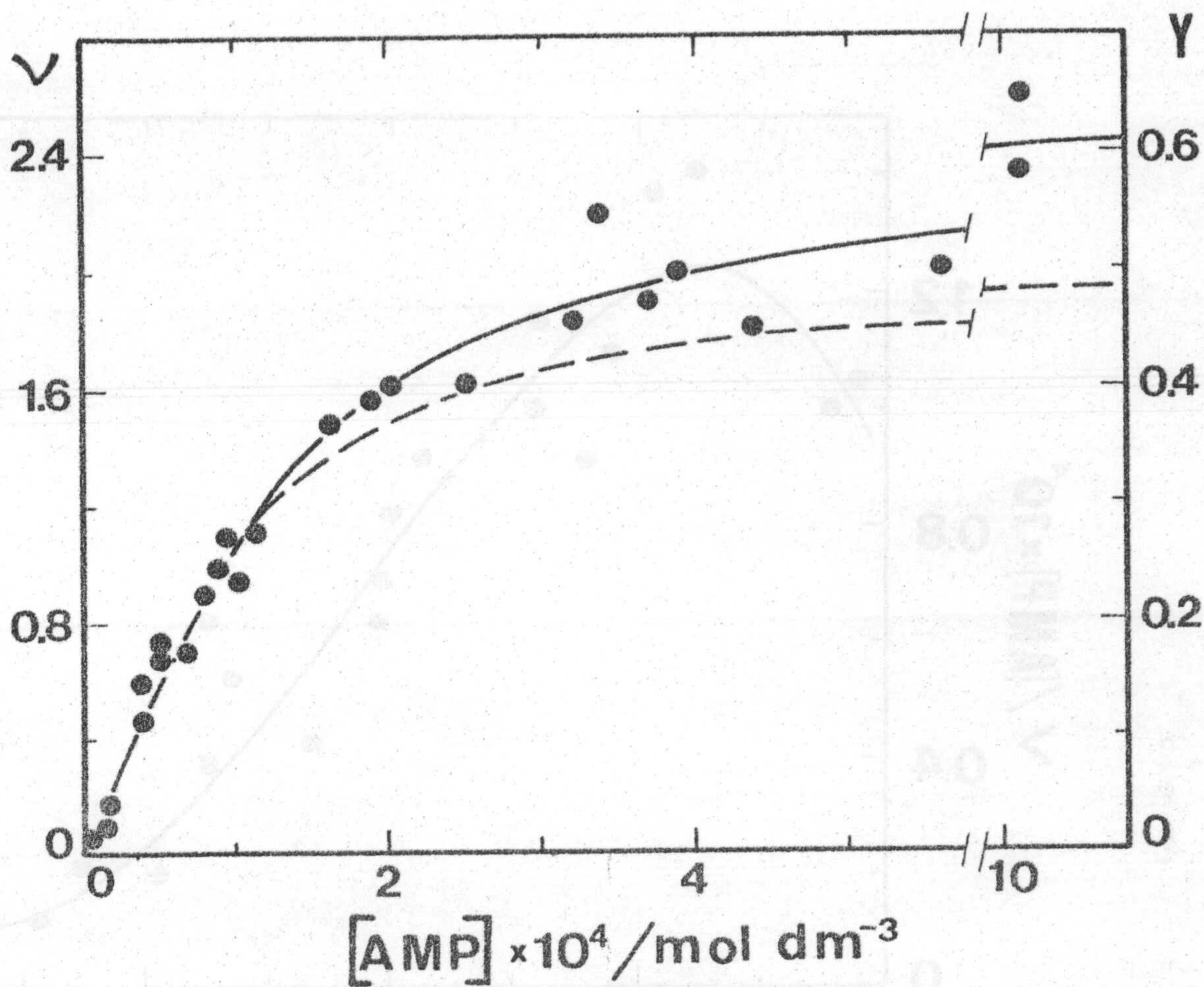


Figura 24. Unión de AMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C medida por diálisis en el equilibrio. Se ha representado la fracción de saturación Y ó el número de moles de AMP unidos por mol dímero de fosforilasa b, ν, frente a la concentración de AMP libre. La concentración de enzima fué 12 mg/ml y el tampón utilizado Tris 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM. La curva continua dibujada es la correspondiente a la ecuación (V.20) para los valores de las constantes de unión incluidas en la Tabla I. La curva discontinua es la teórica debida a la unión en los sitios de mayor afinidad (ver Texto, pag. 137).

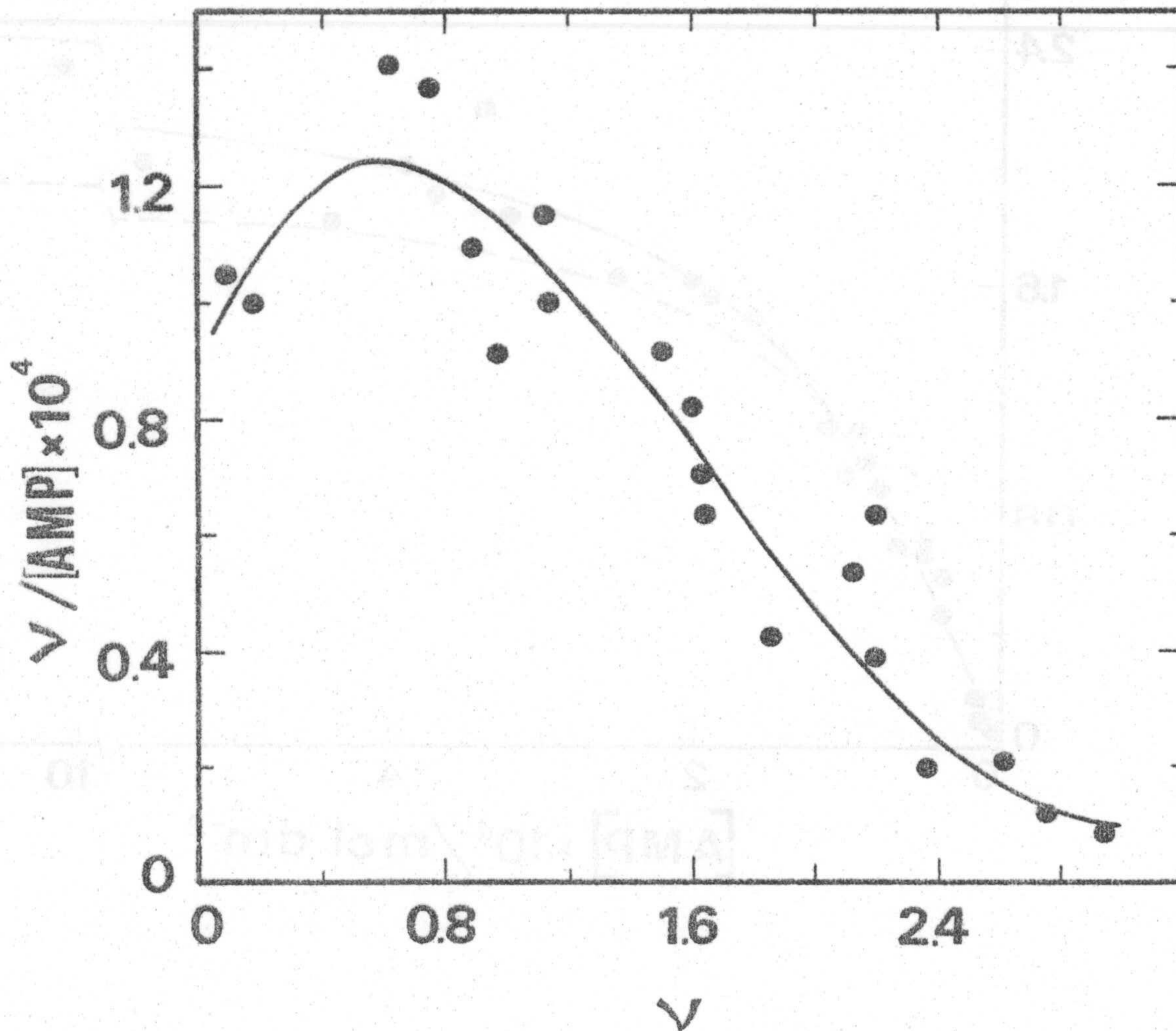


Figura 25. Gráfica de Scatchard de la unión de AMP a fosforilasa b. Los datos de la figura 24 se muestran en forma de una representación de Scatchard de  $v/[AMP]$  libre frente a  $v$ , donde  $v$  es el número de moles de AMP unido por mol dímero de enzima. La curva incluida corresponde a la ecuación (V.20) con los mismos valores de las constantes utilizadas en la figura 24.

de unión) conduce a un valor superior a dos. Este hecho indica que existen más de dos sitios de unión por dímero de enzima para la unión del AMP. Morange et al. (53) encontraron que a 4°C hay dos clases de sitios por subunidad para la unión del nucleótido, es decir, cuatro sitios por dímero. A resultados análogos llegaron Johnson et al. (42) mediante rayos X. Estas experiencias también se realizaron a 4°C y en este caso la concentración de AMP, 100mM, fué muy superior a la fisiológica (86). Wang et al. (74,75) y Merino et al. (81) también propusieron la existencia de dos sitios por monómero a 25°C basándose en resultados calorimétricos. La base experimental de estos autores será sin embargo comentada en la Discusión de esta Memoria.

La forma de la curva de Scatchard (fig. 25) sugiere que los sitios de menor afinidad empiezan a ocuparse cuando prácticamente están saturados los sitios de mayor afinidad. Por lo tanto, gran parte de los datos representados en las figuras 24 y 25 deben corresponder a la unión del AMP a los sitios de más afinidad y probablemente sea fundamentalmente debida a estos sitios la cooperatividad que se refleja en la representación de Scatchard. Según lo expuesto, en principio puede considerarse que el valor de  $\nu = 2$  en la gráfica 24 coincide prácticamente con la saturación de los sitios de mayor afinidad y los datos experimentales con  $\nu$  inferior a dos corresponderían así a la unión del AMP a estos sitios.

La figura 26 muestra en forma de una represen-

tación de Hill los datos experimentales con  $n$  inferior a 2. De esta gráfica se obtiene el valor de  $1,4 \pm 0,1$  para el coeficiente de Hill, que coincide con el obtenido por ésta y otras técnicas para ese sistema (68,71,77,78). Este valor para el coeficiente de Hill refleja la cooperatividad existente entre los sitios de mayor afinidad. Respecto de los otros sitios no es posible, en principio, afirmar la existencia o no de cooperatividad entre ellos, aunque posteriormente en este mismo capítulo se justificará el hecho de considerarlos no cooperativos.

La ocupación de los sitios de menor afinidad comienza a ser significativa a concentraciones de AMP del orden de 0,5 mM y la saturación se alcanza a concentraciones de AMP más de 100 veces superiores a las de enzima, lo cual dificulta la obtención de datos experimentales y aumenta el error de los mismos. Debido a estas causas no ha sido posible obtener datos de unión próximos a la saturación. Sin embargo, es posible precisar el orden de magnitud de la constante de unión del AMP a estos sitios de menor afinidad y también obtener información acerca de la cooperatividad de los mismos.

La unión de AMP a fosforilasa b se puede analizar en base al modelo B descrito en el apartado anterior, considerando independientes las dos clases de sitios. La fracción de saturación en función de la concentración de nucleótido vendrá dada por la ecuación (V. 11), que particularizada a nuestro sistema en estudio adopta la forma:

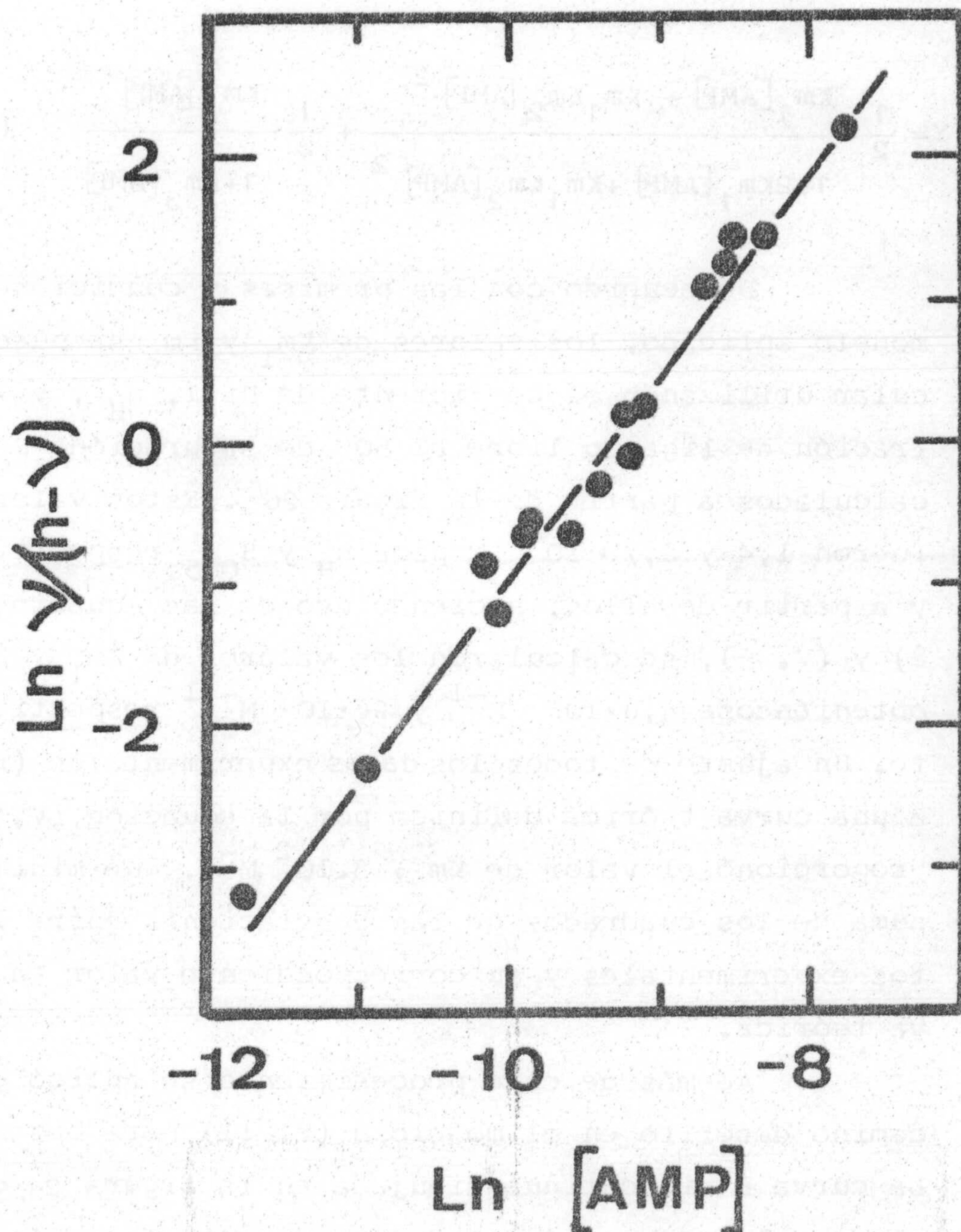


Figura 26. Representación de Hill de la unión de AMP a fosforilasa b. Los datos de la figura 24 con valores de  $v$  inferiores a 2 se muestran en forma de una representación de Hill.



$$Y = \frac{1}{2} \frac{K_{m_1} [AMP] + K_{m_1} K_{m_2} [AMP]^2}{1 + 2K_{m_1} [AMP] + K_{m_1} K_{m_2} [AMP]^2} + \frac{1}{2} \frac{K_{m_3} [AMP]}{1 + K_{m_3} [AMP]} \quad (V. 20)$$

De acuerdo con las premisas y condiciones del modelo aplicado, los valores de  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$  se pueden calcular utilizando el coeficiente de Hill,  $n_H$ , y la concentración de ligando libre al 50% de saturación,  $S_{0,5}$ , calculados a partir de la figura 26. Estos valores fueron 1,4 y  $8,7 \cdot 10^{-5}$  M para  $n_H$  y  $S_{0,5}$  respectivamente y a partir de ellos, haciendo uso de las ecuaciones (V. 8) y (V. 9), se calcularon los valores de  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$  obteniéndose  $4,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  y  $26 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  respectivamente. Un ajuste de todos los datos experimentales (fig. 24) a una curva teórica definida por la ecuación (V. 20) proporcionó el valor de  $K_{m_3}$ ,  $3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ , que minimiza la suma de los cuadrados de las desviaciones entre los datos experimentales y su correspondiente valor en la curva teórica.

Además de este procedimiento se aplicó el otro camino descrito en el modelo B (V. 11) para obtener  $K_{m_3}$ . La curva B discontinua dibujada en la figura 24 corresponde a la curva teórica que representa la unión del ligando al conjunto de sitios de mayor afinidad; dicha curva viene definida por el primer sumando del segundo miembro de la ecuación (V. 20) para los valores previamente obtenidos de  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$ . En el entorno de  $Y = 1/2$

y para valores superiores, los datos experimentales tienen valores de Y más elevados que sus correspondientes en la curva B. Estas diferencias son debidas a la ocupación de los segundos sitios y proporcionan valores de la fracción de saturación de los sitios de menor afinidad para distintas concentraciones de ligando. Una representación de Hill de estos datos, correspondiente a la unión a sitios de baja afinidad, se muestra en la figura 27, de la cual, mediante un ajuste por mínimos cuadrados, se obtiene prácticamente la unidad para el coeficiente de Hill ( $0,97 \pm 0,15$ ) y una constante correspondiente a  $Km_3$  que coincide dentro del error experimental con la obtenida por el otro procedimiento. Este coeficiente de Hill, indica que lo más correcto es considerar los sitios de menor afinidad como no cooperativos.

Tomando los valores de  $Km_1$ ,  $Km_2$  y  $Km_3$ ,  $4,8 \cdot 10^3 M^{-1}$ ,  $26 \cdot 10^3 M^{-1}$  y  $3 \cdot 10^2 M^{-1}$  respectivamente, como valores iniciales, se aplicó el método de Gauss-Newton (ver Apéndice 2) obteniéndose los valores óptimos de las constantes con sus correspondientes errores (Tabla I). Las curvas continuas de las figuras 24 y 25 son las curvas teóricas definidas por la ecuación (V. 20) para los valores de las constantes dadas en la Tabla I.

De acuerdo con los valores de  $Km_1$  y  $Km_2$  los sitios de mayor afinidad se encuentran saturados a una concentración de AMP del orden de 1 mM, mientras que los de menor afinidad para alcanzar el mismo grado de saturación necesitan una concentración de nucleótido del or-

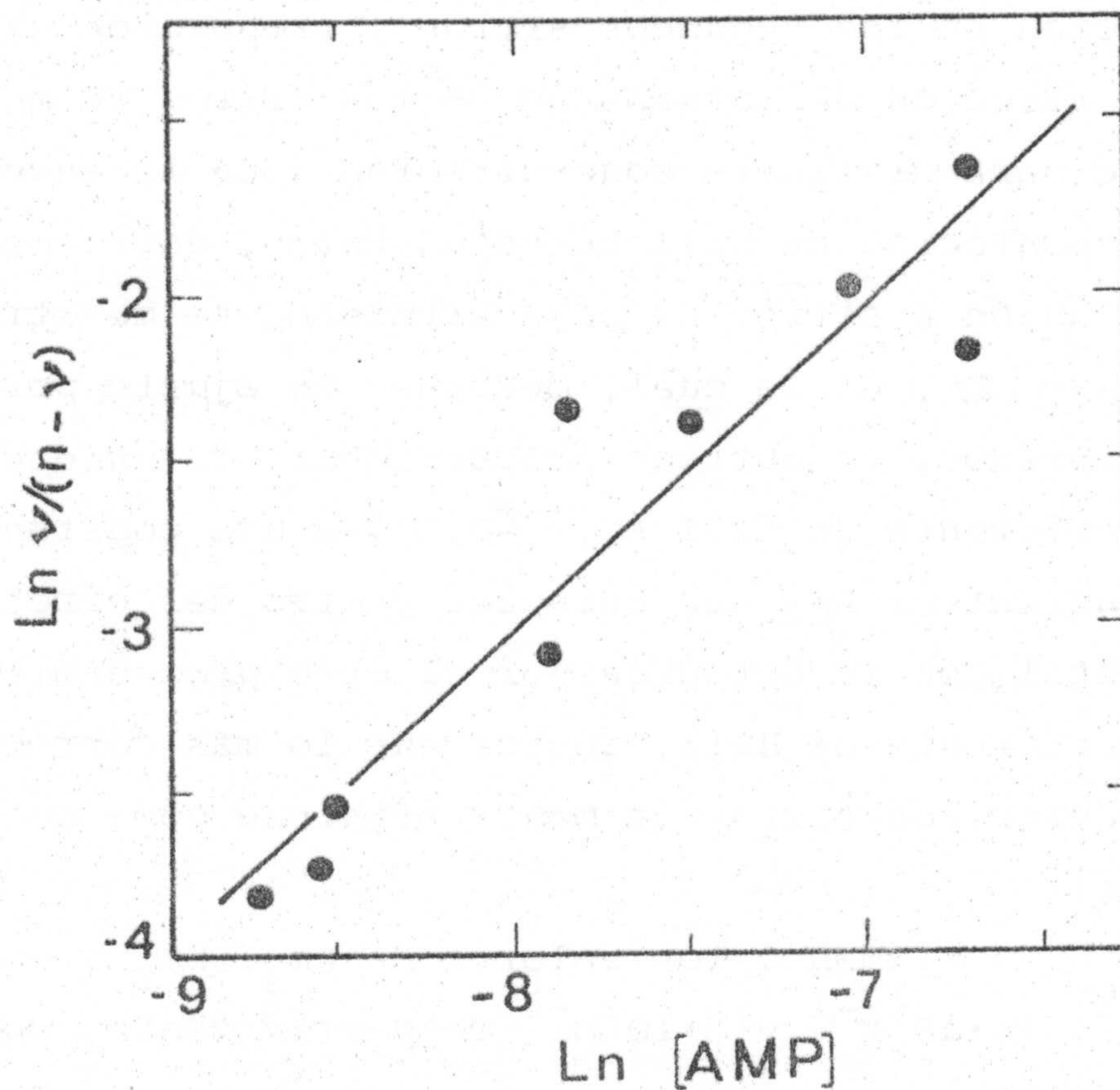


Figura 27. Gráfica de Hill correspondiente a la unión del AMP al sitio I. Para obtener los valores de Y correspondientes a la ocupación del sitio I se han restado a los datos experimentales los correspondientes valores de Y de ocupación del sitio N (ver Texto).

den de 100 mM.

Los resultados de amplios estudios realizados por Buc et al. (57,58) respecto de la unión de AMP a fosforilasa  $\beta$  han sido interpretados en términos del modelo concertado propuesto por Monod et al. (56). A continuación exponemos los resultados de aplicar este modelo a nuestros datos.

Como ya se han indicado, las dos clases de sitios de unión del AMP son independientes entre sí y sólo los sitios de mayor afinidad muestran cooperatividad. Por lo tanto, el modelo concertado sólo puede aplicarse a la unión del AMP a los sitios de mayor afinidad.

La fracción de saturación para este sistema vendrá dado, según el modelo concertado, por la ecuación:

$$Y = \frac{1}{2} \frac{K_R [AMP] (1 + K_R [AMP]) + L_O K_T [AMP] (1 + K_T [AMP])}{(1 + K_R [AMP])^2 + L_O (1 + K_T [AMP])^2} + \frac{1}{2} \frac{K_m_3 [AMP]}{1 + K_m_3 [AMP]}$$

(V. 21)

donde el primer sumando corresponde a la unión del AMP a los sitios de mayor afinidad, que viene definida por la ecuación (V. 15) y el segundo sumando corresponde a la unión del nucleótido a los sitios de menor afinidad, definida por la ecuación (IV. 7).

Las constantes  $K_R$ ,  $K_T$  y  $L_O$  están relacionadas con las constantes  $K_m_1$  y  $K_m_2$ , correspondientes al ajuste según la ecuación general de Adair, mediante las ecuaciones (V. 19). Es evidente que no es posible en este

caso el cálculo de las constantes del modelo concertado a partir de estas ecuaciones (V.19). A falta de información adicional podría considerarse, al igual que establecen otros autores (57,58), el caso límite en que la unión del AMP se produce exclusivamente al estado R de la enzima, con lo que la constante  $K_T$  tendería a cero y la ecuación (V.21) correspondiente a la fracción de saturación se simplificaría a:

$$Y = \frac{1}{2} \frac{K_R [AMP] (1 + K_R [AMP])}{(1 + K_R [AMP])^2 + L_0} + \frac{1}{2} \frac{K_m_3}{1 + K_m_3 [AMP]} \quad (V. 22)$$

Las constantes  $K_R$  y  $L_0$  se calcularon con este supuesto a partir de las constantes  $K_m_1$  y  $K_m_2$  (Tabla I) mediante la ecuación (V. 18), obteniéndose los valores de 5 y  $26,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  para  $L_0$  y  $K_R$  respectivamente. Véase, no obstante, la Discusión para una aplicación más detallada de este modelo a nuestros datos experimentales.

Tabla I

Constantes de unión del AMP a glucógeno-fosforilasa b de músculo de conejo, pH 6,9, temperatura 25°C.

	<u>Sitios de alta afinidad (N)</u>		<u>Sitios de baja afinidad (I)</u>	
	<u>1<sup>er</sup> sitio</u>	<u>2<sup>o</sup> sitio</u>	<u>1<sup>er</sup> sitio</u>	<u>2<sup>o</sup> sitio</u>
Km. $10^{-3}/M^{-1}$	4,0 $\pm$ 1	26,5 $\pm$ 9	0,32 $\pm$ 0,2	0,32 $\pm$ 0,2
K. $10^{-3}/M^{-1}$	8,0 $\pm$ 2	13,2 $\pm$ 5	0,6 $\pm$ 0,4	0,15 $\pm$ 0,1

Km representa las constantes de unión microscópicas y K las constantes de unión macroscópicas.

### 2.3 Interacción fosforilasa a $\rightarrow$ AMP

La figura 28 muestra los resultados de diálisis en el equilibrio de la unión de AMP a fosforilasa a, a pH 6,9 y 25°C. Comparando esta figura con la figura 24 correspondiente a la unión del AMP a fosforilasa b se deduce que la forma a de la enzima presenta una mayor afinidad por el nucleótido que la forma b. Los datos de la figura 28 se han representado en forma de gráfica de Hill en la figura 29 y de gráfica de Scatchard en la figura 30. De la representación de Hill se obtuvo el valor de  $1,1 \pm 0,1$  para el coeficiente de Hill, (76), lo cual indica muy poca cooperatividad para una proteína tetramérica como es la fosforilasa a en las condiciones de trabajo (104). Una baja o incluso nula cooperatividad para este sistema ha sido también propuesta por otros autores (68,77,90). Esto representa una gran disminución de la cooperatividad al pasar de la forma b a la forma a de la enzima, ya que la fosforilasa b siendo un dímero presenta un coeficiente de Hill de 1,4 para los dos sitios de alta afinidad.

La forma a de la enzima en las condiciones experimentales aquí utilizadas es un tetrámero, no produciéndose variación apreciable del estado de agregación en presencia de AMP (104,128).

En la representación de Scatchard (figura 30) la extrapolación de la curva corta el eje de abscisas en el valor  $\nu \approx 4$ , lo cual está indicando que en el tetrámero de fosforilasa a existe un sitio por monómero pa

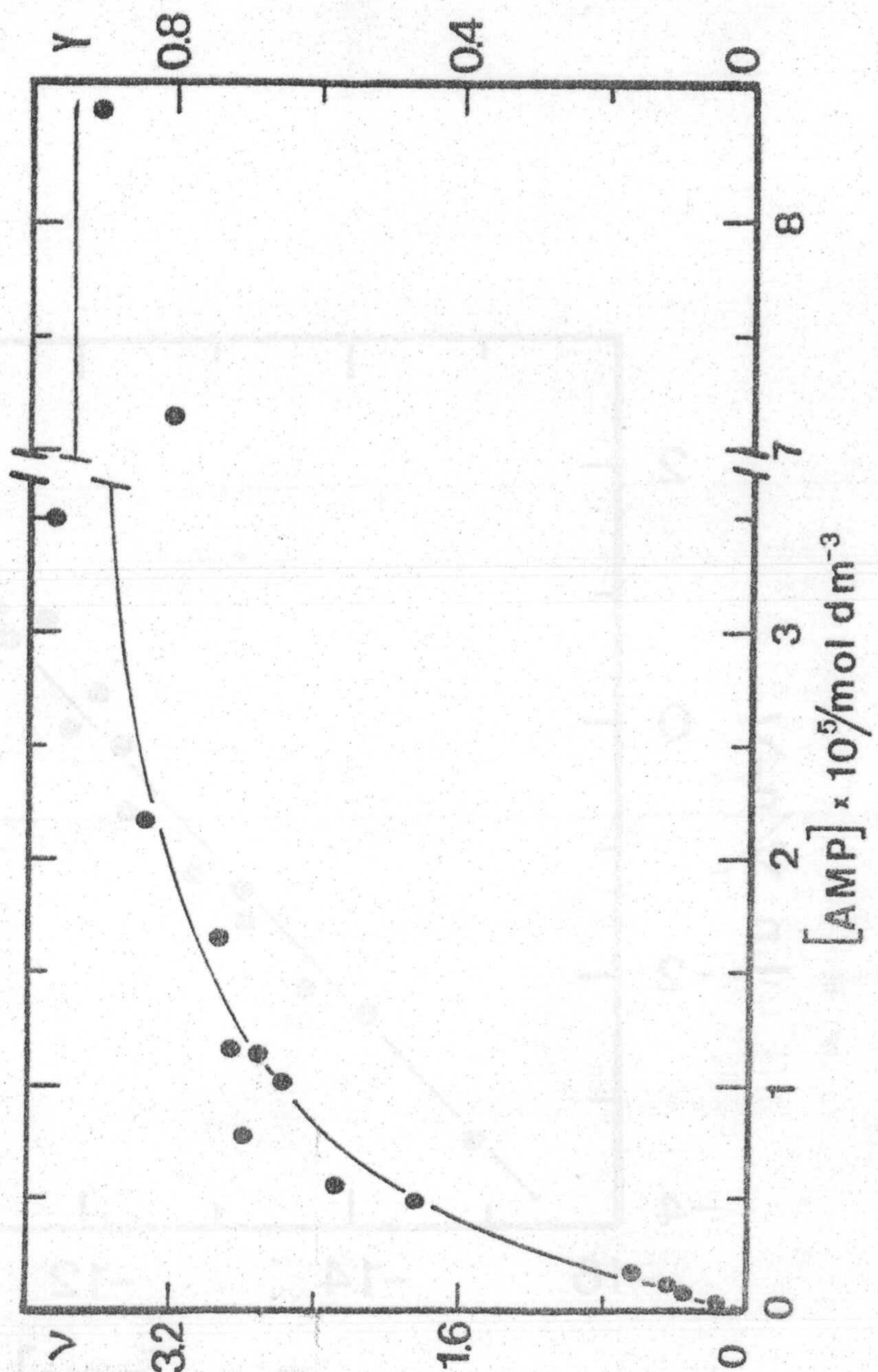


Figura 28. Unión de AMP a fosforilasa  $\alpha$  a pH 6,9 y 25°C medida por dialisis en el equilibrio. La concentración de enzima fué 3 mg/ml en un tampón de Hepes 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoacético 1 mM. La curva teórica se obtuvo de la ecuación (V.23) utilizando los valores de las constantes de unión listados en la Tabla II.

Esta curva es prácticamente indistinguible de la obtenida por la ecuación (V.25) con un único valor de constantes de unión,  $K_m = (1,8 \pm 0,2) 10^3 M^{-1}$  (ver Texto).



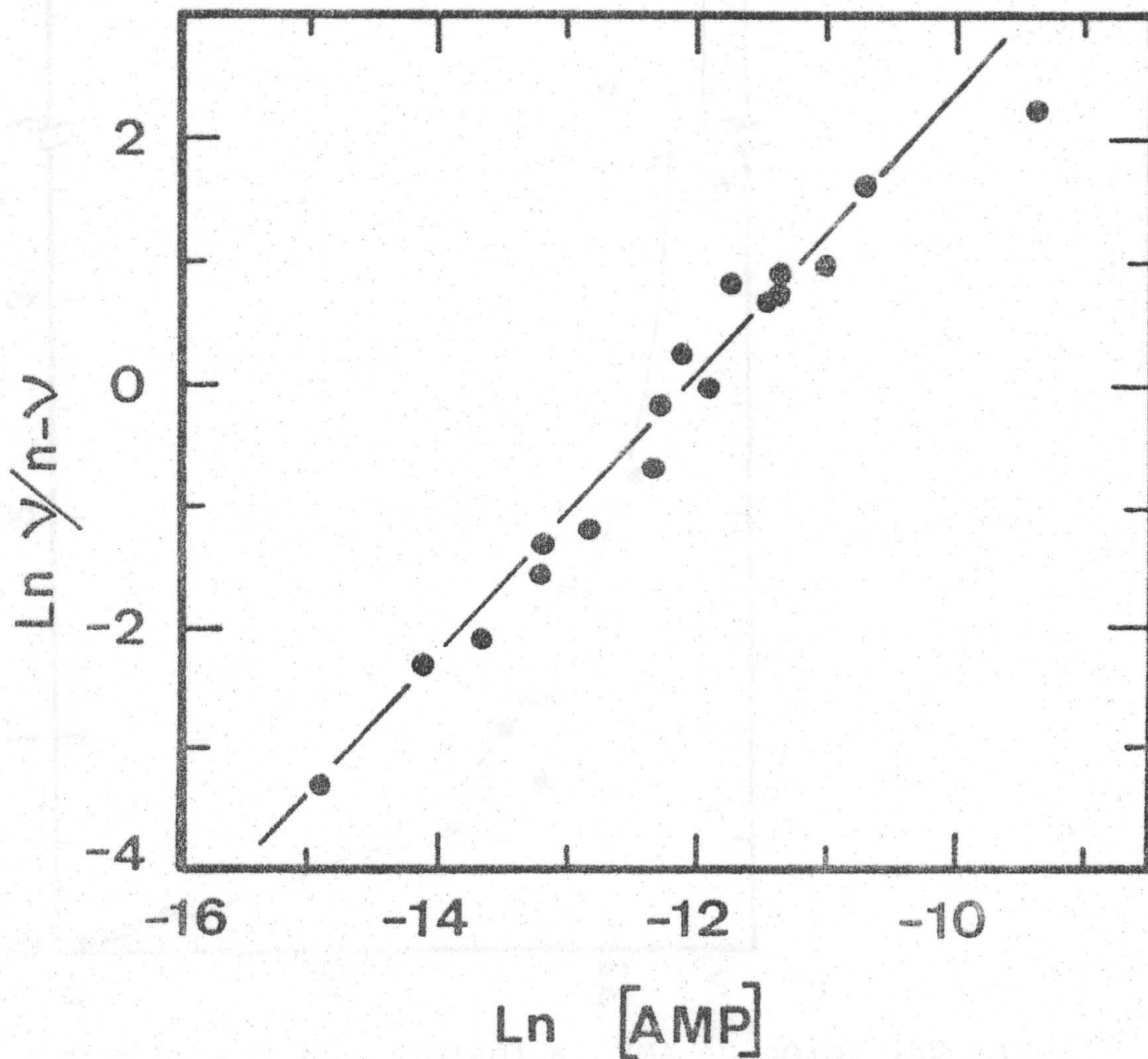


Figura 29. Representación de Hill de la unión de AMP a fosforilasa a. Los datos de la figura 28 se muestran en forma de una representación de Hill.

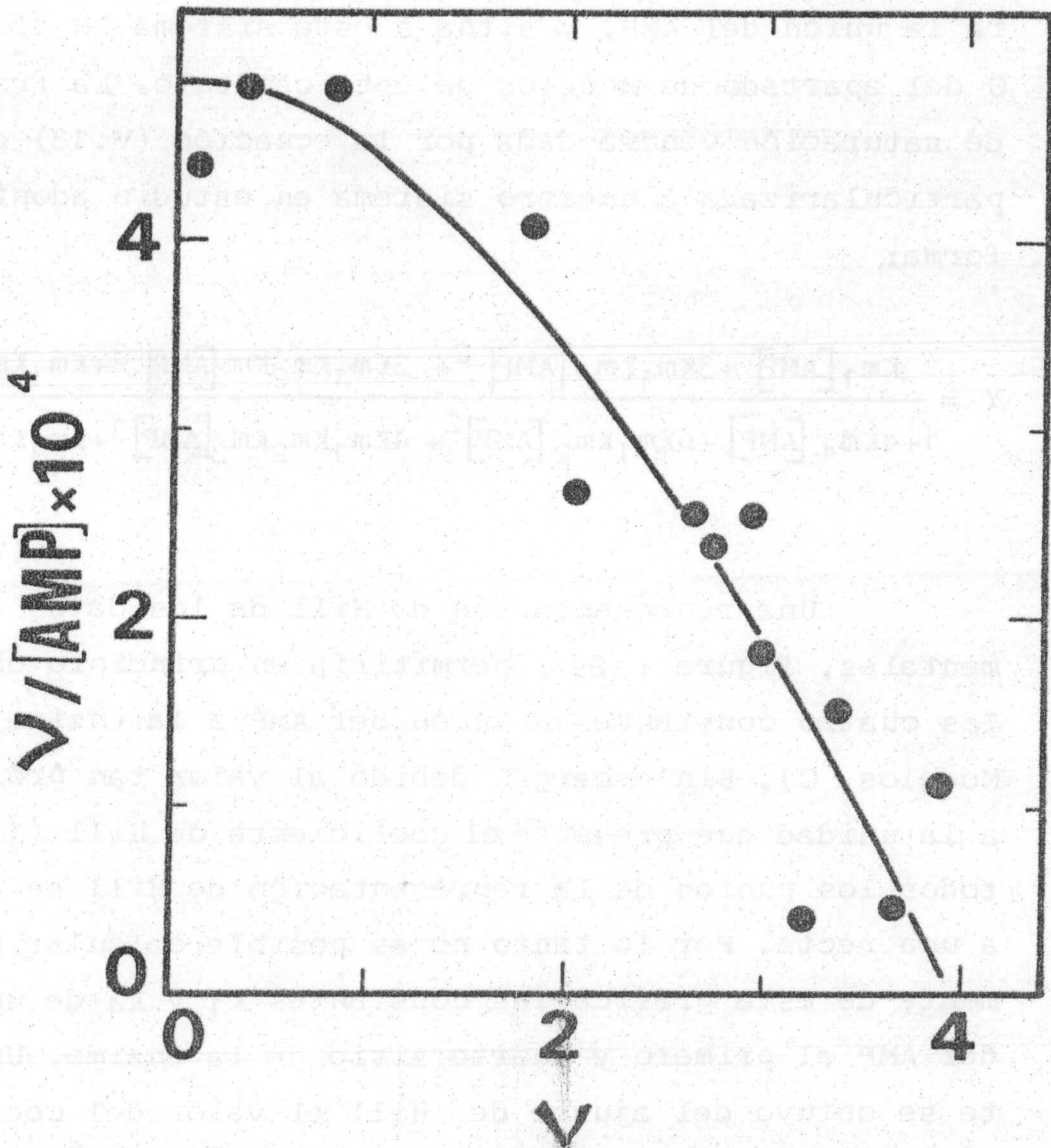


Figura 30. Representación de Scatchard de la unión de AMP a fosforilasa a. Los datos experimentales de la figura 28 se muestran en forma de una representación de Scatchard. La curva incluida corresponde a la ecuación (V.23) para los valores de las constantes listadas en la Tabla II.

ra la unión del AMP, y sitúa a este sistema en el caso C del apartado de Modelos de este capítulo. La fracción de saturación vendrá dada por la ecuación (V.13) que particularizada a nuestro sistema en estudio adopta la forma:

$$Y = \frac{K_{m_1} [AMP] + 3K_{m_1}K_{m_2} [AMP]^2 + 3K_{m_1}K_{m_2}K_{m_3} [AMP]^3 + K_{m_1}K_{m_2}K_{m_3}K_{m_4} [AMP]^4}{1 + 4K_{m_1} [AMP] + 6K_{m_1}K_{m_2} [AMP]^2 + 4K_{m_1}K_{m_2}K_{m_3} [AMP]^3 + K_{m_1}K_{m_2}K_{m_3}K_{m_4} [AMP]^4}$$

(V.23)

Una representación de Hill de los datos experimentales, figura 29, permitiría en principio obtener las cuatro constantes de unión del AMP a la enzima (Ver Modelos, C). Sin embargo, debido al valor tan próximo a la unidad que presenta el coeficiente de Hill (1,1) todos los puntos de la representación de Hill se ajustan a una recta. Por lo tanto no es posible calcular directamente de esta gráfica las constantes  $K_1$  y  $K_4$  de unión del AMP al primero y cuarto sitio de la enzima. Únicamente se obtuvo del ajuste de Hill el valor del coeficiente de Hill ya indicado y el valor de  $5,84 \cdot 10^{-6} M$  para la concentración de ligando libre al 50% de saturación,  $S_{0,5}$ . Particularizando la ecuación (V.23) al valor de  $S_{0,5}$  para la concentración de AMP libre se obtuvo la constante  $K_{m_4}$  en función de dicho valor y de las demás constantes según la ecuación:

$$K_{m_4} = \frac{1 + 2 K_{m_1} S_{0,5}}{4 S_{0,5} K_{m_1} K_{m_2} K_{m_3}} - \frac{2}{S_{0,5}} \quad (V.24)$$

Utilizando las ecuaciones (V.23) y (V.24) y su poniendo cooperatividad positiva se determinaron los valores de  $Km_1$ ,  $Km_2$  y  $Km_3$ , y el de  $Km_4$  en función de los anteriores, que ajustaban aparentemente mejor la curva teórica de la ecuación (V.23). Estos valores se utilizaron como los iniciales para la aplicación del método iterativo de Gauss - Newton que proporcionó los valores óptimos de las constantes y sus correspondientes errores (Tabla II). Las curvas continuas de las fi guras 28 y 30 son las curvas teóricas definidas por la ecuación (V.23) para los valores de las constantes dadas en la Tabla II.

Considerando la baja cooperatividad positiva existente entre los sitios de unión de la forma a de la enzima al AMP se podría estudiar dicha unión considerando los cuatro sitios independientes. Así, la frac - ción de saturación vendría dada por la ecuación (IV, 7) que particularizada al sistema en estudio tiene la expresión:

$$Y = \frac{Km [AMP]}{1 + Km [AMP]} \quad (V.25)$$

Para la constante  $Km$  se obtuvo el valor óptimo de  $(1,8 \pm 0,2) 10^5 M^{-1}$  aplicando el método iterativo de Gauss-Newton. La curva teórica de  $v$  frente a concentra ción de AMP libre definida por la ecuación (V.25) para este valor de la constante es prácticamente indistinguible de la definida por la ecuación (V.23) para los va-

lores de las constantes dados en la Tabla II incluida en la figura 28. Así, la unión de AMP a fosforilasa a puede igualmente ser definida por una única constante fenomenológica de valor  $(1,8 \pm 0,2) 10^5 M^{-1}$  dada la muy baja cooperatividad del proceso, que puede considerarse incluso como nula dentro del error experimental ( $n_H = 1,1 \pm 0,1$ ).

Tabla II

Constantes de unión del AMP a glucógeno-fosforilasa a de músculo de conejo, pH 6,9, temperatura 25°C.

	<u>1er sitio</u>	<u>2º sitio</u>	<u>3er sitio</u>	<u>4º sitio</u>
$K_m \cdot 10^{-5}/M^{-1}$	$1,2 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,4$	$1,8 \pm 1,5$	$2,0 \pm 1,2$
$K \cdot 10^{-5}/M^{-1}$	$4,8 \pm 2,4$	$2,6 \pm 0,6$	$1,2 \pm 1$	$0,75 \pm 0,3$

$K_m$  representa las constantes de unión microscópicas y  $K$  las constantes de unión macroscópicas.

## 2.4 Interacción fosforilasa b - IMP

La unión de IMP a fosforilasa b se estudió a 25°C y pH 6,9 mediante diálisis en el equilibrio usando IMP radiactivo marcado en  $^{14}\text{C}$ . Los valores que se obtuvieron de  $\nu$  (número de moles de IMP unidos por mol de dímero de enzima) se han representado en la figura 31 frente a las correspondientes concentraciones de nucleótido libre.

En las condiciones de pH, 6,9 y temperatura, 25°C, en que se realizaron los experimentos la fosforilasa b se encuentra en estado dimérico en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , sustratos y activadores (58,75,79,80,123,124). Black y Wang (70,127) y posteriormente otros autores (62) comprobaron que el IMP no induce agregación en la fosforilasa b en un amplio rango de concentraciones de enzima ni de temperatura. Por lo tanto, la enzima mantiene la misma estructura cuaternaria dimérica antes y después de su unión al nucleótido y así se ha considerado en el análisis de datos para este sistema.

La concentración de enzima en estos experimentos fue de 15 mg/ml, bastante elevada para así poder determinar con mayor precisión el número de moles de IMP unidos a la misma, ya que la fosforilasa b presenta una afinidad notablemente inferior por este nucleótido que por el AMP.

Los datos de la figura 31 se muestran en la figura 32 en forma de una representación de Scatchard. Los puntos experimentales parecen ajustarse a algún ti

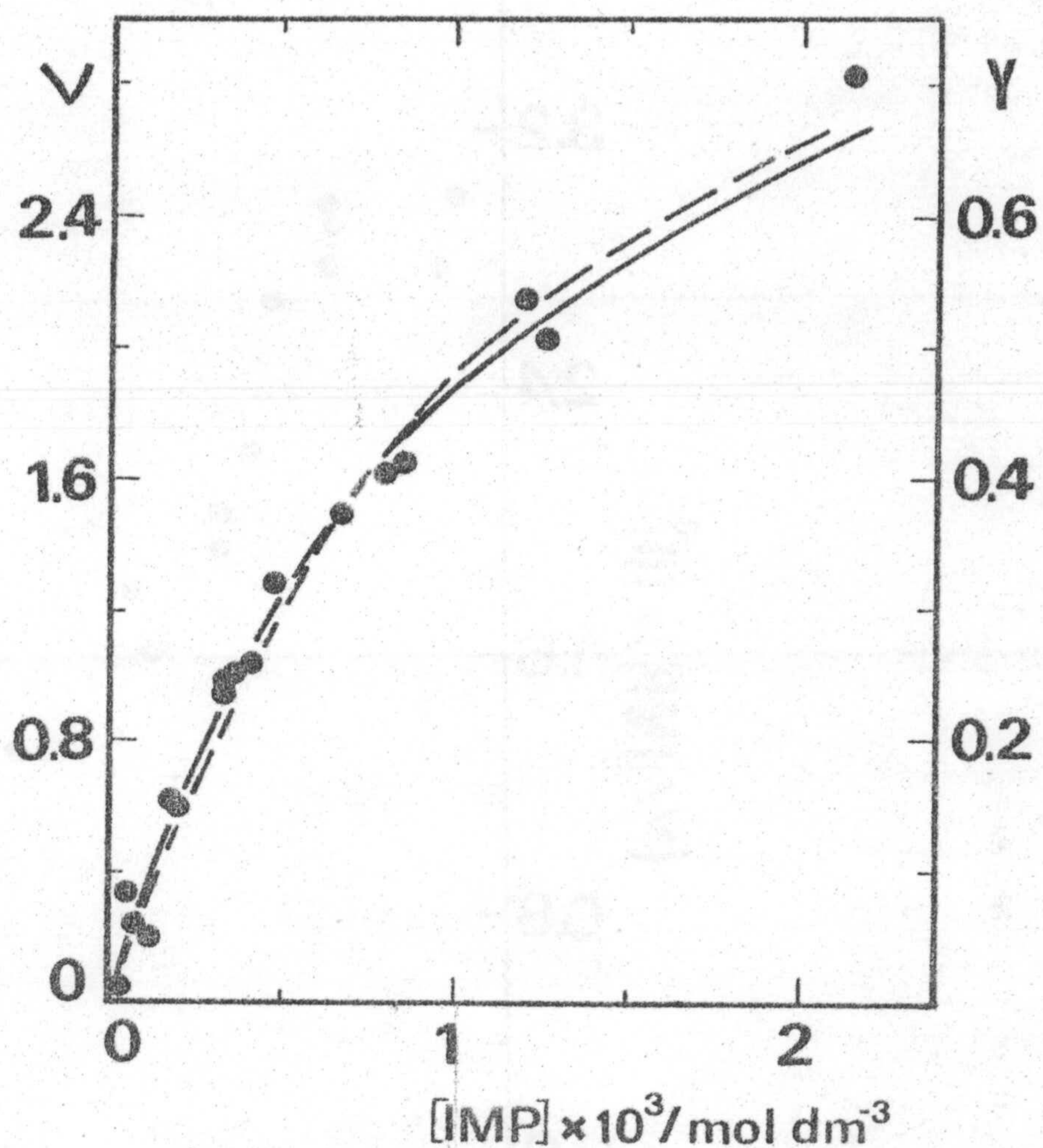


Figura 31. Unión de IMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C medida por diálisis en el equilibrio. Se ha representado la fracción de saturación, Y, o el número de moles de AMP unidos por mol de dímero de fosforilasa b frente a la concentración de IMP libre; La disolución de enzima a 15 mg/ml contenía Tris 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM. La curva en línea continua es la teórica definida por la ecuación (V.26) para los valores de  $K_A = 1250 \text{ M}^{-1}$  y  $K_B = 600 \text{ M}^{-1}$ . En línea discontinua se ha dibujado la curva teórica definida por la ecuación (V.27) para los valores de las constantes mostradas en la Tabla IV .



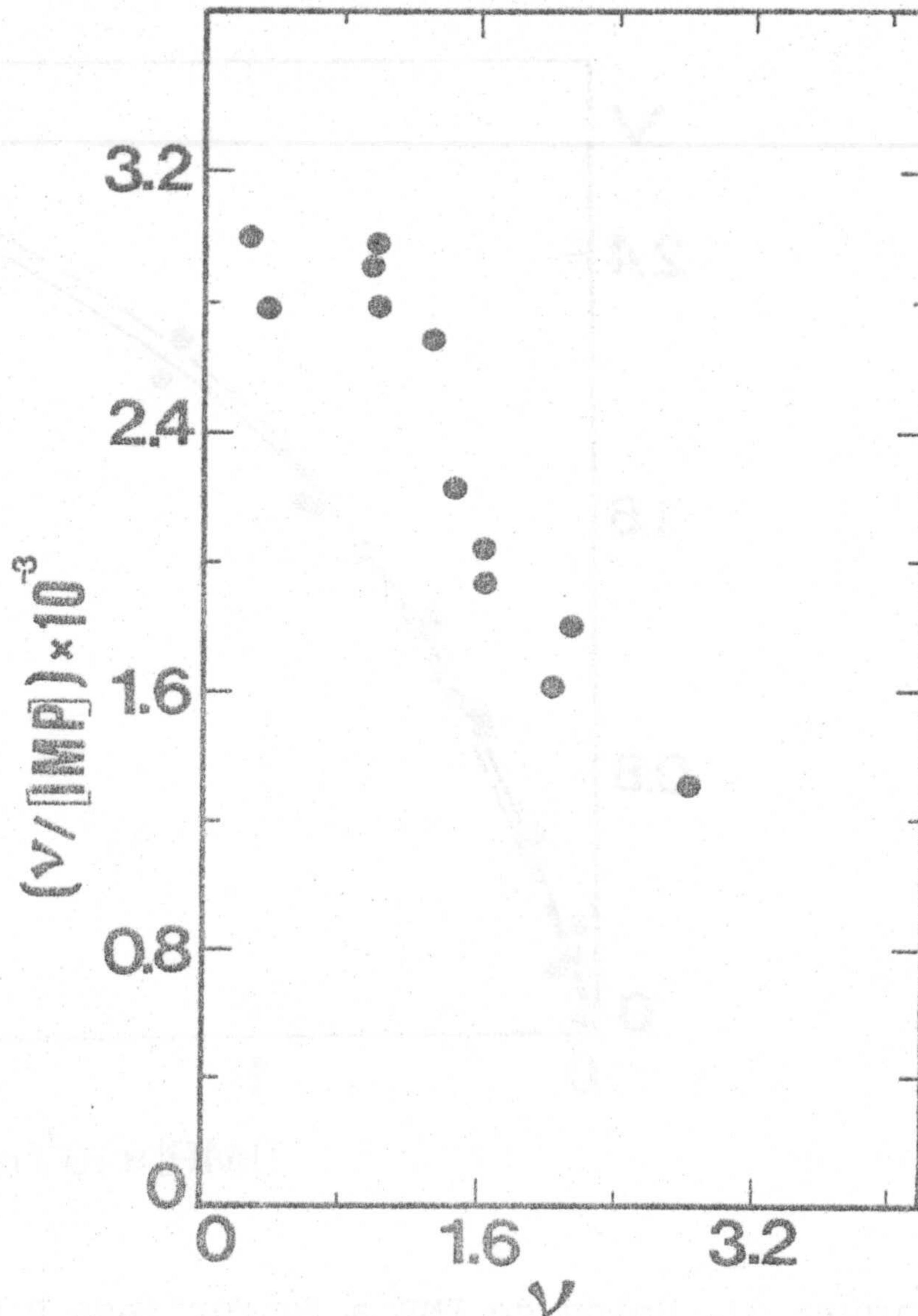


Figura 32. Representación de Scatchard de la unión de IMP a fosforilasa b. Los datos de la figura 30 se muestran en forma de una representación de Scatchard de  $v/[IMP]$  frente a  $v$  (número de moles de IMP unido por mol de dímero de enzima).

po de línea (ver mas adelante) que extrapola a un valor de  $\nu \approx 4$  (o en cualquier caso  $\nu > 2$ ) en el corte del eje de abscisas. Por lo tanto, parece confirmarse la existencia de cuatro sitios en el dímero de fosforilasa b a los cuales se une el IMP. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Johnson et al. (47) mediante difracción de rayos X. Estos autores indicaron que a 4°C el IMP se une al sitio del nucleótido, N, y al del nucleósido o del inhibidor, I, de cada subunidad de fosforilasa b, presentando al igual que el AMP, mayor afinidad por el sitio del nucleótido. Buc et al. (61) obtuvieron resultados análogos estudiando la unión del IMP a fosforilasa b a 4°C en disolución.

Comparando la representación de Scatchard de la unión de IMP a fosforilasa b (figura 32) con la de AMP a la misma forma de la enzima (figura 25) parece deducirse que el IMP, contrariamente al AMP, presenta una afinidad muy similar por el sitio del nucleótido y del nucleósido. Esto hace que la representación de Scatchard no refleje con claridad la existencia o no de cooperatividad positiva entre los sitios de unión.

En general la existencia de cooperatividad positiva entre sitios idénticos se manifiesta por la presencia de un máximo en el Scatchard (concavidad hacia el eje de abscisas), tanto más desplazado a la derecha cuanto mayor sea dicha cooperatividad (76). El caso opuesto, cooperatividad nula entre distintas clases de sitios, origina una curva en el Scatchard de convexidad hacia el eje de abscisas, que es en principio difícil

de diferenciar de una pura cooperatividad homotrópica negativa (76). En el caso de la figura 32 no se observa claramente una curvatura definida, lo que a priori podría interpretarse de diversas maneras. Así, el análisis más simple sería ajustar estos puntos a una recta lo que implicaría sitios idénticos e independientes, pero esta posibilidad queda descartada por la gran diferencia encontrada entre los sitios N e I para su unión al AMP (ver apartado V.2.2) así como la evidencia bibliográfica que es unánime a este respecto (61,70,87). Una hipótesis simple de trabajo sería entonces suponer únicamente dos parejas de sitios no idénticos e independientes por dímero que, al presentar constantes de unión no muy alejadas, proporcionaría una curvatura en el Scatchard no apreciable dentro del error experimental por su gran radio de curvatura en el entorno de nuestros datos experimentales. Una hipótesis de tratamiento algo más complejo, pero a su vez más acorde con la información bibliográfica al respecto (61,70,87), sería suponer cooperatividad positiva para los sitios del nucleótido, al igual que se obtuvo para el caso del AMP (apartado V.2.2), cuya tendencia hacia un cierto tipo de curvatura en un Scatchard queda disminuida por la tendencia opuesta originada por la existencia de dos conjuntos de sitios distintos; el resultado plausible sería una línea sin un máximo definido. Dentro del error experimental los puntos de la figura 32 podrían ajustarse a este tipo de línea.

Naturalmente el tratamiento de los datos es distinto en cada caso, así comenzaríamos por la primera hipótesis, mas simple, para entrar posteriormente en la segunda y ver en una sección posterior la aplicabilidad de ambos modelos de trabajo en el estudio de los resultados calorimétricos.

Considerando pues en principio dos conjuntos de sitios distintos y no cooperativos (independientes), la fracción de saturación vendrá dada por la ecuación:

$$Y = \frac{1}{2} \frac{K_{m_A} [IMP]}{1 + K_{m_A} [IMP]} + \frac{1}{2} \frac{K_{m_B} [IMP]}{1 + K_{m_B} [IMP]} \quad (V.26)$$

donde  $K_A$  y  $K_B$  representan las constantes de unión microscópicas a los sitios de alta y baja afinidad respectivamente (sitios del nucleótido, N, y nucleósido, I, correspondientes).

Los valores óptimos obtenidos para estas constantes de unión aplicando el método de Gauss-Newton son  $K_A = 1250 \pm 360 \text{ M}^{-1}$  y  $K_B = 600 \pm 200 \text{ M}^{-1}$ . Estos valores podrian en principio considerarse como los correspondientes a unas constantes de medio efecto para el sitio del nucleótido ( $K_A$ ) y nucleosido ( $K_B$ ), ya que no tenemos evidencia de que los sitios sean en conjunto independientes. Este análisis de datos es efectivamente

coherente con el que los sitios sean distintos y concordando así con las referencias Bibliográficas (42, 61). En la Bibliografía encontramos información contraria a la suposición de tomar los sitios como independientes, pues, como ya se ha dicho, ciertos autores comprueban la existencia de cooperatividad en la unión del IMP a los sitios N de la fosforilasa b (61, 70, 87). Así, partiendo de la información que nos dan estas constantes  $K_A$  y  $K_B$  previamente obtenidas se hizo un nuevo análisis de los datos experimentales pero incluyendo ahora una cooperatividad homotrópica positiva entre los sitios N del dímero.

Se considera además unión no cooperativa a los sitios I, al igual que se encontró en la unión del AMP (apartado V.2.2), suposición que viene además avalada por el hecho de que algunos inhibidores investigados que se unen preferentemente a I con una afinidad superior tanto al AMP como al IMP (bases nitrogenadas y nucleósidos tales como adenina y adenosina) lo hacen no cooperativamente (53, 128).

En esta nueva situación la fracción de saturación vendrá dada por la ecuación (V.11):

$$Y = \frac{1}{2} \frac{K_{m_1} [IMP] + K_{m_1} K_{m_2} [IMP]^2}{1 + K_{m_1} [IMP] + K_{m_1} K_{m_2} [IMP]^2} + \frac{1}{2} \frac{K_{m_3} [IMP]}{1 + K_{m_3} [IMP]} \quad (V.27)$$

donde  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$  son las constantes microscópicas de unión a los sitios de mayor afinidad,  $N$ , y  $K_{m_3}$  la constante microscópica de unión a los sitios de menor afinidad,  $I$ .

Como valores de partida para la aplicación del método de Gauss-Newton se tomó para  $K_B$  el valor previamente obtenido de 600 y para  $K_1$  y  $K_2$  diferentes parejas de valores iniciales que cumplieran la condición  $\sqrt{K_1 K_2} = 1250$  (22) (valor obtenido previamente para  $K_A$ ). Así, los valores óptimos que se obtuvieron por el método citado fueron  $K_{m_1} = 740 \pm 220 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{m_2} = 2100 \pm 2100 \text{ M}^{-1}$  y  $K_{m_3} = 600 \pm 490 \text{ M}^{-1}$ .

Con estos valores de las constantes y aplicando la ecuación (V.26) se obtuvo la curva teórica representada en la figura 31 en líneas discontinuas. En esta misma figura con línea continua se ha representado la curva teórica definida por la ecuación (V.27) para los valores de  $K_A = 1250 \text{ M}^{-1}$  y  $K_B = 600 \text{ M}^{-1}$ .

Con los valores obtenidos para  $K_{m_1}$  y  $K_{m_2}$  aplicando la ecuación (V.10) se obtiene un coeficiente de Hill de 1,2 que concuerda con el que Buc et al. (61) obtienen a 4°C para este mismo sistema.

En conclusión podemos afirmar que la afinidad del IMP por el sitio del nucleótido es menor que la del AMP a 25°C, siendo la constante fenomenológica de unión un orden de magnitud inferior; sin embargo, ambos nucleótidos presentan una afinidad comparable por el sitio del nucleósido que parece ser muy poco selectivo para ambos ligandos. Los resultados obtenidos mediante

diálisis en el equilibrio son consistentes con el hecho de que la unión del IMP al sitio del nucleótido presenta cooperatividad positiva, aunque inferior a la que presenta el AMP; esto concuerda además con los resultados de Bennick et al. (87) por medidas de actividad que indican una cooperatividad homotrópica en la unión del IMP no muy elevada e inferior en cualquier caso a la del AMP. Resulta claro de todo lo anterior que esta unión puede en principio representarse por sitios independientes o por cualquiera de los dos ajustes anteriores. Las razones para preferir estos últimos y, en particular el segundo (que muestra además un mejor ajuste matemático), se basan sólo en la información que se posee sobre la enzima (sitios distintos, N e I) y la evidencia bibliográfica (cooperatividad en la unión a los sitios N y no cooperatividad a los I) y no en ninguna característica especial que muestren la curva de saturación (figura 31) o la representación de Scatchard (figura 32).

### 3. ESTUDIO CALORIMETRICO DE LA INTERACCION PROTEINA-LIGANDO

La unión de AMP a la fosforilasa a y b y de IMP a fosforilasa b se estudió mediante microcalorimetría a 25°C. En este apartado se incluyen los resultados de dichos experimentos así como el desarrollo teórico de las ecuaciones utilizadas en el análisis de datos, en el que se hace uso de los resultados obtenidos en el estudio de dicha unión mediante diálisis en el equilibrio. Se incluye además un estudio de la influencia tanto de la disolución reguladora como del sustrato en la valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP.



### 3.1. Interacción fosforilasa b - AMP

Las curvas de valoración térmica de fosforilasa b con AMP a 25°C y pH 6,9 se muestran en las figuras 33, 34 y 35 para diferentes disoluciones reguladoras. La unión del activador alostérico, AMP, a la enzima resultó ser exotérmica en todos los casos.

En los distintos estudios de interacción de fosforilasa b con AMP realizados hasta la fecha (74,75, 81-84,129) no se ha indicado si existe intercambio de protones con la disolución reguladora como consecuencia de la unión del nucleótido a la enzima. En la determinación del cambio de entalpía producido en la unión de un ligando a una proteína es necesario conocer si como consecuencia de la unión hay una toma o cesión neta de protones, ya que este hecho produciría una contribución adicional al cambio de entalpía observado. En esa situación el cambio de entalpía, corregido para los calores de dilución de los reactivos, vendría dado por la expresión (85).

$$\Delta H_T = \Delta H_b + n\Delta H_p \quad (V.28)$$

donde  $\Delta H_T$  es el cambio de entalpía determinado experimentalmente,  $\Delta H_b$  el cambio de entalpía debido a la unión del ligando a la proteína,  $n$  es el número de protones intercambiados con la disolución reguladora y  $\Delta H_p$  la entalpía de protonización del tampón.

Como se deduce de la ec. (V.28) es necesario conocer  $n$  para calcular el cambio de entalpía debido a

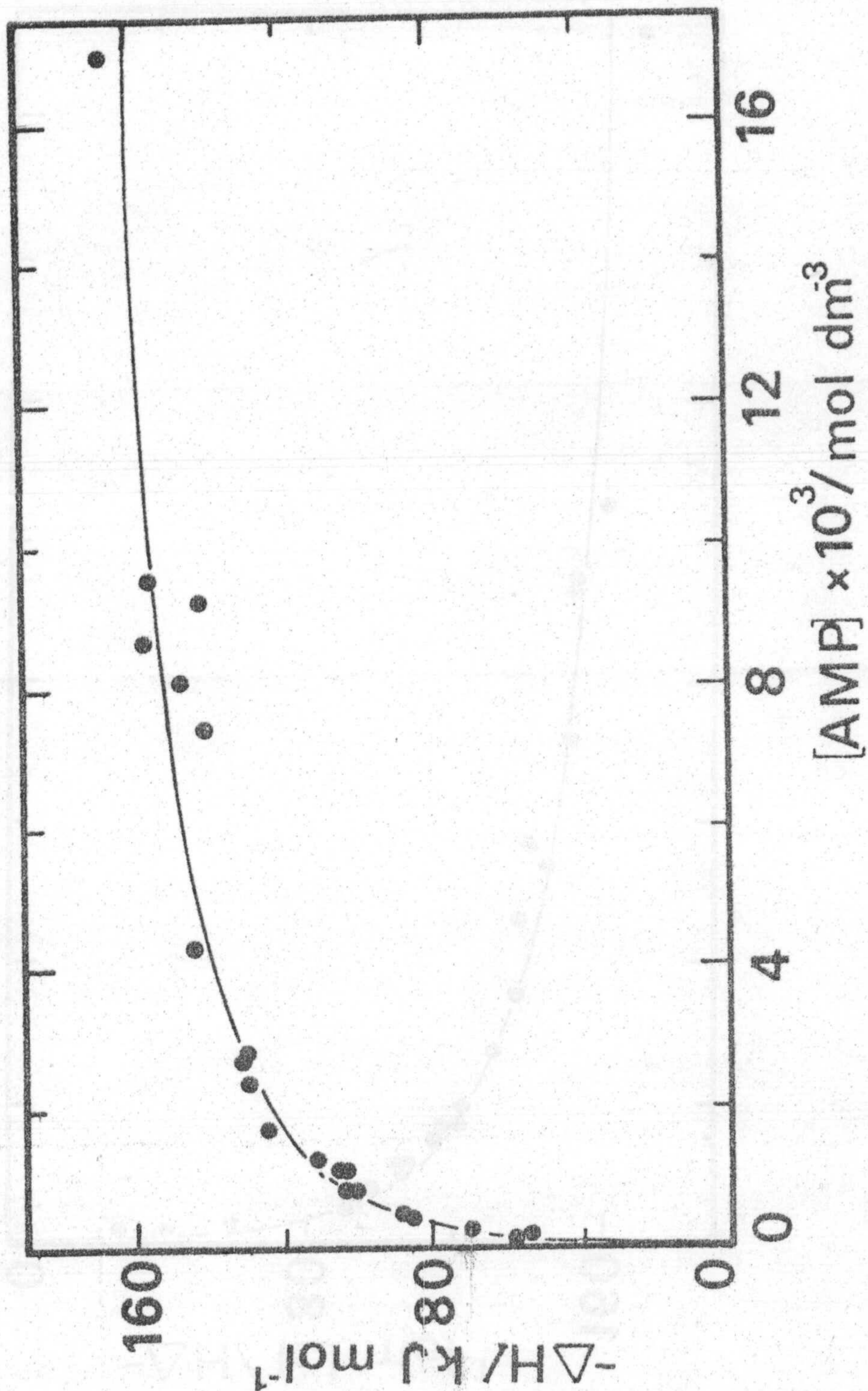


Figura 33. Curva de valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP en Tris a pH 6,9 y 25°C. La fosforilasa b (4mg/ml) disuelta en Tris 50 mM, ClK 50 mM EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol se valoró con AMP disuelto en el mismo tampón. La curva incluida corresponde a la ecuación (V.35) para los valores de  $K_i$  y  $\Delta H_i$  dados en la Tabla III.

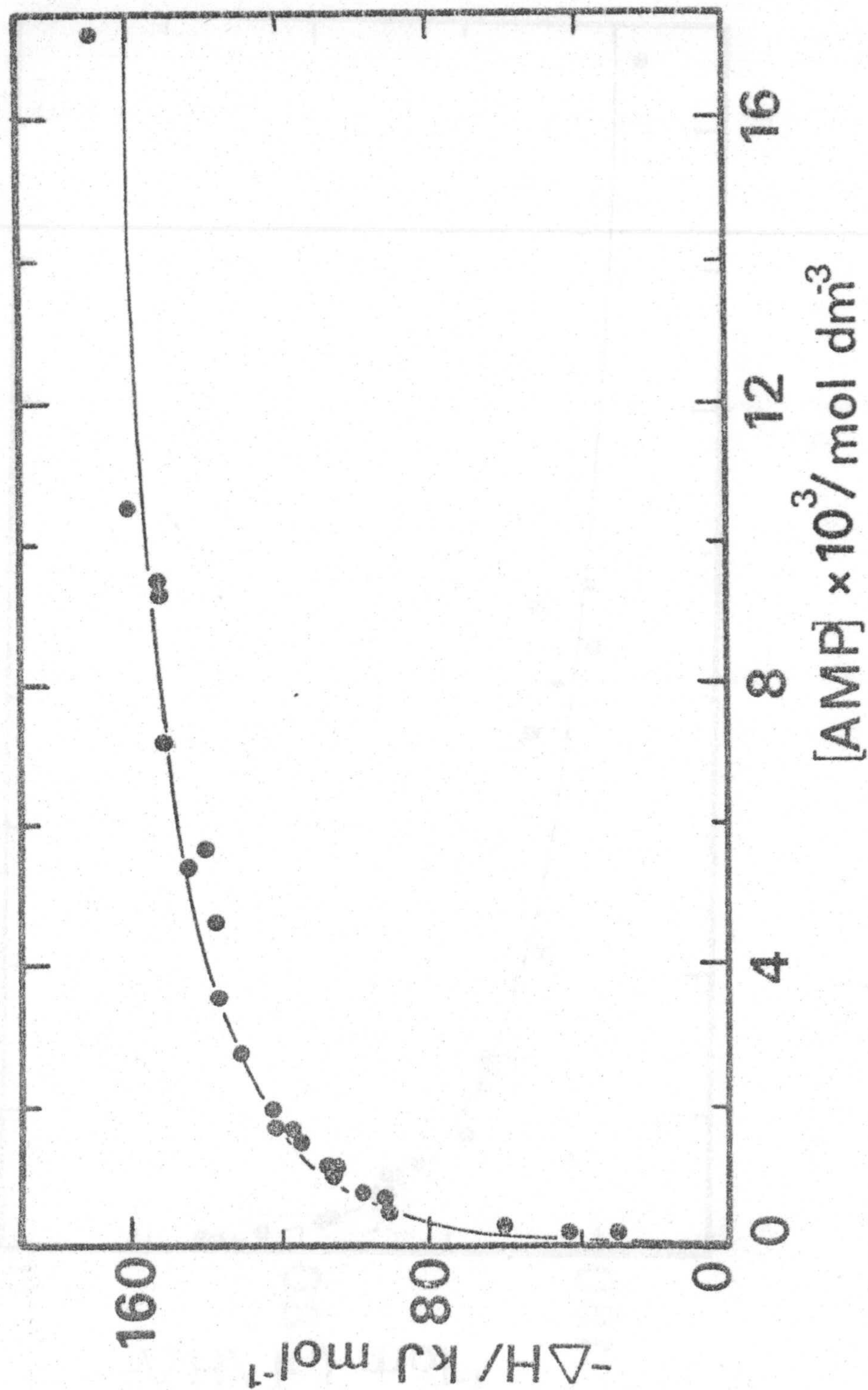


Figura 34. Curva de valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP en glicil-glicina 50 mM a pH 6,9 y 25°C. Los experimentos fueron análogos a los de la figura 33 excepto que en este caso se utilizó como disolución reguladora glicil-glicina 50 mM.

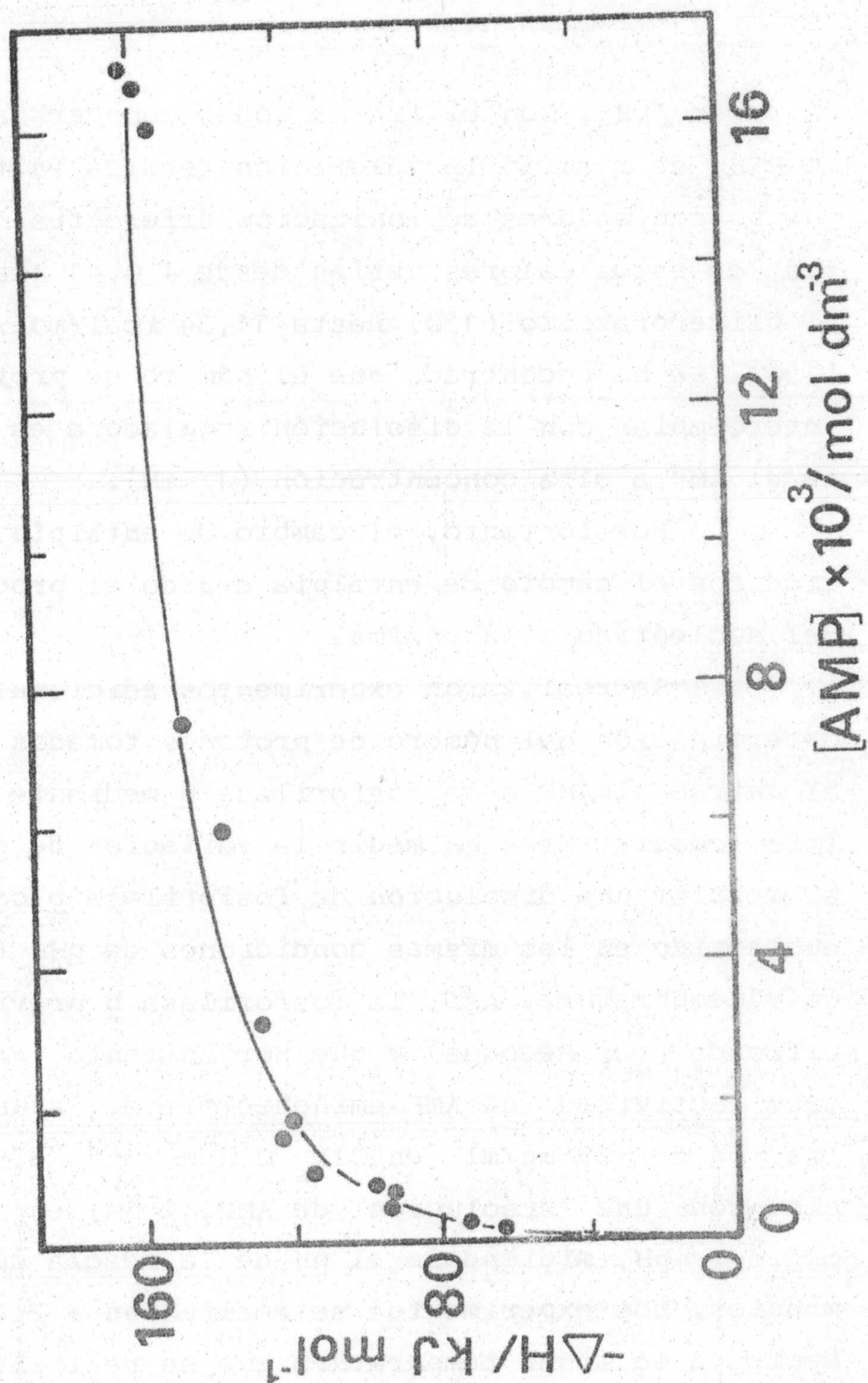


Figura 35. Curva de valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP en glicerofosfato 50 mM a pH 6,9 y 25°C. Excepto la disolución reguladora las demás condiciones experimentales fueron análogas a las utilizadas en los experimentos de la figura 33.

la unión,  $\Delta H_D$ . Con el fin de poder conocer tanto  $n$  como  $\Delta H_D$  se realizó la valoración térmica en tres tampones que poseen calores de ionización diferentes. Los valores de estos calores varían desde  $-0,41$  kcal/mol para el glicerofosfato (130) hasta  $11,34$  kcal/mol para el Tris (130). Se ha encontrado que el número de protones que se intercambian con la disolución reguladora es  $0 \pm 0,2$  al unirse el AMP a alta concentración (17 mM).

Por lo tanto, el cambio de entalpía medido coincide con el cambio de entalpía debido al proceso de unión del nucleótido a la enzima.

Se realizaron experimentos adicionales para la determinación del número de protones tomados o cedidos al unirse el AMP a la fosforilasa b mediante potenciometría, consistentes en medir la variación de pH producida al mezclar una disolución de fosforilasa b con otra de nucleótido en las mismas condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura. Así, la fosforilasa b previamente purificada (ver Métodos) y que por lo tanto no presentaba actividad de AMP-aminohidrolasa, a una concentración de 15 mg/ml en CLK 0,1 M y pH 6,9, se mezcló con una disolución de AMP, 2 mM, en el mismo medio y pH, midiéndose el pH de la mezcla durante 30 minutos. Los experimentos se realizaron a 25° C, es decir, a la misma temperatura que se realizaron los experimentos calorimétricos. Se comprobó que no se producía cambio superior a  $\pm 0,02$  unidades en el pH de las disoluciones al mezclar la enzima con el activador alostérico, lo que indica que el número de protones inter-

cambiados sería inferior a 0,06 para los niveles de saturación correspondientes a esa concentración de AMP. Podría concluirse que no existe ni toma ni cesión neta de protones en la unión de AMP a fosforilasa b, confirmándose así los resultados que previamente se habían obtenido en calorimetría.

Los experimentos de las figuras 33, 34 y 35 se realizaron en idénticas condiciones de concentración enzimática, 4 mg/ml, de pH, 6,9 y de temperatura, 25° C, diferenciándose únicamente en la naturaleza de la disolución reguladora. Como se puede observar en estas figuras la curva calorimétrica obtenida en todos los casos es monofásica; diferenciándose de las publicadas por dos grupos de investigadores(74,81,82) con perfiles bifásicos, similares a las obtenidas por nosotros en los casos en que se utilizaron preparaciones de fosforilasa b impurificada por AMP-aminohidrolasa (fig.15). Estos autores difieren marcadamente en cuanto a la magnitud del calor de reacción a concentraciones saturantes de AMP. Esta diferencia ha sido atribuida por uno de dichos grupos (81) a la distinta naturaleza de las disoluciones reguladoras. Sin embargo, y como se puede ver en las figuras 33, 34 y 35, nosotros obtuvimos la misma curva calorimétrica monofásica independientemente del tipo de disolución reguladora utilizada, estando incluidas entre las estudiadas aquellas que estos dos grupos de autores

habían utilizado. Así, ningún efecto en el cambio de entalpía de la unión AMP-fosforilasa b parece atribuible al tampón utilizado.

Steiner et al. (129) han realizado experimentos de calorimetría similares obteniendo una curva monofásica. Sin embargo, la concentración máxima de AMP a la cual han realizado medidas es 1 mM, muy inferior a los valores máximos de AMP de nuestros experimentos (17 mM).

La información contenida en las curvas calorimétricas (fig. 33, 34 y 35) no permite la caracterización termodinámica del equilibrio enzima-activador alostérico por el carácter cooperativo que esta unión manifiesta, además de presentar distintos sitios de unión. Así, no es posible obtener no sólo los calores de unión por sitio sino tampoco el número de sitios ni las constantes de equilibrio respectivas a partir únicamente de información calorimétrica. Serán precisamente los resultados de los experimentos de diálisis anteriormente expuestos, número y cualidad de sitios en la enzima y constantes de unión del AMP a los mismos, los que permitirán el análisis cuantitativo de las curvas calorimétricas. Este análisis debe proporcionar la contribución entálpica de cada sitio de la enzima al  $\Delta H$  total de unión del AMP. A partir de las constantes de equilibrio e incrementos de entalpía por mol de AMP unido a cada sitio pueden entonces obtenerse los cambios de energía de Gibbs y entropía implicados en dichos procesos a partir de las conocidas relaciones

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad \text{y} \quad \Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ}{T} \quad (\text{v. 29})$$

Estos parámetros termodinámicos son aparentes al no considerarse actividades en la caracterización de las disoluciones. El estado standard es el definido por una concentración de  $1 \text{ mol.l}^{-1}$ .

La fosforilasa b a  $25^\circ \text{C}$  se encuentra en forma de dímero (58, 75, 79, 80, 123, 124). Al unirse al AMP como ya se indicó en (V.2.2) se puede producir una pequeña agregación a la forma de tetrámero según unos autores (125), aunque la mayoría manifiestan que a esta temperatura se mantiene en forma dimérica incluso en presencia del activador alostérico (58, 75, 79, 80, 123, 124). Se midió a este respecto el cambio de entalpía de la unión de AMP a fosforilasa b a una concentración suficientemente elevada de AMP (8,7 mM) y con distintas concentraciones de enzima (figura 36), comprobándose una dependencia lineal entre el cambio de entalpía y la concentración de fosforilasa b. Este resultado parece indicar que junto al cambio de entalpía debido a la unión del nucleótido a la enzima no se está midiendo un cambio de entalpía apreciable de tetramerización que lógicamente sería función de la concentración de enzima. Puede concluirse



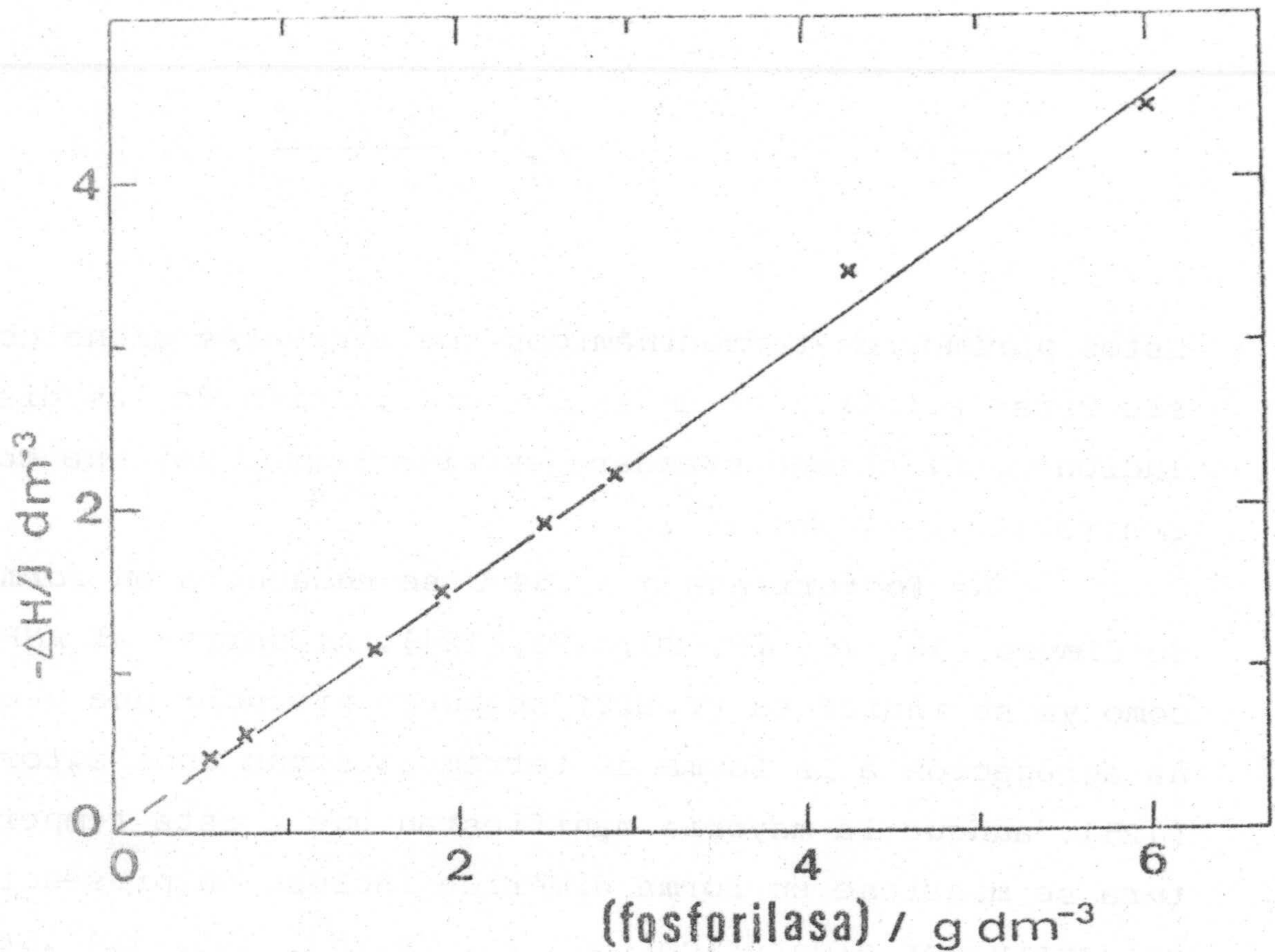


Figura 36. Dependencia del calor de unión de AMP a fosforilasa b con la concentración de enzima a 25°C. Se ha representado el cambio de entalpia por unidad de volumen de disolución. Frente al número de gramos de fosforilasa. La concentración de AMP fué 8,7 mM en una disolución reguladora de Tris 50 mM, ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM a pH 6,9.

que en el caso de existir una pequeña tetramerización durante los experimentos calorimétricos, el calor debido a la misma estaría dentro del error de las medidas (véase Discusión). En consecuencia, se estudió la unión de AMP a fosforilasa b considerando toda la enzima en forma de dímero.

En la figura 37 se ha representado el cambio de entalpía por mol de dímero de fosforilasa b frente a la concentración de AMP libre en equilibrio con la proteína que corresponden a los datos de calorimetría, que se han obtenido utilizando las constantes de unión del AMP a la fosforilasa b calculadas de los datos de diálisis en el equilibrio (Tabla I). Debido a que no se observa ningún efecto producido por la disolución reguladora, en la figura 37 se han representado todos los resultados calorimétricos obtenidos para las distintas disoluciones reguladoras, con objeto de disponer de mayor número de datos para un posterior ajuste a un modelo teórico.

La unión del AMP a la fosforilasa b puede presentarse en un esquema general como la unión de un ligando, S, a un enzima, P, con dos conjuntos de sitios de alta,  $P_A$ , y baja,  $P_B$ , afinidad. De esta forma,  $[P_A]$  y  $[P_B]$  serán las concentraciones de proteína que poseen vacantes los dos sitios de alta y baja afinidad respectivamente;  $[P_A S]$  sería entonces la concentración de proteína que presenta un sólo sitio de alta afinidad vacante, independientemente de que poseyera ligando unido a sitios de baja afinidad;  $[P_B S_2]$  sería la concen-

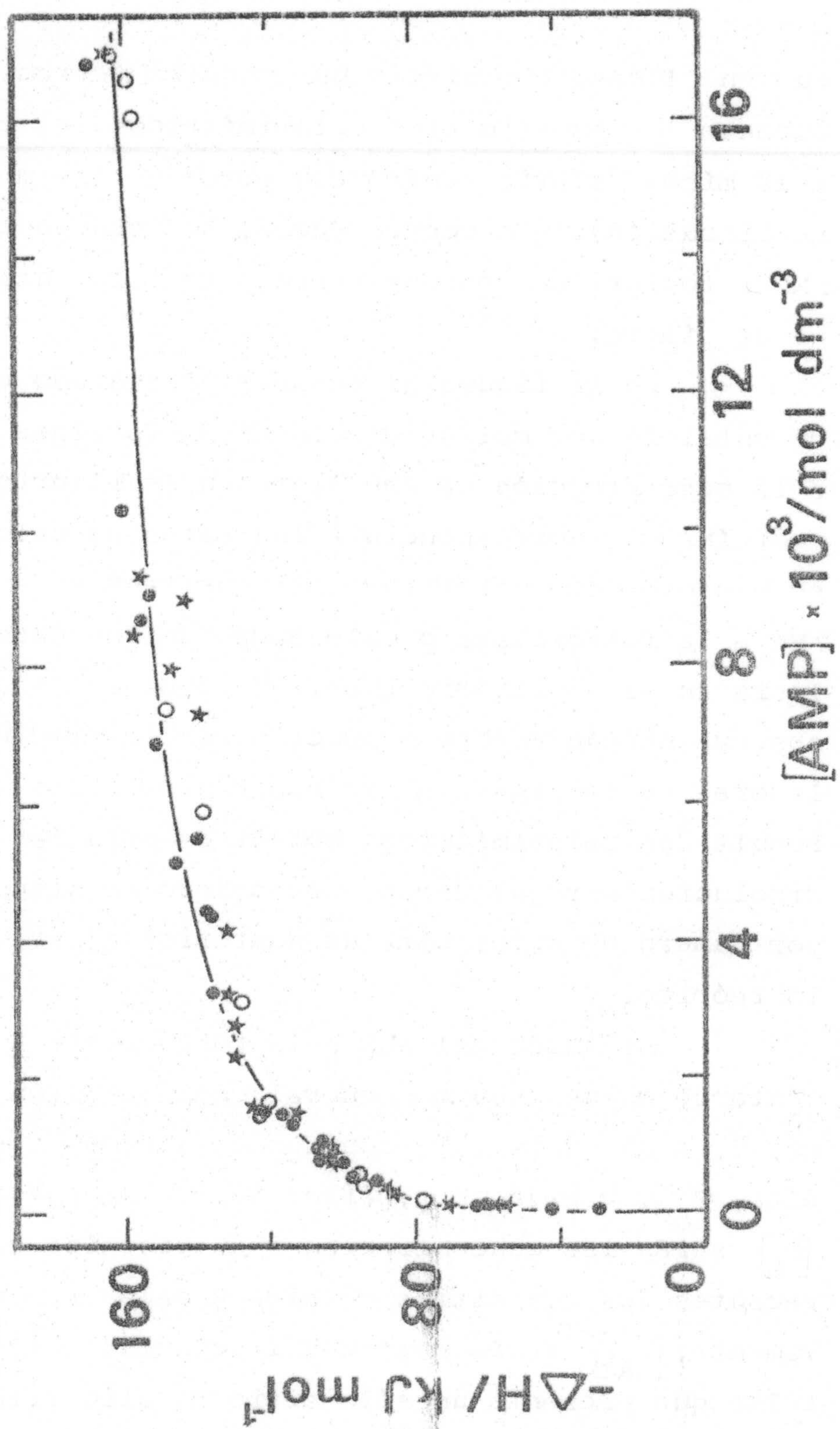
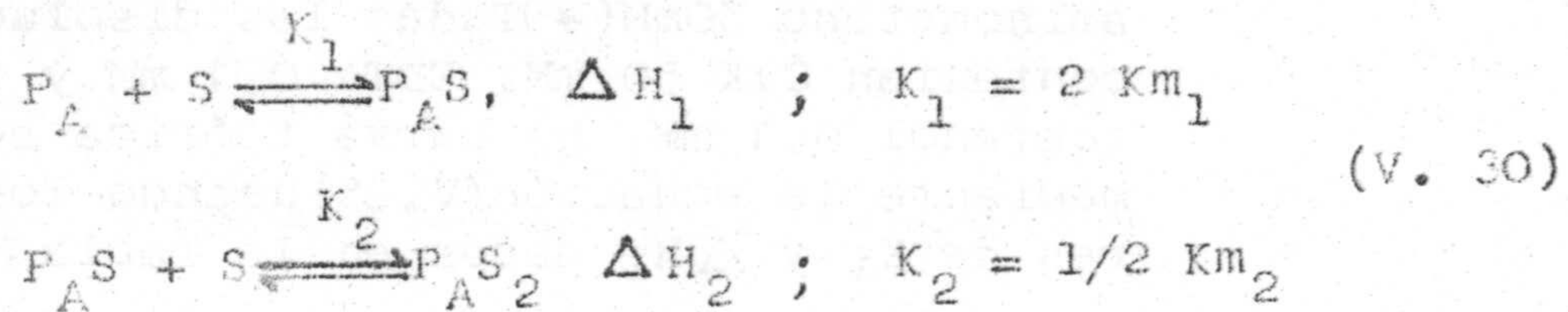


Figura 37. Curva de valoración calorimétrica de fosfo-

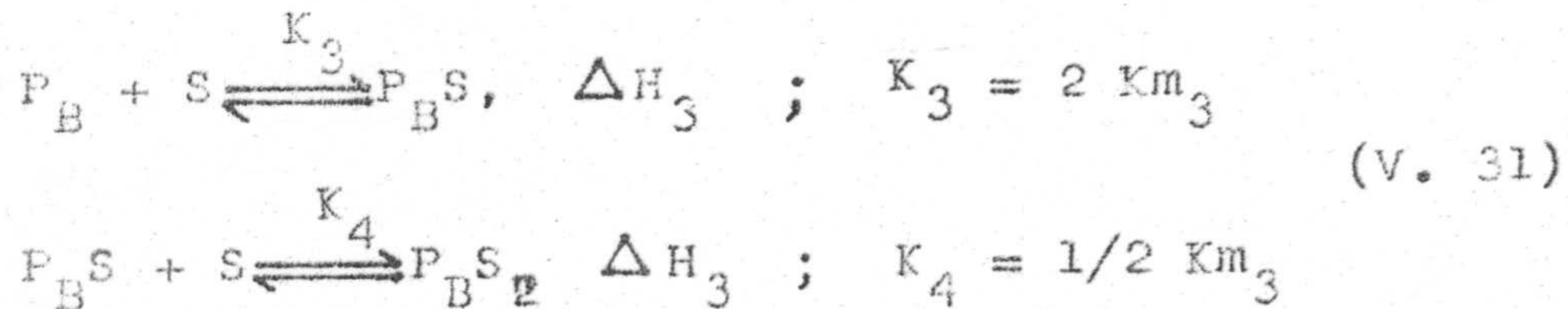
rilasa b con AMP a pH 6,9 y 25°C. El calor desprendido por unión de AMP al dímero de enzima, se ha representado frente a la concentración de AMP libre, la cual se obtuvo haciendo uso de las constantes de unión listadas en la Tabla I. La concentración de enzima fué 4 mg/ml. Se utilizó como disolución reguladora glicilglicina 50 mM (●), 2-glicerofosfato 50mM(O)Tris (hidroximetil) aminometano 50mM(★)Todas las disoluciones contenían ClK 50 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM. La curva teórica se dibujó mediante la ecuación(V.35) usando los valores de  $K_i$  y  $\Delta H_i$  dados en la Tabla III.

tración de enzima con ambos sitios de baja afinidad saturados independientemente del grado de ocupación por el ligando de sitios de alta afinidad, etc. La unión del ligando a la enzima se puede representar así por los siguientes equilibrios:

Unión a los sitios cooperativos de alta afinidad



Unión a los sitios no cooperativos de baja afinidad



donde  $K_i$  son las constantes de unión macroscópicas y  $K m_i$  son las constantes de unión microscópicas. En las ecuaciones anteriores se dan las relaciones entre estos dos tipos de constantes obtenidas de las ecuaciones (IV.11) y (IV. 6 ). Los valores  $\Delta H_i$  corresponden a los cambios de entalpía de unión del ligando a los diversos sitios.

Según los equilibrios definidos en las ecuaciones (V.30) y (V.31) el cambio de entalpía por mol de dímero de enzima,  $\Delta H$ , vendrá dado por la ecuación:

$$\Delta H = \frac{\Delta H_1 [P_A S] + (\Delta H_1 + \Delta H_2) [P_A S_2]}{[P_A] + [P_A S] + [P_A S_2]} + \frac{\Delta H_3 [P_B S] + 2 \Delta H_3 [P_B S_2]}{[P_B] + [P_B S] + [P_B S_2]} \quad (V. 32)$$

donde sustituyendo las concentraciones de todas las especies intermedias en función de la concentración de enzima libre,  $[P_A]$  ó  $[P_B]$  según corresponda, y de la concentración de ligando libre se obtiene la expresión:

$$\Delta H = \frac{\Delta H_1 K_1 [P_A S] + (\Delta H_1 + \Delta H_2) K_1 K_2 [P_A S]^2}{[P_A] + K_1 [P_A S] + K_1 K_2 [P_A S]^2} +$$

$$+ \frac{\Delta H_3 K_3 [P_B S] + 2\Delta H_3 K_3 K_4 [P_B S]^2}{[P_B] + K_3 [P_B S] + K_3 K_4 [P_B S]^2} \quad (V. 33)$$

Si en esta ecuación se sustituyen las constantes de unión macroscópicas por su correspondiente expresión en función de las constantes de unión microscópicas y se simplifica quedará de la forma:

$$\Delta H = \frac{\Delta H_1 2K_{m1} [S] + (\Delta H_1 + \Delta H_2) K_{m1} K_{m2} [S]^2}{1 + 2K_{m1} [S] + K_{m1} K_{m2} [S]^2} +$$

$$+ \frac{2\Delta H_3 K_{m3} [S]}{1 + K_{m3} [S]} \quad (V. 34)$$

Esta ecuación relaciona el cambio de entalpía por mol de dímero de enzima con la concentración de ligando libre. En nuestro sistema en estudio las constantes  $K_{m1}$  se obtuvieron de los experimentos de diálisis en el equilibrio (Tabla I). Por lo tanto, particularizando la ec. (V.32) a la unión de AMP a fosforilasa b, ésta adopta la expresión

$$\Delta H = \frac{\Delta H_1 \cdot 8 \cdot 10^3 [\text{AMP}] + (\Delta H_1 + \Delta H_2) \cdot 106 \cdot 10^6 [\text{AMP}]^2}{1 + 8 \cdot 10^3 [\text{AMP}] + 106 \cdot 10^6 [\text{AMP}]^2} + \frac{\Delta H_3 \cdot 640 [\text{AMP}]}{1 + 320 [\text{AMP}]} \quad (\text{v. 35})$$

Se aplicó el método de Gauss-Newton para determinar los valores óptimos de  $\Delta H_1$ ,  $\Delta H_2$  y  $\Delta H_3$  en el ajuste de los datos experimentales a la ecuación (v. 35) encontrándose los valores de  $-27,0^{+7}$ ,  $-70,0^{+9}$  y  $-38,6^{+2}$  kJ/mol respectivamente. A partir de estos valores de los cambios de entalpía y de las constantes de equilibrio (Tabla I) se obtuvo el cambio de energía de Gibbs y el cambio de entropía debidos a la unión del nucleótido a cada uno de los sitios de la fosforilasa b.

Se han realizado también experimentos calorimétricos de unión de fosforilasa b al AMP en presencia de uno de los sustratos, el fosfato. Los resultados obtenidos de esta valoración calorimétrica a 25°C y pH 6,9 se muestran en la figura 38. La concentración de fosfato en estos experimentos fué 20 mM y las demás condiciones (pH, fuerza iónica, disolución reguladora y temperatura) fueron las mismas que las de la figura 33. Bajo las condiciones de la figura 38 que son más próximas a las que se utilizan en las medidas de actividad catalítica, el perfil de la curva de valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP cambia sustancialmente respecto del que presentaba en ausencia de sustratos. En este caso la saturación por AMP parece alcanzarse a concentraciones de nucleótido del orden de 1 mM habiendo au-

mentado aparentemente la afinidad del AMP por la fosforilasa b.

En estos experimentos las disoluciones tanto de enzima como de AMP poseen inicialmente la misma concentración de fosfato, así, la enzima se encuentra unida a fosfato previamente a su unión al AMP. Sin embargo, de acuerdo con Buc et al. (58) la afinidad del fosfato por la fosforilasa b aumenta en presencia de AMP. Por lo tanto, al ser la concentración de fosfato usada en estos experimentos inferior a la requerida para la saturación de la enzima, (58), al mezclarse las disoluciones de AMP y fosforilasa b en la célula calorimétrica, además del proceso de unión del AMP a la enzima deberá tener lugar una unión adicional de fosfato a la misma. Este último proceso irá acompañado de un efecto calorífico que estará contribuyendo al calor medido experimentalmente. Considerando además que la presencia simultánea de fosfato y AMP desplaza el equilibrio dímero - tetramero hacia esta última forma (70), habría una contribución al calor total debido a esta asociación. Es evidente que el análisis cuantitativo de los datos calorimétricos de la figura 39 cae fuera de lugar dada la complejidad de los diversos procesos que parecen tener lugar en la unión del AMP a la enzima. No obstante, aún teniendo presente la complejidad de esta curva calorimétrica, de la observación de la misma (figura 38) parece deducirse que a partir de 1 mM donde se alcanza un plateau no se produce más unión de AMP a la enzima cuando hay fosfato (20 mM) en el medio. Este hecho se comenta-



rá en la Discusión de esta Memoria al comparar nuestros resultados calorimétricos con los de otros autores (74, 75,81,82).

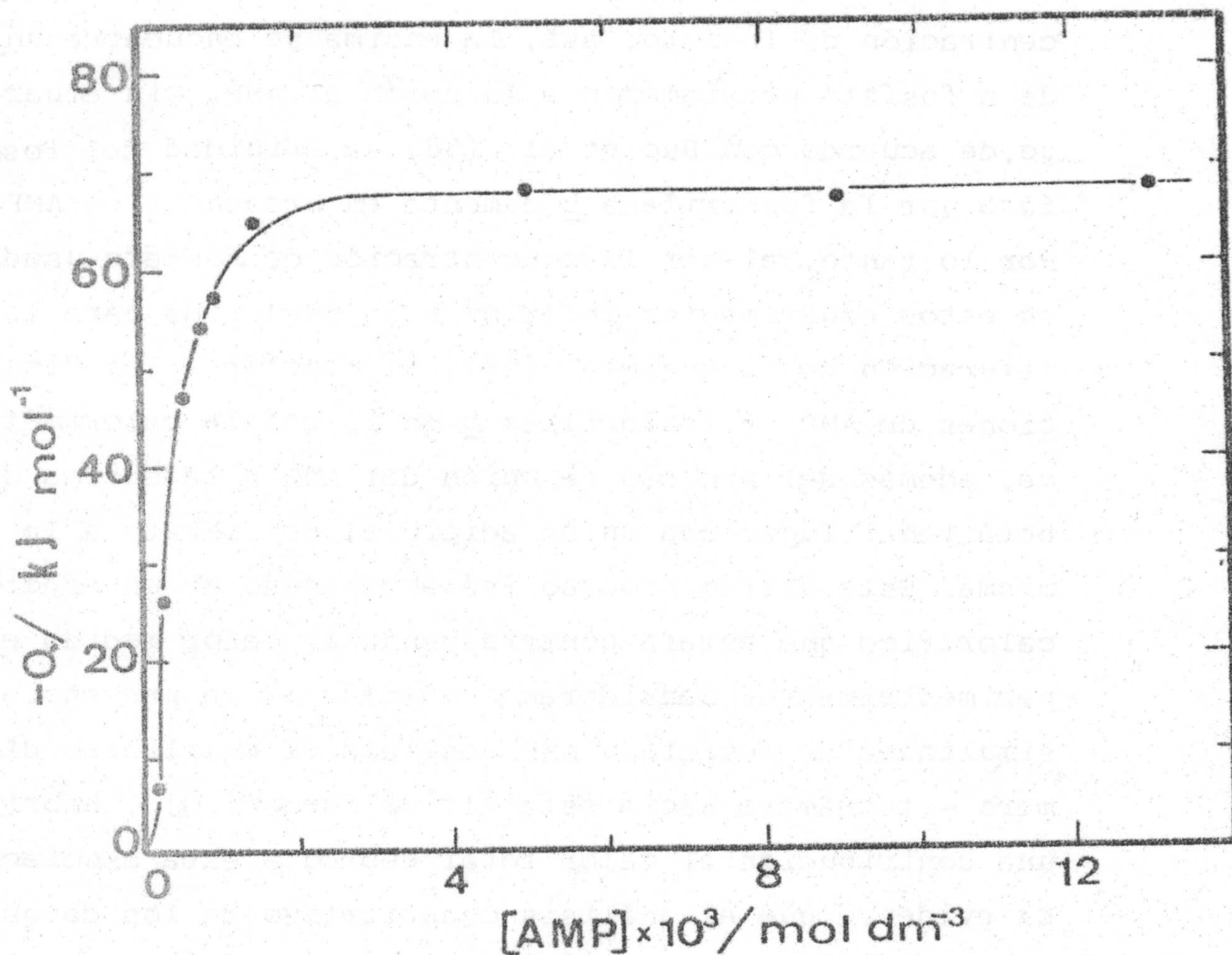


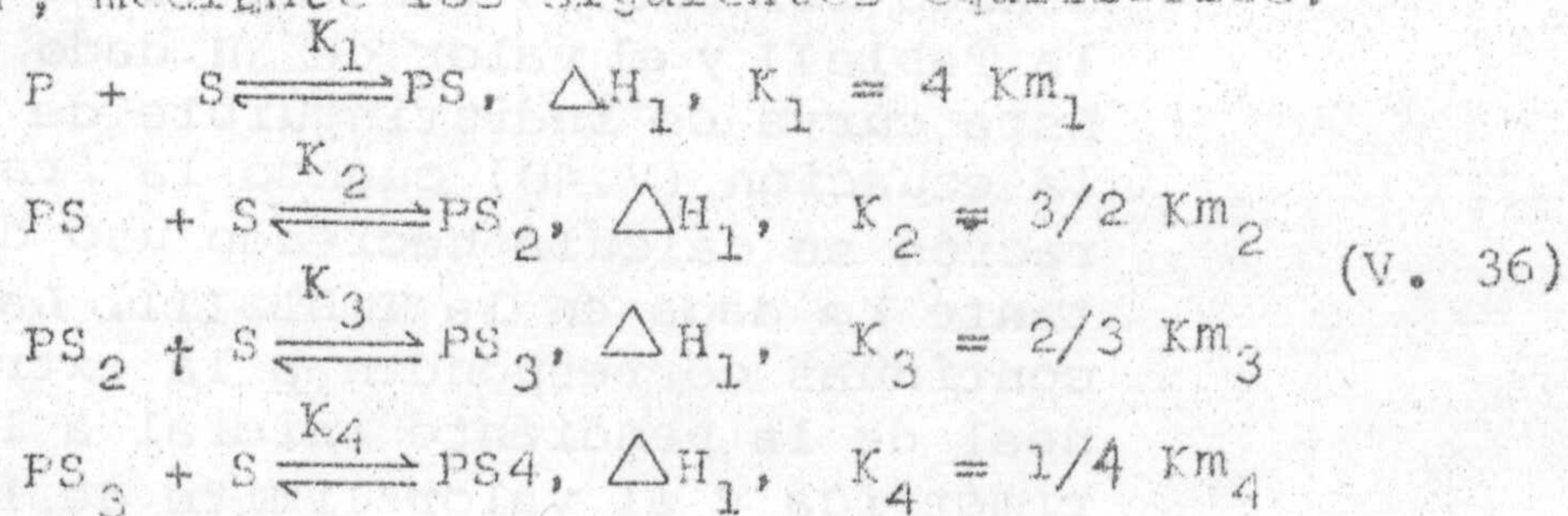
Figura 38. Curva de titulación calorimétrica de fosforilasa b con AMP en presencia de fosfato. Fosforilasa b (4mg/ml) disuelta en Tris 50 mM, ClK 16 mM, EDTA 0,1 mM,  $P_i$  20 mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM (pH 6,9) se tituló con AMP disuelto en el mismo tampón.

### 3.2. Interacción fosforilasa $\alpha$ - AMP

La curva de valoración térmica de fosforilasa  $\alpha$  con AMP se muestra en la figura 39. La unión del nucleótido a la forma  $\alpha$  de la enzima resultó ser exotérmica en las condiciones examinadas, pH 6.9 y 25°C.

La fosforilasa  $\alpha$  en las condiciones de nuestros experimentos, 3 mg/ml de concentración y 25°C, se encuentra en forma de tetrámero, no alterando su estado de agregación al unirse al AMP (104,126).

En el análisis de los datos obtenidos mediante experimentos de diálisis en el equilibrio se obtuvo un único sitio por monómero de enzima para la unión del AMP dentro del rango de concentración de nucleótido estudiado. Estos mismos experimentos dieron como resultado una cooperatividad muy baja entre los sitios de unión, reflejada en un coeficiente de Hill de 1,1. Por lo tanto, en el análisis de los datos calorimétricos se considerará que el cambio de entalpía,  $\Delta H_1$ , producido al unirse el AMP a cada uno de los sitios del tetrámero de fosforilasa  $\alpha$  es el mismo para todos los sitios. Así, la unión del AMP a la fosforilasa  $\alpha$  puede representarse en forma general como la unión de un ligando, S, a una enzima, P, mediante los siguientes equilibrios:



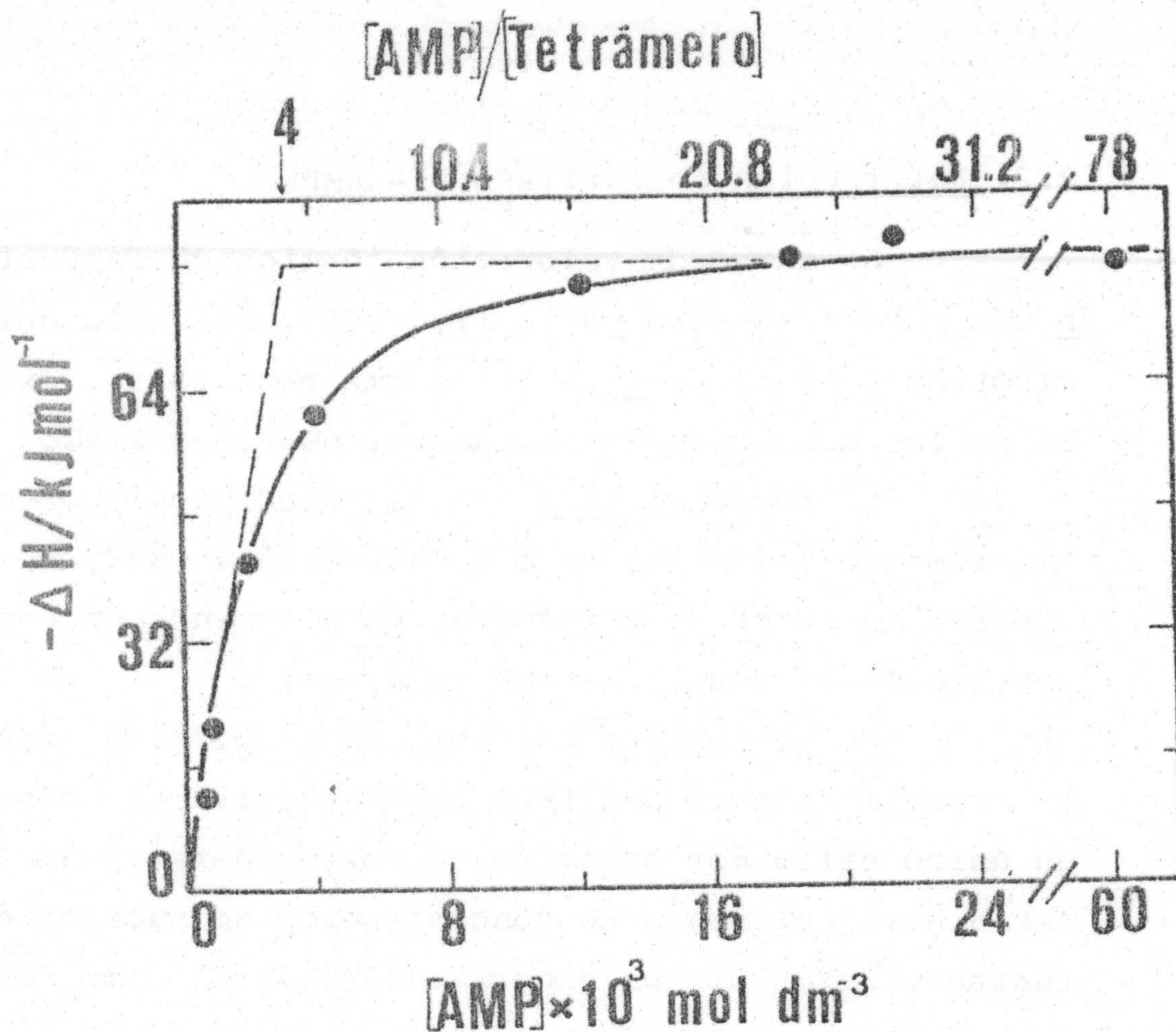


Figura 39. Curva de valoración calorimétrica de fosforilasa con AMP a pH 6.9 y 25°C. El calor desprendido por tetramero de enzima en su unión al AMP se ha representado frente a la concentración de [AMP] total y también frente a la relación de  $\frac{[\text{AMP}] \text{ total}}{[\text{tetramero}]}$ . La concentración de enzima fue 3 mg/ml ( $0.77 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) en hepes 50 mM ClK 50mM, EDTA 0,1mM y 2-mercaptoetanol 0,1mM. La curva se dibujó a partir de la ecuación (V.39) usando las cuatro constantes de unión dadas en la Tabla II y el valor de  $\Delta H$  dado en la Tabla III. Esta curva es indistinguible de la obtenida de la ecuación (V.40) cuando la fracción de saturación se calcula haciendo uso de la única constante  $K_m$  dada en la Tabla III. Las líneas discontinuas corresponden a la extrapolación lineal de la pendiente inicial a la curva calorimétrica y al valor límite de la entalpía de saturación.

donde  $K_i$  son las constantes de unión macroscópicas y  $Km_i$  las constantes de asociación microscópicas. Las relaciones entre ambas constantes dadas en la ecuación se obtuvieron a partir de la ecuación (IV.6).

Según el esquema de reacciones dado en la ecuación (V. 36), el cambio de entalpía por mol de tetrámero de enzima,  $\Delta H$ , se puede expresar en función de la concentración de los productos formados en cada una de las reacciones mediante la ecuación:

$$\Delta H = \frac{\Delta H_1 [PS] + 2\Delta H_1 [PS_2] + 3\Delta H_1 [PS_3] + 4\Delta H_1 [PS_4]}{[P] + [PS] + [PS_2] + [PS_3] + [PS_4]} \quad (V. 37)$$

donde expresando las concentraciones de las especies intermedias en función de la concentración de ligando libre y de las constantes de asociación macroscópicas se obtiene:

$$\Delta H = \frac{\Delta H_1 (K_1 [P][S] + 2K_1 K_2 [P][S]^2 + 3K_1 K_2 K_3 [P][S]^3 + 4K_1 K_2 K_3 K_4 [P][S]^4)}{[P] + K_1 [P][S] + K_1 K_2 [P][S]^2 + K_1 K_2 K_3 [P][S]^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 [P][S]^4} \quad (V. 38)$$

Sustituyendo las constantes de unión macroscópicas en función de las microscópicas y simplificando en la ecuación anterior, el cambio de entalpía,  $\Delta H$ , vendrá dado por:

$$\Delta H = \Delta H_1 \frac{Km_1 [S] + 3Km_1 Km_2 [S]^2 + 3Km_1 Km_2 Km_3 [S]^3 + Km_1 Km_2 Km_3 Km_4 [S]^4}{1 + 4Km_1 [S] + 6Km_1 Km_2 [S]^2 + 4Km_1 Km_2 Km_3 [S]^3 + Km_1 Km_2 Km_3 Km_4 [S]^4} \quad (V. 39)$$

Comparando el cociente de esta ecuación con la ecua -

ción (V. 13) se observa que su valor es cuatro veces el valor de la fracción de saturación, Y. Por lo tanto, la ecuación anterior puede expresarse como:

$$\Delta H = \Delta H_1 \cdot 4 \cdot Y \quad (V.40)$$

Esta ecuación permite calcular el cambio de entalpía por sitio de unión del ligando, siendo necesario únicamente conocer la fracción de saturación, Y, que corresponde a cada cambio de entalpía,  $\Delta H$ , medido experimentalmente. Los valores de Y se determinaron a partir de los datos de concentración total de AMP haciendo uso de las constantes de unión (Tabla II) obtenidas mediante experimentos de diálisis en el equilibrio.

En la figura 40 se han representado gráficamente los valores de  $\Delta H$  frente a la fracción de saturación, obteniéndose a partir de la pendiente de la recta el valor de  $-19,9 \pm 1$  kJ/mol correspondiente al cambio de entalpía por sitio de unión.

Se hizo esta representación gráfica para unos valores de Y obtenidos a partir de los datos de concentración total de AMP y haciendo uso de la única constante de unión  $K = 1,8 \cdot 10^5 M^{-1}$  (Tabla III). En este caso se obtuvo el mismo valor de  $\Delta H_1$ .

En la figura 41 se ha representado el cambio de entalpía en función de la concentración de AMP libre, que fué obtenida haciendo uso de las constantes de unión de AMP a fosforilasa a en la Tabla II. Como se ve en esta figura la saturación por AMP se alcanza a concentraciones de AMP libre del orden de  $10^{-4}$  M, lo que indica una

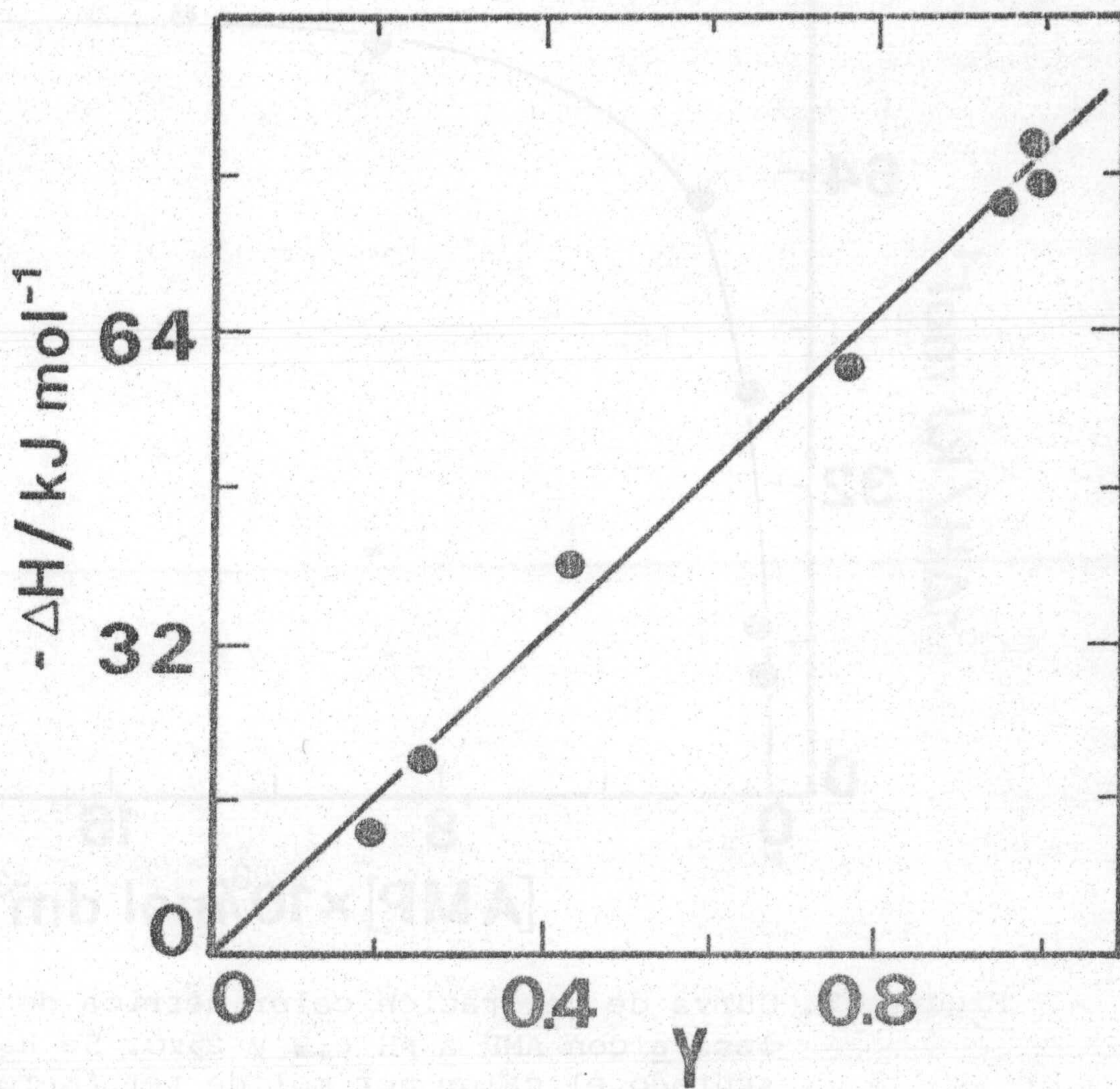


Figura 40. Dependencia de la entalpia de unión de AMP a fosforilasa a con la fracción de saturación. Se han representado los valores del cambio de entalpia dados en la figura 39 frente a la fracción de saturación obtenida de la ecuación (V.13) para las constantes dadas en la Tabla II. La recta corresponde al ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales.

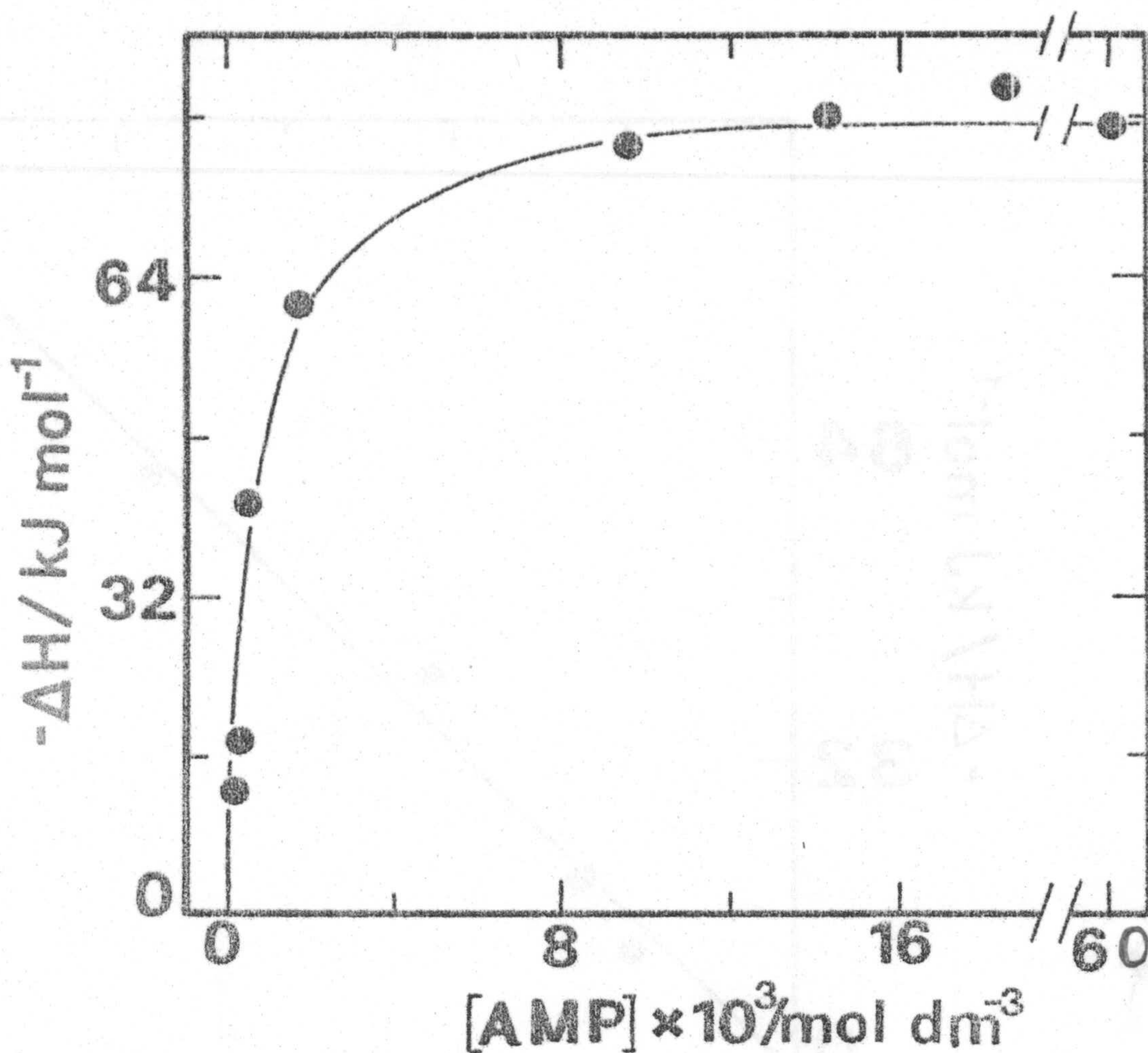


Figura 41. Curva de valoración calorimétrica de fosforilasa a con AMP a pH 6,9 y 25°C. Se ha representado el calor por mol de tetrámero de fosforilasa a frente a la concentración de AMP libre, la cual se obtuvo haciendo uso de las constantes listadas en la Tabla II. Las condiciones experimentales están incluidas en la figura 39. La curva dibujada corresponde a la ecuación (V. 39) para los valores de las constantes dadas en la Tabla II. Esta curva es prácticamente indistinguible de la obtenida usando la ecuación (V. 13) para un único valor de la constante (Tabla III).

afinidad por el nucleótico mucho mayor que en el caso de la forma b de la enzima. Este hecho quedó igualmente reflejado al comparar los experimentos de diálisis realizados con ambas formas de la enzima.

En el apartado (V.2.3.) se indicó que al ser muy pequeña la cooperatividad positiva existente entre sitios de unión el sistema podría en principio considerarse no cooperativo obteniéndose una única constante microscópica de unión para el AMP. Así, considerando el sistema no cooperativo los datos de calorimetría podrían proporcionar el valor de una única constante de unión y del cambio de entalpía por sitio de unión aplicando el proceso iterativo ( 85 ) descrito en Métodos (IV.4.3 ) Mediante este proceso se obtuvieron valores de la constante de unión y del cambio de entalpía por sitio de unión análogos, dentro del error experimental, a los valores obtenidos independientemente. Por lo tanto, al igual que en los experimentos de diálisis, se deduce que la unión de AMP a fosforilasa a puede también representarse adecuadamente por una única constante fenomenológica y un mismo calor para los cuatro sitios. En la figura 39 se han dibujado en líneas discontinuas la extrapolación lineal de la pendiente inicial a la curva de valoración calorimétrica de fosforilasa a con AMP y al valor límite de la entalpía de saturación. Como se observa en dicha figura, al punto de intersección de ambas líneas corresponde una relación de concentración de AMP total a concentración de tetrámero de enzima igual a 4, coincidiendo así con número de sitios del



tetrámero de fosforilasa a para la unión del AMP. Este hecho indica que la unión de este nucleótido a la enzima puede considerarse dentro del error experimental no cooperativa (sitios independientes) y, por tanto, con un mismo calor de unión de AMP por sitio .

Tabla III

Parámetros termodinámicos aparentes para la unión del AMP a glucógeno fosforilasa b y a de músculo de conejo, pH 6,9, temperatura 25°C.

	<u>Fosforilasa b</u>			<u>Fosforilasa a</u>		
	<u>Sitios de alta</u>	<u>Sitios de baja</u>	<u>Valor total por</u>	<u>Valor</u>	<u>Valor total por</u>	
	<u>afinidad (N)</u>	<u>afinidad (I)</u>	<u>mol de dímero</u>	<u>por sitio</u>	<u>mol de tetramero</u>	
	<u>1<sup>er</sup> sitio</u>	<u>2<sup>o</sup> sitio</u>	<u>3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> sitio</u>			
$K_m \cdot 10^{-3}/M^{-1}$	4,0 ± 1	26,5 ± 9	0,32 ± 0,2		180 ± 20	
$\Delta G^\circ/kJmol^{-1}$	-20,5 ± 1	-25,2 ± 1	-14,3 ± 2	-74,3 ± 3	-29,9 ± 1	-119,6 ± 2
$\Delta H^\circ/kJmol^{-1}$	-27,0 ± 7	-70,0 ± 9	-38,6 ± 2	-174,2 ± 12	-19,9 ± 1	-79,6 ± 2
$\Delta S^\circ/JKmol^{-1}$	-22 ± 23	-150 ± 30	-82 ± 10	-336 ± 40	+34 ± 4	+136 ± 8

### 3.3. Interacción fosforilasa b - IMP.

La unión de IMP a fosforilasa b se estudió también mediante calorimetría a 25°C y pH 6,9. En la figura 42 se ha representado el cambio de entalpía por mol de dímero de fosforilasa b frente a la concentración de IMP total en el equilibrio. En esta figura se muestran los resultados obtenidos en dos disoluciones reguladoras diferentes, Tris y glicil-glicina, pudiéndose comprobar que no existe ningún efecto aparente en el proceso de unión producido por ambas disoluciones reguladoras.

Los experimentos realizados en glicil-glicina se hicieron de la manera descrita en Métodos (IV.4.2.). Sin embargo, para los experimentos realizados en Tris se utilizó un método de gradiente exponencial de concentración desarrollado por Mountcastle et al.(131). Este método permite obtener una curva de valoración calorimétrica en menor tiempo que el procedimiento descrito en Métodos. Un gradiente exponencial decreciente continuo de concentración se puede generar por dilución continuadel reactivo en un recipiente que mantiene el volumen de la disolución constante. Inicialmente el recipiente contiene el reactivo a concentración  $C_0$ ; a un flujo constante se le introduce disolvente y con el mismo flujo sale del recipiente la disolución a una concentración  $C$ , cuya dependencia con el tiempo viene dada por la ecuación:

$$C = C_0 \exp (-f \cdot t/v) \quad (V. 41)$$

donde  $v$  es el volumen del recipiente,  $f$  el flujo de en-

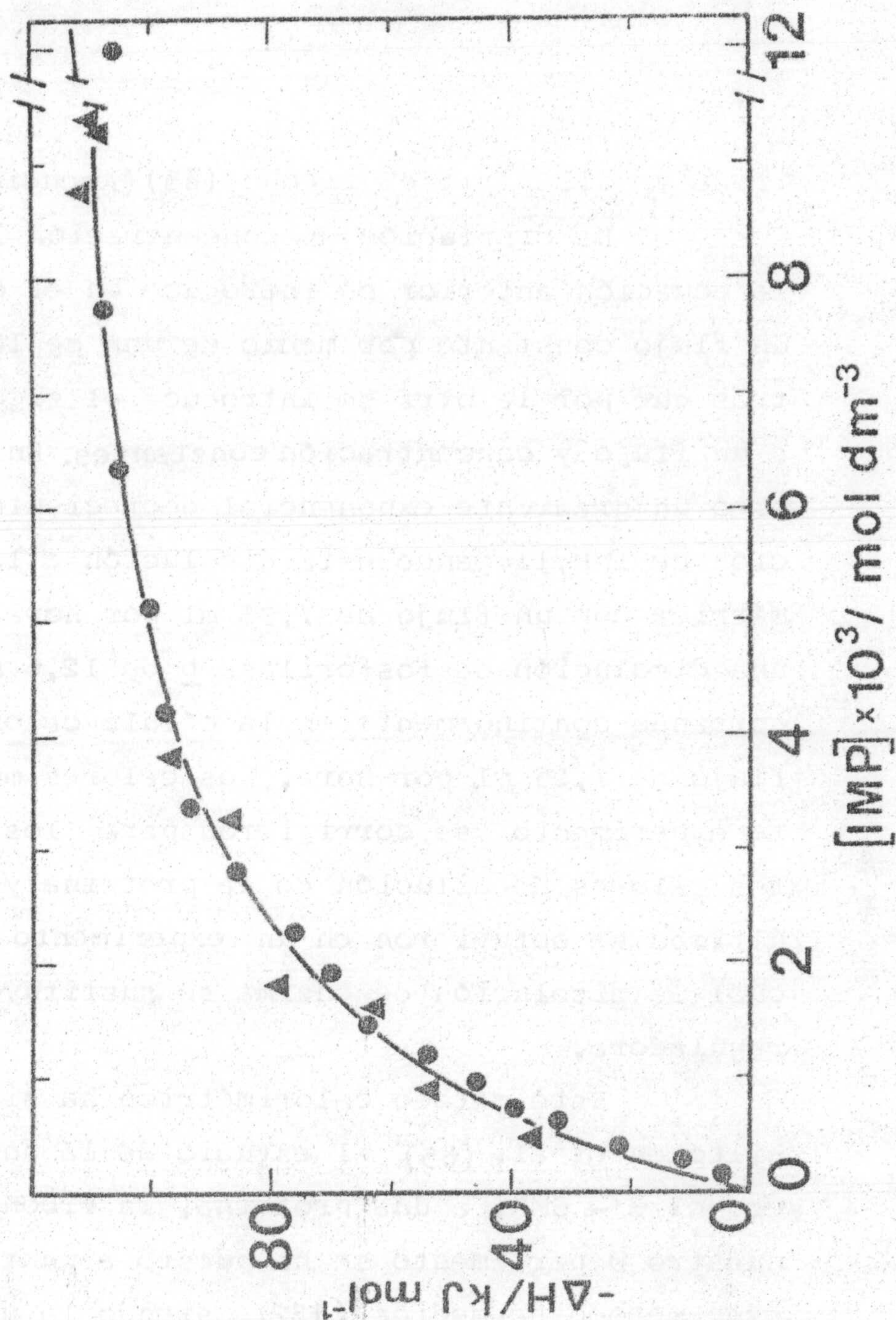


Figura 42. Curva de valoración calorimétrica de fosforilasa  $\beta$  con IMP. La concentración de enzima fue 12,6 mg/ml a pH 6,9 en ClK 50mM, EDTA 0,1mM y 2-mercaptoetanol 0,1 mM. Los experimentos calorimétricos se realizaron en glicil-glicina 50mM por el procedimiento descrito en Métodos (▲), y en Tris 50mM por un método de gradiente continuo exponencial decreciente de concentración (●) (ver Texto). La línea incluida corresponde a la ecuación (V.42) con los valores de  $K_i$  y  $\Delta H_i$  incluidos en la Tabla IV.

trada y salida y  $t$  el tiempo (85) (Apendice 4).

La disolución de concentración  $C$  definida por la ecuación anterior se introduce en el calorímetro a un flujo constante por medio de una de las bombas mientras que por la otra se introduce el siguiente reactivo a un flujo y concentración constantes. En nuestro caso se creó un gradiente exponencial decreciente de concentración de IMP, llegando esta disolución a la célula calorimétrica con un flujo de 7,93 ml por hora, mientras una disolución de fosforilasa b de 12,6 mg/ml se mantuvo entrando continuamente en la célula calorimétrica a un flujo de 7,25 ml por hora. Los calores medidos para este experimento se corrigieron para los correspondientes calores de dilución de la proteína y del IMP. Estos últimos se obtuvieron en un experimento análogo en el cual la disolución de enzima se sustituyó por disolución reguladora.

Este método calorimétrico ha sido aplicado por Biltonen et al. (85) el estudio de la unión de un ligando, el 3'-CMP, a una proteína, la ribonucleasa A. En nuestro Departamento se ha puesto a punto recientemente este método de medida (132), siendo la unión del IMP a la fosforilasa b el primer caso en el que lo aplicamos a una reacción en la que interviene una macromolécula y que, como se deduce de la figura 42, permite alcanzar resultados totalmente comparables a los obtenidos realizando los experimentos de la manera descrita en Métodos, con ganancias de tiempo y de cantidades de reactivos necesarias.

Los datos experimentales de la valoración calori

rimétrica se han ajustado tanto al caso de sitios independientes (con dos constantes,  $K_A$  y  $K_B$ , calculándose dos valores de  $\Delta H$  correspondientes) como el caso de cooperatividad positiva entre los sitios N del dímero (con las constantes  $K_{m_1}$ ,  $K_{m_2}$  y  $K_B$  y obteniéndose por tanto tres valores de  $\Delta H$  para estas uniones).

Como queda explícito en la sección anterior la evidencia Bibliográfica disponible está unánimemente de acuerdo con este segundo supuesto o modelo de trabajo (61,87). Por otra parte, los cálculos de los diversos valores de  $\Delta H$  implicados en los dos tipos de ajustes citados, y que son obviamente compatibles entre sí dentro del error experimental y de ajuste a la ecuación correspondiente (es decir,  $\Delta H_1 + \Delta H_2 = 2\Delta H_A$  y  $\Delta H_3 = \Delta H_B$ ), proporcionan (desde el punto de vista de la desviación standard de los puntos experimentales a los ajustes de las curvas calorimétricas teóricas correspondientes) una mejora del 12,5% en la bondad del ajuste al considerar los sitios de alta afinidad como cooperativos. Por lo tanto, existen razones para decidirse por este último tipo de comportamiento del sistema dentro de los teóricos posibles y se describe así a continuación el cálculo de los  $\Delta H$  de unión del IMP a los sitios N e I de la enzima.

Al considerar pues la unión cooperativa del IMP al sitio N nos encontramos con una situación análoga a la unión del AMP a esta misma forma de la enzima. Por lo tanto, el cambio de entalpía por mol de dímero de fosforilasa b en función de la concentración de ligando

libre vendrá definida por la ecuación (v. 34), en la que sustituyendo las constantes por los valores obtenidos por diálisis en el equilibrio y [S] por [IMP] se obtiene:

$$\Delta H = \frac{\Delta H_1 \cdot 1480 [S] + (\Delta H_1 + \Delta H_2) \cdot 1554 \cdot 10^3 [S]^2}{1 + 1480 [S] + 1554 \cdot 10^3 [S]^2} + \frac{\Delta H_3 \cdot 1200 [S]}{1 + 600 [S]} \quad (v. 42)$$

donde  $\Delta H_1$  y  $\Delta H_2$  son respectivamente los cambios de entalpía en la unión de la primera y segunda moléculas al sitio N de ambas subunidades, mientras  $\Delta H_3$  sería el correspondiente a la unión de este ligando a cualquiera de los dos sitios I de la enzima.

Por aplicación del Método de Gauss-Newton de optimización a la ecuación (v. 42), utilizando valores de partidas compatibles con los obtenidos en un primer ajuste supuestos los sitios independientes, se obtuvieron los siguientes valores que optimizaban el ajuste:  $\Delta H_1 = 18 \pm 5$ ;  $\Delta H_2 = 33 \pm 21$ ;  $\Delta H_3 = 37 \pm 13$  kJ/mol de sitios. En la Tabla IV se incluyen los parámetros termodinámicos de unión del IMP a la fosforilasa b para este ajuste. La curva teórica definida por la ecuación (v.42) para los  $\Delta H$  obtenidos es la que aparece representada en la figura 42.

Tabla IV

Parámetros termodinámicos aparentes para la unión del IMP a la glucógeno-fosforilasa b de músculo de conejo, pH 6,9, temperatura 25°C.

	<u>Sitios de mayor afinidad (N)</u>		<u>Sitios de menor afinidad(I)</u>	<u>Valor por mol</u>
	<u>1<sup>er</sup> sitio</u>	<u>2<sup>o</sup> sitio</u>	<u>3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> sitio</u>	<u>de dímero</u>
Km. $10^{-2}/M^{-1}$	7,4 $\pm$ 2	21,0 $\pm$ 21	6 $\pm$ 4	
$\Delta G^{\circ}/kJmol^{-1}$	-16,4 $\pm$ 1	-18,9 $\pm$ 3	-15,8 $\pm$ 2	-67 $\pm$ 4
$\Delta H^{\circ}/kJmol^{-1}$	-18,0 $\pm$ 5	-33,0 $\pm$ 21	-37,0 $\pm$ 13	-125 $\pm$ 28
$\Delta S^{\circ}/Jmol^{-1}K^{-1}$	-6 $\pm$ 12	-47 $\pm$ 71	-71 $\pm$ 44	-195 $\pm$ 95



TABLE

1. The first column contains the names of the authors of the papers.

2. The second column contains the titles of the papers.

3. The third column contains the page numbers of the papers.

4. The fourth column contains the volume numbers of the papers.

5. The fifth column contains the issue numbers of the papers.

6. The sixth column contains the years of publication of the papers.

7. The seventh column contains the names of the publishers of the papers.

8. The eighth column contains the names of the cities where the papers were published.

VI. DISCUSSION



El trabajo correspondiente a esta Memoria ha estado desde su planteamiento original dirigido al estudio de los sitios de unión de activadores a la fosforilasa en sus dos formas interconvertibles, a y b, y a la caracterización termodinámicas de los respectivos parámetros de unión.

El estudio de esta enzima, ampliamente investigada desde los años 30 (1), ha recibido un particular desarrollo en los últimos diez años con nueva información relativa tanto a su estado y propiedades en disolución como a su estructura cristalina (rayos X), lo que al permitir un conocimiento más íntimo de la misma ha desembocado a su vez en aspectos polémicos relacionados tanto con su interacción con ciertos ligandos tales como activadores, sustratos e inhibidores, como con el posible significado in vivo de dichas interacciones (86). El hecho de disponer en este Departamento, al margen de otras técnicas necesarias, de un sistema microcalorimétrico de reacción adecuado, permitía no solo el cálculo de sitios de unión en la enzima sino la presentación termodinámica de las interacciones correspondientes y el intento consecuente, y hasta ahora inédito, de una interpretación a nivel de detalle y mecanismo molecular de la información termodinámica.

Precisamente en este contexto y al realizar medidas preliminares calorimétricas de unión del AMP a la fosforilasa b nos encontramos con una primera dificultad ineludible: la irreproducibilidad de estas medidas. Se obtenían así inicialmente (como queda explícita

mente reseñado en su apartado de Resultados) perfiles calorimétricos bifásicos de magnitud variable, irreproducible, en ambos "plateaus". Esta situación exigió en su momento el detener lógicamente la línea marcada de trabajo y la necesidad de una serie de comprobaciones y controles a fin de elucidar el origen de esta dificultad como condición previa y necesaria. Esto supuso la realización de nuevas medidas no previstas inicialmente así como un replanteamiento lógico y estricto a fin de, por eliminación de posibilidades, encontrar la(s) causa(s) de estos resultados anómalos. El aspecto afortunado de estas dificultades fue el encontrar, tras el trabajo necesario, la existencia de una impureza y su posterior caracterización y eliminación (como se indica en Resultados) en las preparaciones de la enzima que, pese a su bajo nivel de contaminación (partes por millón), por su naturaleza a su vez enzimática catalizaba reacciones paralelas a las investigadas, originando así verdaderos artefactos en la medida. La importancia de este hallazgo, su posible incidencia en resultados y publicados por otros autores, y lo ineludible de su eliminación para ciertos tipos de medidas entre las que se encuentran las calorimétricas que incluyen al AMP, han dado ya lugar a dos publicaciones (Valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP (135) y Purificación de glucógeno fosforilasa b de actividad de AMP - aminohidrolasa (136)) que son una parte del trabajo que incluye la presente Memoria.

La exposición de esta Discusión se va pues

a iniciar con el apartado referente a esta impureza detectada y a su eliminación, para seguir posteriormente con el estudio de la interacción activador-enzima y la interpretación de los datos termodinámicos obtenidos para los diversos procesos investigados. En el primer apartado se ha preferido seguir un desarrollo lógico, más didáctico a nuestro entender, que la simple exposición cronológica del mismo.

Así pues, del apartado (V.- 1.1) de los Resultados se deduce que las preparaciones de fosforilasa b (y por tanto de fosforilasa a obtenida de aquella por acción de la fosforilasa quinasa, véase III.- 2) pueden y de hecho suelen ir acompañadas de una impureza de carácter enzimático, la AMP - aminohidrolasa, que cataliza la hidrólisis del AMP a IMP. La proporción de esta impureza es variable dependiendo de cada preparación particular (aunque siempre en los niveles de diversas p. p. m.).

A este respecto es interesante considerar que Johnson et al. (42) en 1974 observaron que durante el crecimiento de los cristales de fosforilasa b para estudios de difracción de rayos X el AMP se convertía en IMP. Este hecho lo atribuyeron a la posibilidad de que algunas de sus preparaciones de fosforilasa b estuvieran contaminadas por AMP - aminohidrolasa. Posibilidad que ha sido recogida por Fletterick y Madsen en una revisión bibliográfica reciente (12). Sin embargo la posible presencia de esta impureza en las preparaciones de la fosforilasa b no ha recibido posteriormente la suficien

te consideracion (de hecho, ninguna) por parte de los grupos de investigadores interesados en el estudio de fosforilasa b y que, como queda demostrado en esta Memoria, puede conducir a ciertos resultados totalmente erróneos. Busby et al. (137) determinaron el contenido de una fracción de una partícula de glucógeno y entre otras muchas enzimas encontradas junto a la fosforilasa b detectaron la presencia de AMP - aminohidrolasa. La actividad de esta impureza obtenida era tan alta que les llevó a manifestar que a esos niveles de AMP-aminohidrolasa estaba "prohibido" el estudio del efecto del AMP en el sistema. En su caso se convertía 1 mM de AMP en IMP en menos de 15 segundos en la partícula de glucógeno. Estos autores sin embargo no hacen ninguna referencia a que las preparaciones purificadas de fosforilasa b presentan o no algún nivel de actividad de esta enzima.

Nosotros hemos detectado transformaciones de AMP en IMP en aproximadamente un 50% de las preparaciones de fosforilasa b realizadas, aunque en muchos casos esta transformación era inapreciable hasta transcurridos 20 o 30 minutos. Como ya hemos descrito en Resultados (V.-1.1) se estudió la posibilidad de que la impureza presente en nuestras preparaciones fuese efectivamente AMP - aminohidrolasa y llegamos a una conclusión afirmativa apoyándonos en la siguiente serie de observaciones:

a) Después de un cierto tiempo, dependiendo de la preparación de enzima utilizada así como de la

concentración de fosforilasa b y AMP en la mezcla de reacción, el espectro UV de la disolución de AMP era prácticamente igual al del IMP (figura 19) y correspondía a una concentración de IMP análoga a la inicial de AMP. Por lo que parece deducirse que todo el AMP de la disolución había sido transformado en IMP.

b) De cuatro nucleótidos investigados AMP, ATP, IMP y UDP, sólo el AMP cambió su espectro UV al añadirle una disolución de fosforilasa b. De igual forma sólo la disolución que contenía fosforilasa b y AMP sufrió un cambio en el pH (figura 20), correspondiendo dicho cambio a la desaparición de un protón del medio por molécula de AMP presente. Este comportamiento frente a diversos nucleótidos es compatible con el hecho de que la impureza enzimática de las preparaciones de fosforilasa b sea la AMP - aminohidrolasa, ya que esta enzima no actúa sobre el UDP ni tampoco sobre el ATP (120) y no cataliza la reacción inversa, es decir, la transformación de IMP en AMP (120).

c) La extensión de la reacción de transformación de AMP disminuye considerablemente por la presencia de fosfato inorgánico, el cual es un inhibidor conocido de la AMP - aminohidrolasa (101,119).

Estos resultados llevan a la conclusión de que las preparaciones de fosforilasa b están de hecho contaminadas por trazas de AMP - aminohidrolasa, la cual como ya hemos dicho cataliza la hidrólisis de AMP con liberación de amoníaco (101,119), justificándose de esta forma la subida de pH como consecuencia de la reacción.



La razón de concentraciones de AMP - aminohidrolasa a fosforilasa b fué normalmente inferior a unas 20 p p m estando la cantidad de impureza presente comprendida entre 0,001% y 0,01% en aquellas preparaciones en las que se detectó actividad de AMP-aminohidrolasa. Aunque este nivel de impureza normalmente no es relevante, sin embargo, en experimentos como la valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP, conduce a resultados dramáticamente erróneos debido a las relativamente altas concentraciones necesarias tanto de enzima como de nucleótido y a la naturaleza enzimática de esta impureza. El hecho de encontrar las curvas calorimétricas de naturaleza bifásica y con distinto calor de saturación por AMP dadas en la figura 15 puede ser atribuido al uso de una preparación enzimática contaminada por AMP-aminohidrolasa. Por lo tanto, el segundo plateau que aparece en las curvas de esta figura debe ser el resultado de un proceso catalítico adicional a la unión del AMP a la fosforilasa b. De esta forma, el calor medido es debido a varios procesos, por una parte la unión del nucleótido a la fosforilasa b, que es una reacción suficientemente rápida como para finalizar completamente en la célula calorimétrica; por otra parte, el calor de hidrólisis de AMP y como esta reacción va acompañada de liberación de amoniaco se produce un calor adicional de desprotonización del tampón utilizado. La reacción de hidrólisis es lenta (figura 21) y no finaliza en el tiempo de residencia de los reactivos en la célula del calorímetro. El hecho de que esta reacción no alcance el equilibrio en la célula ca

calorimétrica se comprueba por la dependencia del calor producido con la velocidad de flujo de los reactivos (figura 15). Así conforme disminuye la velocidad de flujo, y por lo tanto aumenta el tiempo de permanencia de los reactivos en la célula del calorímetro, la reacción de hidrólisis se detecta en mayor extensión y el calor por mol de fosforilasa medido aumenta. El hecho de que la fosforilasa b estuviera impurificada por AMP - aminohidrolasa justifica lógicamente que los resultados calorimétricos no fueran reproducibles. Aquellas preparaciones con un nivel de impureza superior originarían curvas calorimétricas con valores de calor más elevados, ya que al aumentar la concentración de impureza aumenta la velocidad global de la reacción catalizada por ella.

Si se comparan los experimentos de valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP y con IMP se observa que sólo aquellos realizados con AMP presentaron anomalías, pues todos los hechos con IMP fueron totalmente reproducibles y el calor de la reacción no presenta ninguna dependencia con la velocidad del flujo al que los reactivos se introducían en el calorímetro. El hecho de que la fosforilasa b esté impurificada por AMP - aminohidrolasa justifica a su vez este distinto comportamiento calorimétrico de la enzima frente a estos dos nucleótidos.

En la mayoría de los experimentos calorimétricos los reactivos permanecen en la célula de medida del orden de 100 segundos. En este período de tiempo tan corto sólo una pequeña fracción del AMP se hidro-

liza a IMP, de manera que si estudiamos la reacción con una técnica que "observe" la transformación del AMP, por ejemplo espectrofotométricamente, en ese tiempo será indetectable el IMP que se ha producido debido a la presencia del AMP que aún queda sin transformar. Sin embargo, la transformación de esta pequeña cantidad de AMP puede alterar sustancialmente los resultados calorimétricos de unión del nucleótido a la fosforilasa b, ya que la concentración de AMP hidrolizado en este periodo de tiempo puede ser del orden de la concentración de enzima en la disolución, pues esta es aproximadamente dos órdenes de magnitud inferior a la total de nucleótido.

La AMP - aminohidrolasa se encuentra presente en muchos tejidos, pero su presencia es ubicua y con un nivel particularmente alto en el músculo (130), de donde se extrae la fosforilasa b utilizada en los experimentos realizados en esta Memoria. Los estudios de Busby et al (137) muestran que en una fracción de partícula de glucógeno junto a fosforilasa b hay AMP - aminohidrolasa y probablemente durante las primeras etapas de obtención de fosforilasa b la otra enzima estará presente en proporciones apreciables. Además de esto la AMP-aminohidrolasa presenta propiedades químico físicas suficientemente parecidas a las de la fosforilasa b como para explicar la presencia de esta impureza en las preparaciones de fosforilasa. Entre estas propiedades semejantes se encuentran algunas que podrían condicionar una separación incompleta de la AMP-aminohidrolasa de la fosforilasa en el proceso rutinario de obtención de esta última. Así,

ambas proteínas tienen un punto isoelectrico de 5,6 (8,119) mientras que la saturacion con sulfato amónico necesaria para conseguir la precipitacion de la proteina por efecto "salting out" es de 40 - 45% en ambas enzimas (91, 101). Este es un método de separación de algunas proteínas de la fosforilasa b que no será así efectivo para la eliminación de AMP - aminohidrolasa. El rango de pH en el que son estables ambas proteínas es también muy similar. Sin embargo, el ajuste del pH a 5,2 en la etapa de precipitación ácida en la obtención de fosforilasa b parece influir en la eliminación de AMP aminohidrolasa (figura 22), aunque no es posible normalmente una eliminación total de la impureza en esta etapa. El hecho de que la fosforilasa b se puede cristalizar favorece mucho la obtención de esta enzima con un elevado nivel de pureza. Aunque se ha comprobado que sucesivas cristalizaciones mejoran la pureza de la misma (figura 23), sin embargo, en las preparaciones que presentan actividad de AMP-aminohidrolasa no desaparece totalmente dicha actividad por recristalización.

La AMP - aminohidrolasa también ha aparecido como una impureza en las preparaciones de miosina (139). Así, Harrys y Suelter (140) encontraron que el nivel de impureza se podía reducir a unas pocas partes por millón por cromatografía en columna de fosfocelulosa. Esta impureza residual no afectaba significativamente los resultados con miosina cuando las concentraciones de nucleótido de sus experimentos eran bajas. Como normalmente las concentraciones de AMP utilizadas en nuestros

experimentos eran elevadas, necesitábamos un método mucho mas eficaz en la eliminacion de AMP - aminohidrolasa. Como ya se ha descrito en Resultados, se encontró un método original muy simple y eficaz para este propósito. Este método se basa en el uso de un adsorbente, la alúmina  $C\gamma$ , de gran selectividad y eficacia en la adsorción de AMP - aminohidrolasa. De hecho, este adsorbente es el utilizado por Nikiforuck y Colowick (101) en el proceso de obtención de esta enzima. Como se puede ver en la figura 23, la incubación de fosforilasa b con pequeñas cantidades de alúmina  $C\gamma$  (como se ha descrito en Métodos) eliminó totalmente las trazas de AMP-aminohidrolasa de la preparacion de fosforilasa en un corto periodo de tiempo, permitiendo la recuperación de la enzima con un rendimiento superior al 80% y la misma actividad que tenía antes de la adición del adsorbente.

Al realizar la valoracion calorimétrica de fosforilasa b, purificada con alúmina  $C\gamma$ , con AMP se obtuvo una curva monofásica (figuras 33, 34 y 35) totalmente reproducible y con un valor de calor a saturacion de AMP independiente de la velocidad de flujo de los reactivos. Este hecho contrasta con la dependencia con la velocidad de flujo que presentaban las curvas bifásicas. Por lo tanto puede concluirse que la curva monofásica (figuras 33, 34 y 35) es precisamente la correspondiente a la valoracion calorimétrica de fosforilasa b con AMP, diferenciándose así de las curvas bifásicas publicadas por dos grupos de investigadores que fácilmente las adscribían a dos tipos de sitios de unión en la fosfo-

rilasa b para el AMP (74,81,82). A pesar de que ambos grupos de autores encuentran curvas de un tipo de perfil parecido, discrepan marcadamente en cuanto a la magnitud del calor obtenido a concentraciones saturantes de AMP. Puesto que esta discrepancia ha sido atribuida por uno de dichos grupos (141) al uso de diferentes disoluciones reguladoras, nosotros hemos obtenido la misma curva de valoración calorimétrica, dentro del error experimental, utilizando los dos tampones empleados por estos autores e incluso con otro tampón adicional. Por lo tanto, podemos afirmar que no se puede atribuir al tampón ninguna influencia en la magnitud de la entalpía de unión del AMP a la fosforilasa b, particularmente a los denominados sitios de alta afinidad de la misma por el nucleótido (veáse más adelante).

Los únicos autores que muestran una curva de valoración calorimétrica monofásica para este sistema son Steiner et al (129). Sin embargo, la concentración máxima de AMP en sus experimentos, 1 mM, es muy inferior a la más elevada de los nuestros, 17 mM. Así, el calor máximo que encuentran es inferior al calor a saturación obtenido en nuestros experimentos, aunque es comparable al valor de calor que muestran ambas curvas calorimétricas para un mismo nivel de concentración de AMP. En todo este contexto, es interesante mencionar que el calor por mol de monómero de nuestros resultados concuerda bastante bien con la entalpía de unión de van't Hoff publicada por Kastenschmidt et al. (80) para este sistema (16,9 kcal/mol).

De todo lo expuesto anteriormente podemos sacar la conclusión de que la AMP - aminohidrolasa es una enzima que puede estar normalmente presente en las preparaciones de fosforilasa b el nivel de partes por millón. Es posible que en esta proporción tan baja en que se encuentra la AMP - aminohidrolasa respecto de la fosforilasa b puedan existir otras enzimas acompañando también a la fosforilasa, las cuales no se podrán detectar por los métodos convencionales de determinación de la pureza de una proteína. Entre estos métodos se encuentra la electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida. Así, se comprobó la pureza de la fosforilasa b mediante esta técnica y, aunque la enzima presentaba actividad de AMP - aminohidrolasa, como era de esperar, dada la baja proporción de impureza, sólo dió una única banda nítida, indicando una elevada pureza.

Algunas enzimas para realizar su función catalítica necesitan la presencia de varios compuestos, uno o mas sustratos, activadores etc. Sin embargo, la AMP-aminohidrolasa para hidrolizar el AMP no requiere activadores ni otros compuestos adicionales, aunque según algunos autores (121) necesita la presencia de iones positivos, que suelen existir en una disolución tamponada. La AMP-aminohidrolasa puede pues, a niveles de impureza, catalizar sin trabas o requisitos especiales "su reacción" siempre que, obviamente, se encuentre presente el AMP.

Es evidente que esta impureza no puede afectar los experimentos en los que no intervenga el AMP; dado en

el nivel tan bajo en el que se encuentra, tampoco afectará significativamente aquellos experimentos que necesiten pequeñas concentraciones de fosforilasa, particularmente cuando el AMP tampoco sea muy concentrado. Sin embargo, cuando se utilizan técnicas que requieran concentraciones altas de fosforilasa y AMP, y especialmente las que necesitan tiempos largos de incubación para su realización, esta impureza puede introducir importantes artefactos en los resultados, llevando así a interpretaciones erróneas. Un ejemplo de esta situación poco deseable podría ser el estudio de la interacción de fosforilasa b con AMP por técnicas tales como diálisis en el equilibrio, microcalorimetría y difracción de rayos X. Así, algunas discrepancias existentes en la Bibliografía podrían ser debidas a la presencia de esta impureza en las preparaciones de fosforilasa b y consideramos que en cualquier estudio donde el AMP y la fosforilasa b se encuentren en concentraciones elevadas debería previamente comprobarse si la preparación de enzima presenta actividad de AMP - aminohidrolasa. Este control es tanto mas necesario si se va a utilizar alguna de las técnicas indicadas anteriormente que requieren periodos largos de incubación y, particularmente, si además la técnica no permite distinguir el AMP del IMP como, por ejemplo, le ocurre a la difracción de rayos X, a la calorimetría o a la diálisis en el equilibrio cuando solo se usa un contaje radiactivo de  $^{14}\text{C}$  sin control espectrofotométrico.



Una vez que se había encontrado la causa (existencia de una impureza de AMP - aminohidrolasa en las preparaciones de fosforilasa) que originaba las anomalías en las medidas calorimétricas de unión de AMP a fosforilasa b y se había conseguido eliminarla, fue cuando se pudo en realidad comenzar el estudio calorimétrico de la unión de activadores a la fosforilasa en sus formas a y b.

Con objeto de utilizar siempre fosforilasa libre de actividad de AMP - aminohidrolasa, en el proceso de obtención de la primera se incluyó una etapa adicional, antes de la última recristalización, en la que se purificaba la enzima con alúmina C<sub>γ</sub> de la manera descrita en Métodos. Con la enzima así purificada no se detectó en posteriores estudios de unión de AMP a la misma mediante calorimetría o diálisis en el equilibrio ninguna anomalía y los resultados fueron siempre reproducibles. Consideramos pues conveniente y lo proponemos como control rutinario, el realizar esta nueva etapa de purificación con alúmina C<sub>γ</sub> en la obtención de la fosforilasa cuando ésta vaya a destinarse a estudios en los que intervienen el AMP y la enzima a concentraciones relativamente grandes.

Los resultados expuestos en la presente Memoria llevan a la conclusión, indicada anteriormente en esta Discusión, de que la curva de valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP es de naturaleza monofásica

figura 37 ) y no bifásica como era aceptado hasta el presente. A partir de técnicas diferentes(4,5,51,65,133) se ha demostrado, y es hoy día bien sabido, que la unión del AMP a esta forma de la enzima es cooperativa. Este hecho imposibilita la obtención, a partir exclusivamente de un análisis de la curva de valoración calorimétrica, de los parámetros termodinámicos que caracterizan la unión del AMP a la enzima a la temperatura de estudio, 25°C. Tampoco es posible incluso determinar el número de sitios de unión del nucleótido a la misma. La determinación de este último dato nos resultaba de gran interés ya que ha sido un punto conflictivo en los últimos años, no existiendo evidencias claras acerca del número de sitios por subunidad de enzima a los que se une el AMP en disolución a 25°C. Por consiguiente, al resultar insuficiente la curva de valoración calorimétrica de la figura 37 para obtener la información deseada se estudió la unión del nucleótido a la enzima mediante diálisis en el equilibrio, técnica que permite en principio la obtención del número de sitios de unión de un ligando a una proteína así como de las constantes de unión correspondientes.

La fosforilasa b en ausencia de AMP y demás activadores, sustratos y  $Mg^{2+}$  se encuentra en forma de dímero a temperatura ambiente (58, 75, 79, 80, 123, 124). De acuerdo con la mayoría de autores al unirse el AMP a 25°C no se produce asociación detectable de dímero a a tetrámero(58, 75, 79, 80, 124). Por lo tanto, en la unión del nucleótido a la enzima no se producirán contribucio

nes apreciables al calor total debidos a procesos de asociación - disociación. Un resultado que corrobora este hecho es la obtención de una proporcionalidad entre el calor de unión de AMP a la fosforilasa b y la concentración de enzima en el experimento. Si existiese un proceso de asociación, el cambio de entalpía debido al mismo, y que estaría contribuyendo al calor total medido en la reacción, sería función de la concentración de enzima. Como se observa en la figura 36 no hay dependencia del calor por mol con la concentración de enzima evidenciando así la ausencia de procesos asociativos, o en cualquier caso, de efectos entálpicos debidos a los mismos. Ho y Wang (75) a 25°C obtienen el mismo resultado que nosotros, comprobando además la inexistencia de tetrámero a esta temperatura por ultracentrifugación, mientras que a 18°C, donde por esta última técnica encuentran una proporción de tetrámero junto al dímero, obtienen, contrariamente a lo que ocurre a 25°C, un calor por mol de enzima que es constante con la concentración de la misma. En base a éstas y a otras evidencias en la Bibliografía (58,75,79,80,123,124) se ha considerado en el estudio de la interacción fosforilasa b - AMP la enzima en estado dimérico.

De los resultados obtenidos mediante diálisis en el equilibrio (ver (V.- 2.2)) se deduce que existen dos sitios por subunidad a los cuales se une el AMP, o el IMP, cuando la fosforilasa b está en disolución a 25°C. La existencia de estos dos sitios ha sido demostrada por difracción de rayos X a 4°C, identifi -

cando su posición en el dímero de fosforilasa. Como ya indicamos en Antecedentes Bibliográficos, el sitio del activador N, al cual se unen los nucleótidos con mayor afinidad se encuentra en la zona de contacto de las dos subunidades. Los nucleótidos (AMP, IMP) además se unen secundariamente al sitio del inhibidor, I, el cual se ha localizado próximo al sitio catalítico, entre los dos dominios de una subunidad de la proteína (12,47).

Además de estos estudios recientes en estado cristalino, la unión de AMP a fosforilasa b en disolución ha sido estudiado por diferentes grupos de investigadores. Buc et al. (53) han realizado diferentes estudios a 4°C obteniendo por diálisis en el equilibrio dos sitios por subunidad para la unión del nucleótido (53). Estos estudios ponen de manifiesto que a 4°C el AMP se une al sitio del inhibidor, aunque con menos afinidad que al sitio del activador. Sin embargo, en la Bibliografía existen discrepancias respecto de dicha unión cuando la enzima está en disolución a temperaturas alrededor de 25°C. Los primeros estudios de Helmreich et al. (51) a 23°C propusieron que una molécula de AMP se unía por monómero de enzima. La constante fenomenológica que estos autores obtienen es del mismo orden a la encontrada por nosotros para la unión del AMP al sitio del activador, N. Posteriormente, Wang et al. (74,75) mediante estudios calorimétricos a 18 y 25°C fueron los primeros en indicar la existencia de dos sitios para la unión del AMP. Como ya hemos indicado antes, una curva

de valoración calorimétrica en el caso de un sistema cooperativo no da ninguna información acerca del número de sitios de unión. Wang et al(74,75) se basaron principalmente en la forma bifásica de su curva calorimétrica para obtener el número de sitios de unión, identificando así cada uno de los plateau con la saturación de un sitio por subunidad. En realidad la curva bifásica de estos autores no está tan bien definida como aquellos en que existe impureza (ver V.-1.) sino que encuentran un "rizo" a concentración de AMP  $\approx 1$  mM que asignan a un primer plateau. Nosotros pensamos que esta asignación es un tanto arbitraria dentro de error experimental (de hecho, la curva en su conjunto se asemeja mucho a la monofásica propuesta en esta Memoria en cuanto a unos niveles globales de saturación) pero que quizás se debe a un intento de racionalizar medidas de unión calorimétrica y de actividad de la enzima. Así, otros autores se apoyaron para su identificación de un primer plateau en el hecho de que éste se alcanzaba aparentemente a esa concentración de AMP  $\approx 1$  mM que es cuando la enzima alcanza su máximo de actividad (9,10). Por lo tanto, según estos autores este plateau debería corresponder a la saturación de un sitio, de cuya unión al AMP dependería la actividad de la enzima, siendo el otro plateau unión a un segundo sitio inespecífico sin influencia en la actividad de la enzima. Sin embargo, como se observa en la figura 38 la curva de valoración calorimétrica de fosforilasa b por AMP en presencia de fosfato, difiere de la obtenida en ausencia de este sustrato (figura 33). Es conocido que el fosfato aumenta la afinidad de la enzima por el

AMP (58, 80). Cuando se realizan las medidas de actividad en la dirección de la síntesis de glucógeno se encuentra presente en el medio el fosfato; si las medidas se hacen en la dirección de degradación de glucógeno, aunque no hay fosfato, se encuentra presente otro sustrato, la glucosa - 1 - fosfato, que también aumenta la afinidad de la enzima por el AMP (80). Por lo tanto, no es correcto comparar el rango de AMP al cual se produce la saturación de la enzima cuando se realizan las medidas en ausencia de sustratos o cuando hay algún sustrato en el medio. Como queda reflejado en la figura 38, la curva de valoración calorimétrica indica una mayor afinidad de la enzima por el AMP cuando está presente el fosfato y en este caso la saturación global de la enzima se alcanza a concentraciones de nucleótido del orden de 1 mM, es decir, la misma a la cual la enzima alcanza máxima actividad. Por lo tanto, desaparece la "necesidad" de la existencia de un segundo sitio en la comparación de datos de actividad y de unión de AMP en ausencia de sustratos.

Otros grupos de investigadores también han estudiado la interacción fosforilasa b - AMP, a temperatura ambiente, entre los cuales se encuentran Radda et al (10,71) y Steiner et al (129,142). Estos autores solo indican unión de AMP a un sitio por subunidad de fosforilasa b. Aunque en nuestra opinión utilizan concentraciones de AMP demasiado bajas como para poder detectar unión a un posible segundo sitio.

Frente a la diversidad de resultados y la con

fusión existente respecto de la unión de AMP a uno o dos sitios de cada subunidad de fosforilasa b, cuando la enzima está en disolución a 25°C, nuestros resultados demuestran claramente que el AMP a esta temperatura al igual que a 4°C, se une a dos sitios, asignables al sitio del nucleótido y al del inhibidor, I. Las constantes microscópicas de unión de AMP a cada uno de estos sitios reflejan una apreciable diferencia en su afinidad por el nucleótido, concordando así con los resultados cualitativos obtenidos por rayos X (47). Si comparamos las constantes obtenidas por Morange et al. a 4°C (53) con las obtenidas por nosotros a 25°C (Tabla I) se observa que la afinidad de la enzima por el AMP disminuye al aumentar la temperatura estando esto de acuerdo con los resultados de Buc et al (58). Esta disminución era claramente de esperar del carácter exotérmico de la unión del nucleótido. Sin embargo, la afinidad en disolución a 25°C, como prueban nuestros resultados, es mucho mayor que la obtenida en estado cristalino a 4°C. Puesto que el efecto de la temperatura hemos visto que era justamente el opuesto, esta diferencia probablemente sea debida a que la conformación en cristal (T) diferirá a la presente en disolución en donde el AMP se supone que origina la transición  $T \rightarrow R$  (58,80) según la terminología del modelo de Monod et al. (56). Esto implicaría una unión de AMP al estado R mucho mayor que al T en la fosforilasa b, de acuerdo con resultados cinéticos en disolución en los que incluso no se tiene en cuenta la unión del AMP a la conformación

T en disolución ( 58, 65 ).

Steiner et al. (129) han estudiado la unión del AMP a la fosforilasa b en unas condiciones de temperatura y pH ligeramente diferentes de las nuestras. La máxima concentración de AMP utilizada en sus experimentos,  $7 \cdot 10^{-5} M$ , es demasiado baja para detectar la unión del AMP al sitio del inhibidor, I. Por lo tanto, estudian solamente la unión del nucleótido al sitio del activador y las constantes obtenidas por estos autores son del mismo orden que las obtenidas por nosotros.

La unión del AMP al sitio de activador es cooperativa, habiéndose encontrado en esta Memoria el valor de 1,4 para el coeficiente de Hill, valor que concuerda bastante bien con el obtenido por otros autores mediante diversas técnicas (68, 71, 77, 78). Sin embargo, de las constantes microscópicas dadas por Steiner et al. (129) se obtiene un coeficiente de Hill de 1,2, esta diferencia respecto del obtenido por nosotros podría ser debida a la ligera diferencia en el pH y temperatura, o más probablemente al número muy limitado de datos experimentales aportados por estos autores que no alcanzan incluso niveles, como se dice arriba, de  $7 \cdot 10^{-5} M$  de AMP en sus trabajos (129, 142).

La unión al sitio I se ha encontrado que es no cooperativa. Buc et al. (53, 128) dan un único valor para las constantes de unión microscópica del AMP al segundo sitio, o sitio I de cada subunidad de la fosforilasa b a 4°C. Este sitio I resulta ser el



sitio primario para la unión de algunos inhibidores entre los que se encuentra la adenina y adenosina. Es tudios de unión de estos compuestos a dicho sitio no reflejan tampoco cooperatividad (53,128). No se tiene pues conocimiento de ligandos que se unan cooperativamente al sitio I. Este hecho apoya nuestros resultados de unión no cooperativa tanto del AMP como del IMP a este sitio. Se ha sugerido que cualquier ligando unido a este sitio origina inhibición de la enzima (53). En experimentos preliminares en curso actualmente en nuestro Departamento se ha encontrado efectivamente que a altas concentraciones de AMP aparece una disminución en la actividad enzimática.

En base a estudios cinéticos a partir de medi das de actividad, algunos grupos de investigadores (80, 65, 143, 144) han sugerido que la regulación alostérica de la fosforilasa b se ajusta al modelo de Monod, Wyman y Changeux (56).

Estudios posteriores indicaron la existencia de más de dos estados conformacionales (R y T) en la enzima, ya que mediante medidas espectroscópicas y paramagnéticas se detectaron diferentes cambios estructurales en la proteína al unirse los diversos ligandos (7,87). Otros autores proponen también modelos intermedios entre el de Monod et al (56) y el de Koshland et al. (145) para interpretar el comportamiento de la fosforilasa (61,87). Hoy en día existen algunos esquemas muy similares entre sí para explicar la activación de la fosforilasa b (61,87). En todos estos esquemas la fosforilasa b en ausencia de activadores y sustrato se encuentra prefe-

rentemente en una conformación inactiva o equilibrio entre conformaciones inactivas y al unirse el AMP adquiere una conformación activa, pudiendo adoptar otra conformación al unirse sustratos.

En el estudio de la unión del AMP a la fosforilasa b por medidas de actividad algunos autores ( 57, 58 ) han ajustado sus datos al modelo de Monod et al. (56) considerando que el AMP se une exclusivamente al estado R. En ausencia de este nucleótido y sustratos el equilibrio entre la forma R y T está muy desplazado hacia esta última, siendo la constante alostérica ( $L_0$ ) dada por Helmreich et al. (80) , a 23°C, 2000 y la obtenida por Buc et al. (57) , a 25°C, 600. Un ajuste de nuestros resultados obtenidos mediante diálisis en el equilibrio al Modelo de Monod et al. (56) considerando unión del ligando exclusivamente al estado R proporciona un valor de  $L_0 = 5$  , del mismo orden del que se pueden obtener a partir de las constantes de unión dadas por Morange et al. ( 53 ) usando la ecuación (IV.18), obviamente en el mismo supuesto de unión exclusiva al estado R. No existe pues concordancia entre el valor de  $L_0$  obtenido por medidas de actividad y de diálisis en el equilibrio. Esto podría ser debido a que la suposición hecha no es cierta y existe alguna unión del nucleótido al estado T, otra posibilidad es que la enzima no se ajuste al modelo simple de dos estados de Monod et al. (56). También es posible que lo que realmente se determine en medidas de actividad sean valores relativos a una etapa o paso limitante en la catálisis distinto a la

propia unión del AMP a la enzima con lo que ambas técnicas (estudios directos de unión AMP - enzima y medidas de actividad enzimática) estarían determinando observables del sistema de alguna forma correlacionables aunque no directamente comparables entre sí.

Si comparamos la unión de AMP a ambas formas de la enzima, a y b, encontramos diferencias significativas. Así, mientras la unión del AMP al sitio del nucleótido de la fosforilasa b es fuertemente cooperativa, la unión de este nucleótido a la forma a de la enzima presenta una cooperatividad muy baja. El coeficiente de Hill aquí obtenido,  $1,1 \pm 0,1$  es muy pequeño comparado con el obtenido para enzimas tetraméricas cooperativas, es decir, con el mismo número de subunidades que la fosforilasa a, por ejemplo la hemoglobina, proteína cooperativa muy estudiada que presenta un coeficiente de 2,8 para la unión del oxígeno (107). Nuestros resultados concuerdan pues con todos los datos de la Bibliografía, los cuales indican una muy baja o incluso nula cooperatividad para esta interacción (68,77,90). Por otra parte, se observa que la afinidad de la fosforilasa a por el AMP es superior a la que presenta la forma b, siendo la constante de unión el sitio del nucleótido aproximadamente un orden de magnitud superior.

Si consideramos la unión del AMP a la enzima a como no cooperativa, aproximación perfectamente aceptable dada la pequeña cooperatividad que existe entre los sitios de unión, se obtiene un valor de la constante de unión de  $(1,8 \pm 0,2) 10^5 M^{-1}$ , comparable al obte -

nido por Helmreich et al. ( 89 ) en condiciones parecidas de pH y temperatura. Radda et al. (90) obtienen una afinidad un poco superior, aunque, estos autores han realizado sus experimentos a 18°C. Podría pensarse pues que en la fosforilasa a, al igual que ocurre en la b ( 58 ), la afinidad por el AMP aumenta al disminuir la temperatura, de acuerdo lógicamente con el caracter exotérmico del proceso.

Al realizar un análisis de datos que tiene en cuenta la cooperatividad se obtiene, como era de esperarse, cuatro constantes de unión con valores muy próximos entre sí y cercanos a una única constante previamente indicada.

Los resultados de diálisis en el equilibrio muestran que en todo el rango de concentración de AMP estudiado sólo se une una molécula de AMP por subunidad de fosforilasa a. Este resultado concuerda con todos los estudios de unión de AMP a esta forma de la enzima en disolución ( 89, 90 ). Sin embargo, Madsen et al. (35) mediante estudios cristalográficos han demostrado la existencia de dos sitios por subunidad de fosforilasa a para la unión del AMP, aunque estos mismos autores indican que la concentración de nucleótido requerida para saturar los segundos sitios (I) es de un orden muy superior a la que se necesita para saturar los primeros (N). Por lo tanto, sería necesario realizar medidas a concentraciones de AMP muy superiores a las de los experimentos expuestos en Resultados (V.3) para detectar la posible unión del activador al sitio del nu-

cleósido (I) en disolución. La concentración de AMP máxima usada en los experimentos de diálisis en el equilibrio fue aproximadamente 20 veces más elevada que las máximas concentraciones de AMP libre detectadas en el músculo (86), con lo que su "interés fisiológico" en el mejor de los casos no queda claro. Además, en los estudios por rayos X la enzima se encuentra cristalizada, en estado dímero y conformación T, mientras que en nuestros trabajos, y otros análogos en la Bibliografía (89,90), la enzima se encuentra en disolución, como tetramero y concentración apreciable de su forma activa, R, por lo que comparaciones directas entre ambos tipos de resultados pueden ser peligrosas si se pretenden obtener conclusiones simplistas. Por ejemplo, podría ocurrir que al margen de otras diferencias el AMP se uniera "mejor" al sitio I de la forma T de la enzima (cristal) que a dicho sitio con una enzima en la que esté presente la forma R (disolución).

La información proporcionada por las medidas de diálisis en el equilibrio permitió calcular los parámetros termodinámicos de AMP a cada uno de los sitios de la fosforilasa a y b a 25°C (Tabla III).

Previo al análisis de la curva de valoración calorimétrica se estudió la existencia o no de una protonización en la unión del AMP a la fosforilasa b. A este fin se realizó la valoración calorimétrica de fosforilasa b con AMP en diferentes disoluciones reguladas cuyos calores de ionización son muy distintos. Los resultados obtenidos nos llevan a afirmar que en la unión del AMP al sitio del activador (N) el número de

protones tomados o liberados es ( $0 \pm 0,02$ ) Investigando esta unión por potenciometría hasta una concentración de nucleótido donde se han saturado los primeros sitios, aunque no los segundos, se obtuvo el mismo resultado. Respecto de los sitios de los inhibidores (I) es necesario tener en cuenta que en la curva de valoración calorimétrica a la máxima concentración de AMP utilizada no se ha obtenido la saturación total de los mismos, por lo tanto, de nuestros resultados podemos decir que el número de protones tomados o liberados en la unión del AMP a estos sitios es con un cálculo conservador del orden de  $0 \pm 0,5$ .

No existe en la Bibliografía información de parámetros termodinámicos de la unión de este nucleótido a la forma a de la enzima, siendo pues éstos los únicos datos que proporcionan esta información. Por el contrario la valoración calorimétrica de fosforilasa b por AMP ha sido realizada por varios grupos de investigadores, aunque no existen concordancia entre sus resultados ni se ha realizado hasta la fecha una caracterización termodinámica de todos los sitios de unión de la enzima b al AMP, siendo también, por tanto, ésta la primera vez que dicho estudio se aborda y realiza. Dos de los grupos anteriores obtienen curvas semejantes en cuanto a forma, pero con grandes discrepancias en la magnitud del calor de reacción y la concentración de AMP a la que la enzima alcanza la saturación total. Las curvas calorimétricas obtenidas por uno de estos grupos de investigadores (81-84) presentan la misma forma

y calores de reaccion comparables a los obtenidos por nosotros (figura 15) cuando paralelamente a la reaccion de unión se producía otra reaccion debida a una impureza enzimática (Ver Resultados 1). En esta Discusion se han analizado detalladamente ya las causas que en nuestro caso originaban este tipo de curvas de valoración calorimétrica, llegando a la conclusión de que la curva que corresponde a la valoración calorimétrica de la enzima con AMP es monofásica (Figuras 33, 34, 35, 36).

Puede calcularse teóricamente la curva de unión de un ligando con dos tipos de sitios distintos. Cuando las constantes de unión estan separadas entre si por un orden de magnitud la curva resultante no puede ser en ningún caso bifásica. De hecho el comportamiento bifásico es apreciable cuando ambas constantes difieren en tres órdenes de magnitud (146). La valoración calorimétrica conduce a conclusiones análogas, a no ser que los calores de unión a ambos tipos de sitios sean tremendamente diferentes, lo cual obviamente no ocurre en la unión de AMP a la fosforilasa b. Por lo tanto desde un punto de vista teórico no deben esperarse curvas bifásicas en este caso.

Steiner et al. (129) obtuvieron una curva monofásica a pH y temperatura análogos a los de nuestros experimentos. Estos autores son los únicos que analizan la curva de valoración calorimétrica para ob-

tener los cambios de entalpia por sitio N de unión ( $\Delta H_1$  y  $\Delta H_2$ ). En dicho análisis consideran que el AMP sólo se une al sitio del activador, ya que dadas las bajas concentraciones de AMP utilizadas en sus experimentos de dialisis en el equilibrio ( $\leq 7 \cdot 10^{-5} M$ ), obtienen que sólo hay un sitio de unión por subunidad. Sus experimentos calorimétricos también los realizan a concentraciones de AMP bajas aunque muy superiores a las usadas en diálisis ( $\leq 1 \text{ mM}$ ). De acuerdo con nuestras constantes de unión al sitio del inhibidor (I), a concentración de AMP  $\approx 1 \text{ mM}$ , la ocupación de éstos sitios es aproximadamente de un 20%, que aunque no muy elevada, quizás afecte a los datos calorimétricos lo suficiente como para introducir errores apreciables. Así, si comparamos los resultados obtenidos por nosotros con los de Steiner et al. (129), se observa que el cambio de entalpia global correspondiente a la unión del nucleótido al sitio del activador (N) en ambas subunidades ( $\Delta H_1 + \Delta H_2$ ) de estos autores es comparable, aunque ligeramente superior al obtenido por nosotros, probablemente debido a esa pequeña contribución al calor total debida a la fracción de segundos sitios ocupados. Quizás por ello sus calores individuales de unión,  $\Delta H_1$  y  $\Delta H_2$ , al sitio N son distintos de los nuestros, y más próximos entre sí que los propuestos en nuestro tra



dajo, lo que concuerda de algún modo con la baja cooperatividad propuesta por dichos autores ( $n_H = 1,2$ ). También el cambio de entalpía global para unión del AMP a este sitio obtenido por Ho y Wang (75) es comparable al de nuestros resultados, aunque ellos no realizan un análisis de sus datos para obtener los  $\Delta H$  correspondientes a cada sitio N del dímero individualmente considerado.

Los valores de  $\Delta G^0$  obtenidos de nuestros resultados no son muy distintos para la unión del AMP al sitio N de ambas subunidades como era de esperar de los valores de constantes  $K_{m1}$  y  $K_{m2}$ . Por el contrario, los valores de entalpía y entropía para estos sitios son muy diferentes entre sí. Estas diferencias se deben evidentemente a la gran cooperatividad homotrópica entre sitios de unión, que está reflejando cambios conformacionales que se transmiten de una subunidad a otra a través de la interfase de contacto entre ellas. Desde un punto de vista entálpico se favorece la entrada de la segunda molécula de AMP aunque este efecto está en parte compensado por una contribución entrópica contraria. El proceso de unión al sitio N es, por lo tanto, de carácter entálpico. En la unión del AMP a este sitio en ambas subunidades las entalpías y entropías tienen valor negativo. Al obtener estos parámetros para la unión al sitio del inhibidor (I) se obtienen también valores negativos para los mismos. Sin embargo, esta última unión tiene una diferencia fundamental respecto de la otra y es que los sitios parecen no presen

tar cooperatividad como ya previamente hemos indicado. Así, puesto que estos sitios son independientes los cambios de entalpía y entropía obtenidos deberán ser debidos exclusivamente a la unión intrínseca y a posibles cambios conformacionales localizados en el entorno del sitio I, y al ser los sitios independientes no existirán tampoco cambios conformacionales transmitidos a la otra subunidad via la interfase inter-protómeros. En el caso de unión al sitio N los parámetros termodinámicos son suma de dos procesos distintos, la unión intrínseca y el cambio conformacional asociado. Para poder estimar las contribuciones de cada uno de estos procesos en los cambios totales en los parámetros termodinámicos podemos comparar la unión de este nucleótido al sitio N de la forma a y b de la enzima. Así, se comprueba que la unión del AMP a la fosforilasa a presenta una entalpía menos negativa que en el caso de unión al sitio N de las dos subunidades de la forma b. Al comparar las entropías se observa una diferencia mucho mayor ya que en el caso de la forma b todos los cambios de entropía obtenidos son negativos y en la forma a este cambio es positivo. Estas diferencias es de esperar que se correspondan más con las diferencias en cambios conformacionales originados que no con la unión intrínseca ya que en ambas formas de la enzima el AMP se une al mismo sitio (N), aunque éstos se encuentren en distinta conformación de la enzima. Naturalmente todas las consideraciones que se están realizando sobre el con -

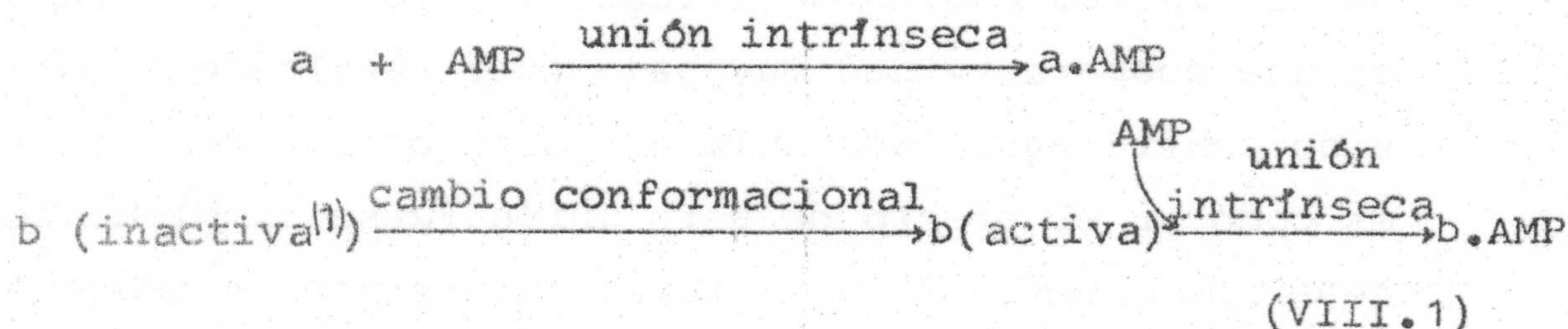
junto de los parámetros termodinámicos son significativos dentro del margen de fiabilidad de los mismos debido a su error experimental, incluido en las Tablas correspondientes.

Como ya hemos indicado en Antecedentes Bibliográficos la estructura cristalina de la fosforilasa a y b se ha estudiado por rayos X a 2,5 y 3 Å respectivamente de resolución identificando los sitios de unión del AMP y comparando ambas formas de la enzima, aunque esta comparación se ha realizado a una resolución más baja (6 Å) (12). Las diferencias observadas son muy pequeñas, reduciéndose prácticamente a la diferente movilidad de los 19 aminoácidos del extremo N-terminal que es mucho mayor en el caso de la forma b. Los estudios en estado cristalino realizados con fosforilasa a y b se han asignado a la forma T de la enzima (12,47) en la nomenclatura de Monod et al. (56). No es de extrañar esta diferencia estructural entre ambas formas T debido a las interacciones de fosfato unido a la Ser-14 en el caso de la forma a que ordenan este segmento N-terminal (12). Recientemente se ha obtenido alguna información estructural acerca de la transición T → R en el caso de la a (32) que será discutida posteriormente en el contexto de la interpretación de nuestros parámetros termodinámicos. El hecho es que la fosforilasa a en disolución presenta una actividad elevada en ausencia de AMP, que solo aumenta en un 30% en presencia del nucleótido, mientras que la b en disolución tiene una actividad prácticamente nula en ausencia de AMP necesitando al

nucleótido para alcanzar un nivel de actividad análogo al de la forma a en presencia también del AMP. En el segundo caso es claramente la unión cooperativa del AMP la que da lugar a una estructura activa, actuando así el nucleótido como un activador alostérico. En el caso de la a es la acción del fosfato en la Ser-14 actuando en este entorno de la cadena N-terminal, la que estabiliza la estructura activa, por lo que este segmento N-terminal se comporta una vez fosforilado como un "efector alostérico intramolecular" del estado activo que desempeña una función análoga a la del AMP en la b (41). Por otra parte, en la unión del AMP a la forma a, además de ese incremento en actividad señalado del 30%, aparece una cooperatividad muy baja (ver Resultados) que ha sido considerada como nula por algunos autores (77,68); es como si el efecto de esta unión fuese simplemente el de estabilizarla forma activa, quizás por un pequeño ajuste más apropiado en la orografía del sitio activo, pero sin cambios conformacionales apreciables que se transmitan a las otras subunidades via las interfases correspondientes.

Por todo lo anterior son entonces muy aceptables las hipótesis de que la estructura de la a unida al AMP y la b unida también al AMP (estados activos R en el modelo alostérico concertado) deben ser muy semejantes (su actividad de hecho es igual) y de que la unión del AMP a la forma a puede en principio adscribirse a lo que se conoce como unión intrínseca (85).

De acuerdo con lo anterior es posible un cálculo simple que proporcione los parámetros termodinámicos de los cambios conformacionales que indudablemente ocurren en la b al unirse alostéricamente al AMP (a es te respecto conviene señalar que la distancia entre los sitios N en el cristal de la b, forma T, ha sido estimada en 45 Å (47) mientras que esa misma distancia en disolución, presumible forma R, lo ha sido en 14 Å (54)) y que son claramente los responsables estructurales del proceso de activación de la enzima. Así, con el esquema siguiente:



en donde la secuencia de acontecimientos no es significativa pues obviamente interesan solo estados iniciales

- (1) A lo largo de esta Discusión se utiliza la denominación "inactiva" para la fosforilasa b en ausencia de AMP aun que ésta presenta, como es sabido, una actividad residual despreciable frente a la forma llamada activa (fosforilasa b - AMP ó fosforilasa a con o sin AMP).

y finales, pueden obtenerse los  $\Delta G_{CC}$ ,  $\Delta H_{CC}$  y  $\Delta S_{CC}$  del cambio conformacional por una simple sustracción a partir de los valores dados en la Tabla III.

$$\Delta H_{CC} = -27,0 - 70,0 - 2(-20,0) = -57,0 \pm 11 \text{ kJ/mol de dímero}$$

$$\Delta S_{CC} = -22 - 150 - 2(34) = -240 \pm 38 \text{ J/K.mol de dímero}$$

$$\Delta G_{CC} = -20,5 - 25,2 - 2(-30,0) = +14,3 \pm 2 \text{ kJ/mol de dímero}$$

(VIII.2)

donde las incertidumbres representan el error más probable (147).

Como era de esperar el  $\Delta G_{CC} > 0$ , es decir, el cambio conformacional que lleva el dímero de fosforilasa b de la forma inactiva a la activa no tiende a producirse espontáneamente. En este sentido es interesante mencionar que a partir de los valores de la constante alostérica  $L_0$  para la conversión  $T \rightleftharpoons R$  en la fosforilasa a y en la b se ha obtenido una disminución en el incremento de la energía de Gibbs de  $4 \pm 1 \text{ kcal}$  (41) en concordancia con nuestros resultados calorimétricos y el análisis previo. El cambio conformacional parece pues estar favorecido entálpicamente pero con una barrera entrópica demasiado alta como para ocurrir espontáneamente.

Quizás el aspecto más llamativo del esquema y cálculo termodinámico anterior es el valor negativo y muy alto de  $\Delta S_{CC}$ . La cooperatividad en la unión de AMP se debe a la transmisión de información estructural des

de un sitio de unión N al otro a través de la superficie de contacto de ambas subunidades. El efecto alostérico se efectúa así a través del cambio conformacional que conecta los sitios N a esta interfase. Entre las interacciones no covalentes responsables de la transmisión de este tipo de información estructural (sistemas alostéricos) tanto las hidrofóbicas como los puentes salinos parecen desempeñar un papel especialmente importante (148,149). Estas dos interacciones se caracterizan precisamente por su alta componente entrópica con muy pequeñas contribuciones entálpicas (85,150,151). Volviendo a nuestro estudio de la fosforilasa b se ha publicado recientemente que la superficie de contacto de ambas subunidades rodea o engloba una cierta cantidad de disolvente en una cavidad ubicada en el centro de la interfase de volumen  $\approx 2000 \text{ \AA}^3$  en el que cabrían unas 150-180 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , inaccesibles al resto del disolvente en el estado T (41). En el proceso de activación  $\text{T} \rightarrow \text{R}$ , esta interfase se afecta mucho, como cabría esperar, y la cavidad interna de disolvente se hace entonces mas "estrecha y profunda" como consecuencia de un movimiento coordinado de separación de las subunidades (recuérdese a este respecto las diferencias en distancias citadas entre los sitios N-N en cristal (T) y disolución (R)). Es por tanto lógico esperar que a consecuencia de esta transición se origine un contacto mas amplio entre el disolvente y las paredes internas de esa cavidad en la que existen grupos tanto polares como apolares (41). Se sabe hoy día que un aumento en este ti-

po de interacciones, en especial aquellas que implican restos apolares (hidrofóbicos), da lugar a un incremento neto de entropía negativa debido a la ordenación de las moléculas de H<sub>2</sub>O alrededor de dichos grupos (151,152). Por otra parte, hay cuatro puentes salinos que parecen jugar un papel importante en la superficie de contacto entre subunidades. Dos de ellos (Arg 10 - Asp 32 y Ser 14 - Arg 43) conectan los dos extremos N-terminales y existen solo cuando la Ser-14 esta fosforilada (caso de la fosforilasa a). Los otros dos puentes (Arg 49-Gln 195 y Arg 184 - Asp 251) conectan no solo las zonas N-terminales sino los núcleos de estructura  $\beta$  de ambos protómeros, estando presentes tanto en la forma a como en la b de la enzima. Estas dos últimas interacciones salinas parece que se rompen o al menos se reorientan y distorsionan en el proceso de activación (T  $\rightarrow$  R) (41), lo que también implicaría una contribución negativa al  $\Delta S$  durante el cambio conformacional correspondiente.

Contribuciones negativas al  $\Delta H$  de este cambio conformacional es también lógico esperarlas del aumento de contactos entre ese "lago" interno de disolvente y los restos polares de la pared interna de la cavidad que lo contiene (alrededor del 40% de estos restos polares en la interfase están inicialmente en contacto con restos no polares a través de fuerzas de dispersión, es decir, interacciones apolares (41)). Al hacerse la molécula algo más rígida debido a la unión con el AMP algunas interacciones tipo puente de hidrógeno o de van der Waals podrían originarse dando lugar a  $\Delta H$  negativos. La formación neta de puente de hidrógeno no parece ser en opi

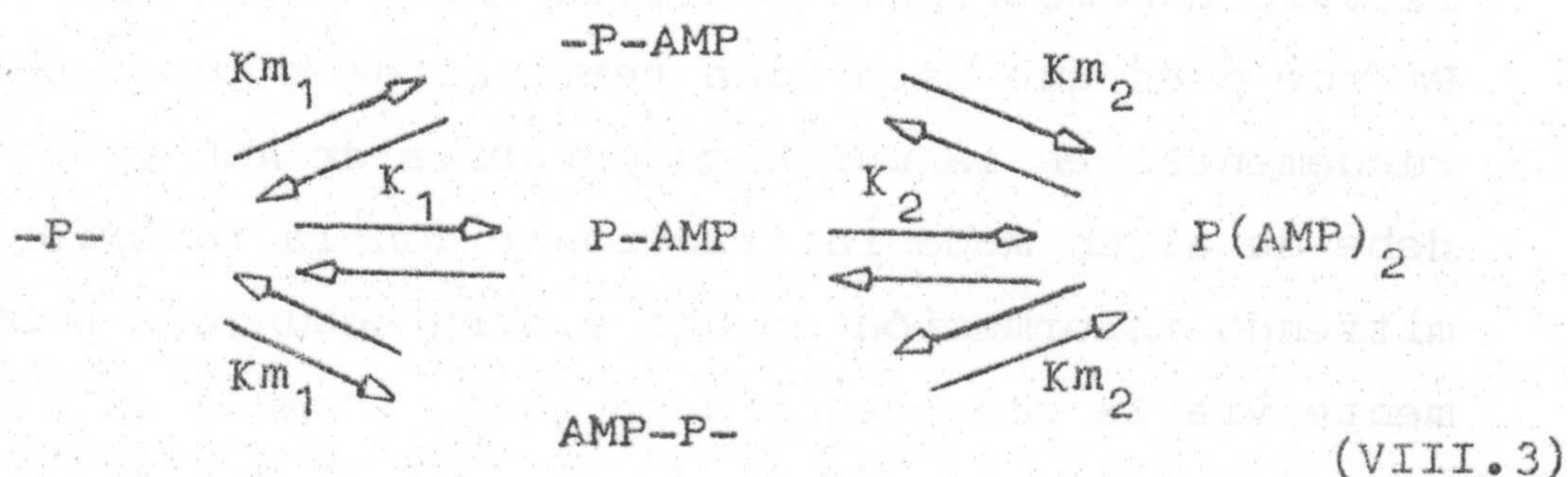


nión de Sturtevant (117) una fuente usual en  $\Delta H$  negativos ( en contra del recurso manido a estas interacciones en tálpicas para interpretar  $\Delta H$  en biopolímeros) debido a que los puentes de hidrógeno pueden reorganizarse pero sin formación neta de los mismos. En cuanto a las inte racciones de van der Waals no se tiene generalmente en cuenta en este tipo de interpretaciones por su baja con tribución entálpica (unos pocos cientos de calorías por contacto de grupos alifáticos o aromáticos (85)), aunque estas contribuciones pueden ser significativas si fuesen muchas de estas interacciones las que se ocasionaran simultáneamente en un proceso dado (su desaparición en un proceso límite, la desnaturalización de pro teinas, sería un ejemplo particular (153)).

En este contexto podría comentarse un poco el posible papel del segmento N-terminal en la activación, tema que está hoy día sujeto a polémica. Se conoce hoy que los  $\approx 17$  restos N-terminales están desordenados (no pueden "verse") según los estudios en cristal por rayos X en la fosforilasa b en estado T (47), mientras que existe una mayor ordenación (excepto para los 6 últimos restos) según estudios similares realizados con la forma a también en estado T (12). Esta es de hecho la diferencia característica entre ambas estructuras comparadas a 6 Å de resolución (12) y atribuida a las interac ciones salinas específicas debidas a la fosforilación de la Ser - 14 en la fosforilasa a (41). Sin embargo parece ser que se produce una ordenación adicional de esta cadena N-terminal en la activación de la a (T  $\rightarrow$  R),

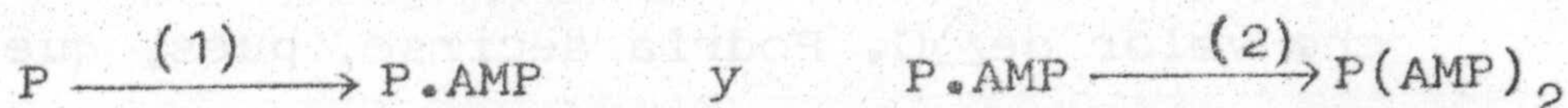
siendo ésto considerado como un "acontecimiento" dentro del camino seguido en su proceso de activación (12,53) por el que la hélice  $\alpha$  N-terminal se desplaza hacia el centro de la enzima ( $\approx 5 \text{ \AA}$ ). Si ocurriera algo similar en el caso de la b por unión con el AMP (activación) aparecerían nuevas interacciones en estos restos finales y la zona de contacto entre subunidades, lo que originaría balances energéticos localizados pero de difícil predicción, a lo sumo una disminución entrópica debida a una ordenación neta tanto de restos aminoácídicos como de moléculas de disolvente. El aspecto polémico descansa en trabajos cuya interpretación es en principio contradictoria. Así, estudios por "entrecruzamiento" muestran que parte al menos del segmento N-terminal existe desordenado o móvil en la fosforilasa b activada (154). Por otra parte, la tripsinólisis parcial de la enzima b conduce a un "enzima" al que le faltan los 16 restos N-terminales, la llamada fosforilasa b', que es aún activa en presencia de AMP (155); sin embargo, Graves et al. (72) demostraron que esta forma b' no presenta cooperatividad homotrópica positiva en su unión con el AMP. Parece pues que esta zona terminal debe jugar un papel fundamental en la unión cooperativa de AMP y, por tanto, debe de algún modo interaccionar con la interfase transmitiendo información de una a otra subunidad probablemente via la zona denominada gorra ("cap") en la molécula (Figura 2). Estudios cristalinos actualmente en curso (12) con la forma R de la enzima esclarecerán no obstante este punto conflictivo.

Se sabe también que la activación produce, como es natural, cambios en el sitio activo y en el entorno del PLP. Del conocimiento estructural al respecto (12), no es posible sin embargo obtener información concreta, por especulativa, acerca de los cambios de  $\Delta S$  y  $\Delta H$  allí producidos. En el esquema VIII.1 y en los cálculos termodinámicos correspondientes (VIII.2) se han utilizado los incrementos totales de entalpía y entropía correspondientes a la unión de dos moléculas de AMP al dímero de fosforilasa b. Sin embargo, puesto que se conocen los  $\Delta H$  y  $\Delta S$  para la unión individual de cada AMP al dímero, es posible, por un razonamiento similar al anterior, obtener una estimación de las características termodinámicas asociadas a los posibles cambios conformacionales que ocurren cuando se une una primera o una segunda molécula de AMP a la enzima. Así, podríamos plantear el siguiente esquema:

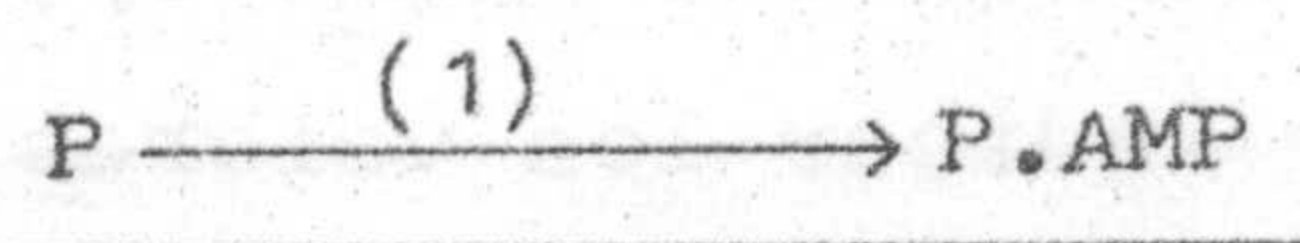


donde  $Km_1$  y  $K_1$  son las constantes micro y macroscópicas respectivamente, con  $K_1 = 2 Km_1$  y  $K_2 = Km_2/2$ , mientras

que P representa el dímero de fosforilasa b con los dos sitios N para el AMP. Es posible, como antes se hizo, obtener los  $\Delta G, \Delta H, \Delta S$  adjudicables a los cambios conformacionales que tendrían lugar en los procesos:



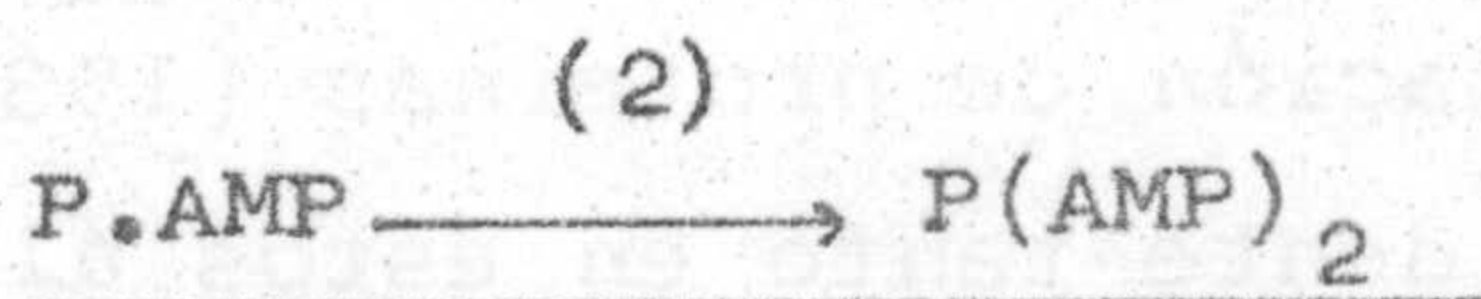
para ello simplemente restaríamos los incrementos por sitio correspondientes a la unión de AMP a la fosforilasa a de los respectivos a la unión de cada AMP a los dos sitios N de la fosforilasa b, es decir:



$$\Delta H_{cc}(1) = -27,0 - (-20,0) = -7 \text{ kJ/mol de dímero}$$

$$\Delta S_{cc}(1) = -22 - (34) = -56 \text{ J/K} \cdot \text{mol de dímero}$$

$$\Delta G_{cc}(1) = -20,5 - (-30,0) = 9,5 \text{ kJ/mol de dímero} \quad (\text{VIII.4})$$



$$\Delta H_{cc}(2) = -70,0 - (-20,0) = -50 \text{ kJ/mol de dímero}$$

$$\Delta S_{cc}(2) = -150 - (34) = -184 \text{ J/K} \cdot \text{mol de dímero}$$

$$\Delta G_{cc}(2) = -25,2 - (-30,0) = 4,8 \text{ kJ/mol de dímero}$$

De acuerdo con este planteamiento secuencial, puramente fenomenológico, el primer cambio conformacional presenta una barrera energética superior al segundo, apareciendo ambas barreras energéticas condicionadas por restricciones entrópicas. Sin embargo, las

contribuciones entálpicas y entrópicas del segundo cambio conformacional son muy superiores a las del primero, aunque aquellas tiendan a un menor valor de  $\Delta G$  debido al balance de sus influencias contrarias sobre dicho valor de  $\Delta G$ . Podría decirse, pues, que desde un punto de vista estructural (interacciones) la conformación P.AMP fuera de alguna forma más cercana a la P que a la  $P(\text{AMP})_2$  (o bien, que la entrada de un segundo AMP originara "mayores" transiciones conformacionales en el dímero que la entrada del primero), a pesar de lo que podrían parecer indicar los valores de  $\Delta G_{cc}(1)$  y  $\Delta G_{cc}(2)$ . Este balance entrópico-entálpico es ya un lugar común en la termodinámica de procesos que implican macromoléculas biológicas, como por ejemplo las variaciones de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  con la temperatura en la unión de ligandos a biopolímeros (109), o la dependencia con la temperatura de los parámetros termodinámicos asociados a la desnaturalización de proteínas (153). Este tipo de balance es evidente tanto en estos últimos resultados como en los valores directamente calculados para la unión del AMP a los sitios N de la fosforilasa b (Tabla III). No parece pues descabellado el pensar que también para las uniones alostéricas (homotrópicas en este caso) la tendencia o afinidad de los efectores hacia los sitios de unión, consecuencia de una reorganización estructural de la enzima, sea la resultante de un delicado balance de variaciones relativamente altas de entalpía y entropía que se traduzcan, sin embargo, en cambios no tan dramáticos en la energía de Gibbs para estos proce-

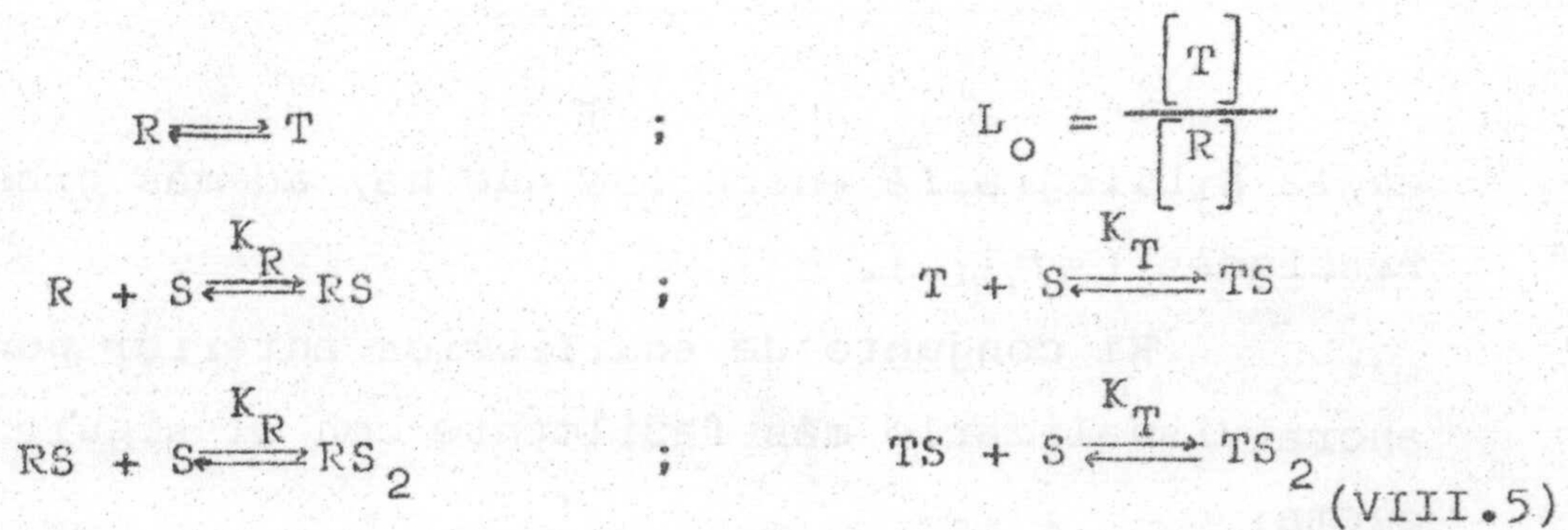
tos individuales de unión.

En el cálculo previo referente a los dos cambios conformacionales consecutivos se ha hecho la aproximación implícita de considerar la misma "unión intrínseca" de AMP a las formas P.AMP y P(AMP)<sub>2</sub>. La posible variación que esta aproximación pudiera suponer en los resultados numéricos expuestos no sería de esperar, sin embargo, que alterase las conclusiones cualitativas establecidas. En cualquier caso, un parámetro termodinámico dado relativo al cambio conformacional global debe ser la suma de los implicados en los dos cambios conformacionales propuestos, lo que evidentemente se cumple en nuestros cálculos.

Por otra parte, como se indicó ya en Resultados y se comentó anteriormente en esta Discusión, la aplicación del modelo concertado de Monod et al. (56) a nuestros resultados, supuesto que el AMP no se une al estado T, conduce a resultados no demasiados admisibles. Si consideramos además los valores obtenidos para  $\Delta H$  y  $\Delta S$  en la unión del AMP a los dos sitios N de la fosforilasa b (y no sólo las constantes de equilibrio) para el modelo concertado sin unión al estado T sería de esperar que los datos termodinámicos por sitio correspondientes a la unión del AMP a la fosforilasa a fueran al menos comparables con los respectivos de unión de un segundo AMP a la fosforilasa b. De acuerdo con la Tabla III es evidente que estos datos son sin embargo demasiado dispares, particularmente los correspondientes a  $\Delta S$ . El modelo de Monod et al. (56) ha sido

no obstante utilizado frecuentemente en la fosforilasa para interpretar datos cinéticos (143,144), de unión de diversos efectores (58,80) e incluso cristalográficos (12,47), aunque en la mayoría de los casos no se ha tenido en cuenta la unión del AMP al estado T por considerarla muy baja en relación con la unión al estado R. Estrictamente hablando la no unión al estado T implicaría que el sistema una vez saturado con el activador manifestaría un comportamiento de Michaelis hacia el sustrato ( 22 ) y éste no parece ser el caso de la fosforilasa b ( 9 ). Con el fin pues de racionalizar nuestros resultados termodinámicos en el contexto de un comportamiento de Monod para la enzima es necesario tener en cuenta la unión del AMP al estado T que, como veremos, aunque presente constantes de unión sobre dos órdenes de magnitud inferiores a las de unión al estado R puede proporcionar un esquema de Monod para esta enzima con parámetros termodinámicos compatibles con nuestros resultados experimentales. No tenemos noticia de que exista tal estudio termodinámico para la fosforilasa a partir de datos obtenidos directamente por calorimetría. Esta es, por tanto, la primera vez que se caracteriza termodinámicamente el equilibrio entre las formas R y T de la fosforilasa y las uniones del activador AMP a ambas formas R y T, incluyendo tanto los valores de  $\Delta G$  como los de  $\Delta S$  y  $\Delta H$  para dichos equilibrios.

Según el modelo de Monod, una proteína dimérica que se una alostéricamente tanto en su estado R como T al ligando S da lugar a los equilibrios:



en donde las relaciones entre las constantes de Monod y las  $K_1$  y  $K_2$  obtenidas por la ecuación de Adair son (22)

$$Km_1 = \frac{K_T L_o + K_R}{1 + L_o} \quad ; \quad Km_2 = \frac{K_T^2 L_o + K_R^2}{K_T L_o + K_R} \quad (\text{VIII.6})$$

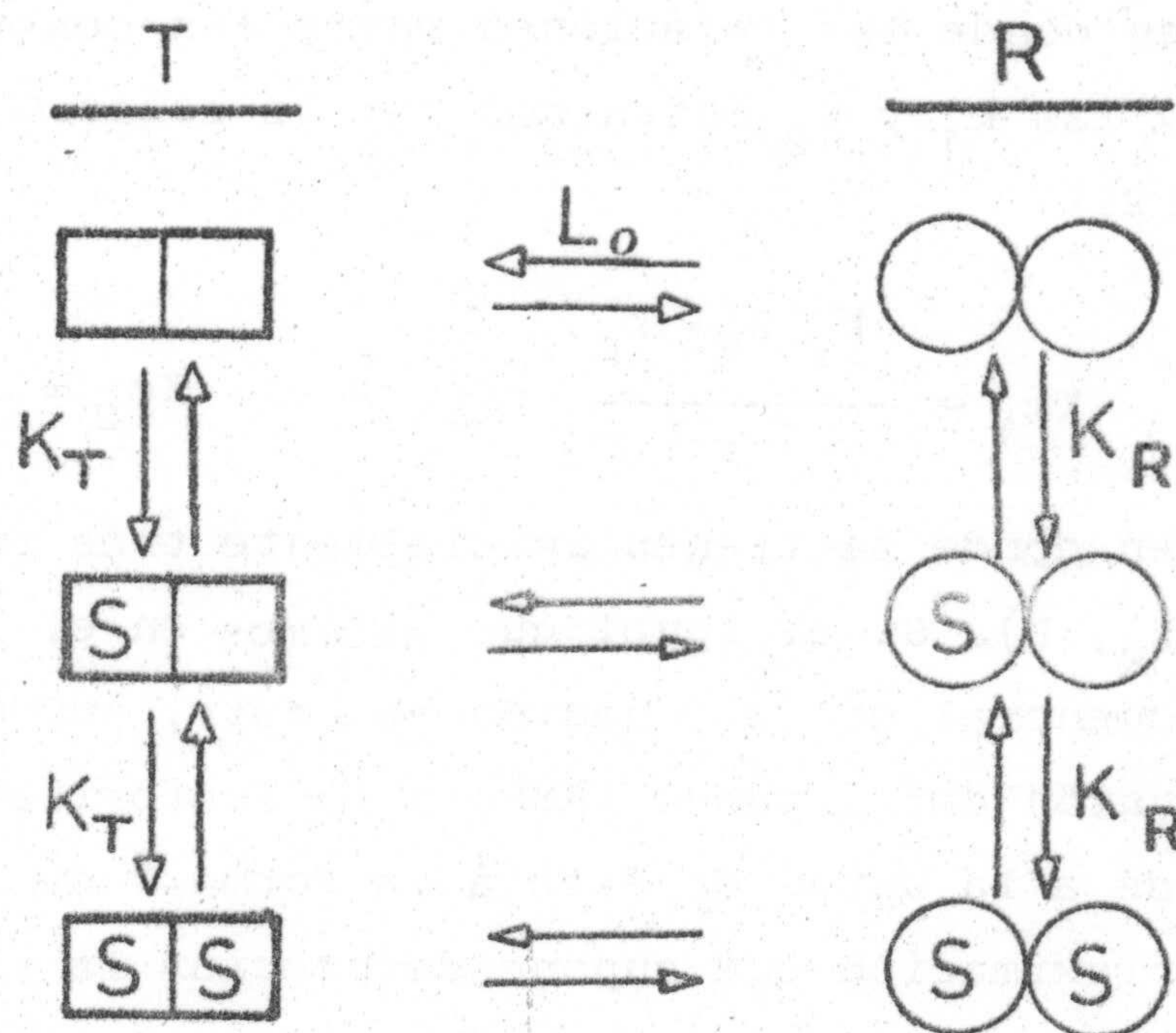
en donde se tienen inicialmente tres incógnitas ( $K_T$ ,  $K_R$ ,  $L$ ). Si al igual que hicimos en el tratamiento secuencial de la ecuación de Adair, suponemos que la unión del ligando (AMP) a la fosforilasa a corresponde a la unión de éste a la forma R de la enzima (aproximación que supone despreciar la influencia en dicha constante del desplazamiento de forma T a R en fosforilasa a, en la que se sabe que su valor de  $L_o$  es mucho menor que en la forma b (90), y aún lo será mucho menor en presencia de AMP), dispondremos de dos ecuaciones con dos únicas incógnitas,  $K_T$  y  $L_o$  para los valores de  $K_1 = 4,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_2 = 26,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  y  $K_R = 1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Resolviendo el sistema se encuentra  $K_T = 3,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ;  $L_o = 360$ .

La afinidad del AMP por el estado T es aproximadamente dos órdenes de magnitud inferior a la del estado R, mientras que  $L_o$  muestra, como era de esperar, un valor elevado algo inferior no obstante a los propuestos



en la Bibliografía entre los que hay además grandes variaciones (57,80).

El conjunto de equilibrios anterior podemos ahora visualizarlo más fácilmente con el siguiente esquema:



(VIII.7)

en donde el sistema queda totalmente caracterizado desde el punto de vista de constantes de equilibrio. Sin embargo, es también posible con la suposición anterior caracterizarlo termodinámicamente (valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  para todos los equilibrios implicados) a partir de los valores de  $\Delta H_1, \Delta S_1, \Delta H_2, \Delta S_2$  correspondientes a la unión de un primer o segundo AMP a la enzima (Tabla III). Así, en la situación hipotética de que el ligando se una sólo al primer sitio de la enzima tendremos en equilibrio las forma que llamaremos TS y RS, mientras que a saturación de ambos sitios (sitios N) el e-

quilibrio será entre las formas  $TS_2$  y  $RS_2$ . Sea pues  $[P]$  una cierta concentración de enzima en la que se saturan sus primeros sitios por el ligando S; el cambio de calor producido,  $Q_1$ , será :

$$Q_1 = [RS] \Delta H_R + [TS] \Delta H_T - ([RS] - [R]) \Delta H_L \quad (\text{VIII.8})$$

Si dividimos esta expresión por  $[P]$  y se expresan las concentraciones de las diversas especies en función de las constantes características del esquema de Monod anterior resulta (ver Apendice 3):

$$\Delta H_1 = \frac{1}{1 + K_T L_0 / K_R} \left[ \Delta H_R + \frac{K_T L_0}{K_R} \Delta H_T + \frac{L_0 (K_T / K_R - 1)}{1 + L_0} \Delta H_L \right] \quad (\text{VIII.9})$$

Por otra parte, considerando la situación en que ambos sitios N de la enzima se encuentren saturados por el ligando ( $\nu = 2$ ), se tendrán en equilibrio las formas  $TS_2$  y  $RS_2$ . El calor producido en este caso,  $Q_2$ , al saturar ambos sitios de una cierta cantidad de enzima, P, será ahora :

$$Q_2 = 2[RS_2] \Delta H_R + 2[TS_2] \Delta H_T - ([RS_2] - [R]) \Delta H_L \quad (\text{VIII.10})$$

en donde dividiendo de nuevo por  $[P]$  y sustituyendo las concentraciones por sus valores en función de los parámetros de Monod se llega a (ver Apendice 3):

$$\Delta H_1 + \Delta H_2 = \frac{1}{1 + L_0 (K_R / K_T)^2} \left[ 2\Delta H_R + 2L_0 \frac{K_T^2}{K_R} \Delta H_T + \frac{L_0 [(K_T / K_R)^2 - 1]}{1 + L_0} \Delta H_L \right]$$

(VIII.11)

De nuevo nos encontramos con dos ecuaciones (VIII.9) y (VIII.11) y tres incógnitas ( $\Delta H_R$ ,  $\Delta H_T$  y  $\Delta H_L$ ), pero haciendo uso de la suposición de partida, es decir, adscribiendo el valor de  $\Delta H_R$  al valor de  $\Delta H$  obtenido en la unión por sitio del AMP a la fosforilasa a, pueden obtenerse los valores de  $\Delta H_T$  y  $\Delta H_L$  a partir de las ecuaciones (VIII.9) y (VIII.11). Resolviendo el sistema se llega a:

$$\Delta H_T = -18,8 \text{ kJ/mol} \quad ; \quad \Delta H_L = 65,5 \text{ kJ/mol}$$

Por un procedimiento similar al anterior se puede llegar a dos ecuaciones análogas a (VIII.9) y (VIII.11) pero expresadas en función de  $\Delta S_1$  y  $\Delta S_2$  y de  $\Delta S_R$ ,  $\Delta S_T$  y  $\Delta S_L$ . Utilizando para  $\Delta S_R$  el valor 34 J/K mol (correspondiente a la unión de un mol de AMP a la fosforilasa a) se obtienen de estas ecuaciones los valores siguientes:

$$\Delta S_T = 7 \text{ J/K mol} \quad ; \quad \Delta S_L = 266 \text{ J/K mol}$$

Los mismos valores de  $\Delta S$  se obtienen utilizando los  $\Delta H$  anteriores y los correspondientes valores de  $\Delta G$  obtenidos de las constantes de equilibrio respectivas, usando la ecuación  $\Delta G_i = \Delta H_i - T\Delta S_i$ . En la Tabla V se incluyen todos los parámetros termodinámicos que caracterizan el modelo de Monod aplicado a la unión de la fosforilasa b a su activador alostérico, AMP.

Los valores termodinámicos obtenidos para el proceso de activación,  $T \rightarrow R$ , con el modelo de Monod son cualitativamente comparables a los correspondientes al cambio conformacional global obtenido del esque

ma fenomenológico secuencial. Así,  $\Delta G^\circ$  para este proceso de activación es 14,5 kJ/mol mientras que el  $\Delta G_{cc}$  era  $14,3 \pm 2$  kJ/mol, es decir, prácticamente la barrera energética a superar en la unión del AMP a la fosforilasa b puede ahora interpretarse como debida a la transición desde el estado inactivo, T, al activo, R. También aquí el  $\Delta H$  negativo del proceso facilitaría el mismo mientras que son las dificultades de origen entrópico las que impiden que este proceso se produzca per sé sin necesidad de la unión del activador, AMP. La interpretación de estos resultados a nivel de interacciones intramoleculares no covalentes sería totalmente análoga a la realizada anteriormente al discutir los resultados de los incrementos termodinámicos debidos al cambio conformacional global, pero ahora referidos a un modelo molecular de comportamiento que identifica los estados T y R. Por otra parte, se obtiene aquí una variación en el valor de  $\Delta G$  relativo a los equilibrios  $R \longrightarrow T$  y  $RS_2 \longrightarrow TS_2$  de 19,3 kJ/mol ( 4,6 kcal/mol) comparable al valor de la Bibliografía y citado anteriormente de  $4 \pm 1$  kcal/mol para los valores de  $L_0$  obtenidos con la fosforilasa a y b (41) . También habría que citar a este respecto que el valor que se obtiene para la constante del equilibrio  $TS_2 \longrightarrow RS_2$  es 0,14, sobre un orden de magnitud inferior al propuesto en ausencia de efectores para la fosforilasa a ( 90 ); pero de acuerdo con nuestras premisas de partida, las especies realmente comparables( por ejemplo, igual actividad) serían la fosforilasa b y a, ambas en presencia de AMP, por lo que lógicamente debe es

perarse un valor menor para  $L_0$  en la fosforilasa a unido al AMP que el propuesto en la Bibliografía para la fosforilasa a en ausencia de efectores.

No existen diferencias entálpicas significativas entre la unión del AMP a las formas T y R. La influencia en los valores correspondientes de  $\Delta G^\circ$  es de naturaleza entrópica. Esto indicaría que las interacciones "entálpicas" establecidas en la unión del AMP al sitio N en ambos estados T y R deben ser muy semejantes, mientras que serán las "entrópicas" las que realmente "decidan" la mayor afinidad en la unión a R que a T. Volveremos sobre la posible naturaleza de estas interacciones al discutir posteriormente lo que venimos denominando "unión intrínseca".

Tabla V

	<u>R + T</u>	<u>T+AMP + T.AMP</u>	<u>R+AMP+R.AMP</u>
K	$3,60 \times 10^2$	$3,51 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$1,80 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
$\Delta G^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	-14,5	-20,2	-30,0
$\Delta H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	65,5	-18,8	-20,0
$\Delta S^\circ / \text{JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	266	7	34

Se ha estudiado además la unión del IMP a la fosforilasa b. Este es un activador de la enzima más débil que el AMP, y al igual que éste se une al sitio N preferentemente y al sitio I con menos afinidad(47,61). Estudios de unión de IMP a fosforilasa b han sido realizados a 4°C, con el resultado de que hay dos sitios distintos por subunidad con constantes de unión análogas(47). A 25°C no parece que se hayan aportado datos a la Bibliografía, aunque Graves y colaboradores han publicado, sin incluir la base experimental, que a 30°C las constantes de inhibición y activación por este nucleótido son aproximadamente iguales (156). Ho y Wang (75) hacen la suposición de un único sitio por subunidad, basados en la obtención de una curva de valoración calorimétrica monofásica por comparación con la obtenida por ellos para el AMP. Sin embargo, y como ya se ha dicho repetidamente a lo largo de esta Memoria, este tipo de curva calorimétrica no proporciona información acerca del número de sitios cuando éstos son distintos y/o cooperativos.

Nuestros experimentos de diálisis en el equilibrio parecen demostrar que el IMP se une a dos sitios, el del activador (N) y del inhibidor (I), de la fosforilasa b en disolución a 25°C. Comparando la afinidad de este nucleótido por el sitio N con la del AMP se observa que aquella es bastante menor siendo la constante de unión aproximadamente un orden de magnitud inferior mientras que la constante de unión al sitio I es comparable a la del AMP (incluso un poco superior). Esta gran proximidad entre las constantes de unión a ambos sitios (I y N) podría ser la causa de su débil efecto activador, ya que la unión al sitio I puede ejercer un efecto inhibitor. De hecho, la unión del AMP a este sí

tio, termodinámicamente comparable a la del IMP (Tabla III y IV) produce un efecto inhibitor como se indicó previamente. Este es además el sitio de unión de inhibidores característicos de la enzima, tales como adenina y adenosina. De los resultados de diálisis se deduce que dentro del error experimental esta interacción fosforilasa b - IMP podría considerarse tanto no cooperativa, es decir con dos clases de sitios distintos e independientes en su conjunto, como cooperativa en la unión a los sitios N (ver Resultados). En este último caso el ajuste de los datos experimentales es alrededor de un 17% mejor que en el otro. Se optó por considerar que la unión del IMP a la enzima se produce de acuerdo con esta último planteamiento no sólo porque proporciona un ajuste de nuestros datos experimentales ligeramente superior, sino también porque la información existente en la Bibliografía apoya el hecho de la cooperatividad positiva en la unión de este nucleótido a la enzima (61,70,87) sin referencia alguna de una posible unión independiente. Las constantes de unión al sitio N obtenidas proporcionan un coeficiente de Hill, 1,2, que coincide con el dado por Buc et al. (61) y que está reflejando una cooperatividad homotrópica positiva inferior a la del AMP en su unión a estos sitios N.

Los parámetros termodinámicos de unión de IMP a fosforilasa b se han calculado pues en el supuesto de que la unión a los sitios N es cooperativa y a los sitios I no lo sea (ver Resultados). Una comparación de los parámetros termodinámicos obtenidos para la unión



de uno y otro nucleótido a los sitios I y N resulta bastante interesante. Así, se observa que estos parámetros son análogos para ambos nucleótidos cuando se unen al sitio I. Los valores de  $\Delta G$  son muy próximos como consecuencia de unas constantes de unión comparables, y los valores obtenidos para  $\Delta H$  y  $\Delta S$  son en ambos casos negativos y parecidos. Este último hecho indica que la unión del AMP y del IMP a este sitio es análoga, es decir, que no existe en este sitio una preferencia estructural hacia el IMP o el AMP, siendo por tanto un sitio no discriminante para los nucleótidos, cosa que no ocurre con las bases nitrogenadas y nucleósidos que reconocen el sitio mucho más específicamente (53). Cuando se compara la unión al sitio N se observan diferencias significativas en los valores sobre todo de  $\Delta H$  y  $\Delta S$ . Estos valores para la unión del IMP son inferiores en magnitud a los de unión del AMP.

El gran exceso de IMP sobre AMP libre que se acumula en el músculo durante el ejercicio sugiere que, aunque el IMP sea peor activador de la fosforilasa b que el AMP, puede desempeñar, no obstante, el papel de activador fisiológico de la enzima durante el ejercicio continuado o durante la recuperación del ejercicio (86). A este respecto se ha explicado en la Bibliografía el menor efecto activante del IMP por la afinidad similar de este nucleótido por los sitios N e I (7).

Sin embargo, los parámetros termodinámicos aquí obtenidos para la unión de AMP e IMP al sitio de activador, N, son claramente distintos, lo que indica que los cambios

conformacionales originados por ambos nucleótidos deben serlo. Aunque este resultado no presupone un juicio de valor sobre la importancia in vivo de ambos nucleótidos, sí indica que las conformaciones de las especies fosforilasa b-AMP y fosforilasa b-IMP son diferentes cuando tanto el AMP como el IMP se unen sólo al sitio N. Esto comprueba a su vez la mayor especificidad del sitio N en comparación con el sitio I y el papel crítico que el grupo amino de la base debe jugar en unión del AMP al sitio N.

La baja activación de la fosforilasa b ocasionada por el IMP al unirse al sitio N sería, por tanto, consecuencia no sólo de la unión concomitante del nucleótido al sitio I, sino también del hecho de que la unión al sitio N da lugar a un estado de la enzima no equivalente al originado por la unión del AMP a este sitio N. Esta diferente conformación propuesta para las especies fosforilasa b-AMP y fosforilasa b-IMP está cualitativamente de acuerdo con los resultados de Radda et al. (87) obtenidos por resonancia de spín electrónico.

Es por otra parte de esperar que las diferencias en los parámetros termodinámicos para la unión al sitio N del AMP e IMP de deben tanto a los cambios conformacionales así originados, como a los propios valores de la unión intrínseca de ambos nucleótidos. No es posible pues en este caso obtener información acerca de las contribuciones conformacionales e intrínsecas en la unión del IMP al sitio N de la fosforilasa b.

La interpretación de los parámetros termodinámicos de lo que hemos denominado unión intrínseca del AMP al sitio N de la fosforilasa puede realizarse en función de lo que hoy día se conoce acerca de la estructura de sitio N y de las interacciones postuladas en la interacción con el nucleótido.

Por difracción de rayos X a 3 Å de resolución se propone una interacción por puente de hidrógeno del grupo 2'-OH de la ribosa del AMP con la Gln - 72 en la hélice AA' y con otro resto aminoácido en el "cap" de la otra subunidad, la Asn - 42 (47). Por otra parte, se ha encontrado que la base nitrogenada del AMP interacciona con la Tyr-75 a través quizás de la formación de una interacción tipo "stacking" de los anillos aromáticos (157, 159). Esta interacción parece ser fundamental para la unión del AMP siendo la naturaleza púrica de la base un requisito indispensable en el AMP u otro compuesto que también se una al sitio N. Existe también una interacción posiblemente electrostática, entre el grupo fosfato de AMP y la Arg-309 y quizás la Arg-308 (47). El grupo fosfato parece ser también un requisito para esta unión de AMP al sitio N (47), así como para dar lugar a una especie catalíticamente activa (53, 88). La posición N-10 de la base parece formar una interacción específica con algún resto aún no definido (47). A esta especificidad sería en principio atribuible el muy diferente comportamiento del AMP e IMP en este sitio N. Por último, se conoce que dicho sitio N es una región de naturaleza básicamente hidrofóbica (160).

En la unión intrínseca se obtuvieron valores negativos de  $\Delta H$  y positivos de  $\Delta S$ . La interpretación de los mismos muestra un acuerdo cualitativo con lo que es de esperar de las interacciones anteriores propuestas. Así, la formación neta de enlaces de hidrógeno originaría un  $\Delta H$  negativo, aunque por lo comentado anterior (pág. 230) acerca de estas interacciones es difícil establecer que realmente exista formación neta de dichos enlaces de hidrógeno (117). Las interacciones electrostáticas del grupo fosfato son de un carácter más entrópico que entálpico, sin embargo su magnitud depende en gran extensión de la constante dieléctrica o micropolaridad del medio, que se desconoce, por lo que es difícil establecer conclusiones al respecto. La interacción entre anillos aromáticos ("stacking") es una interacción entálpicamente dirigida que puede ocasionar valores negativos de varias kcal/mol. Por otra parte, debido al carácter hidrofóbico del sitio N, las moléculas de  $H_2O$  en contacto con él pasaran a la disolución como consecuencia de la unión del AMP, originando un  $\Delta S$  positivo y dando lugar muy posiblemente a un  $\Delta C_p$  negativo para dicha unión (150), lo que implicaría una dependencia del  $\Delta S$  con la temperatura.

Es decir, tanto la interacción de la base púrica del AMP con la Tyr - 75 y la posible formación neta de puentes de hidrógeno como el carácter hidrofóbico del sitio N parecen ser las causas principales para los valores de  $\Delta H$  e  $\Delta S$  respectivamente de la unión del AMP al sitio N.

La unión no cooperativa del AMP al sitio del inhibidor, I, se ha visto que es muy inespecífica por comparación con el IMP y como corrobora una publicación reciente sobre unión a este sitio de una diversidad de ligandos (inhibidores) (128). En esta publicación se encuentran valores también negativos para  $\Delta H$  y  $\Delta S$  a 25°C en la unión de FMN al sitio I con un  $\Delta C_p$  negativo y función a su vez de la temperatura. Parece ser que la contribución entálpica provendría fundamentalmente de la interacción de la base con la Tyr-612 y/o la Phe-285 mientras que el valor de  $\Delta S$  no admite una clara interpretación salvo que, por comparación con el trabajo citado recientemente, deba variar mucho con la temperatura, incluso cambiando su signo a temperaturas ligeramente inferiores a la ambiente, 25°C. Otros restos del sitio I que pueden presentar algún tipo de interacción serían la Gly-611 y la His-613. Estas consideraciones serían válidas tanto para el AMP como el IMP unido a este sitio I. En cuanto a la unión del IMP al sitio N, ya se indicó anteriormente la imposibilidad de caracterizar su unión intrínseca.

VII. CONCLUSIONES



Como consecuencia del análisis, interpretación y discusión de los resultados obtenidos en la presente Memoria, en el contexto de la información bibliográfica existente para nuestros sistemas y técnicas de trabajo, se proponen las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que muchas preparaciones de glucógeno-fosforilasa consideradas como puras por los criterios convencionales comúnmente utilizados, se encuentran contaminadas por AMP-aminohidrolasa al nivel de partes por millón. Este nivel de impureza puede conducir a resultados erróneos en experimentos que requieran concentraciones relativamente altas de AMP y fosforilasa.

2. Se ha puesto a punto un método simple y eficaz para la eliminación de AMP-aminohidrolasa en las preparaciones de fosforilasa. Este método se basa en la utilización de un adsorbente, la alúmina  $C_{\gamma}$ , de gran selectividad y eficacia para la adsorción de la AMP-aminohidrolasa. Así, muestras de fosforilasa a una concentración de 12,5 mg/ml, purificadas por este procedimiento, y en presencia de AMP 17 mM, no muestran conversión detectable de este nucleótido en IMP tras dos meses de incubación en la cámara fría.

Se propone, pues, el procedimiento de purificación con alúmina  $C_{\gamma}$  descrito en esta Memoria como una etapa adicional al método general de obtención de fosforilasa, al menos cuando ésta vaya a utilizarse en presencia de su activador alostérico, AMP.



3. Cada subunidad de fosforilasa b posee en di solución a 25°C dos sitios con distinta afinidad para la unión tanto del AMP como del IMP. Estos sitios se han asignado a los denominados sitios N e I respectivamente, caracterizados por estudios de difracción de rayos X. La constante de unión del AMP a los sitios I en el dímero es tal que parece excluirse su significado fisiológico, ya que la concentración de AMP requerida para saturar dichos sitios es más de tres órdenes de magnitud superior a la concentración intracelular de este nucleótido.

4. La unión del AMP a los sitios N muestra cooperatividad homotrópica positiva, mientras que los sitios I se comportan como independientes para la unión del AMP. Un comportamiento similar parece evidenciarse para la unión del IMP a este conjunto de sitios. La diferencia de afinidad del AMP para los sitios N e I es claramente superior a dicha diferencia para el IMP, en el que las constantes de unión a N e I son de un mismo orden de magnitud.

5. Los parámetros termodinámicos de unión respectivos de ambos nucleótidos al sitio I de la fosforilasa b son iguales dentro del error experimental, indicando así que dicho sitio no discrimina prácticamente entre ambos nucleótidos. La unión del AMP e IMP a este sitio a 25°C es entálpicamente dirigida mostrando valores negativos en el incremento de entropía.

6. La interacción de AMP con fosforilasa a no muestra unión apreciable al sitio I, únicamente al N, en el rango de concentración de AMP investigado. La unión a los sitios N del tetrámero de fosforilasa a muestra una cooperatividad muy baja. El análisis tanto de los experimentos de diálisis como calorimétricos, prueba que la interacción fosforilasa a - AMP puede representarse por una única constante y un único calor de unión por sitio. Es decir, que los sitios N pueden considerarse idénticos e independientes dentro del margen de error experimental para la unión del AMP a 25°C.

7. Un análisis comparativo de los parámetros termodinámicos de unión del AMP a la fosforilasa a y b a 25°C ha permitido el desglose de los mismos en los correspondientes a la unión intrínseca del nucleótido a los sitios N y los relativos al cambio conformacional global provocado por la unión a la fosforilasa b del activador alostérico. Este cambio conformacional se caracteriza por estar entrópicamente impedido a 25°C, mostrando un alto valor de  $\Delta S$  negativo, responsable del valor  $\Delta G > 0$  para dicha transición. Esta disminución de entropía se interpreta fundamentalmente como debida al incremento de las interacciones entre restos hidrofóbicos y el agua que parecen tener lugar en dicho cambio conformacional.

8. Los resultados termodinámicos para la unión del AMP a la fosforilasa b son compatibles con el modelo concertado de Monod et al. en el que el nucleótido

se une tanto al estado R como al T. Los parámetros termodinámicos obtenidos para el proceso de activación,  $T \rightarrow R$ , son análogos a los del cambio conformacional previamente planteado según un esquema secuencial. Los incrementos de entalpía en las uniones del AMP a las configuraciones T y R son comparables, mientras que las diferencias entrópicas, favorables a esta segunda unión, justifican que la constante de unión al estado R sea dos órdenes de magnitud superior que al estado T.

9. Los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  correspondientes a la unión intrínseca del AMP al sitio N de la fosforilasa se interpretan como debidos a un conjunto de interacciones varias caracterizadas por estudios de rayos X, como sería el caso de la existente entre la base nitrogenada del nucleótido y el resto de tirosina-75. El 2'OH de la ribosa se une a su vez por puentes de hidrógeno a dos restos definidos en ambas subunidades pudiendo así ocurrir formación neta de dichos enlaces. Un aporte positivo al  $\Delta S$  se originaría además por el desplazamiento de moléculas de agua desde el sitio N, de naturaleza hidrofóbica, al seno de la disolución.

VIII. BIBLIOGRAFIA



- ( 1 ) Cori, C. F., y Cori, G. T. (1936) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34,702
- ( 2 ) Cortijo, M. y Shaltiel, S. (1972) Eur. J. Biochem. 29,134
- ( 3 ) Cortijo, M., Jiménez, J. S. y García Blanco, F. (1976) Primer Congreso de la FESBE Resúmenes, 23
- ( 4 ) Cortijo, M., Llor, J., Jiménez, J. S. y García Blanco, F. (1976) Eur. J. Biochem. 65,521
- ( 5 ) Jiménez, J. S. Mateo, P. L. y Cortijo, M. (1977) 11 FEBS Meeting Abstracts. A 1-6-066
- ( 6 ) Cortijo, M. Jiménez, J. S. y Llor, J. (1978) Biochem. J. 171,497
- ( 7 ) Dombradi, V. (1981) Int. J. Biochemistry 11,125
- ( 8 ) Brown. D. M. y Cori, C. F. (1961) The Enzymes, (Ed. Boyer) 5,207 Academic Press, Nueva York
- ( 9 ) Graves, D. J. y Wang, J. W. (1972) The Enzymes, (Ed. Boyer) 7,435 Academic Press, New York
- ( 10 ) Busby, S. J. W., Radda, G. K. (1975) Curr. Top. Cell Ref. 10,89
- ( 11 ) Helmreich, E.J.M. y Klein, H. W. (1980) Angew. Chem.Int.Edn Eng. 19.441 - 455
- ( 12 ) Fletterick, R. J. y Madsen, N. B. (1980) Ann.Rev. Biochem. 49,31
- ( 13 ) Cori, C. F. (1931) Physiological Reviews 11,143
- ( 14 ) Smith, E. E. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 146, 380
- ( 15 ) Cori, G. T., Colowich, S. P. y Cori, C. F. (1938) J. Biol. Chem. 123,381
- ( 16 ) Krebs, E. G. y Fischer, E. H. (1956) Biochim. Biophys. Acta 20,150
- ( 17 ) Walker, U. J. y Whelan, W. J. (1960) Biochem. J. 76,264
- ( 18 ) Nelson, T. E., Palmer, D. H. y Larner, J. (1970) Biochim. Biophys. Acta 212,269

- ( 19 ) Cori, G. T. y Larner, Y. (1951) J. Biol. Chem. 188,17
- ( 20 ) Brown, D. H. y Brown, D. I. (1966) Methods in Enzymology 8,515
- ( 21 ) Stryer, L. (1976) Bioquímica, Reverté, Barcelona
- ( 22 ) Newsholme, E. A. y Start, C. (1973) Regulation in Metabolism. John Wiley and Sons, Londres
- ( 23 ) Leboir, L. F. y Cardini, C. E. (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79,6340
- ( 24 ) Villar - Palasi, C. y Larner, J. (1960) Arch. Biochem. 86,61
- ( 25 ) Krebs, E. G. Cori, G.T. (1953) Biochim. Biophys. Acta. 12,235
- ( 26 ) Fischer, E. H. y Krebs, E. G. (1955) J. Biol. Chem. 216,121
- ( 27 ) Wang, J. H. , Shonka, M. L. y Graves, D. J. (1965) Biochemistry 4,2296
- ( 28 ) Titani, K., Koide, A., Hermann, J., Ericsson, L. H., Kumar, S., Wade, R. D., Walsh, K. A., Neurath, H. y Fischer, E. H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4762
- ( 29 ) Fletterick, R. J., Sygusch, J., Murray, N., Madsen, N. B. y Johnson L. N. (1976) J. Mol. Biol 103,1
- ( 30 ) Fletterick, R. J., Sygusch, J., Semple, M. y Madsen, N. B. (1976) J. Biol. Chem. 251,6142
- ( 31 ) Kasvinski, P. J. y Madsen, N. B. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6852
- ( 32 ) Fletterick, R. J. y Madsen, N. B. (1977) Trends Biol. Sci. 2,145
- ( 33 ) Sygusch, J., Madsen, N. B., Kasvinsky, P. J. y Fletterick, R. J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74,4757
- ( 34 ) Li, E. C. Y., Fletterick, R. J., Sygusch, J. y Madsen, N. B. (1977) Can. J. Biochem. 55,465

- ( 35 ) Kasvinsky, P. J., Madsen, N. B., Sygusch, J. y Fletterick, R. J. (1978) J. Biol. Chem. 253,3343
- ( 36 ) Madsen, N. B., Kasvinsky, P. J. y Fletterick, R. J. (1978) J. Biol. Chem 253,9097
- ( 37 ) Kasvinsky, P. J., Madsen, N. B., Fletterick, R. J. y Sygusch, J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1290
- ( 38 ) Kasvinsky, P. J., Shechosky, S. y Fletterick, R. J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 9102
- ( 39 ) Fletterick, R. J., Sprang, S. y Madsen, N. B. (1979) Can. J. Biochem. 57,789
- ( 40 ) Sprang, S. y Fletterick, R. J. (1979) J. Mol. Biol. 131,523
- ( 41 ) Sprang, S. y Fletterick, R. J. (1980) J. Biophys. Soc. 18,175
- ( 42 ) Johnson, L. N., Madsen, N. B., Mosley, J. y Wilson, K. S. (1974) J. Mol. Biol. 90,703
- ( 43 ) Johnson, L. N., Weber, I. T., Wild, K. S. y Yeates, D. G. R. (1978) (Ed. Esmann V.) FEBS Symposium. 42,185, Pergamon Press. Oxford
- ( 44 ) Johnson, L. N., Weber, I. T., Wild, D. L., Wilson, K. S. y Yeates, D. G. R. (1978) J. Mol. Biol. 118,579
- ( 45 ) Wilson, K. S. y Yeates, D. G. R. (1979). Acta Crystallogr. sect. A, 35,146
- ( 46 ) Weber, I. T., Johnson, L. N., Wilson, K. S., Yeates, D. G. R., Wild, D. L. y Jenkins, J. A. (1978) Nature 274, 433
- ( 47 ) Johnson, L. N., Stura, E. A., Wilson, K. S., Sansom, M. S. P. y Weber, I. T. (1979) J. Mol. Biol. 134,639
- ( 48 ) Johnson, L. N., Jenkins, J. A., Wilson, K. S., Stura, E. A. y Zanotti, G. (1980) J. Mol. Biol. 140,1565
- ( 49 ) Jenkins, J. A., Johnson, L. N., Stuart, D. I., Stura, E. A., Wilson, K. S. y Zanotti, G. (1981) Phil. Trans.R.Soc. Londres



- ( 50 ) Fischer, E., Graves, D.J., Crittenden E. R. S. y Krebs, E. G. (1955) J. Biol. Chem. 234,1698
- ( 51 ) Klein, H. w., Palm, D. y Helmreich, E. J. M. (1983) Biochemistry, en prensa
- ( 52 ) Cortijo, M. y Shaltiel, S. (1972) Eur. J. Biochem. 29,134
- ( 53 ) Morange, M., García Blanco, F., Vandebunder, B. y Buc, H. (1976) Eur. J. Biochem. 65,553
- ( 54 ) Chatachy, C., Forchioni, A., Morange, M. y Buc, H. (1978) Eur. J. Biochem. 82, 363
- ( 55 ) Fukui, T., Shimomura, S. y Nakano, K. (1982) Mol. Cell. Biochem. 42,129
- ( 56 ) Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J. P. (1965) J. Mol. Biol. 12,88
- ( 57 ) Buc, H. C. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28,59
- ( 58 ) Buc, M. H. y Buc, H. C. (1967) Fed. Eur. Biochem. Soc. Meet. 4th,109
- ( 59 ) Buc, M. H., Ullmann, A., Goldberg, M. y Buc, H. C. (1971) Biochimie 53,283
- ( 60 ) Danchin, A. y Buc, H. C. (1972) F E B S Lett. 22,289
- ( 61 ) Buc, H. C., Buc, M. H., García Blanco, F., Morange, M. y Winkler, H. Metabolic Interconversion of Enzymes. Springer Verlag 21, New York
- ( 62 ) Buc, H. C., Morange, M., García Blanco, F. y Danchin, A. (1973) 9th FEBS Meeting 32,57, Budapest
- ( 63 ) Danchin, A. y Buc, H. C. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3241
- ( 64 ) Buc-Caron, M. H., Faure, F., Oudin, L. C., Vandebunder, B. y Buc, H. C. (1974) Biochimie 56,477

- ( 65 ) Buc-Caron, M. H. y Buc, H. C. (1975) Eur. J. Biochem. 52,575
- ( 66 ) Vandebunder, B., Morange, M. y Buc, H. C. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73,2696
- ( 67 ) Vandebunder, B., Dreyfus, M. y Buc, H. C. (1978) Biochemistry 17,4153
- ( 68 ) Dreyfus, M., Vandebunder, B. y Buc, H. C. (1980) Biochemistry 19,3634
- ( 69 ) Morange, M., Kolb, A., H. C., Chachaty, C. y Langht, G. (1977) Eur. J. Biochem. 74,99
- ( 70 ) Black, W. J. y Wang, J. H. (1968) J. Biol.Chem. 243,5892
- ( 71 ) Campbell, I.D., Dwek, R.A., Price, N. C. y Radda, G. K. (1972) Eur. J. Biochem. 30,339
- ( 72 ) Graves, D. J., Scharfenberg Mann, A., Philip, G. y Oliveria, R.J. (1968) J. Biol. Chem. 243,6090
- ( 73 ) Busby, S. J. W., Hemminga, M. A., Radda, G. K., Trommer, V. E. y Wenzel, H. (1975) Eur. J. Biochem. 63,33
- ( 74 ) Wang. J. H., Hwok, S. C., Wirch, E. y Suzuki, I. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40,1340
- ( 75 ) Ho, H. C. y Wang, J. H. (1973) Biochemistry 12, 4750
- ( 76 ) Dahlquist, F. W. (1978) Methods Enzymol. 48,270
- ( 77 ) Avramovic, O. y Madsen, N. B. (1968) J. Biol. Chem. 243,1656
- ( 78 ) Danforth, W. H., Helmreich, E. y Cori, C. F. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1191
- ( 79 ) Kastenschmidt. L. L., Kastenschmidt, J. y Helmreich, E. (1968) Biochemistry 7, 3590
- ( 80 ) Kastenschmidt, L. L., Kastenschmidt, J. y Helmreich, E. (1968) Biochemistry 7, 4543
- ( 81 ) Gutierrez Merino, C., Garcia Blanco, F. y Laynez, J. (1977) FEBS Lett. 73, 97

- ( 82 ) Gutierrez Merino, C., Laynez, J. y García Blanco, F. (1979) Biophys.Chem. 9,263
- ( 83 ) Gutierrez Merino, C., Laynez, J. y García Blanco, F. (1979) Biophys.Chem. 9,251
- ( 84 ) Gutierrez Merino, C., García Blanco, F., Pocovi, M., Menendez, M. y Laynez, J. (1980) J. Biochem. 87,1483
- ( 85 ) Eftink, M. y Biltonen, R. (1980) Biological Micro-calorimetry ( Ed. A.E. Beezer ) 343 Academic Press, Nueva York
- ( 86 ) Aragón. J. J., Torhheim, K. y Lowenstein, J. M. (1980) F E B S Lett. 117,56
- ( 87 ) Bennick, A., Dwek, R. A., Griffiths, J. R. y Radda, G. K. (1972) Annals New York Academy of Sciences 175
- ( 88 ) Mott, D. M. y Bieber, A. L. (1970) J. Biol. Chem. 245,4058
- ( 89 ) Helmreich, E., Michaelides, M. C. y Cori, C. F. (1967) Biochemistry 6,3695
- ( 90 ) Griffiths, J. R., Price, N. C. y Radda, G. K. (1974) Biochim. Biophys. Acta 358,275
- ( 91 ) Fischer, E. H., Krebs, E. G. y Kent, A. B. (1958) Biochem. Prepn. 6,68
- ( 92 ) Krebs, E. G., Love, D. S., Bratvold, G. E., Trayser, K. A., Meyer, W. L. y Fischer, E. H. (1964) Biochemistry 3,1022
- ( 93 ) Hedrick, J.L. y Fischer, E.H. (1965) Biochemistry 4,1337
- ( 94 ) Krebs, E.G. (1966) Methods Enzymol. 8,543
- ( 95 ) Cohen, P. (1973) Eur.J.Biochem. 34,1
- ( 96 ) Illingworth, B. y Cori, G.T. (1953) Biochem.Prep. 3,1
- ( 97 ) Fischer, E.H. y Krebs, E.G. (1962) Methods Enzymol. 5,369

- ( 98 ) Palau Franco, J. (1979) Tesis Doctoral Universidad de Palma de Mallorca
- ( 99 ) Krebs, E.G., Kent, A.B. y Fischer, E.H. (1958) J. Biol.Chem. 231,73
- (100) Cohen, P., Duewer, T. y Fischer, E.H. (1971) Biochemistry 10,2683
- (101) Nikiforuk, G. y Colowick, S.P. (1955) Methods Enzymol. 2,469
- (102) Tanford, C. (1961) Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, J. & Sons. New York
- (103) Bray, G.A. (1960) Anal. Biochem. 1, 279
- (104) De Vicenzi, D.L. y Hedrick, J.L. (1970) Biochemistry 9,2048
- (105) Hill, A.V. (1910) J.Physiol. 40,6
- (106) Hill, A.V. (1913) Biochem.J. 7,471
- (107) Levitzki, A. (1975) Enzymology 2,3
- (108) Sturtevant, J.M. (1972) Methods Enzymol. 26,227
- (109) Sturtevant, J.M. (1974) Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 3,35
- (110) Wadsø, I. (1975) New Techniques in Biophysics and Biology 85 (Ed. Pain, R. H. y Smith, B. J.) Wiley, J. and Sons New York
- (111) Langerman, N. Y., Biltonen, R. L. (1979) Methods Enzymol. 61,261
- (112) Mabrey, S. y Sturtevant, J. M. (1978) Methods Membr. Biol. 9, 237
- (113) Privalov, P. L. (1980) Pure and Appl. Chem. 52,479
- (114) Gucker, F. T., Pichard, H. B. y Planck, R. W. (1938) J.Amer.Chem. Soc. 61,454
- (115) Bjurulf, C., Laynez, J. y Wadsø, I. (1970) Eur. J. Biochem. 14,47

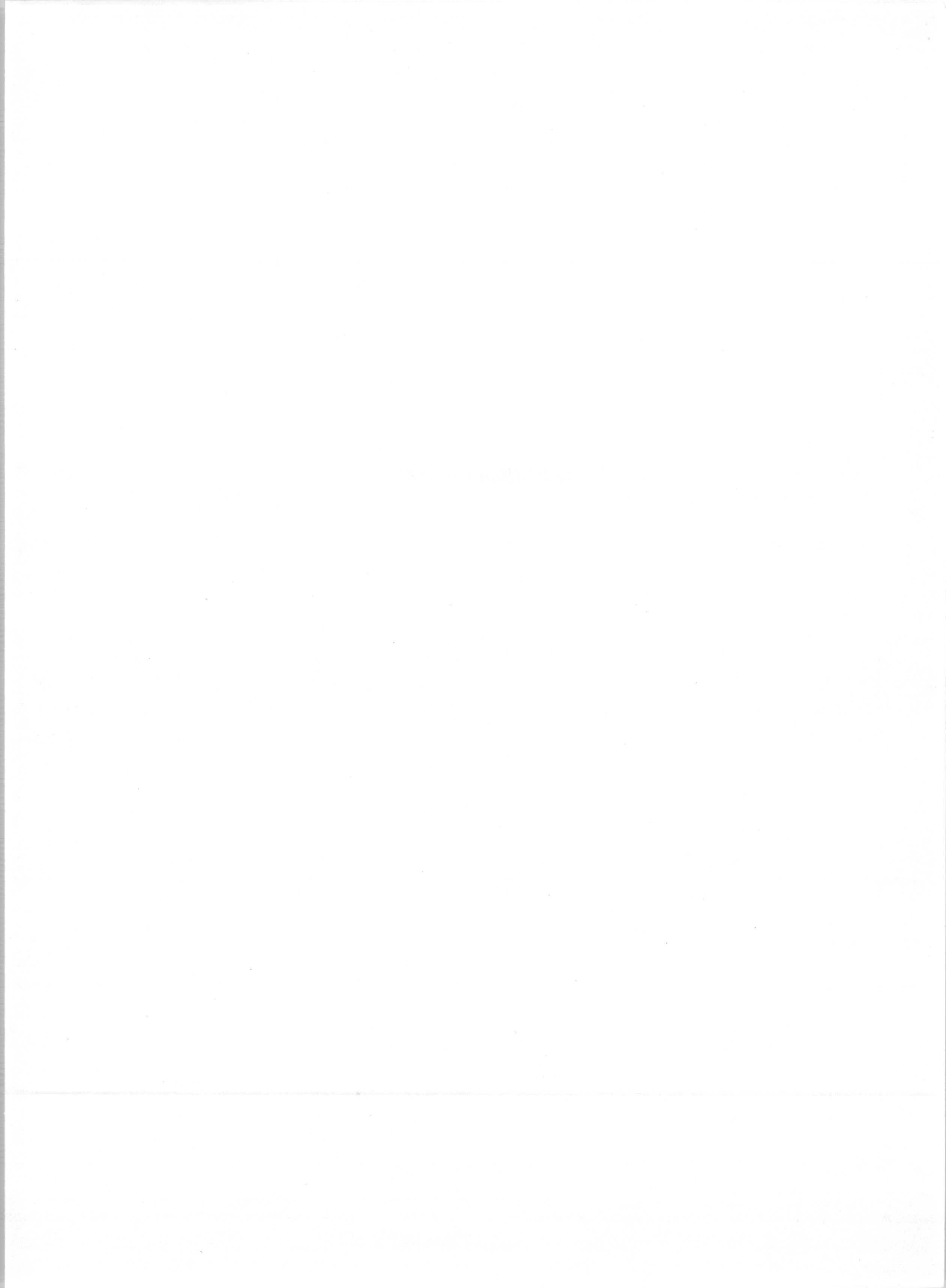
- ( 116 ) Bolen, D. W., Flogel, M. y Biltonen, R. L. (1971) Biochemistry 10,4136
- ( 117 ) Niekamp, C. W., Sturtevant, J. M. y Velick, S. F. (1977) Biochemistry 16,436
- ( 118 ) Allewell, N. M., Friedland, J. y Niekamp, K. (1975) Biochemistry 14,224
- ( 119 ) Lee, Y. P. (1960) The Enzymes (Ed. Boyer, P. D.) 4,279 Academic Press, New York
- ( 120 ) Lee, Y. P. (1957) J. Biol. Chem. 227,999
- ( 121 ) Ashby, B. y Frieden, C. (1978) J. Biol. Chem. 253,8728
- ( 122 ) Gill, S. J., Gaud, H. T., Wyman, J. y Barisas, B. G. (1978) Biophys. Chem. 8, 53
- ( 123 ) Puchwein, F., Kratky, O., Fölker, C. F. y Helmreich, E. (1970) Biochemistry 24,4691
- ( 124 ) Ficher, E. H. y Krebs, E. G. (1968) J. Biol. Chem. 231,65
- ( 125 ) Muñoz, F., Pocovi, M., Echevarria Gorostidi, G., Roig, A. y Garcia Blanco, F. (1982) Anales de Bioquímica 78,226
- ( 126 ) Chignell, D. A., Gratzner, W. B. y Valentine, R. C. (1968) Biochemistry 7,1082
- ( 127 ) Black, W. J. y Wang, J. H. (1970) Biochim. Biophys. Acta. 212,257
- ( 128 ) Sprang, S., Fletterick, R., Stern, M., Yang, D., Madsen, N. y Sturtevant, J. M. (1982) Biochemistry 21,2036
- ( 129 ) Steiner, R. F., Greer, L., Gunther, C. y Moran, C. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 445,610
- ( 130 ) Christensen, J.J., Hansen, L. D. y Izatt, R. M. (1976) Handbook of Proton Ionization Heats and Related Thermodynamic Quantities. Wiley, J. and Sons, New York
- ( 131 ) Mountcastle, D., Freire, E. y Biltonen, R. L. (1976) Biopolymers 15,335

- (132) López Mayorga, O. (1983) Tesis Doctoral Universidad de Granada
- (133) Illingworth, B., Jansz, H. S., Brown, D. H., y Cori, C. F. (1958) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44,1180
- (134) Shimomura, S. y Fukui, T. (1978) Biochemistry 17,5359
- (135) Cortijo, M., Barón, C., Jiménez, J.S. y Mateo, P.L. (1982) J. Biol. Chem. 257,1121
- (136) Barón, C., Mateo, P.L., Cortijo, M. y Jiménez, J.S. (1982) Anal. Biochem. 124, 84
- (137) Busby, S.J.W., Gadian, D.G., Griffiths, J.R., Radda, G.K. y Richards, R.E. (1976) Eur. J. Biochem. 63,23
- (138) Lowenstein, J.M. (1972) Physiol. Rev. 52,382
- (139) Byrnes, E.W. y Suelter, C.H. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 20,422
- (140) Harrys, M. y Suelter, C.H. (1967) Biochim. Biophys. Acta 133,393
- (141) Gutierrez Merino, C., García Blanco, F. y Laynez, J. (1976) F E B S Lett. 67,9
- (142) Steiner, R.F., Greer, L. y Bhat, R. (1979) Biochemistry 18,1380
- (143) Madsen, N.B. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 15,390
- (144) Madsen, N.B. y Shechosky, S. (1967) J. Biol. Chem. 242,3301
- (145) Koshland, D.E., Nemethy, G. y Felmer, D. (1966) Biochemistry 5,365
- (146) Van Holde, K.E. Physical Biochemistry (1971) Prentice-Hall Englewood Cliffs, New Jersey
- (147) Topping, J. (1960) Errors of Observation and the Treatment. (Ed. Reinhold) New York
- (148) Chothia, C. (1975) Nature 254,304
- (149) Perutz, M. F. (1978) Science 201,1187

- (150) Sturtevant, J. M. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2236
- (151) Kauzmann, W. (1959) Adv. Protein Chem. 14, 1
- (152) Tanford, C. The Hydrophobic Effect (1973) Wiley, New York
- (153) Privalov, P. L. (1979) Adv. Protein Chem. 33, 167
- (154) Gusev, N. B., Hajdu, J. y Friedrich, P. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 70
- (155) Cori, C. F. y Cori, G. T. (1943) J. Biol. Chem. 151, 39
- (156) Uhing, R. J., Jonsky, A. M. y Graves, D. J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3166
- (157) Stoesser, P. R. y Gill, S. J. (1967) J. Phys. Chem. 71, 564
- (158) Marenchic, M. G. y Sturtevant, J. M. (1973) J. Phys. Chem. 77, 544
- (159) Mitchell, P. R. y Sigel, H. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 149
- (160) Anderson, R. A. y Graves, D. J. (1973) Biochemistry 12, 1895
- (161) Leach, S. J. (1973) Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry (Part. C). Ed. Leach S. J. Academic Press, New York

IX. APENDICES





1. TABLAS DE DATOS EXPERIMENTALES

Tabla VI

Datos correspondientes a los experimentos calorimétricos de unión de AMP  
a fosforilasa b .

<u>A<sub>1</sub></u>		<u>A<sub>2</sub></u>		<u>A<sub>3</sub></u>		<u>B<sub>1</sub></u>	
<u>[AMP] x 10<sup>3</sup> (a)</u>	<u>-Q (b)</u>	<u>[AMP] x 10<sup>3</sup> (a)</u>	<u>-Q (b)</u>	<u>[AMP] x 10<sup>3</sup> (a)</u>	<u>-Q (b)</u>	<u>Flujo (c)</u>	<u>-Q (b)</u>
0,3	36	0,6	62	0,1	15	5,1	792
0,4	47	1,2	83	0,2	30	8,5	559
1,0	72	1,7	88	0,6	46	9,0	480
1,3	86	3,4	132	1,1	54	18,2	228
1,5	125	5,3	236	1,4	57		
1,7	104	6,1	265	1,6	61		
2,1	100	7,5	269	2,8	66		
3,1	191	10,6	275	3,4	68		
3,9	214			4,5	69		
4,8	348			5,6	90		
5,4	393			7,5	75	4,2	76
6,4	428			7,1	76	5,1	79
8,1	464			10,5	80	7,5	79
9,6	475			17,0	83	19,6	78

En la figura 15 A se encuentran representados los datos incluidos en las columnas A<sub>1</sub> (●), A<sub>2</sub> (Δ) y A<sub>3</sub> (○). En la figura 15 B se muestran los datos de las columnas B<sub>1</sub> (●), y B<sub>2</sub> (○).

(a) : mol dm<sup>-3</sup>; (b) : kJ (mol de monómero)<sup>-1</sup>; (c) : ml hora<sup>-1</sup>.

Tabla VII

Datos correspondientes a los experimentos de calorimetría de unión de AMP a fosforilasa b representados en la figura 16.

<u>[AMP] x 10<sup>3</sup>/mol dm<sup>-3</sup></u>	<u>-Q/kJ (mol de monómero)<sup>-1</sup></u>
0,39	34
0,60	42
0,70	41
1,00	52
1,10	53
1,90	52
3,10	63
3,30	65
3,50	68
4,50	80
4,70	84
5,10	81
5,50	83
5,60	90
5,90	90
6,00	92
7,60	101
7,80	93
8,30	99
10,20	107
11,00	103
11,10	105

Tabla VIII

Datos correspondientes a la unión de AMP a fosforilasa b mediante calorimetría.

A		B	
$[AMP] \times 10^3 / \text{mol dm}^{-3}$	$-Q / \text{kJ}(\text{mol de monómero})^{-1}$	$[AMP] \times 10^3 / \text{mol dm}^{-3}$	$-Q / \text{kJ}(\text{mol de monómero})^{-1}$
0,4	34	0,4	30
0,7	54	0,5	37
1,4	63	0,6	45
2,0	77	0,7	50
3,6	105	1,1	54
6,3	118	1,3	55
		1,5	56
		1,7	63
		2,1	62
		2,2	64
		2,8	78
		3,6	90
		5,2	93

Los datos incluidos en las columnas A y B corresponden a las curvas de la figura 17 A y B respectivamente.

Tabla IX

Variación con el tiempo de la concentración de protones consumidos al mezclar AMP con fosforilasa b.

<u>Tiempo/minutos</u>	<u>[H<sup>+</sup>] x 10<sup>3</sup>/mol dm<sup>-3</sup></u>
10	3,4
19	3,8
30	6,7
40	9,9
50	14,4
60	16,4
70	16,6

Los datos incluidos en esta tabla se muestran en la figura 18.

Tabla X

Reacción de transformación de AMP en IMP seguida por medidas de absorbancia a 265 nm. Los datos se muestran en la figura 19 B.

<u>Tiempo/minutos</u>	<u>Absorbancia</u>
9	1,37
15	1,31
20	1,24
25	1,20
42	1,06
48	1,02
60	0,96
70	0,90
80	0,83
90	0,80
105	0,78
130	0,75

Tabla XI

Variación con el tiempo de la concentración de protones consumidos en la mezcla de distintos nucleótidos con fosforilasa b. Datos incluidos en la figura 20.

AMP		AMP y Pi 50mM		UDP		ATP		IMP	
t(1)	$[H^+] \times 10^3 (2)$	t(1)	$[H^+] \times 10^3 (2)$	t(1)	$[H^+] \times 10^3 (2)$	t(1)	$[H^+] \times 10^3 (2)$	t(1)	$[H^+] \times 10^3 (2)$
10	4,5	10	1,2	20	0	15	0	50	0
20	8,0	22	2,8	60	0	30	0	80	0
40	8,9	26	3,8	120	0	40	0		
70	9,7	30	4,9						
		40	5,4						
		70	7,0						

(1) El tiempo viene expresado en minutos.

(2) La  $[H^+]$  viene expresada en mol  $dm^{-3}$ .

Tabla XII

Cinética de la hidrólisis de AMP por AMP-aminohidrolasa. Datos incluidos en la figura 22.

A		B	
<u>Tiempo/minutos</u>	<u>Absorbancia</u>	<u>Tiempo/minutos</u>	<u>Absorbancia</u>
5	1,07	5	1,09
12	1,01	60	1,05
17	0,97	120	1,00
37	0,86		
79	0,73		

Los datos incluidos en las columnas A y B corresponden a las curvas de la figura 22 A y B respectivamente.



Tabla XIII

Reacción de transformación de AMP en IMP seguida por medidas de absorbancia a 265 nm.

A		B		C		D	
Tiempo (minutos)	Absorbancia	Tiempo (minutos)	Absorbancia	Tiempo (minutos)	Absorbancia	Tiempo (minutos)	Absorbancia
3	1,23	3	1,25	4	1,27	4	1,30
8	1,14	8	1,19	18	1,10	30	1,30
12	1,03	14	1,12	26	1,02	80	1,30
15	0,98	18	1,06	34	0,96	97	1,30
20	0,88	26	0,98				
27	0,77	39	0,87				
33	0,72	44	0,83				
38	0,65						
42	0,58						
60	0,55						

Todos los datos incluidos en esta Tabla se muestran en la figura 23.

Tabla XIV

Datos correspondientes a los experimentos de diálisis en el equilibrio de unión de AMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C.

<u>[AMP] libre</u> $\times 10^4 / \text{mol dm}^{-3}$	<u><math>\nu</math></u>
0,08	0,08
0,16	0,10
0,18	0,18
0,43	0,44
0,49	0,68
0,52	0,72
0,71	0,72
0,82	0,88
0,97	1,12
1,06	0,96
1,14	1,12
1,64	1,48
1,95	1,60
2,02	1,62
2,53	1,64
3,42	2,20
3,75	1,92
3,91	2,12
4,42	1,84
5,59	2,18
12,54	2,34
12,54	2,60

Estos datos se muestran en la figura 24 y a partir de ellos se obtuvieron los datos que se representan en las figuras 25, 26 y 27 (ver pag. 131).  $\nu$  representa el número de moles de AMP unido por mol de dímero de fosforilasa b.

Tabla XV

Datos correspondientes a los experimentos de diálisis en el equilibrio de unión de AMP a fosforilasa a a pH 6,9 y 25°C.

$[AMP]_{\text{libre}} \times 10^5 / \text{mol dm}^{-3}$	$\nu$
0,18	0,88
1,02	2,69
1,63	2,92
3,50	3,90
8,48	3,64
0,03	0,15
0,07	0,36
0,45	1,84
0,77	3,07
1,14	2,72
2,18	3,36
7,80	3,20
1,65	2,96

Los datos incluidos en esta Tabla se muestran en la figura 28 y a partir de ellos se obtuvieron los datos que se han representado en las figuras 29 y 30.  $\nu$  representa el número de moles de AMP unido por mol de tetrámero de fosforilasa a.

Tabla XVI

Datos obtenidos de los experimentos de diálisis en el equilibrio de unión de IMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25° C.

[IMP] libre $\times 10^3$ mol dm <sup>-3</sup>	$\nu$
0,006	0,022
0,08	0,24
0,12	0,34
0,33	0,96
0,33	0,98
0,35	0,98
0,40	1,04
0,48	1,29
0,66	1,48
0,79	1,62
0,85	1,64
1,19	2,16
1,27	2,02
2,14	2,86

Estos datos se muestran en la figura 31. La representación de Scatchard de la figura 32 se hizo a partir de los datos incluidos en esta Tabla.

Tabla XVII

Datos obtenidos de los experimentos de calorimetría correspondientes a la unión de AMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C., en una disolución reguladora de Tris 50 mM.

<u>[AMP] x 10<sup>3</sup> / mol dm<sup>-3</sup></u>	<u>-ΔH/kJ dímero<sup>-1</sup></u>
0,18	58
0,20	54
0,25	70
0,40	86
0,50	88
0,80	104
0,82	102
1,06	104
1,10	106
1,20	112
1,70	175
2,40	130
2,80	130
3,30	132
4,30	132
7,40	140
8,10	147
8,60	158
9,20	142
9,50	156
16,95	166
17,10	170

Los datos experimentales incluidos en esta tabla se han representado en las figuras 33 y 37.

Tabla XVIII

Datos obtenidos de los experimentos de calorimetría correspondientes a la unión de AMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C., en una disolución reguladora de glicil - glicina 50 mM.

<u>[AMP] x 10<sup>3</sup> / mol dm<sup>-3</sup></u>	<u>-ΔH / kJ dímero<sup>-1</sup></u>
0,10	30
0,16	43
0,22	63
0,23	60
0,35	86
0,58	91
0,67	97
0,97	107
1,08	106
1,10	107
1,40	114
1,56	116
1,57	122
3,43	136
4,50	137
4,56	138
5,30	146
5,54	140
7,06	151
8,70	156
9,20	152
10,44	160
17,01	166

Los datos experimentales incluidos en esta tabla se han representado en las figuras 34 y 37.

Tabla XIX

Datos obtenidos de los experimentos de calorimetría correspondientes a la unión de AMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C., en una disolución reguladora de 2-glicerofosfato 50 mM.

<u>[AMP] x 10<sup>3</sup> / mol dm<sup>-3</sup></u>	<u>-ΔH / kJ dímero<sup>-1</sup></u>
0,27	78
0,50	94
0,72	95
0,81	99
1,01	105
1,47	123
1,76	121
3,20	128
6,00	139
7,50	148
16,60	157
16,65	160
17,01	162

Los datos experimentales incluidos en esta tabla se han representado en las figuras 35 y 37.

Tabla XX

Dependencia del calor de unión de AMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C, con la concentración de enzima. Datos incluidos en la figura 36.

<u>[fosforilasa] /g dm<sup>-3</sup></u>	<u>-ΔH/J dm<sup>-3</sup></u>
0,6	0,5
0,8	0,6
1,5	1,1
1,9	1,5
2,5	1,9
2,9	2,2
4,2	3,4
6,0	4,4



Tabla XXI

Datos calorimétricos correspondientes a la unión de AMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C , en presencia de fosfato 20 mM.

<u>[AMP] x 10<sup>3</sup>/mol dm<sup>-3</sup></u>	<u>-Q/kJ (mol de monómero)<sup>-1</sup></u>
0,10	8
0,13	26
0,53	47
0,75	54
1,00	57
1,40	65
5,05	68
7,00	67
13,00	68

Los datos incluidos en esta Tabla se muestran en la figura 38.

Tabla XXII

Datos calorimétricos de la unión de AMP a fosforilasa a a pH 6,9 y 25°C.

<u>[AMP] x 10<sup>5</sup>/mol dm<sup>-3</sup></u>	<u>-ΔH kJ/ tetramero</u>
0,69	12,0
0,95	20,0
1,71	42,0
4,00	61,0
12,30	76,8
18,30	80,0
21,80	83,0
63,40	79,2

Los datos incluidos en esta tabla se han representado en la figura 39 y se han utilizado en el cálculo de los datos representados en las figuras 40 y 41.

Tabla XXIII

Datos experimentales correspondientes a la unión de IMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25°C mediante calorimetría.

<u>[IMP] x 10<sup>3</sup> / mol dm<sup>-3</sup></u>	<u>-ΔH/ kJ dímero<sup>-1</sup></u>
0,12	8
0,23	12
0,28	20
0,42	24
0,63	32
0,75	36
0,97	46
1,17	54
1,45	64
1,80	68
2,25	80
2,80	86
3,35	94
4,20	98
5,10	100
6,35	106
7,85	108
12,00	106

Experimentos realizados por un método de gradiente continuo decreciente (ver V. 2.4). Los datos incluidos en esta tabla se han representado en la figura 42.

Tabla XXIV

Datos experimentales correspondientes a la unión de IMP a fosforilasa b a pH 6,9 y 25° C mediante calorimetría.

<u>[IMP] x 10<sup>3</sup>/mol dm<sup>-3</sup></u>	<u>-ΔH /kJ [dímero]<sup>-1</sup></u>
0,45	36
0,90	41
1,60	63
1,80	78
3,25	86
3,80	97
8,75	112
9,30	108
9,40	110

Experimentos realizados por el procedimiento descrito en Métodos (IV. 4.2). Estos datos se han presentado en la figura 42.

## 2. METODO DE GAUSS-NEWTON

Los datos correspondientes a experimentos de diálisis en el equilibrio y calorimetría descritos en esta Memoria se han ajustado a ecuaciones o modelos teóricos que han permitido obtener parámetros que caracterizan las interacciones proteína-ligando estudiadas. El cálculo de estos parámetros que mejor ajustan los datos experimentales a sus ecuaciones correspondientes se ha realizado por el método descrito a continuación.

Consideremos una serie de  $n$  datos correspondientes a unos experimentos en los que se determina la magnitud o cantidad  $Y$  a intervalos de una segunda cantidad  $X$ , disponiéndose así de  $n$  pares de valores  $(X_i, Y_i)$ ,  $i = 1, 2, 3, \dots, n$ .

Se define una función  $F$  a la cuál se van a ajustar los datos  $(X_i, Y_i)$ . Para cada valor de  $X_i$ , mediante esta función  $F$ , se le puede calcular un valor correspondiente de  $Y$  denominado  $F_i$ . Las diferencias entre  $F_i$  e  $Y_i$  se representan por  $\zeta_i$

$$\zeta_i = F_i - Y_i \quad (\text{IX. 1})$$

En el ajuste de los datos a la función  $F$  se pretende encontrar los valores óptimos de los parámetros  $P_1 \dots P_m$  incluidos en dicha función, para la cual se sigue el criterio de minimizar la suma ponderada de los cuadrados de  $\zeta_i$

$$S = \sum_{i=1}^n W_i \zeta_i^2 \quad (\text{IX. 2})$$

El valor  $W_i$  permite dar un peso estadístico a cada valor. En muchos casos  $W_i$  se considera la unidad para todo  $i$  de manera que todos los puntos se consideran con igual peso.

La condición que se debe cumplir para que  $S$  sea mínimo es que la derivada parcial de  $S$  con respecto a cada uno de los parámetros sea cero. De esta forma derivando la ecuación (IX. 2) respecto de cada uno de los parámetros se obtendrán  $m$  ecuaciones a partir de las cuales se pueden obtener los  $n$  parámetros. Por lo general esas ecuaciones no son lineales con respecto a los parámetros y por lo tanto se utilizan métodos que implican realizar una serie de sucesivas aproximaciones para estimar los valores óptimos de los parámetros. Un método muy general utilizado para este fin es el de Gauss o Gauss-Newton (161), en el cuál se utilizan como valores iniciales para el cálculo de los parámetros unos valores próximos a los óptimos.

Consideremos que  $P_1, \dots, P_m$  son los valores de los parámetros que minimizan  $S$  y se dispone de unos valores aproximados  $P_1^{(0)}, \dots, P_m^{(0)}$ . Desarrollando la función  $F$  en serie de Taylor y despreciando el segundo término y los superiores a éste se obtiene:

$$F_i = F_i^{(0)} + \sum_{j=1}^m \left( \frac{\delta F_i}{\delta P_j} \right)^{(0)} \Delta P_j ; (i=1, \dots, n) \quad (\text{IX. 3})$$

donde  $F_i = F_i(P_1, \dots, P_m)$

$$F_i^{(0)} = F_i(P_1^{(0)}, \dots, P_m^{(0)})$$

$$\left( \frac{\delta F_i}{\delta P_j} \right)^{(0)} = \frac{\delta F_i}{\delta P_j} (P_1^{(0)}, \dots, P_m^{(0)})$$

$$\Delta P_j = P_j - P_j^{(0)}$$

Teniendo en cuenta la ecuación (IX. 1) y (IX. 2)

$\zeta_i$  vendrá dado por

$$\zeta_i = \zeta_i^{(0)} + \sum_{j=1}^m \left( -\frac{\delta F_i}{\delta P_j} \right)^{(0)} \Delta P_j ; (i=1, \dots, n) \quad (\text{IX. 4})$$

La condición de que S sea mínimo requiere según se han indicado anteriormente que

$$\frac{\delta S}{\delta P_k} = 2 \sum W_i \zeta_i \frac{\delta S_i}{\delta P_k} = 0 ; (k=1, \dots, m)$$

Igualando en primera aproximación  $\left( \frac{\delta F_i}{\delta P_k} \right) = \left( \frac{\delta F_i}{\delta P_k} \right)^{(0)}$  y teniendo en cuenta que  $\left( \frac{\delta \zeta_i}{\delta P_k} \right) = \left( \frac{\delta F_i}{\delta P_k} \right)^{(0)}$ ,

puede utilizarse el valor de  $\zeta_i$  dado en la ecuación (IX. 4) para obtener una serie de ecuaciones de forma general

$$\sum_{j=1}^m \Delta P_j \sum_{i=1}^n W_i \left( \frac{\delta F_i}{\delta P_j} \right)^{(0)} \left( \frac{\delta F_i}{\delta P_k} \right)^{(0)} = - \sum_{i=1}^n W_i \zeta_i^{(0)} \left( \frac{\delta F_i}{\delta P_k} \right)^{(0)} \quad (k=1, \dots, m) \quad (\text{IX. 5})$$

o bien,

$$\begin{aligned} C_{11} \Delta P_1 + C_{12} \Delta P_2 + \dots + C_{1m} \Delta P_m &= d_1 \\ C_{21} \Delta P_1 + C_{22} \Delta P_2 + \dots + C_{2m} \Delta P_m &= d_2 \\ \vdots & \\ C_{m1} \Delta P_1 + C_{m2} \Delta P_2 + \dots + C_{mm} \Delta P_m &= d_m \end{aligned}$$

donde

$$C_{jk} = C_{kj} = \sum_{i=1}^n W_i \left( \frac{\delta F_i^{(0)}}{\delta P_j} \right) \left( \frac{\delta F_i^{(0)}}{\delta P_k} \right)$$

$$d_k = -\sum_{i=1}^n W_i \zeta_i^{(0)} \left( \frac{\delta F_i^{(0)}}{\delta P_k} \right)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones se obtienen  $P_1, \dots, P_m$ . Los valores corregidos de los parámetros buscados serán pues

$$P_i^{(1)} = P_i^{(0)} + \Delta P_i \quad (\text{IX. 6})$$

Como se ha indicado anteriormente la función  $F$  en la mayoría de los casos no suele tener una dependencia lineal con estos parámetros. Así, el valor de  $F_i$  calculado de la ecuación (IX. 3) será tan sólo un valor próximo el óptimo. Por lo tanto, los nuevos parámetros obtenidos,  $P_i^{(1)}$ , no serán los correctos aunque proporcionarán un valor de  $S$  inferior al obtenido con los valores iniciales  $P_i^{(0)}$ . Para calcular los parámetros óptimos se debe seguir un proceso iterativo, repitiendo todo el proceso utilizando ahora como valores iniciales los últimos  $P_i^{(1)}$  obtenidos. La iteración continúa hasta que los valores  $P_j$  sean despreciables. En este caso se dice que la iteración converge y los valores de los parámetros obtenidos corresponden a un mínimo en  $S$ . En muchos casos, si se utilizan valores iniciales muy diferentes de los óptimos, el valor de  $S^{(1)}$  calculado de los parámetros ajustados puede resultar más grande que  $S^{(0)}$  calculado con los parámetros ini-



ciales y la iteración diverge en este caso, siendo el método inaplicable.

Errores en los parámetros estimados:

Una vez minimizado  $S$  la desviación standard vendrá dada por

$$\sigma = \left[ \frac{S_{\min}}{n-m} \right]^{1/2} \quad (\text{IX. 6})$$

donde  $S_{\min}$  es el valor mínimo de  $S$  y  $m$  es el número de parámetros independientes en el ajuste a la función  $F$ .

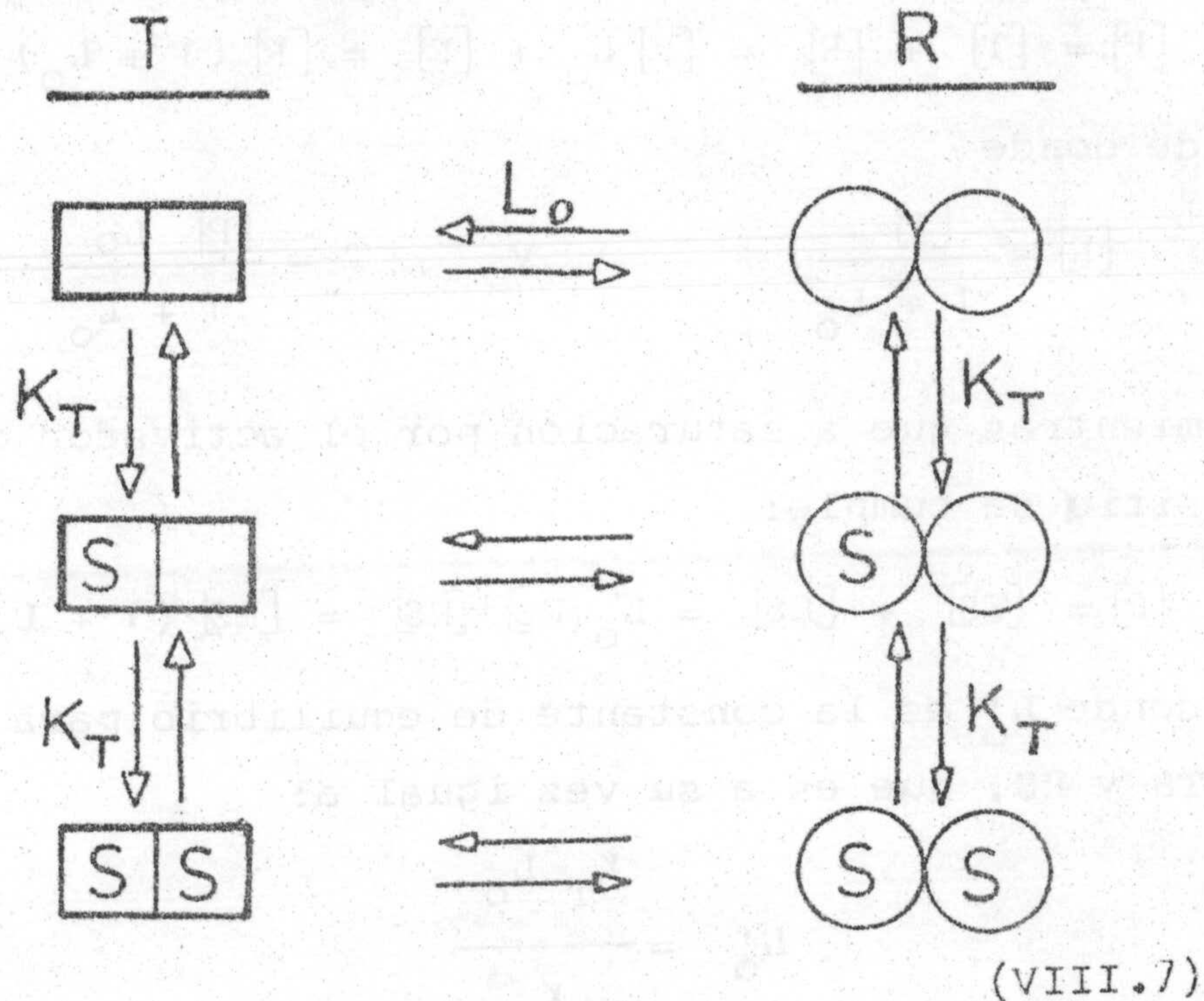
Las desviaciones standard de los valores de los parámetros se pueden estimar de las relaciones

$$\sigma_j = \sigma \left( C^{-1} \right)_{jj}^{1/2} \quad (\text{IX. 7})$$

para todo  $j$ .

### 3. PARAMETROS TERMODINAMICOS DEL MODELO DE MONOD

Sea el siguiente esquema del modelo de Monod et al (56) para una proteina dimérica P, que se une a un activador alostérico, S, tanto el estado R como el T.



Sean  $\Delta X_R, \Delta X_T, \Delta X_{L_0}$ , las variaciones de una función termodinámica (H, S, G) debidos a los procesos  $R + S \rightleftharpoons R S$ ;  $T + S \rightleftharpoons T S$  y  $R \rightleftharpoons T$  respectivamente.

El cambio total en dicha función X cuando, partiendo del equilibrio inicial definido por  $L_0$ , se satura el primer sitio de P por S para una concentración de proteina [P] será:

$$\Delta X(1) = [R S] \Delta X_R + [T S] \Delta X_T - ([R S] - [R]) \Delta X_L \quad (\text{IX. 8})$$

donde las  $[R S]$  y  $[T S]$  son las concentraciones de estas especies en equilibrio a saturación del primer sitio

de P por S, y  $[R]$  la concentración de P en estado R en ausencia de activador.

En ausencia de activador se cumple:

$$[P] = [T] + [R] = [R] L_0 + [R] = [R] (1 + L_0)$$

de donde

$$[R] = \frac{[P]}{1 + L_0} \quad \text{y} \quad T = \frac{[P] L_0}{1 + L_0} \quad (\text{IX.9})$$

mientras que a saturación por el activador del primer sitio se cumple:

$$[P] = [TS] + [RS] = L'_0 [RS] + [RS] = [RS] (1 + L'_0)$$

donde  $L'_0$  es la constante de equilibrio para las especies TS y RS, que es a su vez igual a:

$$L'_0 = \frac{K_T L_0}{K_R}$$

con lo que

$$[RS] = \frac{[P]}{1 + L'_0} = \frac{[P]}{1 + \frac{K_T L_0}{K_R}} \quad \text{y} \quad (\text{IX.10})$$

$$[TS] = \frac{[P] L'_0}{1 + L'_0} = \frac{[P] \frac{K_T L_0}{K_R}}{1 + \frac{K_T L_0}{K_R}}$$

Sustituyendo los valores de las concentraciones dadas por (IX.9) y (IX.10) en (IX.8) resulta :

$$\Delta X(1) = \frac{[P]}{1 + \frac{K_T L_O}{K_R}} \Delta X_R + \frac{[P] \frac{K_T L_O}{K_R}}{1 + \frac{K_T L_O}{K_R}} \Delta X_T - \left[ \frac{[P]}{1 + \frac{K_T L_O}{K_R}} - \frac{[P]}{1 + L_O} \right] \Delta X_L$$

Dividiendo por la concentración total de proteína,  $[P]$ , reordenando y sacando factor común, se llega a:

$$\frac{\Delta X(1)}{[P]} = \Delta X_1 = \frac{1}{1 + \frac{K_T L_O}{K_R}} \left[ \Delta X_R + \frac{K_T L_O}{K_R} \Delta X_T + \frac{L_O (K_T / K_R - 1)}{1 + L_O} \Delta X_L \right] \quad (\text{IX.11})$$

donde  $\Delta X_1$  es el incremento de X debido a la saturación del primer sitio de P por el activador S, por mol de proteína (este valor correspondería en nuestro caso a los valores  $\Delta H_1$ ,  $\Delta S_1$  y  $\Delta G_1$  obtenidos para la saturación del primer sitio de fosforilasa b por AMP y dados en la Tabla III).

El cambio total en X cuando partiendo del equilibrio inicial se saturan ambos sitios de P por S, para una concentración P de proteína, será ahora:

$$\Delta X(2) = 2 [\overline{RS}_2] \Delta X + 2 [\overline{TS}_2] \Delta X_T - ([\overline{RS}_2] - [R]) \Delta X_L \quad (\text{IX.12})$$

donde  $[\overline{RS}_2]$  y  $[\overline{TS}_2]$  son las concentraciones de estas especies en equilibrio a saturación de ambos sitios de P con S, y  $[R]$ , como antes, la concentración de P en estado R en ausencia de activador.

A saturación se cumple que:

$$[P] = [TS_2] + [RS_2] = L'_0 [RS_2] + [RS_2] = [RS_2] (1 + L'_0)$$

donde  $L'_0$  es la constante de equilibrio entre las especies  $TS_2$  y  $RS_2$ , que es a su vez igual a:

$$L'_0 = \frac{K_T L_0}{K_R} = \frac{L_0 K_T^2}{K_R^2}$$

con lo que

$$[RS_2] = \frac{[P]}{1 + L'_0} = \frac{[P]}{1 + L_0 (K_T/K_R)^2} \quad y$$

(IX.13)

$$[TS_2] = \frac{[P] L'_0}{1 + L'_0} = \frac{[P] L_0 (K_T/K_R)^2}{1 + L_0 (K_T/K_R)^2}$$

Sustituyendo ahora los valores de las concentraciones dadas por (IX.9) y (IX.13) en (IX.12), resulta:

$$\Delta X(2) = 2 \frac{[P]}{1 + L_0 (K_T/K_R)^2} \Delta X_R + 2 \frac{[P] L_0 (K_T/K_R)^2}{1 + L_0 (K_T/K_R)^2} \Delta X_T -$$

$$- \left( \frac{[P]}{1 + L_0 (K_T/K_R)^2} - \frac{[P]}{1 + L_0} \right) \Delta X_L$$

Dividiendo aquí también por la concentración total de proteína,  $[P]$ , reordenando y sacando factor común, se llega a:

$$\frac{\Delta X(2)}{[P]} = \Delta X_1 + \Delta X_2 = \frac{1}{1 + L_0 (K_T/K_R)^2} \left[ 2\Delta X_R + 2L_0 \frac{K_T^2}{K_R} \Delta X_T + \frac{L_0 (K_T^2/K_R^2 - 1)}{1 + L_0} \Delta X_L \right] \quad (\text{IX.14})$$

donde, de nuevo,  $\Delta X_1$  y  $\Delta X_2$  son las variaciones de X debidas a saturación de los primeros y segundos sitios de P por S respectivamente, por mol de proteína (estos valores corresponderían también en nuestro caso a  $\Delta H_1, \Delta S_1$  y  $\Delta G_1$ , y  $\Delta H_2, \Delta S_2$  y  $\Delta G_2$  para la unión del AMP a los sitios N de la fosforilasa b y que aparecen en la Tabla III .

Las ecuaciones (VI. 9) y (VI.11) del texto de la Discusión son pues las equivalentes a la (IX.11) y (IX.14) cuando se hace  $\Delta X = \Delta H$ .

#### 4. CONVERSION DE LA SEÑAL CALORIMETRICA

En un experimento de calorimetría de unión de un ligando a una proteína por el procedimiento descrito en Métodos (4.2), la señal registrada a la salida del calorímetro se ha representado en la figura 43. La diferencia de altura entre la línea C y B, expresada en cm, h, se convierte en calor expresado en kJ por mol de proteína, Q, mediante la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{A \cdot h \cdot 10^{-9}}{f_1 \cdot c} \quad (\text{IX. 15})$$

donde  $f_1$  es el flujo de la bomba por la que fluye la proteína expresado en  $\text{ml s}^{-1}$ ; c la concentración molar de proteína que se introduce en el calorímetro y A es la constante de calibración expresada en  $\mu\text{w cm}^{-1}$ . El valor de A se obtiene en un experimento de calibración que puede ser de naturaleza química o eléctrica.

Esta última consiste en hacer pasar una corriente por una resistencia calibrada,  $50,096 \Omega$ , que hay junto a la célula calorimétrica. Cuando la corriente es de  $0,527 \text{ mA}$ , la potencia disipada es  $13,913 \mu\text{ws}^{-1}$ . La diferencia de altura entre la señal registrada cuando no pasa corriente por la resistencia y cuando fluye una corriente de  $0,5 \text{ mA}$  promediada por varios experimentos fue  $6,3 \text{ cm}$ . Así, la constante de calibración es  $A = 13,2/6,3 = 2,1 \mu\text{wcm}^{-1}$ . Q es el calor en kJ por mol de proteína; el valor de Q incluye el calor de la reacción ligando proteína y el calor de dilución de la proteína.

Se incluyen a continuación como ejemplo algunos datos de un experimento de calorimetría de unión de AMP a fosforilasa b. En este experimento, el flujo de la bomba por la que fluía la proteína fue 9,9 ml hora<sup>-1</sup> y la concentración de enzima fue 8,1 mg ml<sup>-1</sup>, para varias concentraciones de ligando, AMP:

<u>h/cm</u>	<u>Q/kJ(mol de dímero)<sup>-1</sup></u>	<u>AMP x 10<sup>3</sup>/mol dm<sup>-3</sup></u>
5,3	97,4	0,72
8,3	152,4	9,20
5,4	97,4	0,67
8,7	160,0	10,44
8,5	156,0	8,70

En un experimento adicional se obtuvo que el calor de dilución de la proteína era despreciable en estas condiciones. Por lo tanto, Q coincide con el calor de unión ligando-proteína.

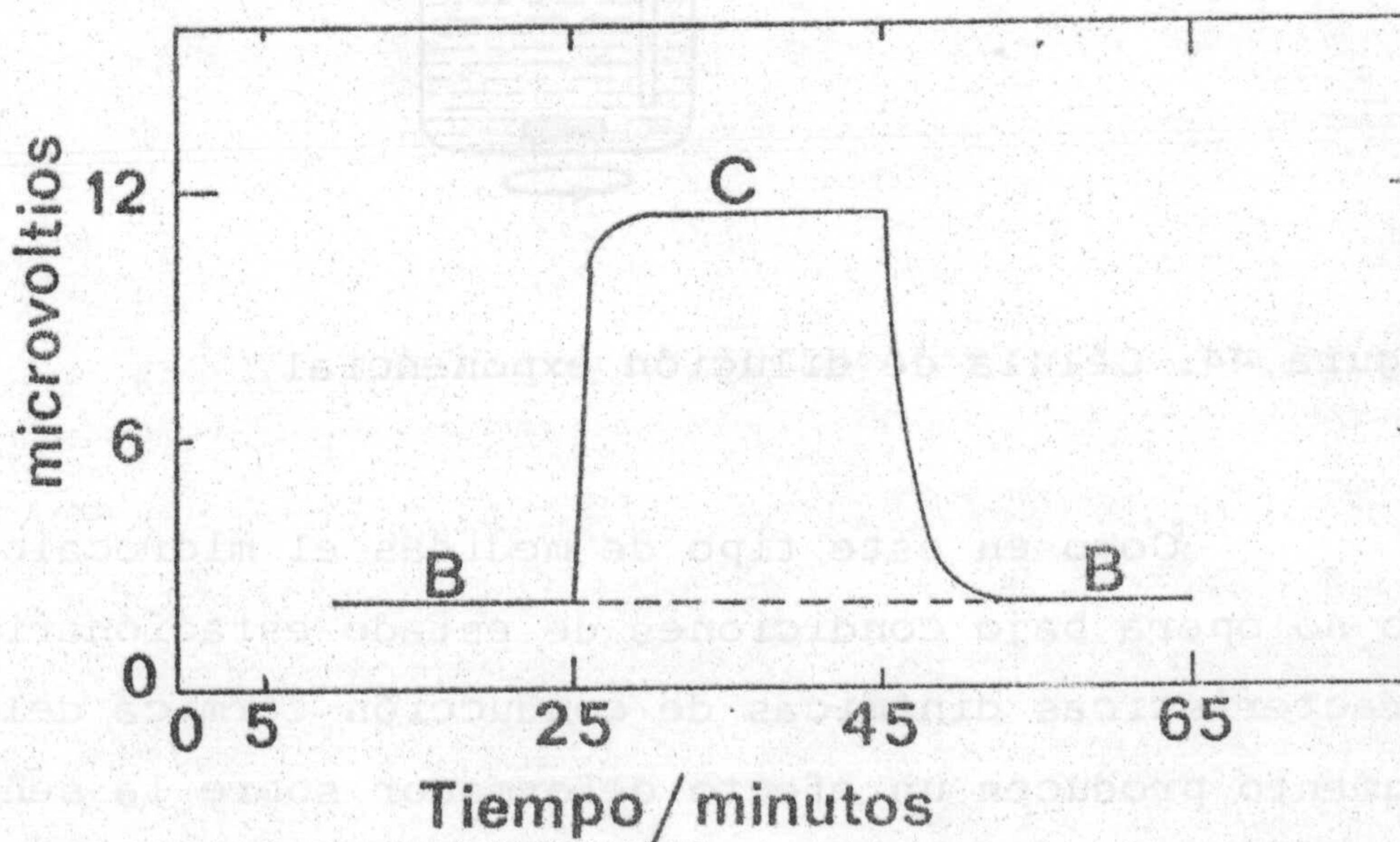


Figura 43. Señal en un registro Y - tiempo



correspondiente a un experimento de calorimetría de flujo de unión de un ligando a una proteína. (B) Señal correspondiente al estado estacionario alcanzado al mezclar ligando y tampón; (C) Señal obtenida cuando están reaccionando el ligando y la proteína.

### Generación de gradiente continuo de concentración

Un dispositivo de dilución exponencial, como el que se muestra en la figura 44, puede ser utilizado para generar gradientes continuos de concentración en un microcalorímetro de flujo (ver pag. 187).

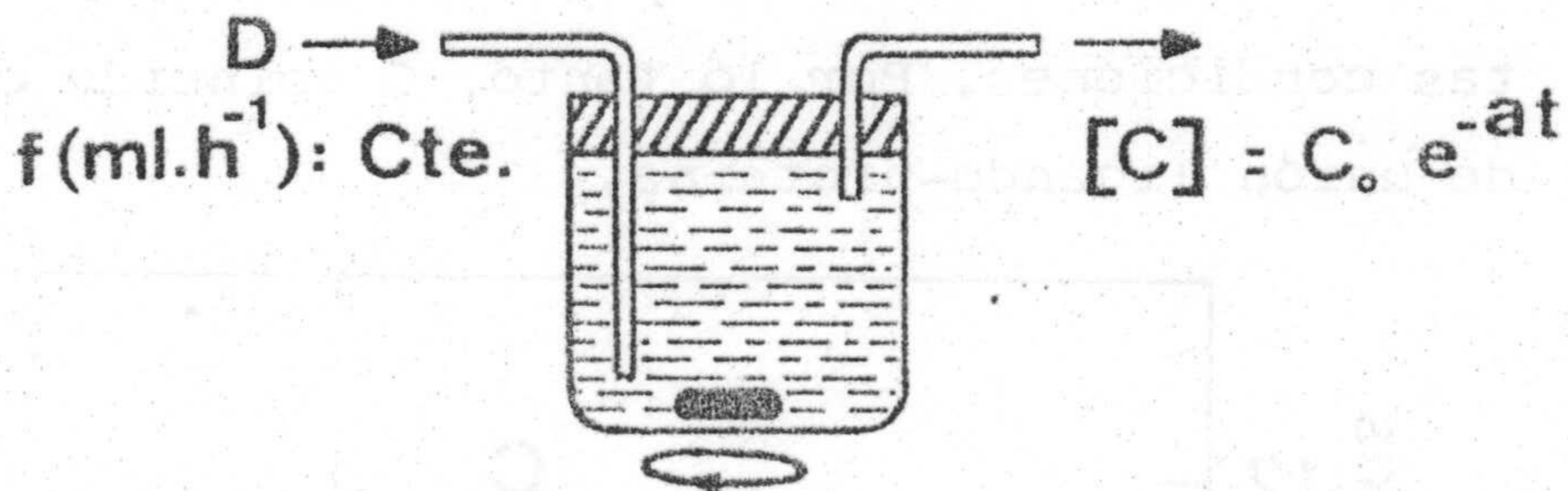


Figura 44. Célula de dilución exponencial

Como en este tipo de medidas el microcalorímetro no opera bajo condiciones de estado estacionario, las características dinámicas de conducción térmica del instrumento producen un efecto deformador sobre la señal, aso

ciada a una determinada reacción química, dando lugar a un termograma que es preciso corregir. Aproximando el comportamiento del microcalorímetro a un sistema de primer orden, esta corrección viene dada por la ecuación:

$$S_t = S + \tau \frac{dS}{dt} \quad (\text{IX. 16})$$

en donde  $S$  corresponde a la señal experimental ó termograma,  $\tau$  a la constante de tiempo predominante del sistema microcalorimétrico y  $S_t$  al efecto térmico real o corregido.

La realización práctica de esta corrección para el experimento de unión de IMP a fosforilasa b, se ha llevado a cabo usando el algoritmo de deconvolución para señales microcalorimétricas puesto a punto en la Tesis Doctoral "Desarrollo, caracterización y aplicaciones de instrumentación electrónica de control para medidas en microcalorimetría de flujo" presentada por D. Obdulio López Mayorga en la Sección de Químicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (132).

CLASIFICACION DE LA INFORMACION Y DE LOS DOCUMENTOS

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA

DE LA BIBLIOTECA UNIVERSITARIA DE GRANADA



Biblioteca Universitaria de Granada



01052461