

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Física



TESIS DOCTORAL

**Estudio termodinámico de la interacción entre fosforilasa b
y sus efectores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Margarita Menéndez Fernández

Madrid, 2015

Margarita Menéndez Fernández

TP
1981

096

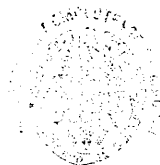


* 5 3 0 9 8 5 5 7 1 5 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x - 53 - 044052 - x

ESTUDIO TERMODINAMICO DE LA INTERACCION ENTRE FOSFORILASA b
Y SUS EFECTORES

Departamento de Química-Física
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

© Margarita Menéndez Fernández
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-11167-1981

Autor: MARGARITA MENENDEZ FERNANDEZ

**ESTUDIO TERMODINAMICO DE LA INTERACCION
ENTRE FOSFORILASA b Y SUS EFECTORES**

**Memoria para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**

Director:
José Luis Laynez Vallejo
Investigador Científico del C. S. I. C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química-Física
Año 1980

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Instituto de Química Física "ROCASOLANO", con una Beca del C.S.I.C., bajo la dirección del Dr. D. José Luis Laynez Vallejo, a quién expreso mi agradecimiento.

Igualmente deseo expresar mi gratitud a los Dres. D. F. García Blanco, D. J. Sáez y Dña. P. Usobiaga así como a C. Watt, por la gran colaboración prestada.

Por último, deseo agradecer al Dr. D. M. Díaz Peña el haber aceptado ser ponente de la misma.

I N D I C E

	Pág
AGRADECIMIENTOS	I
INDICE	II
ABREVIATURAS	IV
INTRODUCCION	1
CAPITULO I. FOSFORILASA <u>b</u> : CONOCIMIENTOS ACTUALES SOBRE LA ENZIMA	5
I. 1.- Acción catalítica	5
I. 2.- Propiedades estructurales	6
I. 3.- Coenzima: Fosfato de piridoxal	9
I. 4.- Activación alostérica	12
I. 5.- Otros mecanismos de activación de la fosforilasa <u>b</u> ...	17
BIBLIOGRAFIA	20
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	26
II. 1.- Preparación de la fosforilasa <u>b</u>	26
II. 2.- Preparación de la fosforilasa quinasa	27
II. 3.- Preparación de la fosforilasa <u>a</u>	28
II. 4.- Resolución de la enzima	29
II. 5.- Medidas de actividad enzimática	31
II. 6.- Microcalorimetría	32
II. 7.- Ultracentrifugación analítica	33
II. 8.- Determinación de volúmenes específicos parciales	34
II. 9.- Difusión de luz	38
BIBLIOGRAFIA	41
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION	44
III. 1.- Efecto de la concentración de enzima sobre algunas propiedades físicas de la fosforilasa <u>b</u>	44

III. 2.- Efecto de la temperatura y el pH sobre la interacción fosforilasa <u>b</u> - AMP y fosforilasa <u>b</u> - fosfato	48
III. 2a.- Estudio calorimétrico de la interacción fosforilasa <u>b</u> -AMP en función de la temperatura	51
III. 2b.- Equilibrios de asociación \rightleftharpoons disociación inducidos por la unión de AMP en función de la temperatura.	52
III. 2c.- Estudio calorimétrico de la interacción fosforilasa <u>b</u> -fosfato en función de la temperatura	58
III. 2d.- Efecto del pH sobre la interacción fosforilasa <u>b</u> - AMP y fosforilasa <u>b</u> - fosfato	60
III. 3.- Estudio cinético de la activación de la fosforilasa <u>b</u> en función de la temperatura	70
III. 4.- Efecto de la concentración de enzima sobre el comportamiento catalítico de la fosforilasa <u>b</u>	74
III. 5.- Interacciones heterotrópicas entre la unión de AMP y fosfato a la fosforilasa <u>b</u>	78
III. 6.- Efecto de la concentración de enzima sobre la resolución con hidroxilamina	93
III. 7.- Efecto de la concentración de enzima sobre la conversión de fosforilasa <u>b</u> en fosforilasa <u>a</u> por acción de la fosforilasa quinasa	96
BIBLIOGRAFIA	98
CONCLUSIONES	103

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

- ADP - 5' difosfato de adenosina
- AMP - 5' monofosfato de adenosina
- ATP - 5' trifosfato de adenosina
- c-AMP - 3'-5' monofosfato de adenosina
- DTNB - Acido 2-2'-dinitro-5-5'-ditiodibenzoico
- ϵ -AMP - 1,N⁶-eteno-AMP
- EDTA - Acido etilendiaminotetracético
- G-1-P - 1-fosfato de glucosa
- G-6-P - 6-fosfato de glucosa
- glicil-glicina - glicinato de glicina
- IMP - 5' monofosfato de inosina
- I_{90} - Intensidad de luz difundida a un ángulo de 90° con respecto del rayo incidente
- I_0 - Intensidad del rayo incidente
- $K_{1/2}$ - concentración de ligando a la que se produce la mitad del efecto inducido por su unión a la enzima.
- M - Peso molecular promedio
- n - n° de Avogadro
- NADP - dinucleótido de nicotinamida-2' fosfato de adenina
- NADPH - dinucleótido de nicotinamida-2' fosfato de adenina reducido
- P_i - Ortofosfato
- PLP - fosfato de piridoxal
- tempo-AMP - 5' monofosfato de N⁶-(2,2,6,6,-tetrametil-piperidina-4-yl-1-osi) adenosina

-V-

TRIS - Tris(hidroximetil) aminometano

τ - tiempo de relajación

U / mL - unidades de actividad enzimática por unidad de volumen

$V_{m\acute{a}x}$ - Velocidad catalítica máxima

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

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

Gracias a sus propiedades catalíticas, las enzimas permiten a los organismos vivos efectuar el conjunto de las reacciones químicas del metabolismo; por otro lado determinadas enzimas, situadas por ejemplo en el cruce de diferentes vías metabólicas, son capaces de adaptar su actividad a las necesidades celulares.

Estos mecanismos de regulación han sido detectados y caracterizados a lo largo de los últimos veinticinco años, indicando que la actividad catalítica de una enzima, puede ser modulada a través de tres mecanismos diferentes:

- por modificación covalente de su cadena polipeptídica, fosforilación, acción proteolítica, etc.. (1)
- por interacción con moléculas pequeñas, no relacionadas estructuralmente con los sustratos o productos de la reacción enzimática catalizada, es decir una regulación alostérica.
- por interacción con otras moléculas proteicas capaces de modificar su actividad o cambiar su especificidad.

La enzima elegida para realizar el presente estudio, la fosforilasa b de músculo de esqueleto de conejo, se encuentra sometida, a la vez, a los tres tipos de regulación indicados, siendo la primera enzima para la que se detectaron mecanismos de regulación por modificación covalente (2) y alostérica (3,4).

Ampliamente estudiada (5-9) presenta sin embargo un gran número de problemas por resolver; aún no se conoce cual es el mecanismo catalítico, ni los papeles exactos que en él desempeñan las dos moléculas

de AMP capaces de fijarse por monómero (10-13) y la coenzima (14, 15).

El hecho de que se encuentre en el músculo a concentraciones del orden de 7,0 mg/ml o superiores (16) y el estar sometida a un complejo mecanismo de control (17) hacen de ella uno de los sistemas enzimáticos más atractivos para realizar estudios quimiofísicos.

Diferentes estudios realizados con fosforilasa b (18-20) han puesto de manifiesto la alta flexibilidad conformacional de la enzima, necesaria por otra parte para poder explicar su comportamiento en disolución.

Además de las modificaciones de carácter químico que la fosforilasa b experimenta, está sometida a modificaciones de su estructura conformacional por acción de la temperatura (20), pH (21) y concentración de enzima (13).

En nuestro caso hemos llevado a cabo un estudio de los efectos inducidos por estas tres variables en el sistema enzimático. Si bien es cierto que alguno de los efectos asociados al pH y a la temperatura se producen en unas condiciones que en principio podrían considerarse poco fisiológicas, los estados inducidos presentan características muy similares a las de los estados estabilizados por acción de diversos efectores en un rango de temperaturas más próximo al fisiológico, pudiendo ser utilizados quizás como mecanismos de modificación enzimática capaces de simular los efectos producidos por otros efectores en condiciones que supondrían una mayor complejidad del sistema enzimático.

Los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1.- Caracterización mediante técnicas físicas de la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima que presenta la fosforilasa b de músculo de esqueleto de

conejo.

- 2.- Efecto que la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima ejerce sobre los mecanismos de activación alostérica, por AMP y fosfato, y covalente por conversión a fosforilasa a.
- 3.- Modificaciones en el entorno de la coenzima, asociadas a la transición conformacional dependiente de la concentración.
- 4.- Efecto de la temperatura y el pH sobre los estados conformacionales de la fosforilasa b y su interacción con AMP y fosfato.
- 5.- Caracterización de las interacciones heterotrópicas entre el activador alostérico AMP y el fosfato.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Cohen, P., (1976), Control of enzyme activity, (Chapmann y Hell), London.
- 2.- Krebs, E. G., y Fischer, E. H., (1956), Biochem. Biophys. A., 20, 150.
- 3.- Cori, C. F., y Cori, G. T., (1936) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34, 702.
- 4.- Parnas, M. J. K., y Mochnacke, I., (1936), C. R. Soc. Biol. 123, 1173.
- 5.- Fischer, E. H., Pocker, A., y Saari, J. C., (1970), "Assays in Biochemistry" (Campbell, N. N., y Dickens, F., eds) 6, 23-68, Academic Press, New York.
- 6.- Graves, D. J., y Wang, J, H. (1972), "The Enzymes" 3 Ed. P. D. Bo-

- yer, Ed.) VII, 435-482. Academic Press, New, York.
- 7.- Busby, S. J. W., y Radda, G.K., (1976), *Curr. Top. Cell. Regul.* (Horecker and Stadtman eds.) 10, 89-160, Academic Press, New York.
 - 8.- Johnson, L. N., Stura, E. A., Wilson, K. S., Samsom, M. S. P. y Weber, I. T., (1979), *J. Mol. Biol.* 134, 639-653.
 - 9.- Madsen, N. B., Kasvinski, P. J. y Fletterick, R. J., (1978), *J. Biol Chem.* 253, 9097-9101.
 - 10.- Wang, J. H., Kwok, S., Wirch, E., y Suzuki, I., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46, 1340-1347.
 - 11.- Morange, M., García Blanco, F., Vandebunder, B., y Buc, H., (1976) *Eur. J. Biochem.*, 65, 553-563.
 - 12.- Kasvinski, P. J., Madsen, N.B., Sygusch, J., y Fletterick, R. J., (1978), *J. Bio. Chem.*, 253, 3343-3351.
 - 13.- Merino, C. G., García Blanco, F., Poci, M., Menendez, M., y Laynez J., *J. Biochem.* "in press".
 - 14.- Hoerl, M., Feldmann, K., Schnackerz, K. D., y Helmreich, E., (1979) *Biochem*, 2457-2464.
 - 15.- Fukui, T., y Shimomura, S., (1978), *Biochem*, 17, 5359-5367.
 - 16.- Cohen, P., Dworer, T., Fischer, E. H., (1971). *Biochem.*, 10, 2683-2694.
 - 17.- Ebashi, S., y Endo, M., (1960), *Quart. Rev. in Biophys.* 2, 351-384.
 - 18.- Buc, M. H., Faure, F., Oudin, L. C., Morange, M., Vandebunder, B., y Buc, H., (1974), *Biochimie*, 56, 477-489.
 - 19.- Madsen, N. B., Avramovic-Zikic, O., Lue, R. F., Honikel, K. O., (1976), *Mol. Cell. Biochem.* 11, 35-50.
 - 20.- Kastenschmidt, J., Kastenschmidt, L., y Helmreich, E., (1968), *Biochem.*, 7, 4543-4556.
 - 21.- Kasvinski, P. J., Meyer, W. L., (1977), *Archv. Biochem. Biophys.*, 181, 616-631.

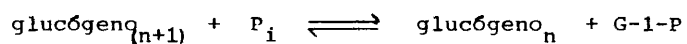
C A P I T U L O I

C A P I T U L O I

FOSFORILASA b: CONOCIMIENTOS ACTUALES SOBRE LA ENZIMA

I. 1.- ACCION CATALITICA

La fosforilasa b de músculo de esqueleto de conejo, (α -1-4-glucan-orto-fosfato glucosiltransferasa, EC.2.4.4.1), cataliza "in vivo", la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato, la cual es metabolizada inmediatamente dentro de la ruta glucolítica.



La reacción inversa es catalizada "in vivo" por la sintetasa del glucógeno (1).

Constituye uno de los pocos casos, conocidos hasta ahora, de enzimas sometidas a los tres tipos de regulación descritos en la introducción.

1.- Su actividad catalítica puede ser regulada por fosforilación de la serina 14 de su cadena polipeptídica. Esta modificación covalente, que supone la transformación de la forma inactiva, la fosforilasa b, en la activa, la fosforilasa a, es realizada por la fosfori-

lasa quinasa, según el siguiente esquema de reacción (2),



siendo catalizada la reacción inversa por la fosforilasa fosfatasa. Este mecanismo de activación, por modificación covalente, tiene lugar durante la contracción muscular (3); la señal que provoca "in vivo" esta conversión, es el ión Ca^{2+} , que activa a la fosforilasa quinasa. Esta enzima puede también ser activada por fosforilación, bajo la acción de una quinasa dependiente del c-AMP, cuyos niveles aumentan por el efecto de la adrenalina. El conjunto de todos estos modos de regulación enzimática, se encuentra resumido en el esquema I, (4).

2.- La actividad de la fosforilasa b puede modificarse mediante un mecanismo alostérico, por acción de pequeñas moléculas, unidas no covalentemente; así, en presencia de AMP, puede alcanzar niveles de actividad similares a los de la fosforilasa a (5) y es inhibida por acción de la G-6-P, ADP y ATP (6).

El comportamiento de la fosforilasa b, por su activación alostérica, se ajustaría al de un sistema tipo K, V, es decir no solo se modificaría la eficiencia catalítica, sino que se produciría un aumento de la afinidad hacia los sustratos (7).

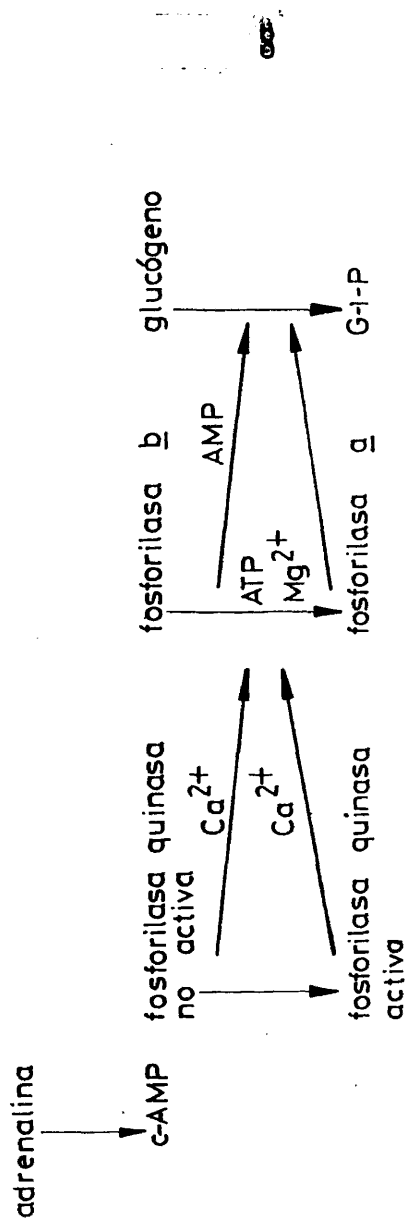
3.- "In vivo", la fosforilasa b se encuentra asociada a otras proteínas, en la partícula del glucógeno. Esta asociación modifica sus propiedades, en particular su interacción con los nucleótidos (8,9).

I. 2.- PROPIEDADES ESTRUCTURALES

La forma mas activa de la enzima, tanto en la forma b, como en la a, es

ESQUEMA I

REGULACION DE LA FOSFORILASA β



un dímero (10, 11) formado por dos unidades idénticas de peso molecular 97.415, formadas por 841 aminoácidos cada una (12) y una molécula de piridoxal fosfato, que actúa como coenzima, unida mediante una base de Schiff (13) a la lisina 679 (14).

Mediante estudios de microscopía electrónica, Chignell y col (15), llegaron a la conclusión de que el dímero de fosforilasa b, estaba formado por dos subunidades elipsoidales, con dimensiones de $55 \text{ \AA} \times 65 \text{ \AA} \times 110 \text{ \AA}$, dispuestas simétricamente.

A partir de datos de difracción de Rayos-X, de la fosforilasa cristalina, con una resolución de 6 \AA , Johnson y col (16) mostraron que el dímero de la enzima era una molécula compacta con dimensiones totales de aproximadamente $63 \text{ \AA} \times 63 \text{ \AA} \times 100 \text{ \AA}$, resultados acordes con los obtenidos por microscopía electrónica.

Los valores obtenidos para el dímero de fosforilasa a, cristalizada en presencia de glucosa 50 mM, por Madsen y col. (17), a una resolución de 3 \AA de la estructura cristalina, eran $55 \text{ \AA} \times 75 \text{ \AA} \times 85 \text{ \AA}$, ligeramente diferentes de los anteriores.

El análisis comparativo de los datos de difracción de Rayos-X de las fosforilasas b y a, (14, 16-19), indica una gran analogía estructural entre ambas formas enzimáticas, correspondiendo las mayores diferencias existentes, con un desplazamiento en la posición de los veinte primeros aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica, hacia el interior de la proteína, en la fosforilasa a.

La ordenación tridimensional de la cadena polipeptídica permite distinguir tres grandes zonas o dominios de organización estructural: 1).- Dominio N-terminal, formado por los residuos de aminoácidos

1 a 311; 2).- Dominio de unión del glucógeno, formado por los aminoácidos 322 a 420 y 3).- Dominio C-terminal, constituido por los residuos 491 a 841 (14).

La cadena protéica del monómero de fosforilasa b, constituye un cuerpo compacto, salvo por el desplazamiento de dos segmentos de la cadena polipeptídica hacia el interior de la otra cadena, simétricamente relacionada, en la zona de la interfase del dímero. Los principales contactos, responsables al menos en parte del mantenimiento de la estructura dimérica, tienen lugar entre el segmento de cadena formado por los residuos 36 a 44, que se pliegan sobre el sitio de fijación del activador alostérico, AMP, de la otra subunidad y entre la hélice formada por los residuos 265 a 274 que hace contacto, de una forma bastante amplia, con la hélice antiparalela de la otra subunidad. Existe además otra zona de interacción, entre los residuos 248 a 262 de un monómero y el plegamiento de la cadena que conecta los segmentos de cadena formados por los residuos 277 a 291 y 177 a 180 de la otra subunidad que forma el dímero (14).

Aunque como ya se ha indicado anteriormente, la forma activa de ambas fosforilasas b y a, es el dímero, la fosforilasa a en ausencia de sustratos existe normalmente en estado tetramérico, si bien el equilibrio puede desplazarse hacia la formación del dímero, a concentraciones muy bajas de enzima (11), en medios con concentraciones salinas elevadas (20), en presencia de sustratos y glucosa (10),.... La fosforilasa b presenta normalmente un estado dimérico, aunque puede asociarse a tetramero bajo determinadas condiciones, como son concentraciones altas de enzima, bajas temperaturas, en presencia de Mg^{2+} , F^{-} , con AMP a bajas temperaturas, (5, 7, 21, 22).

La disociación del dímero en monómeros, exige someter a la enzima a condiciones bastante drásticas, como son urea 1 M (23), tratamiento con p-mercuriobenzoato (24), medios distorsionantes de la conformación enzimática (25), etc. lo que indica que las fuerzas responsables del mantenimiento del dímero han de ser bastante diferentes de las que mantienen la estructura tetramérica (26, 27).

El hecho de que temperaturas y pH bajos, favorezcan la formación del tetrámero de fosforilasa b, parece indicativo de que las fuerzas responsables de su mantenimiento serían mas de tipo electrostático que de naturaleza hidrofóbica (27).

I. 3.- COENZIMA: FOSFATO DE PIRIDOXAL

El fosfato de piridoxal, se encuentra unido a la fosforilasa b con una estequiometría 1:1 (1 mol de PLP por mol de monómero), (28). Presente en todas las α -glucan fosforilasas conocidas (29), es absolutamente necesario para que exista actividad enzimática (30).

En la fosforilasa de músculo se encuentra unido a la lisina 679 (14), formando una base de Schiff, dentro de un entorno hidrofóbico (13, 31, 32), si bien ha de ser accesible al disolvente (33).

La reducción del doble enlace de la base de Schiff con BH_4Na sin mas que un pequeño descenso en la actividad catalítica (34), indicaba que la posible participación en el proceso catalítico no tenía lugar a través del grupo carbonílico de la coenzima, en contraste con su comportamiento en otras enzimas, en las que la reducción del grupo aldehído del PLP, daba lugar a una inactivación completa (35)

El estudio de la influencia de la coenzima sobre las propie-

dades estructurales y catalíticas de la enzima, puso claramente de manifiesto que el PLP desempeñaba al menos un papel estructural, como estabilizante de la conformación de la fosforilasa nativa (27, 36-40). Aunque su separación de la enzima no llevaba a un desordenamiento general de la enzima nativa (41, 42), la estructura cuaternaria de la apoenzima presentaba menor estabilidad, tendiendo a disociarse o a formar agregados de orden superior, dependiendo de la temperatura, concentración de enzima, pH, etc y era menos estable (27, 36, 43, 44).

El amplio análisis estructural llevado a cabo con fosforilasa b reconstituida con diferentes análogos de PLP, puso de manifiesto que gran número de las fosforilasas así reconstituidas, a pesar de que presentaban propiedades estructurales análogas a las de la enzima nativa, eran catalíticamente inactivas, lo que parecía sugerir que además de su acción estructural la coenzima podía desempeñar un papel en el proceso catalítico.

No existe ninguna evidencia que pueda considerarse concluyente sobre la participación del PLP en la catálisis de una manera directa, sin embargo, a lo largo de los estudios indicados anteriormente, se fueron acumulando gran número de datos que parecen apuntar hacia el grupo fosfato en posición 5 como el candidato más idóneo, entre todos los grupos funcionales de la molécula de PLP, para participar en la catálisis, actuando como transmisor de un Π^+ (37, 38, 48, 49).

Para que la enzima reconstituida con un análogo de PLP presente actividad catalítica es preciso que exista, en la posición 5, un sustituyente con dos grupos ionizables (27, 37, 38, 45).

Aunque la enzima reconstituida con piridoxal es inactiva, Parrish y col. (39), encontraron que en presencia de iones fosfato, fos-

fito o fluorofosfato era capaz de activarse hasta niveles del 19 %, atribuyendo este efecto a la unión del dianión al sub-sitio del fosfato de la coenzima, de una manera no covalente.

El estudio de la dependencia de los valores de activación máxima y de la constante de Michaelis del fosfato, en función del pH (50), indican la dependencia de ambos con respecto a un grupo ionizable, con un pK de 6,1, que podría corresponder a la constante de ionización del segundo grupo ionizable del PLP, en un entorno hidrofílico. Aunque la molécula de PLP debe de encontrarse en un entorno hidrofóbico, en el cual, el pK del segundo grupo ionizable del fosfato de la coenzima sería de 9,3, el grupo del cual depende la actividad catalítica en esta zona de pH no podría corresponderse con el primer grupo ionizable del fosfato del PLP, con un pK de 6,5 en ese tipo de entorno (38), si consideramos que la enzima reconstituida con el monometil ester de piridoxal, al que le correspondería el mismo pK para su único grupo ionizable, es inactivo (38). El estudio de RMN del ^{31}P realizado por Helmreich y col, (51), indicaba que aunque el estado de ionización de la coenzima para la enzima sola no variaba en esa zona de pH, si lo hacía en presencia de AMP y sustratos; lo que podría significar que al menos en la conformación activa, el grupo fosfato podría encontrarse en un medio hidrofílico.

Vidogff y al (45), encontraron que una variación de los pKs de los grupos ionizables situados en posición 5, daba lugar a un desplazamiento en la zona del pH óptimo para la actividad en el mismo sentido.

Helmreich y col (52), utilizando RMN del ^{31}P , para estudiar la coenzima en las fosforilasas b y a, encontraron que la estabiliza-

ción de la conformación activa de la enzima, coincidía con la formación del estado doblemente ionizado del fosfato de la coenzima.

El análisis de la estructura de la fosforilasa b, mediante difracción de Rayos-X a 3 Å de resolución (14) y de la fosforilasa a a 2,5 Å indicaba que el cofactor se encontraba situado en el centro del monómero, de acuerdo con los datos que indicaban su posición en un entorno hidrofóbico, a una distancia del sitio de unión de la G-1-P de 8 Å en la fosforilasa b y de 7,2 Å en la fosforilasa a.

Illingworth y Brown (30) habían demostrado previamente que no existía intercambio isotópico entre la G-1-P marcada radiactivamente en el fosfato y la coenzima.

Los resultados recientemente obtenidos por Graves y col. (54) para la fosforilasa a, reconstituida con diferentes análogos de PLP, parecen indicar que la coenzima podría desempeñar, además, un papel en el control de la defosforilación de la fosforilasa a por acción de diferentes efectores, como cafeína y glucosa.

I. 4.- ACTIVACION ALOSTERICA

Los efectos reguladores ejercidos sobre la actividad de la fosforilasa de músculo han sido interpretados, a nivel molecular, en base a la existencia de equilibrios entre diferentes estados conformacionales posibles, pudiendo ser estabilizados los mas activos por fosforilación covalente o a través de la unión de AMP.

Basándose en datos de fijación de diferentes ligandos y estudios de activación, Madsen y col. (55) y Buc (56), sugirieron que la regulación alostérica de la fosforilasa b, se ajustaba al modelo concertado de transición entre dos estados propuesto por Monod y col. (57).

Uno de los hallazgos mas interesantes realizados por Buc (56), de acuerdo con los hechos que podían predecirse a partir del modelo de Monod, era la no absoluta dependencia de la fosforilasa b, con respecto a AMP para ser activa; así, a elevadas concentraciones de fosfato, podían alcanzarse niveles de actividad comparables a los obtenidos a saturación de AMP.

Un análisis mas detallado del proceso de activación de la enzima, a bajas concentraciones de AMP (58) y de la respuesta cinética en el estado estacionario, a la acción de diferentes análogos del activador alostérico (7, 59), hicieron necesario un mayor número de estados conformacionales en equilibrio, para explicar el comportamiento cinético.

El estudio de variaciones en la estructura de la proteína, por acción de la unión de diferentes ligandos, (modificación del espectro de absorción ultravioleta, fluorescencia, valoración de grupos cisteínas, paramagnetismo...) llevaron a la formulación de diferentes equilibrios conformacionales para la fosforilasa b, por diversos grupos, (60, 61) sin embargo la adscripción de estados conformacionales en base a este tipo de determinaciones, puede plantear bastantes dificultades debido a:

1.- La dificultad para discernir si los efectos observados reflejan grandes cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima o pequeñas modificaciones estructurales en la proximidad del grupo o grupos cuyo comportamiento estamos siguiendo.

2.- La interpretación de la mayoría de las medidas estáticas en términos de cambios conformacionales, de una manera inequívoca, es difícil, por el hecho de que solamente permiten medir propiedades pro-

medio del sistema, que pueden ser indicativas de diferentes grados en desplazamiento de un mismo equilibrio conformacional.

La aplicación de técnicas de cinéticas rápidas (salto de temperatura y flujo retenido), al estudio de los equilibrios conformacionales de la fosforilasa b, en presencia y ausencia de AMP y sustratos, en función de la temperatura y el pH, llevó a Buc y col. (62) a postular la existencia al menos de tres estados conformacionales, uno de los cuales presentaba una gran tendencia a asociarse a tetrámero.

Además de AMP, la enzima puede ser activada o inhibida por la acción de gran número de análogos del activador alostérico (59, 63-65) de ellos el único con significación a nivel biológico es el IMP. Black y Wang (7), sugirieron en base a diferencias en el comportamiento catalítico en presencia de AMP o IMP, que la transición alostérica implicada en la activación por el nucleótido, constaba de dos procesos, en el primero de los cuales aumentaba la afinidad de la enzima hacia el sustrato y en el segundo la eficiencia catalítica. Según este esquema, la unión de IMP produciría únicamente el segundo proceso, mientras que la unión de AMP induciría los dos.

La utilización de diferentes análogos del activador alostérico (59, 63, 65-67) permitió además determinar que no existía una correspondencia directa entre fijación del activador alostérico y activación. Las conclusiones más importantes de estos estudios eran las siguientes

1.- Las tres partes de la molécula de AMP estaban implicadas en su unión a la enzima (59, 63, 65) siendo los puntos de anclaje por parte de la base, el grupo amino en posición 6, los nitrógenos en posición 1 y 3 y el anillo imidazólico y por parte de la ribosa el -OH en posición 2'.

2.- El mantenimiento del grupo -OH en posición 2' de la ribosa era fundamental para la activación.

3.- Era necesaria la presencia del grupo fosfato y además en la posición 5' de la ribosa para que existiese activación. Las dos únicas excepciones las constituían el 5'fosforamidato de adenosina (63), y el 8-(m-(m-fluorosulfonil-benzamido)-benziltio) adenina (67), que siendo análogo de la adenina se une covalentemente a la enzima y la activa hasta niveles del 24 %.

Los estudios de fijación de AMP, IMP y ATP a la fosforilasa b en estado cristalino, a una resolución de 3 Å, realizados por Johnson y col. (14), indicaban que la unión del nucleótido a la enzima se realizaba a través del grupo fosfato, que interaccionaba electrostáticamente con la arginina 309 y quizás con la 308; el grupo -OH en posición 2' de la ribosa, que forma enlaces de hidrógeno con la glutamina 72 de su propia subunidad y quizás con la asparagina 42 de la otra subunidad del dímero; la base hacía contacto mediante el grupo amino en posición 6 con la tirosina 75. Existen además interacciones entre la base y la otra subunidad del dímero, a través de los residuos 43 a 45 y probablemente con los aminoácidos siguientes al 311. Tanto el AMP como el IMP parecen unirse en su conformación anti.

En 1970 Wang y col. (68), mediante medidas calorimétricas, determinaron la existencia de dos sitios de unión para AMP por monómero, resultado confirmado posteriormente por otros autores (39, 69). Morange y col. (39) demostraron además la existencia de dos sitios de unión con diferente afinidad hacia la adenina, correspondiendo el de máxima afinidad hacia la base con el de menor afinidad hacia el nucleótido. El hecho de que los niveles máximos de actividad se alcanzasen a concentra

ciones de AMP, correspondientes a la saturación de la primera clase de sitios de AMP, hizo que no se atribuyese ningún papel sobre la catálisis a la saturación de la segunda clase de sitios de unión, aunque en presencia de glucógeno su afinidad hacia AMP se viese aumentada (70).

Ambas zonas de unión del nucleótido han sido identificadas, mediante la utilización de Rayos-X, en las fosforilasas a y b (71, 79) atribuyéndose a la fijación de la adenina, a su sitio de mayor afinidad y al AMP, a su segunda clase de sitios de unión (situado a unos 10 Å del sitio catalítico), un efecto inhibitor de la catálisis enzimática, al menos en la fosforilasa a.

Merino y col. (72) encontraron que la entalpía de interacción enzima - AMP, a saturación de las dos clases de sitios de unión del activador alostérico, en función de la concentración de enzima, presentaba una abrupta discontinuidad entre 2,6 y 1,5 mg/ml, atribuyéndolo a una transición conformacional entre dos estados dependiente de la concentración de enzima.

La fijación de AMP ejerce un efecto heterótopico positivo - sobre la fijación del glucógeno, G-1-P y fosfato (5) y presenta competición exclusiva hacia la fijación de G-6-P, ADP, ATP y glucosa, todos ellos inhibidores de la actividad enzimática (6).

El análisis combinado de los diagramas de difracción de Rayos-X y del comportamiento cinético de la fosforilasa a, en función de la concentración de maltoheptosa, utilizada como análogo del glucógeno, permitieron identificar un sitio de almacenamiento del polisacárido, situado sobre la superficie de la molécula a 25 Å del sitio de mayor afinidad hacia el nucleótido y a 33 Å del sitio catalítico, con propieda-

des reguladoras del comportamiento catalítico (73).

En el esquema II podemos ver un diagrama de la estructura tri dimensional del monómero de fosforilasa b y sus principales sitios de unión, obtenido a partir de la referencia 14.

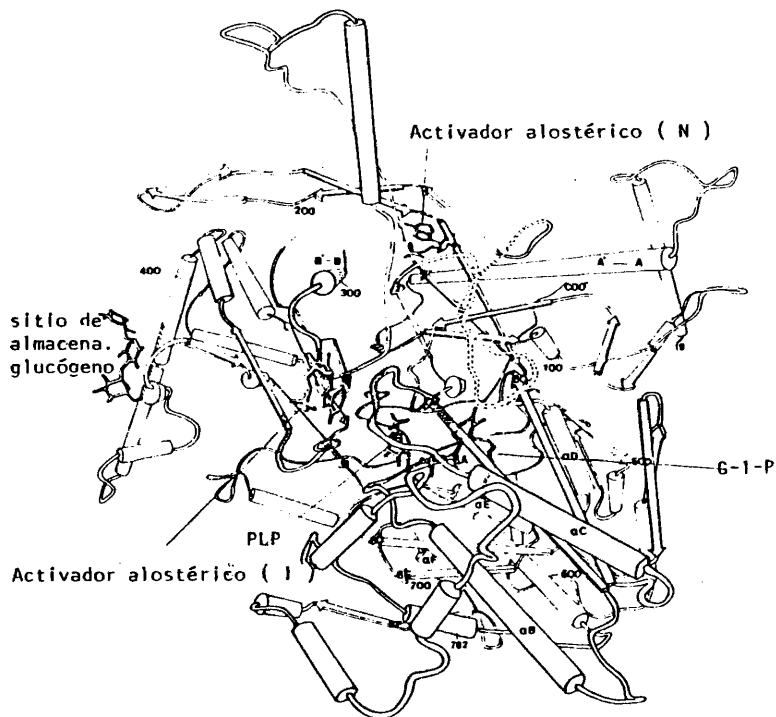
Las propiedades termodinámicas y catalíticas de la fosforilasa b, presentan un discontinuidad al estudiar su variación en función de la temperatura (50, 58), efecto atribuido a la existencia de una tran sición conformacional dependiente de la temperatura, al parecer relacio nada con el entorno de la coenzima, puesto que modificaciones en su for ma de unión a la fosforilasa b, hacen que el comportamiento en función de la temperatura de la misma, sea absolutamente normal (50, 58).

La velocidad catalítica de la fosforilasa b, es máxima a pH 6,5, siendo el intervalo de pH óptimo para la actividad 6,0 - 7,5 (50). El perfil de la variación de la velocidad máxima de catálisis y de la constante de Michaelis del fosfato en función del pH (50), permitió con cluir, que los auténticos sustratos de la enzima eran las formas dianió nicas del fosfato y de la G-1-P, así como la existencia de dos grupos ionizables esenciales para la actividad catalítica, posiblemente una - histidina y el grupo fosfato de la coenzima. Uno de ellos es altamente modificado por la transición conformacional que experimenta la enzima - en función de la tempertatura.

I. 5.- OTROS MECANISMOS DE ACTIVACION DE LA FOSFORILASA b

Vandenbunder y col. (74) encontraron que en presencia de compuestos hidrofóbicos, alcoholes alifáticos principalmente, la fosforilasa b podía activarse hasta niveles del 140% (caculado con respecto a la velocidad - máxima de catálisis en presencia de AMP 1 mM), sin necesidad del ac-

ESQUEMA I I



Trazado esquemático del monómero de fosforilasa b , visto en la dirección del eje cristalográfico Y, con los principales sitios de unión. Los sitios de mayor y menor afinidad hacia el activador alostérico han sido denominados con las letras N e I respectivamente. (Referencia 14).

tivador alostérico y hasta niveles del 150 - 170 % en presencia de AMP y alguno de los alcoholes alifáticos por ellos utilizados. El comportamiento de la enzima así activada era bastante similar al de la fosforilasa a, con respecto a sus propiedades de agregación, afinidad hacia AMP y comportamiento cinético.

Resultados similares fueron encontrados recientemente por Graves y col. (75) trabajando con una serie mas amplia de disolventes orgánicos; el efecto de activación mas pronunciado era inducido por la acción de éteres metílicos de glicoles.

Mientras que Vandebunder y col. atribuyeron el fenómeno de activación, así como la inhibición que se producía a concentraciones de los alcoholes superiores a las necesarias para activar la enzima, a interacciones de caracter hidrofóbico, que hacian accesibles al medio determinados aminoácidos hidrofóbicos, Graves y col. , indican, que la activación podría explicarse en base al efecto que los disolventes ejercen sobre las constantes de fijación de los sustratos y el activador, sin analizar el origen de los cambios enzimáticos responsables del aumento de la afinidad de la enzima hacia AMP y G-1-P.

Buc y col. (76) al estudiar el efecto que la presencia del fosfato ejercía sobre el proceso de unión de AMP, utilizando para ello ξ -AMP, encontraron un doble efecto. A concentraciones bajas del sustrato se producía una salida del marcador fluorescente, ξ -AMP, debido quizás a una competición con el grupo fosfato, mientras que a concentraciones superiores del sustrato, el desplazamiento del nucleotido era seguido de un proceso lento de recaptación del mismo por parte de la enzima, con características semejantes a las de la unión del activador a la forma a de la enzima. Este último proceso tenía una $K_{1/2}$ para la fijación

del fosfato bastante superior a la de fijación del sustrato (77) , y del orden de las concentraciones del mismo que activaban a la enzima - hasta niveles próximos a los inducidos en presencia de AMP (56).

Estos hechos podrían relacionarse con los previamente encontrados por Graves y col. (78), al estudiar la acción de diferentes sales sobre la actividad de la enzima.

Los datos hasta ahora expuestos, unidos a la influencia que la fijación del AMP tiene sobre el fosfato unido covalentemente a la serina 14 y el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica (52, 79), así como la relación entre todos los sitios de regulación y el sitio catalítico, encontrada por Madsen y col. (79) al estudiar la unión de AMP a la fosforilasa a, nos indujeron a pensar en la posibilidad de un mecanismo general de activación de la fosforilasa, a través de dos procesos interaccionantes entre sí; uno de ellos debido al cambio conformacional que la cadena proteica experimenta por fijación del fosfato a la serina 14 o por la acción de determinadas sales, entre ellas el propio sustrato, sobre este sitio regulador, que producirían un cambio en la constante dieléctrica de los aminoácidos del extremo N-terminal (78) (comparable quizás al efecto de activación producido por los disolventes orgánicos); y un segundo proceso debido a la acción directa del activador alostérico, de tal forma que cuanto mayor fuese el efecto activador producido por modificación del segmento N-terminal, menos dependiente sería la fosforilasa b con respecto a AMP, para ser catalíticamente activa.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Larner, J., Villar Palasí, C. (1971), "Current Topics Cellular Regulations". (Horecker, B. L. y Stadtman, F. R. Eds.), 3, 196-236. Academic Press, New York.
- 2.- Krebs, E. G. y Fischer, E. H. (1966). Biochem. Biophys. Acta, 20, 150- 157.
- 3.- Danforth, W. H., Helmreich, E. y Cori, C. F. (1962), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 48, 1191-1199.
- 4.- Nimmo, H. G. y Cohen, P. (1977), Adv. Cyclic Nucleotides Res. 8, 145-266.
- 5.- Helmreich, E. y Cori, C. F., (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 51, 131-138.
- 6.- Madsen, N. B. y Shechosky, S., (1967), J. Biol. Chem., 242, 3301-3307.
- 7.-Black, W. J. y Wang, J. H., (1968), J. Biol. Chem., 243, 5892-5898.
- 8.- Meyer, F., Heilmeyer, L. M. G., Haschke, R. H. y Fischer, E. H., (1970), J. Biol. Chem., 245, 6642-6648.
- 10.- Helmreich, E., Michaelides, M. C. y Cori, C. F., (1967), Biochemistry 6, 3695-3710.
- 11.- De Vicenzi, D. L. y Hedrick, J. L., (1970), Biochemistry, 9, 2048-2058.
- 12.- Titani. K., Koide, A., Hermann J., Ericsson, L. H., Kumar, S., Wade, R. D., Kenneth, W. A., Neurath, A. y Fischer, E. H., (1977), Proc.

- Natl. Acad. Sci. USA., 74, 4762-4766.
- 13.- Shaltiel, S. y Cortijo, M., *Bioph. Biochem. Res. Comm.*, 41, 594-600
 - 14.- Johnson, L. N., Stura, E. A., Wilson, K. S., Sansom, M. S. P. y Weber, I. T., (1979), *J. Mol. Biol.*, 134, 639-653.
 - 15.- Chignell, D. A., Gratzner, W. B. y Valentine, R. C., (1968), *Biochemistry*, 7, 1082-1089.
 - 16.- Johnson, L. N., Weber, I. T., Wild, D. L., Wilson, K. S. y Yeates, D. G. R., (1978), *J. Mol. Biol.*, 118, 579-591.
 - 17.- Fletterick, R. J., Sygusch, J., Semple, H. y Madsen, N. B., (1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 6142-6146.
 - 18.- Fletterick, R. J., Sygusch, J., Murray, N., Madsen, N. B. y Johnson, L. N., (1976), *J. Mol. Biol.*, 103, 1-13.
 - 19.- Weber, I. T., Johnson L. N., Wilson, K. S., Yeates, D. G. R., Wild, D. L. y Jenkins, J. A., (1978), *Nature*, 274, 433-437.
 - 20.- Wang, J. H. y Graves, D. J., (1963), *J. Biol. Chem.*, 238, 2386-2389.
 - 21.- Kent, A. B., Krebs, E. G. y Fischer, E. H., (1958), *J. Biol. Chem.*, 232, 549-558.
 - 22.- Buc, M. H. y Buc, H., (1968) in *The Regulation of Enzyme Activity a Allosteric Interactions.* , 109-130, Universitets Forlaget, Oslo.
 - 23.- Buc, M. H. y Buc, H., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 52, 575-588.
 - 24.- Madsen, N. B. y Cori, C. F., (1956), *J. Biol. Chem.*, 223, 1055-1065.
 - 25.- Shaltiel, S., Hedrick, J. L. y Fischer, E. H., (1966), *Biochemistry*, 5, 2108-2116.
 - 26.-Valentine, R. C. y Chignell, D. A. , (1968), *Nature*, 218, 950-953

- 27.- Kastenschmidt, L. L., Kastenschmidt, J. y Helmreich, E., (1968), *Biochemistry*, 7 , 3590-3608.
- 28.- Baranowski, T., Illingworth, B., Brown, D. H. y Cori, C. F., (1958), *Biochem. Biophys. Acta*, 25, 16-
- 29.- Fischer, E. H. y Krebs, E. G., (1966), *Fed. Proc.*, 25, 1511-1520.
- 30.- Illingworth, B., Jansz, H. S., Brown, D. H. y Cori, C. F., (1958), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 44, 1180-1191.
- 31.- Johnson, G. F., Tu, S. L., Bartlett, M. L. S., Graves, D. J., (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 5560-5568.
- 32.- Shimomura, S. y Fukui, T., (1970), *J. Biochem.*, 81, 1781-1790.
- 33.- Honikel, K. O. y Madsen, N. B., (1973), *Can. J. Biochem.*, 51, 344-356.
- 34.- Fischer, E. H., Kent, A. B., Synder, E. R. y Krebs, F. G., (1958), *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 2906-2907.
- 35.- Snell, E. S., DiMari, S. J., (1970), *The Enzymes*, ed. Boyer, P. D., (Academic Press, New York) Vol 2, 335-370.
- 36.- Hedrick, J. L., Shaltiel, S. y Fischer, E. H., (1966), *Biochemistry*, 5, 2117-2125.
- 37.- Pffeufer, T., Ehrlich, J. y Helmreich, E., (1972), *Biochemistry*, 11 2125-2136.
- 38.- Pffeufer, T., Ehrlich, J. y Helmreich, E., (1972), *Biochemistry*, 11, 2136-2146.
- 39.- Parrish, R. F., Uhing, R. J. y Graves, D. J., (1977), *Biochemistry*, 16, 4824-4831.
- 40.- Shimomura, S. y Fukui, T., (1978). *Biochemistry*, 17, 5359-5367.

- 41.- Johnson, G. F. y Graves, D. J., (1966), *Biochemistry*, 5, 2906-2913.
- 42.- Hedrick, J. L. (1966), *A. B. B.*, 114. 216-222.
- 43.- Shaltiel, S., Hedrick, J. L., Pocker, A. y Fischer, E. H., (1969), *Biochemistry*, 8, 5189-5196.
- 44.- Steiner, R. F., Greer, L. y Gunther, G., (1977), *Biochemi Biophys. Acta*, 494, 233-244.
- 45.- Vidgoff, J. M., Pocker, A. Hullar, T. L., Fischer, E. H., (1974), *Bioph. Biochem, Res. Com.*, 57, 1166-1174.
- 46.- Fischer, E. H., Pocker, A. y Saari, J. C., (1970), *Essays Biochem.*, 6, 23-68.
- 47.- Graves, D. J. y Wang, J. L. (1972), *Enzymes*, 3rd. Ed. 7, 435-482.
- 48.- Ehrlich, J., Feldmann, K., Helmreich, E. y Pffeufer, T., (1971), *Joint. Biochem. Symp. U.S.S.R., G.D.R., May 3-7, Schloss Reinhards Brunn, Akademieserlag, Berlín.*
- 49.- Weisshaar, H. D. y Palm, D., (1972), *Biochemistry*, 11, 2146-2153.
- 50.- Kasvinsky, P. J. y Meyer, W. L., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, 18, 616-631.
- 51.- Feldmann K. y Helmreich, E., (1976), *Biochemistry*, 15, 2394-2401.
- 52.- Hoerl, M., Feldmann, K., Schackerz, K. D. y Helmreich, E., (1979), *Biochemistry*, 18, 2457-2464.
- 53.- Sygusch, J., Madsen, N. B., Kasvinski, K. J. y Fletterick, R. J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 4757-4761.
- 54.- Yan, S. C. B., Uhing, R. J., Parrish, R. F., Metzler, D. E. y Grave D. J., (1979), *Biochemistry*, 25, 8263-8269.

- 55.- Madsen, N. B. y Shechosky, S., (1967), *J. Biol. Chem.*, 242, 3301-3307.
- 56.- Buc, H., (1967), *Biophy. Biochem. Res. Comm.*, 28, 59-64.
- 57.- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J. P., (1965), *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.
- 58.- Kastenschmidt, L. L., Kastenschmidt, J. y Helmreich, E., (1968), *Biochemistry*, 12, 4543-4556.
- 59.- Morange, M., Garcia Blanco, F., Vandebunder, B. y Buc, H., (1976), *Eur. J. Biochem.* 65, 553-563.
- 60.- Birkett, D. J., Dwek, R. A., Radda, G. K., Richards, R. E. y Salmon, A. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, 20, 494-508.
- 61.- Madsen, N. B., Avramovic-Zikic, O., Lue, P. F. y Honikel, K. O., (1976), *Mol. Cell. Biochem.*, 11, 35-50.
- 62.- Buc, H., Buc, M. H., Garcia Blanco, F., Morange, M. y Winkler, H., (1973) in *Metabolic Interconversion of Enzymes*, New York, N. Y., Springer Verlag, 21-31.
- 63.- Okazaki, T., Nazakawa, A., y Hayaishi, O., (1968), *J. Biol. Chem.*, 243, 5266-5271.
- 64.- Black, W. J. y Wang, J. H., (1970), *Biochem. Biophys. Acta*, 212, 257-268.
- 65.- Mott, D. M. y Bieber, A. L., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 4058-4066.
- 66.- Gutierrez Merino, C., (1977), Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- 67.- Anderson, R. A. y Graves, D. J., (1973), *Biochemistry*, 12, 1895-1900.
- 68.- Wang, J. H., Kwok, S., Wirch, E. y Suzuki, I., (1970), *Biophy. Biochem. Res. Comm.*, 46, 1340-1347.

- 69.- Merino, C. G., García Blanco, F. y Laynez, J., (1976), *Febs Letters*, 67, 9-12.
- 70.- Merino, C. G., Garcia Blanco, F. y Laynez, J., *Febs Letters*, 73, 97-100.
- 71.- Kasvinsky, P. J., Madsen, N. B., Sygusch, J. y Fletterick, R. J., (1978), 253, 3343 - 3351.
- 72.- Merino, C. G., Garcia Blanco, F. y Laynez, J., (1976), *Febs Letters*, 68, 129-131.
- 73.- Kasvinsky, P. J., Madsen, N. B., Fletterick, R. J. y Sygusch, J., (1978), 253, 1290-1296.
- 74.- Dreyfus, M., Vandebunder, B. y Buc, H., (1978), *Febs Letters*, 95, 185-189.
- 75.- Uhing, R., Janski, A. M. y Graves, D. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 3166-3169.
- 76.- Vandebunder, B., Dreyfus, M. y Buc, H., (1978), *Biochemistry*, 17, 4153-4160.
- 77.- Busby, S. J. W., y Radda, G. F., (1976), *Curr. Top. Cell. Regul.*, 10, 89-160.
- 78.- Sealock, R. N. y Graves, D. J., (1967), *Biochemistry*, 6, 201-207.
- 79.- Madsen, N. B., Kasvinsky, P. J. y Fletterick, R. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 9097-9101.

C A P I T U L O I I

C A P I T U L O I I

MATERIALES Y METODOS

II. 1.- PREPARACION DE FOSFORILASA b

El método seguido para la preparación de la fosforilasa b de músculo de esqueleto de conejo, fue el descrito por Fischer y Krebs (1), utilizando α -mercaptoetanol como reactivo de grupos sulfidrilos en lugar de L-cisteína (2). La enzima se recrystalizaba al menos tres veces previamente a su utilización.

Diariamente, antes de ser utilizada, la enzima se centrifugaba a 4.000 r.p.m., durante veinte minutos; se eliminaba el sobrenadante, se redisolvió en tampón glicilglicina (SIGMA) y se pasaba por una columna de Sephadex G-25 medio (PHARMACIA), equilibrada previamente con el mismo tampón. A continuación se trataba con carbón activo durante diez o quince minutos, para eliminar completamente el AMP y el Mg^{2+} utilizados para su recrystalización.

La concentración de enzima se determinó esnectrofotometricamente, utilizando un coeficiente de extinción $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ de 13,2 a 280 nm, pH 6,9 y 30 °C (3). La relación de absorbancias a 260 y 280 nm era inferior a 0,54.

El tampón utilizado en los estudios realizados en el presente

trabajo, con la fosforilasa b, era el siguiente: clorhidrato de glicilglicina 5×10^{-2} M (SIGMA), ClK (RIEDEL) 5×10^{-2} M, EDTA (CARLO ERBA) 2×10^{-4} M y β -mercaptoetanol (MERCK) $5,7 \times 10^{-4}$ M, a pH 6,9 a 25°C.

II. 2.- PREPARACION DE FOSFORILASA QUINASA

La fosforilasa quinasa de músculo de esqueleto de conejo se preparó según el método descrito por Krebs (4), con algunas modificaciones introducidas por Cohen (5).

Una vez muertos y desangrados los conejos, se diseccionan los músculos de los dorsales y de las patas; una vez picados, se homogeneizaban durante diez o quince minutos con tres volúmenes de agua destilada, manteniendo el pH del extracto entre 6,5 y 7,0 con TRIS (SIGMA) 2 M. El extracto se filtraba sobre gasa y después sobre lana de vidrio, para eliminar material lipídico, manteniendo la temperatura a 4°C.

El pH del extracto frío, se ajustaba a 6,1-6,2 con ácido acético 1 N; se dejaba durante diez minutos en un baño de hielo, centrifugando a continuación a 6.600 r.p.m. durante 30 minutos.

El precipitado se resuspendió en β -glicerofosfato (SIGMA) 0,1 M, EDTA 4×10^{-3} M a pH 8,2, utilizando un volumen aproximadamente igual al del precipitado recogido y se diluía en β -glicerofosfato 5×10^{-2} M, EDTA 2×10^{-2} M y pH 7,0 hasta un volumen final de aproximadamente 200 ml por cada kg de carne utilizada en la preparación. La suspensión se centrifugaba a 78.000 x g durante cien minutos y el sobrenadante era cuidadosamente decantado a través de lana de vidrio.

La proteína se precipitaba con un volumen de una disolución saturada y fría de sulfato amónico neutro (MERCK), por cada dos volúme-

nes de disolución enzimática, agregado gota a gota y con agitación continua. Después de dejarla durante 10 minutos en hielo, la suspensión se centrifugaba durante 10 minutos a 10.000 x g. El sobrenadante era eliminado y el precipitado se resuspendía en un volumen pequeño de β -glicero-fosfato 5×10^{-2} M y EDTA 2×10^{-2} M a pH 6,8, siendo dializado a continuación durante una hora frente al mismo tampón. El dializado se clarificaba, centrifugando durante 2 minutos a 15.000 x g, y se almacenaba congelado.

II. 3.- PREPARACION DE FOSFORILASA a

La fosforilasa a se preparó a partir de la forma b de la enzima por fosforilación con fosforilasa Kinasa, en presencia de ATP (SIGMA) y Mg^{2+} .

La conversión de la fosforilasa b en a, se realizó a 30 °C en un medio que contenía 1 volumen de enzima en tampón glicil-glicina a pH 6,9, mezclado con 1 volumen del medio de activación de la kinasa y dos volúmenes de tampón glicil-glicina - TRIS a pH 8,6. El pH final del medio de reacción así preparado era 8,2.

La reacción se iniciaba con la adición de la fosforilasa kinasa, en cantidades variables para obtener una actividad enzimática constante, preparada según se indicó en el apartado anterior de este capítulo.

La cinética de conversión era seguida por el aumento de la actividad catalítica de la fosforilasa en ausencia de AMP, en función del tiempo; para ello se tomaban alícuotas y se paraba la reacción diluyendo 100 veces y enfriando a 4 °C.

El tampón glicil-glicina utilizado en la conversión de fosfori

lasa b en a no contenía EDTA, por ser inhibidor de la actividad catalítica de la fosforilasa kinasa (6).

La composición del medio de activación de la fosforilasa kinasa era: ATP 4×10^{-3} M, Ac_2Mg 4×10^{-2} M, $ClCa$ 4×10^{-4} M y FNa 0,2 M. El Ca^{2+} se utilizaba para activar la kinasa (7) y los iones F^- para inhibir la acción de posibles fosfatasas.

II. 4.- RESOLUCION DE LA ENZIMA

El estudio de la reactividad del PLP frente a reactivos carbonílicos, en función de la concentración de enzima y en ausencia de agentes deformantes de la conformación enzimática, se realizó utilizando hidroxilamina 0,1 M como reactivo de aldehidos, a pH 6,5 y 28,6 °C (8), en tampón glicil-glicina sin β -mercaptoetanol.

La reacción se iniciaba por adición de un volumen de hidroxilamina (SIGMA) a pH 6,5 a otro volumen de enzima, de concentración adecuada para obtener concentraciones finales comprendidas en el intervalo 0,2 - 5,0 mg/ml, llevada también previamente a pH 6,5 con ClH , incubando a continuación durante una hora.

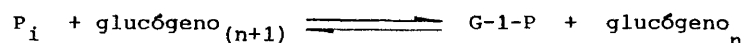
La reacción se paraba por dilución de 1:20 de las muestras de reacción y se tomaban muestras por duplicado para determinar la actividad catalítica de la enzima. La resolución de la enzima se siguió, normalmente, mediante medidas de la actividad catalítica de la enzima, mas que por determinación directa del PLP unido, debido a la simplicidad del método (8). Las cinéticas de activación se realizaron en el sentido de la síntesis de glucógeno, por determinación del fosfato liberado a partir de G-1-P siguiendo el método de Baginski y col (9, 10).

El % de actividad se calculó con respecto a los experimentos de control, realizados en las mismas condiciones pero en ausencia de hidroxilamina.

Las determinaciones directas del PLP unido a la enzima después de ser tratada con hidroxilamina, se hizo espectrofotométricamente, tras separar la coenzima unida por precipitación con ácido perclórico 1,2 N o tricloroacético al 40 %, hasta concentraciones finales de 0,3 N y el 7 % respectivamente (11, 12), utilizando un coeficiente de extinción molar a 295 nm de $6.250 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (8).

II. 5.- MEDIDAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La reacción catalizada por la fosforilasa es:



In vivo, el equilibrio se encuentra desplazado en el sentido de la degradación del polisacárido, siendo catalizada la síntesis del mismo, por la sintetasa del glucógeno (13).

En el presente trabajo, las medidas de actividad catalítica, a partir de velocidades iniciales se hicieron tanto en el sentido de síntesis como en el de degradación del polisacárido.

En el primer caso, se siguió el procedimiento descrito por Hu y Gold (14). La composición del medio de reacción (50 μl) era : AMP 10^{-3} M, G-1-P $7,5 \times 10^{-2}$ M, glucógeno 1 % y fosforilasa b 1 μg aproximadamente, utilizando glicil-glicina como tampón a pH 6,8 y 30°C.

El P_i formado se determinó por el método de Baginski y col. (9, 10). ligeramente modificado (14), basado en la formación de ácido fosfomolibdico y su posterior conversión en azul de molibdeno, que absorbe a 840 nm; para ello, las muestras de reacción (60 μ l) se diluían con agua destilada (0,5 ml) y se trataban a continuación con tres reactivos, a intervalos de 9 minutos, A (0,5 ml), B (50 μ l) y C (0,4 ml) cuyas composiciones eran:

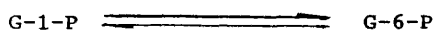
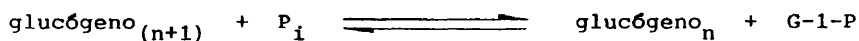
REACTIVO A.- Acido ascórbico (MERCK) 2,4 %, EDTA 0,1 % y ácido tricloroacético (RIEDEL) 12 %.

REACTIVO B.- Molibdato amónico tetrahidratado (MERCK) al 6 %.

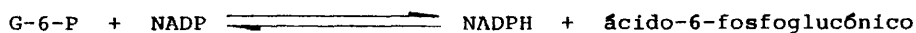
REACTIVO C.- Citrato sódico dihidratado (RIEDEL) 3 %, arsenito sódico anhidro (B.D.H.) 3 % y ácido acético 3 %.

La determinación del n° de micromoles de P_i formados por minuto y miligramo de enzima se realizó utilizando una recta patrón que relacionaba la absorbancia a 840 nm con la concentración de P_i en el medio.

La actividad en el sentido de la degradación del glucógeno se midió utilizando el procedimiento descrito por Helmreich y Cori (15), basado en el siguiente esquema de tres reacciones acopladas.



fosfoglucomutasa



G-6-P deshidrogenasa

En presencia de una concentración suficientemente alta de -

NADP, el equilibrio puede ser desplazado a la derecha y la variación de la absorbancia a 340 nm, característica del NADPH, en función del tiempo, permite determinar la actividad catalítica de la fosforilasa b. El coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm es $6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (16).

La composición del medio de reacción era: glucógeno 0,2 %, Ac_2Mg $8,9 \times 10^{-3} \text{ M}$, NADP (SERVA) $5,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, fosfoglucomutasa 1 U/ml, G-6-P deshidrogenasa (BOEHRINGER) ,7 U/ml y una concentración de fosforilasa b variable, de tal manera que la variación de la absorbancia con el tiempo fuese del orden de 30 - 40 mDO/ min. Las concentraciones de AMP y P_i (MERCK) eran variables y se indicarán en cada caso.

La pureza de todos los nucleótidos se comprobó mediante cromatografía en capa fina de PEI celulosa (17, 18).

Se consideró como 100 % de actividad a una concentración de sustratos dada y a cada temperatura, el valor de la actividad catalítica máxima alcanzada a saturación de AMP en esas mismas condiciones.

II. 6.- MICROCALORIMETRIA

El calor de reacción asociado a la interacción de la fosforilasa b con los diferentes ligandos estudiados se midió utilizando microcalorímetros LKB 10700-1 y 10700-2 de flujo y batch respectivamente, de conducción térmica, basados en el principio de los calorímetros gemelos (19, 30).

La sensibilidad de los aparatos era tal, que permitía medir calores de 0,9 mcal con un error máximo de un 0,8 %, siendo la precisión del 0,3 % para calores del orden de 0,01 cal.

Los aparatos fueron calibrados previamente por métodos químicos y eléctricos, siguiendo el procedimiento descrito por Wadso y col. (19, 20).

En cada experimento, el calor de dilución del reactivo era an lado directamente, mediante la utilización de la célula de referencia en el calorímetro de batch y tomando como base este calor en los experimen tos realizados en el calorímetro de flujo. El calor asociado en cada ex perimento a la dilución de la enzima fue medido en experimentos indepen dientes y descontado del calor total de reacción de cada experimento.

La estabilidad de la enzima durante el periodo de tiempo nece sario para alcanzar el equilibrio térmico, a cada temperatura de reacción, se comprobó mediante la determinación de su actividad catalítica al - principio y al final de dicho periodo de tiempo.

II. 7.- ULTRACENTRIFUGACION ANALITICA

Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron con una ul tracentrífuga BECKMAN, modelo E, con Scanner fotoeléctrico.

Las velocidades de sedimentación variaron de 20.000 a 60.000 r.p.m. según el tipo de experimento a realizar, utilizándose el dispositivo óptico Schlieren o Scanner, dependiendo de la concentración de - enzima utilizada.

Las determinaciones del coeficiente de sedimentación se reali ron a temperaturas comprendidas entre 12 y 30 °C, siendo la constancia de la misma en cada experimento de ± 0,5 °C.

Los coeficientes de sedimentación aparentes obtenidos, se nor malizaron a condiciones standar de un disolvente con la densidad y visco sidad del agua a 20 °C, utilizando la ecuación

$$S_{20,w} = S \frac{\eta}{\eta_{20,w}} \frac{(1 - \bar{v} \rho_{20,w})}{(1 - \bar{v} \rho)}$$

donde $S_{20,w}$ es el coeficiente de sedimentación corregido para condiciones standar, S el coeficiente sin corregir, η y ρ la viscosidad y densidad del disolvente a cada temperatura, \bar{v} el volumen específico parcial aparente de la proteína, $\rho_{20,w}$ y $\eta_{20,w}$ la densidad y viscosidad del agua a 20 °C. Estrictamente hablando, deberían utilizarse la densidad y viscosidad de la disolución, pero si la concentración del soluto tiende a cero, pueden aproximarse a los del disolvente.

La densidad del disolvente a cada temperatura se midió utilizando un densitómetro digital ANTON PAAR DMA-02, termostaticado. La precisión experimental del aparato era de $\pm 2 \times 10^{-6}$ g/ml, para lo cual las oscilaciones de temperatura del termostato no excedían de $\pm(1-2) 10^{-3}$ °C.

La viscosidad del disolvente a cada temperatura, fue medida con un viscosímetro automático FICA VISCOMATIC MS, provisto de tubos de dilución tipo UBBELOHDE de $9 \times 0,046$ cm. Los tiempos de caída se medían automáticamente con precisión de ms, mediante una célula fotoeléctrica. La variación de la temperatura no era superior a $\pm 0,02$ °C.

II. 8.- DETERMINACION DE VOLUMENES ESPECIFICOS PARCIALES

La determinación del volumen específico parcial de la proteína se realizó a partir de la variación de la densidad de la disolución, en función de la concentración de enzima. Las ecuaciones básicas utilizadas han sido previamente deducidas por Casassa y Eisenberg (21).

La relación entre el incremento de la densidad de una disolución y el volumen parcial de sus componentes, puede determinarse por diferenciación de la expresión (1), con relación a la concentración de los componentes de la disolución.

$$\rho = \sum_{k=1}^n m_k M_k / V_m \quad (1)$$

ρ densidad de la disolución

m_k molalidad del componente k

M_k Peso molecular del componente k

V_m volumen de disolución que contiene un kg de disolvente principal

Así, para el componente j -mo, tenemos:

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial c_j} \right)_{p,T,m_{k \neq j}} = \frac{(1 - \bar{v}_j \rho)}{(1 - \bar{v}_j c_j)} \quad (2)$$

c_j concentración del componente j -mo en g/ml

\bar{v}_j volumen específico parcial del componente j

Para disoluciones muy diluidas del componente j , ($c_j \rightarrow 0$), mediante un desarrollo en serie de Taylor de la densidad en torno a $c_j = 0$, la ecuación (2) se transforma en la ecuación (3), cuya aproximación lineal, ecuación (4), es independiente de c_j . (Los superíndices 0, indican extrapolación a concentración cero para c_j .)

$$(3) \quad \left(\frac{\partial \rho}{\partial c_j} \right)_{p,T,m_{k \neq j}} = \frac{(1 - \bar{v}_j \rho^0)}{(1 - \bar{v}_j c_j^0)} [1 - \bar{v}_j c_j^0 + 0 (c_j^0)^2 + \dots]$$

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial c_j} \right)_{p, T, \mu_{k \neq j}} = (1 - \bar{v}_j \rho^0) \quad (4)$$

En el caso de que uno de los componentes sea una macromolécula la existencia de posibles interacciones entre esta y otros componentes de la disolución, hace que el volumen específico parcial de la misma, determinado a potencial químico constante de los demás componentes de la disolución, no sea un volumen específico parcial real, sino aparente debido a que el incremento de la densidad que se produce al variar la concentración de la macromolécula, sería el que correspondería a la variación de la concentración del componente macromolecular mas la cantidad adicional de aquellas especies del sistema que interaccionen con la macromolécula, y que estarían incluídas en ella. En este caso y extrapolando a concentraciones muy diluidas del componente macromolecular (en nuestro caso una enzima), al que designaremos con el subíndice 2, la variación de la densidad con relación a la concentración de proteína, a presión, temperatura y potencial químico de los demás componentes de la disolución constantes, vendría dada por la ecuación (5), donde γ_k^+ es un parámetro asociado a la interacción entre el componente k y la macromolécula.

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial c_2} \right)_{p, T, \mu} = (1 - \bar{v}_2^+ \rho^0) + \sum_{k \neq 2}^n \gamma_k^+ \quad (5)$$

γ_k^+ significaría el número de moles de este componente que ha-

bría que añadir a la disolución por gramo de proteína, para mantener cons tante su potencial químico, al variar la concentración de proteína.

$$g_k^\dagger = \frac{1}{M_2} \left(\frac{\partial m_k}{\partial m_2} \right)_{p, T, \mu} \quad (6)$$

\bar{v}_2^\dagger es el volumen específico parcial aparente de la proteína definido como:

$$\bar{v}_2^\dagger = \bar{v}_2 + \sum_{k \neq 2}^n g_k^\dagger \bar{v}_k \quad (7)$$

\bar{v}_k volumen molar parcial del componente k.

Desde un punto de vista formal, \bar{v}_2^\dagger podría ser considerado co mo el volumen específico parcial de un componente 2, definido por la inclusión en un gramo de proteína de las cantidades de las especies in teraccionantes con ella, necesarias para hacer que $\left(\frac{\partial m_1}{\partial m_2} \right)_{p, T, m} = 0$.

Por analogía con el volumen específico determinado a molalidad constante o en ausencia de interacciones preferenciales, podemos esta blecer la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial c_2} \right)_{p, T, \mu} = (1 - \phi) \rho^0 \quad (8)$$

siendo ϕ un volumen específico parcial aparente, cuya relación con el vo lumen específico parcial aparente \bar{v}_2^\dagger , vendría dada por:

$$\phi = \bar{v}_2^\dagger - \frac{\sum_{k \neq 2}^n g_k^{\dagger 0}}{\rho^0} \quad (9)$$

evidentemente, en ausencia de interacciones preferenciales entre el componente 2 y los demás elementos de la disolución, ϕ sería igual a \bar{v}_2^+

Las medidas de densidad se realizaron con un densitómetro digital DMA-02 (22) a 25 °C. Cada serie de medidas fue precedida y seguida por la determinación de la constante de calibrado del aparato.

Las disoluciones de enzima para cada serie de medidas, se prepararon mezclando pesos conocidos de disolvente y una disolución de enzima, equilibrada en el mismo disolvente, cuya concentración se había determinado espectrofotométricamente. La concentración de enzima real, de cada solución así preparada, se determinó a partir de estos valores y de la densidad de la muestra resultante.

II. 9.- DIFUSION DE LUZ

La actividad catalítica de la fosforilasa b, a 1,0 y 3,0 mg/ml, se midió en la dirección de síntesis del glucógeno, utilizando almidón (SIGMA) como aceptor de moléculas de glucosa. La G-1-P se purificó según el método descrito por Fukui y col (24).

El crecimiento de la cadena del polisacárido se siguió a partir del incremento de la intensidad de luz difundida, a ángulo fijo con respecto a la radiación incidente, debido al aumento del peso molecular del azúcar en función del tiempo.

El tratamiento de los datos se hizo utilizando como punto de partida la ecuación de Debye (23), para la difusión de luz.

$$I_{90} = \frac{I_0}{r^2} \frac{2\pi^2 \bar{n}_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 M c \quad (I)$$

Considerando la diferencia de tamaño entre la molécula de enzima y el polisacárido, la intensidad de luz difundida, era debida fundamentalmente al segundo.

Si denominamos n al número de moléculas que difunden luz por unidad de volumen y que no existe síntesis de nuevas moléculas de glucógeno, a partir de G-1-P (24,25),

$$c = n \frac{M}{N_A}$$

con lo cual, la ecuación (1), podemos expresarla como:

$$I_{90} = A_0 \left(\frac{d\bar{n}}{dc} \right)^2 M^2 \quad (2)$$

$$\text{siendo } A_0 = \frac{I_0}{r^2} \frac{2 \pi^2 \bar{n}_0^2}{N_A^2 \lambda_0^4}$$

Puesto que $\left(\frac{d\bar{n}}{dc} \right)$ no varía para los azúcares en un amplio rango de concentraciones, al menos diez veces superior al utilizado por nosotros, y es independiente del número de monosacáridos que lo forman (26), podemos considerarlo constante en la ecuación (2).

El peso molecular del polisacárido en el tiempo t , podemos expresarlo en función de la velocidad promedio de catálisis, \bar{v} , una vez alcanzado el estado estacionario, según la ecuación

$$M = M_0 + \bar{v} t \quad (3)$$

Siendo M_0 el peso molecular extrapolado a tiempo cero, con lo cual tene

44

mos,

$$I_{90}^{1/2} = A_0^{1/2} \left(\frac{d\bar{n}}{dc} \right) (M_0 + \bar{v} t) \quad (4)$$

Si denominamos S_m , al valor de la pendiente en el estado estacionario,

$$I_{90}^{1/2} = S_m \left(\frac{M_0}{\bar{v}} + t \right) \quad (5)$$

Salvo que conozcamos el valor de n , este método no nos permite calcular mas que velocidades relativas para la síntesis del polisacárido.

Las medidas de difusión de luz se realizaron en un fotogonio difusómetro FICA, modelo 42.000, provisto de un baño de xileno termostaticado a $25 \pm 0,05$ °C.

El aparato se calibró con benceno, de acuerdo al procedimiento descrito por Kratochvil y col (27). Se utilizó benceno puro como referencia, por lo cual se aplicó el factor de corrección debido a la diferencia de índices de refracción del disolvente y del benceno (28). La relación de Rayleigh para el benceno a 25 °C y 546 nm era $16,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ (29). El polvo de las disoluciones utilizadas para este tipo de medidas, se eliminó filtrando a través de filtros Millipores HA de 0,45 μm y centrifugando durante dos horas a 4 °C y 16.000 g.

Las células utilizadas, ópticamente perfectas, eran de la casa FICA.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fischer, E. H. y Krebs, E. G. (1962). *Methods in Enzymology*. (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds.) Vol 5, 369-373.
- 2.- Hedrick, J. L., Shaltiel, S., Fischer, E. H., (1966). *Biochemistry* 5, 2117-2125.
- 3.- Buc, M. H., Ulman, A., Goldberg, M. E. y Buc, H., (1971), *Biochimie* 53, 283-289.
- 4.- Krebs, E. G., (1966), *Methods in Enzymology*. (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds.) Vol 8, 543-546.
- 5.- Cohen, P., (1973), *Eur. J. Biochem.* 34, 1-14.
- 6.- Krebs, E. G., Love, D. S., Bratold, G. E., Trayrer, K. A., Meyer, W. L. y Fischer, E. H., (1964), *Biochemistry* 3, 1022-1039.
- 7.- Brostrom. C. O., Hunkeler, F. L. y Krebs, E. G., (1971), *J. Biol. Chem.* 246, 1961-1967.
- 8.- Shaltiel, S., Hedrick, J. L. y Fischer. E. H., (1966), *Biochemistry* 5, 2108-2116.
- 9.- Bagniski, E. S., Foa, P. P. y Zack, B. (1967). *Clin. Chem. A.* 15, 155
- 10.- Bagniski, E. S., Foa, P. P. y Zack, B., (1967), *Clin. Chem.* (Winston-Salem N. C.) 13, 326-332.
- 11.- Pffeuffer, T., Ehrlich, J. y Helmreich, E., (1972), *Biochemistry* 11, 2125-2136,
- 12.- Baranowski, T., Illingworth, B., Brown, D. H. y Cori, C. F., (1957)

- Biochem. Biophys. Acta 25, 16-23.
- 13.- Larner, J. y Villar Palasí, C. (1971), "Current Topics in Cellular Regulations". (Horecker, B. L. y Stadman, E.R., Eds.) 3, 196-236.
 - 14.- Hu, H. y Gold, A. M., (1975), Biochemistry 14, 2224-2230.
 - 15.- Helmreich, E. y Cori, C. F., (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 51, 131-138.
 - 16.- Horecker, B. L., Kornberg, A., (1948), J. Biol. Chemistry, 175, 385-90.
 - 17.- Randerath, E. y Randerath, K., (1964), J. Chromatog. 16, 126-129.
 - 18.- Randerath, K. y Randerath, E., (1964), J. Chromatog. 16, 111-125.
 - 19.- Wadso, I., (1968), Acta Chem. Scand. 22, 927-937.
 - 20.- Monk, P. y Wadso, I., (1968), Acta Chem. Scand. 22, 1842-1852.
 - 21.- Casassa, E. F. y Eisenberg, H., (1964), Advan. Protein Chem. 19, 287-395.
 - 22.- Kratky, O., Leopold, H. y Stabinger, H., (1973), Methods in Enzymology, 27, parte D, 98-110.
 - 23.- Champetier, G. y Monnerie, L., (1969) in "Introduction a la Chemie Macromoleculaire". Masson et cie., Paris. 252-300.
 - 24.- Kamagawa, A., Fukui, T. y Nikuni, Z., (1968), J. Biochem. 63, 361-369.
 - 25.- Abdullah, M., Fischer, E. H., Qureshi, M. V., Slessor, K. N. y Whelan, W. J., (1965), Biochem. J. 97, 9P.
 - 26.- Pulvermacher, O., (1920), Z. Anorganische Chem. 113, 141-148.
 - 27.- Kratochvil, J. P., Dezelic, G. J., Kerker, M. y Matijevic, E. (1962),

J. Polymer. Sci. 57, 59-66.

28.- Hermann, J. J. y Levinson, S., (1951), J. Optical Soc. Ame. 41, 460-465.

29.- Carr, C. I. y Zimm, B. H., (1950), J. Chem. Phys. 18, 1616-1626.

CAPITULO III

C A P I T U L O I I I

RESULTADOS Y DISCUSION

III. 1.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES FISICAS DE LA FOSFORILASA b

Merino y col., al estudiar el efecto de la concentración de enzima sobre la entalpía de interacción de la fosforilasa b con diferentes nucleótidos, entre ellos AMP (1, 2), encontraron una abrupta variación de esta magnitud termodinámica entre 1,5 y 2,5 mg/ml. La diferencia en la entalpía de interacción no podía explicarse en base a los diferentes niveles de agregación inducidos por el nucleótido; este hecho, unido a la diferencia en el comportamiento de los grupos cisteinas lentos de la enzima (3), al ser valorados con DTNB (4), hizo que dichos autores postulasen la existencia de una transición conformacional dependiente de la concentración de enzima.

Basándonos en estos hechos, iniciamos el presente trabajo, estudiando algunas de las propiedades físicas y termodinámicas de la enzima, que pudiendo ser sensibles a cambios conformacionales de la estructura enzimática, nos permitiesen confirmar la hipótesis formulada por esos autores.

Las propiedades estudiadas han sido: volumen específico parcial aparente, coeficiente de sedimentación y entalpía de dilución de la enzima.

Estudios similares habian sido realizados previamente con la fosforilasa b (5 - 8), bajo diferentes condiciones experimentales, sin encontrar ninguna anomalía en el comportamiento enzimático.

La determinación del volumen específico parcial aparente de la enzima, a presión, temperatura y molalidad de los componentes del tampón constantes, se realizó a partir de la variación de la densidad de la disolución en función de la concentración de enzima, siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos.

Según puede verse en la figura 1, la densidad de la disolución es función lineal de la concentración de enzima, con una discontinuidad entre 1,8 y 2,4 mg/ml, seguida de un aumento en la pendiente de la recta, a concentraciones superiores a 2,4 mg/ml.

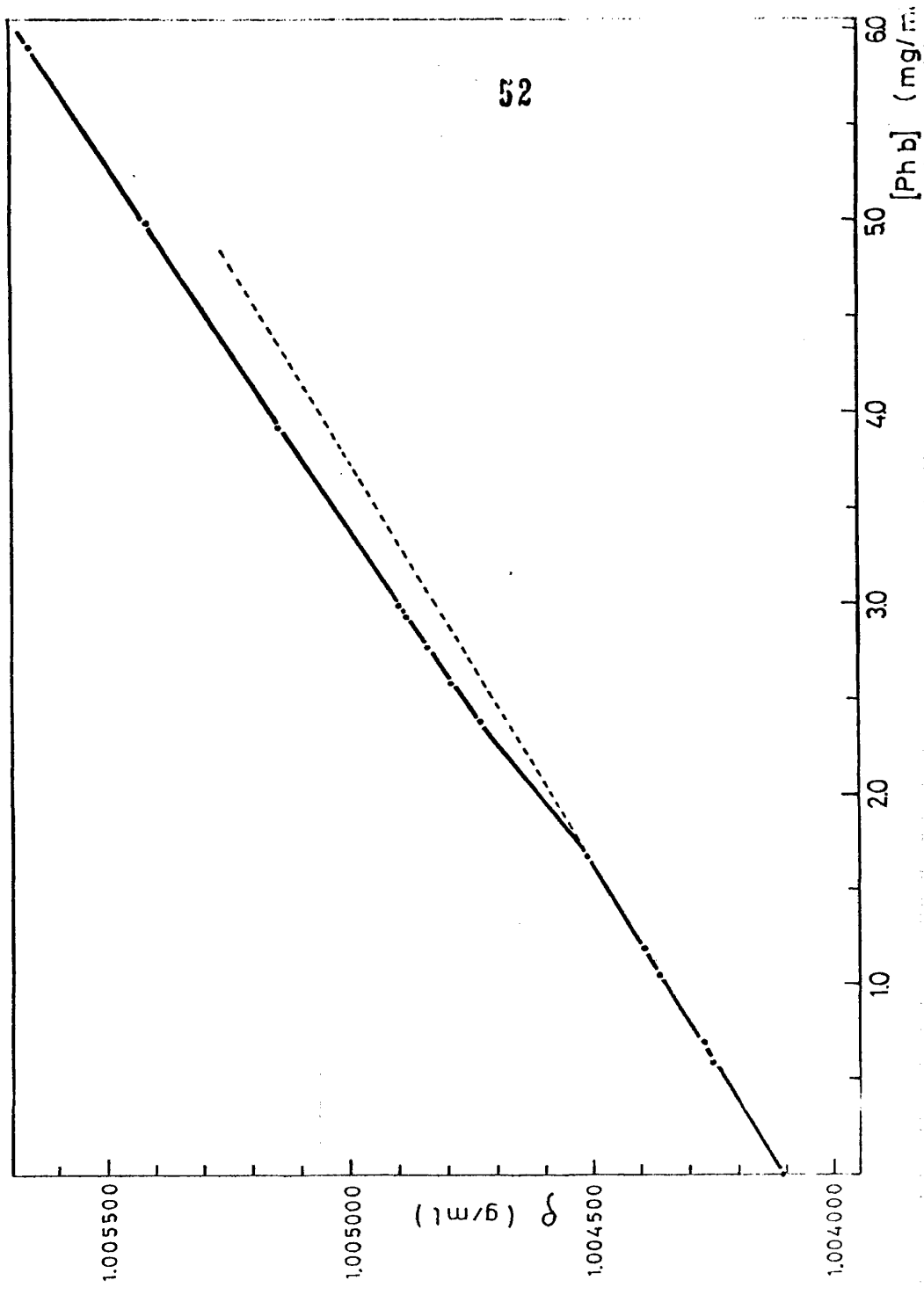
Los volúmenes específicos parciales aparentes obtenidos según la ecuación (8) del apartado II. 8 de materiales y métodos son: $\phi = 0,753 \pm 0,003$ ml/g, para concentraciones inferiores a 1,8 mg/ml, y $\phi' = 0,733 \pm 0,001$ ml/g, para concentraciones superiores a 2,4 mg/ml.

El valor del volumen específico parcial a concentraciones bajas de enzima es similar al obtenido por Cori y col. (5) y Cohen y col.(5) en glicerofosfato y en presencia de β -mercaptoetanol 1,5 mM; por otro lado, el valor obtenido por Seery y col. (7) en ausencia de β -mercaptoetanol, es similar al obtenido por nosotros a concentraciones superiores a 2,4 mg/ml.

Una variación del volumen específico parcial puede ser debida a diferentes efectos: cambios en los estados de agregación o solvatación de la enzima, o un cambio de forma del dímero de fosforilasa b.

La primera de estas posibilidades se estudió mediante experimen

FIGURA 1.- Variación de la densidad de la fosforilasa b en función de la concentración de enzima, a 25°C y pH 6,9.



tos de velocidad de sedimentación, realizados a 40.000 r.p.m. y 25 °C. La variación de $S_{20,w}$ con la concentración de enzima, presenta un hábito similar, desde un punto de vista cualitativo, al de la variación de la densidad en función de la concentración, aunque la pequeña magnitud del efecto observado y la precisión experimental de la técnica, hacen difícil asignar un peso específico elevado a estos resultados.

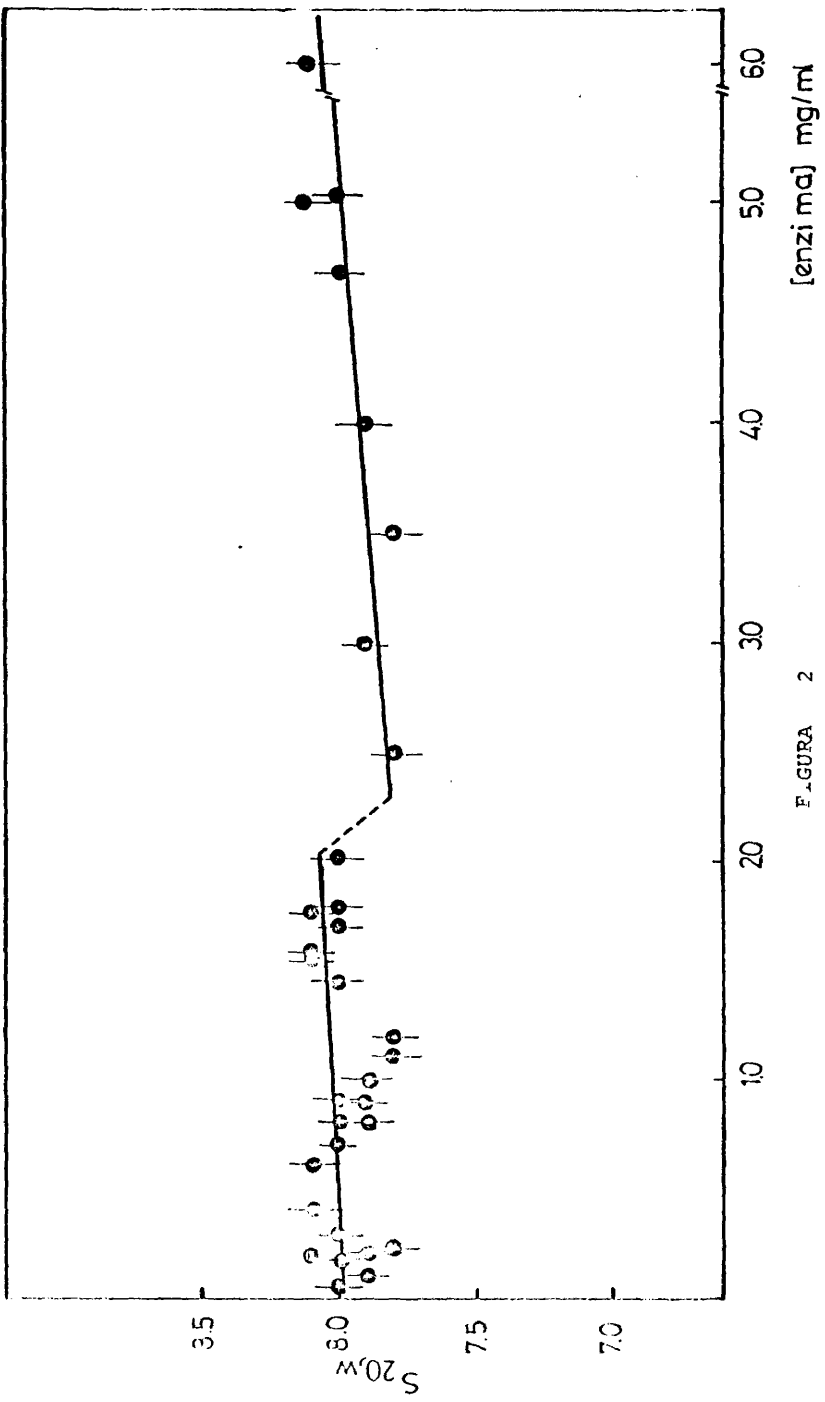
Hasta 2,0 mg/ml, la enzima tiene un coeficiente de sedimentación $S_{20,w}$ de $8,0 \pm 0,2$ S; entre 2,0 y 2,5 mg/ml se produce un descenso de aproximadamente 0,3 S y por encima de esta concentración, el coeficiente de sedimentación presenta una dependencia lineal con la concentración, característica de sistemas que agregan. Únicamente a las concentraciones más altas de enzima puede observarse un pequeño porcentaje de tétrámero, del orden del (2-3) % a 6,0 mg/ml, resultado concordante con los datos obtenidos por Pocovi (9).

La variación observada en el coeficiente de sedimentación entre 2,0 y 2,5 mg/ml es contraria a la inducida por efecto de la agregación a concentraciones más altas de enzima.

La existencia de un cambio de solvatación no asociado a una variación en la forma, o a cualquier otro proceso relacionado con la conformación de la enzima, es bastante improbable, puesto que el único parámetro variable es la concentración de enzima.

La posibilidad de que el fenómeno detectado reflejase un proceso de desaturación entre la enzima y alguno de los componentes del tampón, fue comprobada por Merino y col (4), mediante medidas de fluorescencia, valoración de grupos cisteínas y espectroscopía diferencial, a diferentes concentraciones de EDTA, el único de los componentes del tampón presente a concentraciones comparables a las de la enzima, obte-

FIGURA 2.- Variación del coeficiente de sedimentación de la fosforilasa b en función de la concentración de enzima, a 25°C y pH 6,9.



F. GURA 2

niendo un resultado negativo.

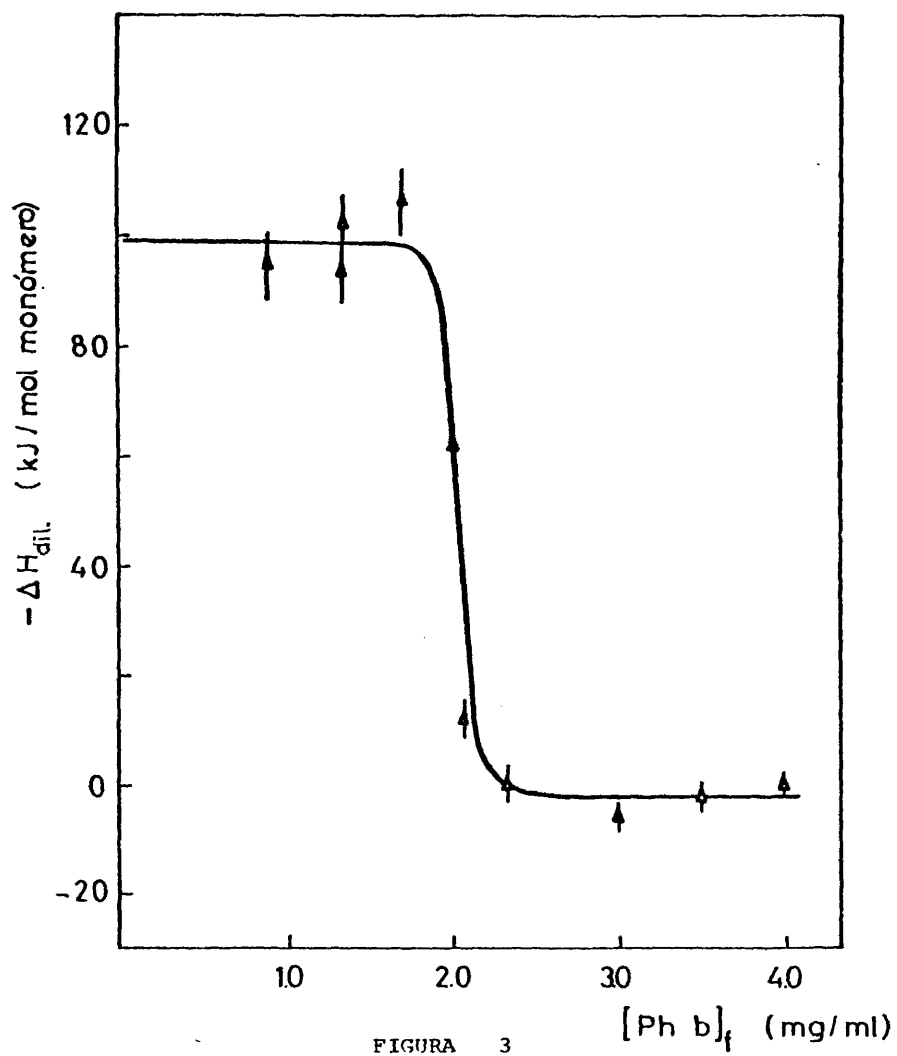
La interpretación de los resultados de volúmenes específicos y sedimentación como un cambio de forma del dímero de fosforilasa b, es consistente con la gran variación de otra de sus propiedades hidrodinámicas, la viscosidad intrínseca, en el mismo intervalo de concentraciones de enzima; por debajo de 1,6 mg/ml, la enzima presenta una viscosidad intrínseca $[\eta] = 5,2 \pm 0,2$ ml/g y una constante de Huggins, $K' = 0,48 \pm 0,03$; a concentraciones superiores a 2,4 mg/ml, $[\eta] = 2,98 \pm 0,02$ ml/g y $K' = 40,4 \pm 0,3$ (10).

Los datos de viscosidad a concentraciones superiores a 2,4 mg/ml pueden considerarse indicativos de un cambio en la forma, hacia una conformación mas compacta, a la que le correspondería un volumen específico parcial aparente menor, de acuerdo con nuestros resultados, y en la que las interacciones moleculares serían mas elevadas.

El incremento de entalpía asociado al desplazamiento del equilibrio conformacional entre dos estados, dependiente de la concentración de enzima, se determinó por dilución de la misma desde una concentración inicial constante de 4,0 mg/ml a concentraciones finales variables (figura 3); a partir de estos datos, puede estimarse una entalpía de tránsito, desde el estado conformacional estabilizado a concentraciones altas de enzima al de mas baja concentración, de $-(102 \pm 10)$ kJ/mol de monómero.

El hecho de que el desplazamiento del equilibrio conformacional tenga lugar en un rango de concentración de fosforilasa b, comparable al existente en el músculo (6), hace plantearse su posible significado a nivel biológico. A partir de los datos hasta ahora presentados, no podemos concluir mas que su existencia, pero no la naturaleza del proce

FIGURA 3.- Entalpía de dilución de la fosforilasa b en función de la concentración final de enzima, a 25°C y pH 6,9; [enzima] inicial 4,0 mg/ml.



so o procesos que la originan; por ello, el estudio de la interacción en zima-AMP y enzima-sustrato, llevado a cabo en el presente trabajo, ha sido realizado simultáneamente a dos concentraciones de enzima, 1,0 y 3,0 mg/ml, inferior y superior al intervalo de concentración de enzima en que se produce la transición, intentado obtener una mayor información que permitiese conocer tanto el significado biológico, al menos según lo que los datos "in vitro" permitiesen concluir, como la naturaleza de los procesos implicados en el cambio.

III. 2.- EFEECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH SOBRE LA INTERACCION FOSFORILASA b - AMP Y FOSFORILASA b - FOSFATO

La fosforilasa b de músculo de esqueleto de conejo, es estable entre pH 5,0 y 9,5 (11), produciendo la separación del cofactor un estrechamiento del intervalo de pH de máxima estabilidad a 5,5 y 8,5 (12).

El estudio de determinadas propiedades enzimáticas, como son el comportamiento espectroscópico del PLP, tanto de absorción como fluorescente y la actividad catalítica, dentro del intervalo de máxima estabilidad muestra claramente la existencia de cambios estructurales en la enzima que no afectan sin embargo a su estabilidad (12).

A pH ácido o básico, se produce un desplazamiento del equilibrio entre las diferentes formas tautómeras de la coenzima, estabilizándose el estado favorecido en medios hidrofílicos, lo que supone un aumento de la exposición del cofactor al disolvente (13).

El perfil de la variación de $V_{m\acute{a}x}$ con el pH presenta dos lumbos, uno ácido y otro básico, correspondientes a la ionización de dos grupos esenciales para la actividad enzimática, con pKs de 6,12 y 7,03 a 30 °C, siendo máxima a pH 6,5 la actividad catalítica (14).

La fosforilasa b presenta una transición conformacional dependiente de la temperatura, detectada a partir de medidas de RMN, cinéticas y termodinámicas (14 - 17).

El intervalo de temperatura en que se produce el desplazamiento del equilibrio conformacional varía entre 13°C (15,16) y 22°C (18), según la técnica utilizada para detectarlo.

La conformación estabilizada a bajas temperaturas presenta mayor afinidad hacia el activador alostérico, menos cooperatividad en los procesos de unión de ligandos, mayor tendencia hacia la formación del tetramero y mayor eficiencia catalítica que la que le correspondería - teniendo en cuenta los resultados cinéticos a alta temperatura (16,17, 19).

Desde el punto de vista de la catálisis enzimática, además del descenso relativo de $V_{\text{máx}}$ con la temperatura, existe una gran diferencia entre la variación de ésta con el pH a 30 y 15°C (14). A esta temperatura se produce un desplazamiento del pK del grupo ácido esencial para la actividad enzimática hacia zonas más bajas de pH, de tal forma, que - no se produce descenso en $V_{\text{máx}}$ cuando el pH desciende por debajo de 6,4 (14). Kasvinski y Meyer (14), sugirieron que el grupo responsable de este comportamiento podía ser el fosfato de la coenzima.

A 30°C la fijación del P_i depende de un solo grupo ionizable con un pK de 6,56, correspondiente a la segunda constante de ionización del propio sustrato; por descenso de la temperatura a 15°C, la fijación de sustrato se hace dependiente de la ionización de dos grupos enzimáticos, cuyos pKs 6,00 y 6,60 varían por fijación del sustrato (14).

Por reducción del doble enlace entre el cofactor y la lisina 679, la variación de $V_{\text{máx}}$ con el pH era prácticamente idéntica a 30 y

15°C (14).

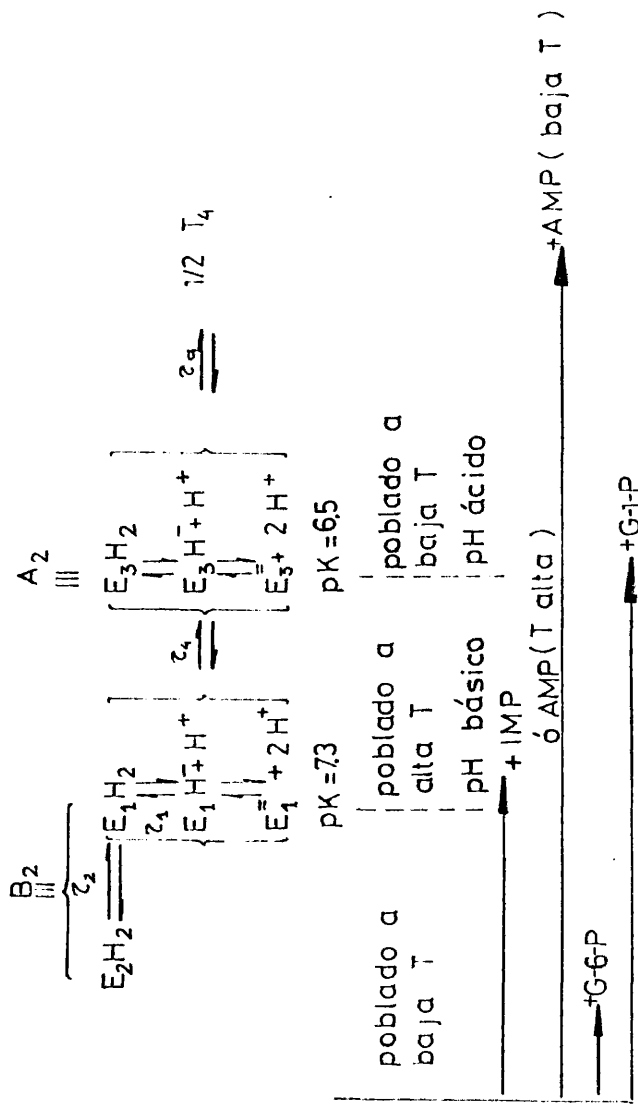
Helmreich y col. (16) encontraron un descenso en la afinidad de la apoenzima hacia AMP por debajo de 16°C.

Estos hechos hacían pensar que la transición conformacional de pendiente de la temperatura era sensible o dependiente del modo de unión del PLP a la proteína.

El desplazamiento del equilibrio conformacional en función de la temperatura, no solo hace que la constante de fijación del AMP sea mayor a bajas temperaturas, sino que influye en el modo de unión del activador a la enzima; a altas temperaturas la formación del complejo binario AMP-enzima es un proceso rápido, con un tiempo de residencia del nucleótido del orden de 10^2 μ s, mientras que a bajas temperaturas la unión del activador es capaz de inducir en la fosforilasa b un estado conformacional que une lentamente al AMP, cuyo tiempo de residencia pasa a ser del orden de milisegundos. Este comportamiento es similar al que presenta la unión de AMP a la fosforilasa a, a altas temperaturas (20).

Todos estos datos son concordantes con los obtenidos por Shimomura y Fukui, quienes encontraron, mediante estudios de dicroísmo circular, que el enfriamiento del sistema fosforilasa b AMP por debajo de 13°C era suficiente para generar una forma de enzima, semejante a la a (21).

El estudio por técnicas de cinéticas rápidas de los equilibrios conformacionales de la enzima en función de T, pH y concentraciones variables de AMP, realizado por Buc (17), le llevó a proponer el siguiente esquema conformacional para la fosforilasa b.



ESQUEMA CONFORMACIONAL PROPUESTO POR BUC

E_i = estados diméricos
 T_4 = tetrámero

(ref. 17)

Helmreich y col (16) y Radda y col (15) postularon sendos esquemas conformacionales para la enzima, que analizados en profundidad pueden ser equivalentes, así como el propuesto por Madsen y col (22), al formulado por Buc y col (17), si bien en algún caso existen diferencias entre las propiedades asignadas a cada uno de ellos. Una relación entre su esquema y el propuesto por Radda (15), ha sido ya establecida por Buc (23).

III. 2 a.- ESTUDIO CALORIMETRICO DE LA INTERACCION FOSFORILASA

b - AMP EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

En el presente trabajo se ha estudiado calorimetricamente, el efecto de la temperatura sobre la interacción de la enzima con AMP a 14,0; 19,0; 21,0; 23,0; 25,0 y 30,0 °C , a dos concentraciones de enzima, 3,0 y 1,0 mg/ml. Los resultados obtenidos se encuentran representados en las figuras 4 a 11.

En todo el intervalo de temperatura estudiado, el AMP se une a dos sitios con diferente afinidad por monómero de enzima, a ambas concentraciones de enzima.

La entalpía de interacción fosforilasa b - AMP para el sitio de mayor afinidad hacia el nucleótido, a ambas concentraciones de enzima, presenta un incremento con la temperatura, figura 12, existiendo una discontinuidad en el intervalo de 19 a 23°C.

Excepto a 14°C en que la entalpía de interacción para la primera clase de sitios de unión, es practicamente idéntica a 1,0 y 3,0 mg/ml, la unión de AMP es mas exotérmica a bajas concentraciones de enzima, siendo la diferencia de entalpía de $-(75-100)$ kJ/mol de monómero.

La constante de fijación aparente ha sido calculada aplicando

FIGURA 4.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 14°C

14 °C

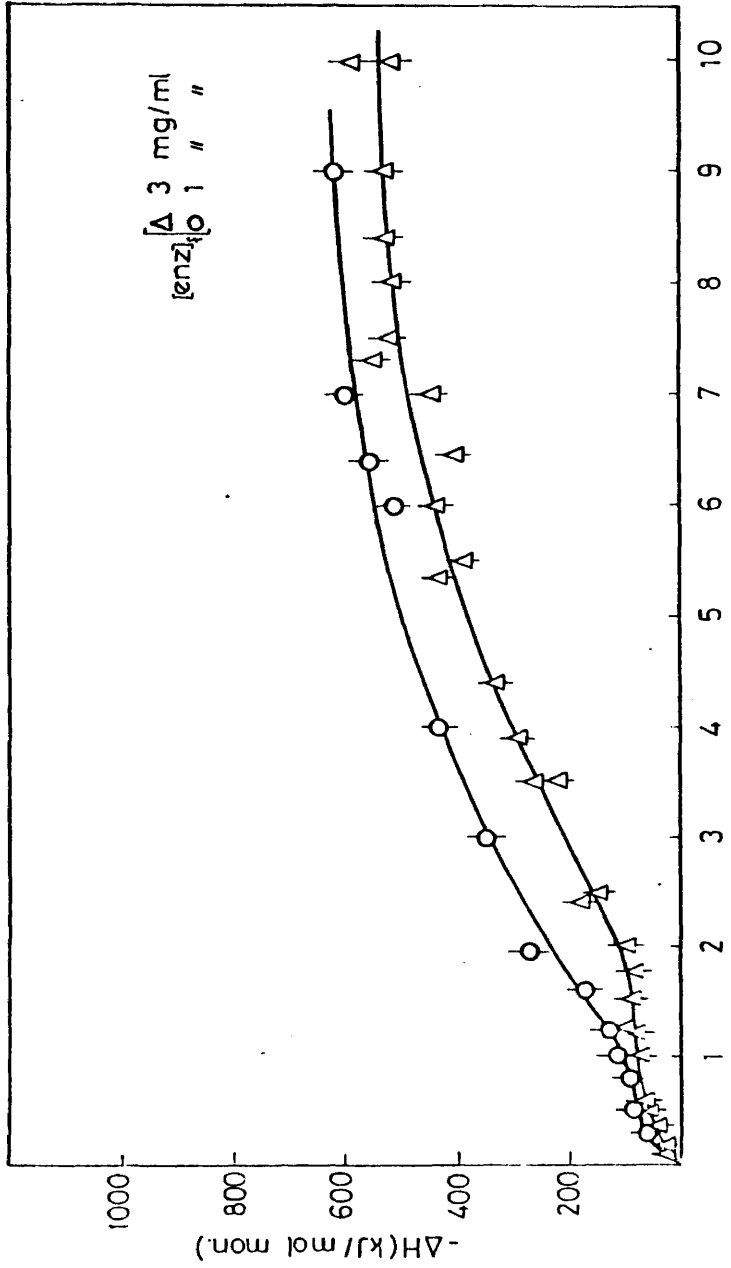


FIGURA 4

FIGURA 5.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 19°C.

19°C

67

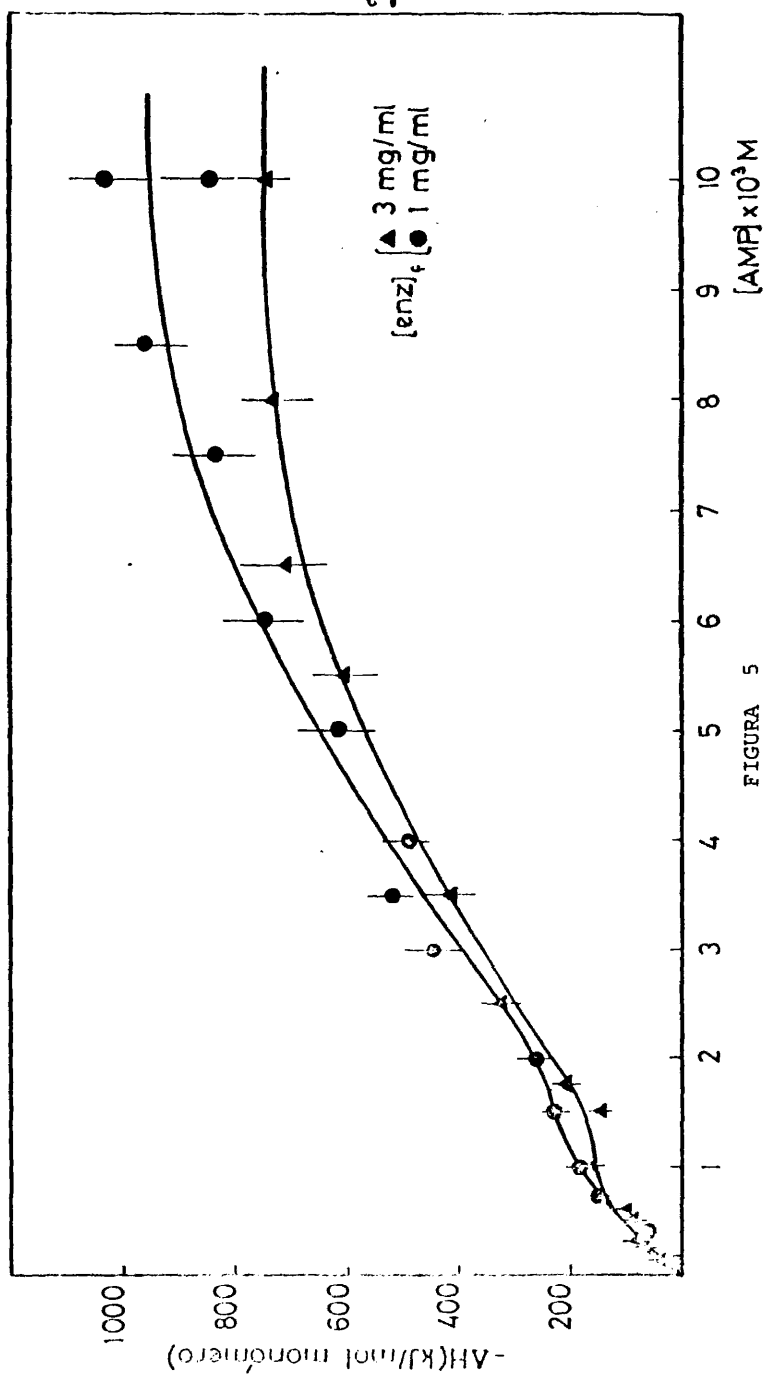
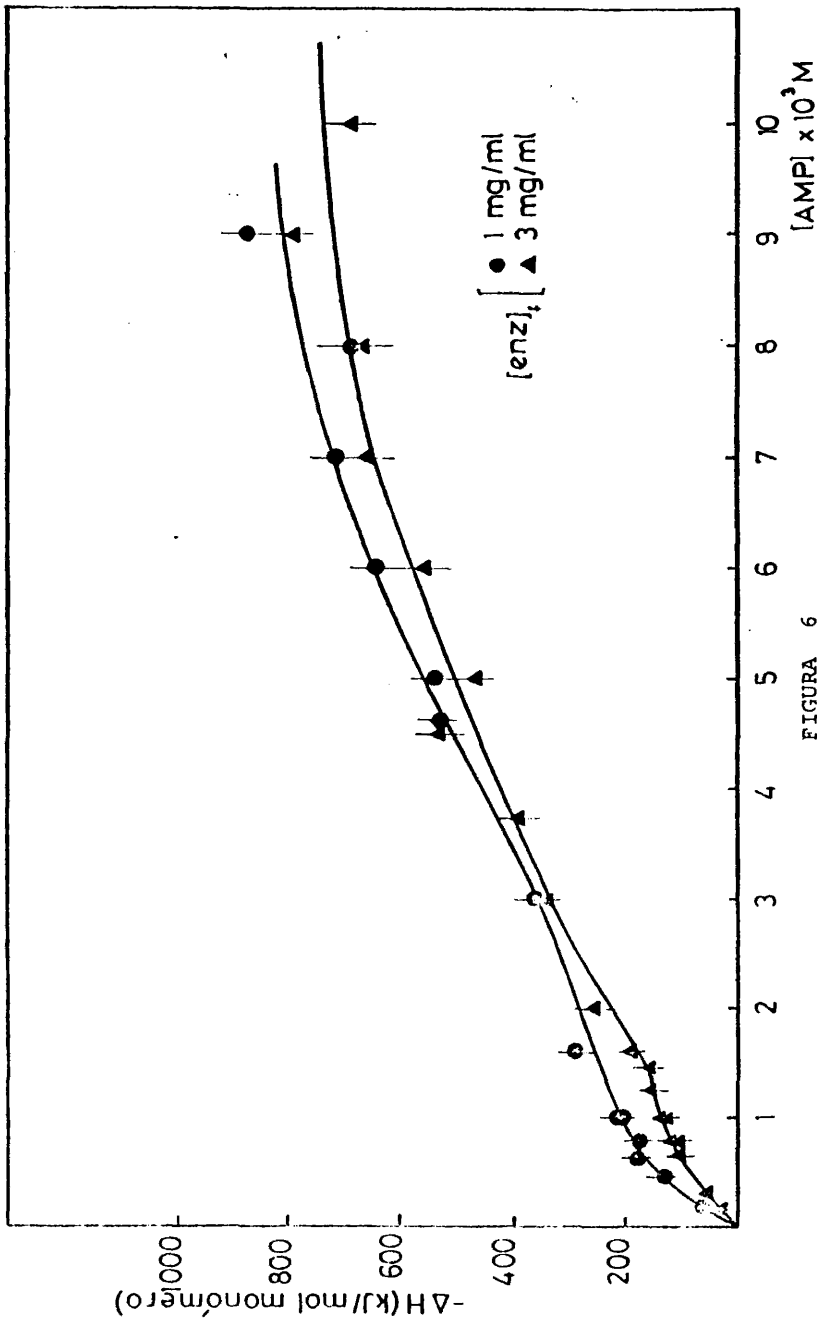


FIGURA 5

FIGURA 6.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 21°C.

21°C



69

FIGURA 6

FIGURA 7.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 23°C.

23°C

71

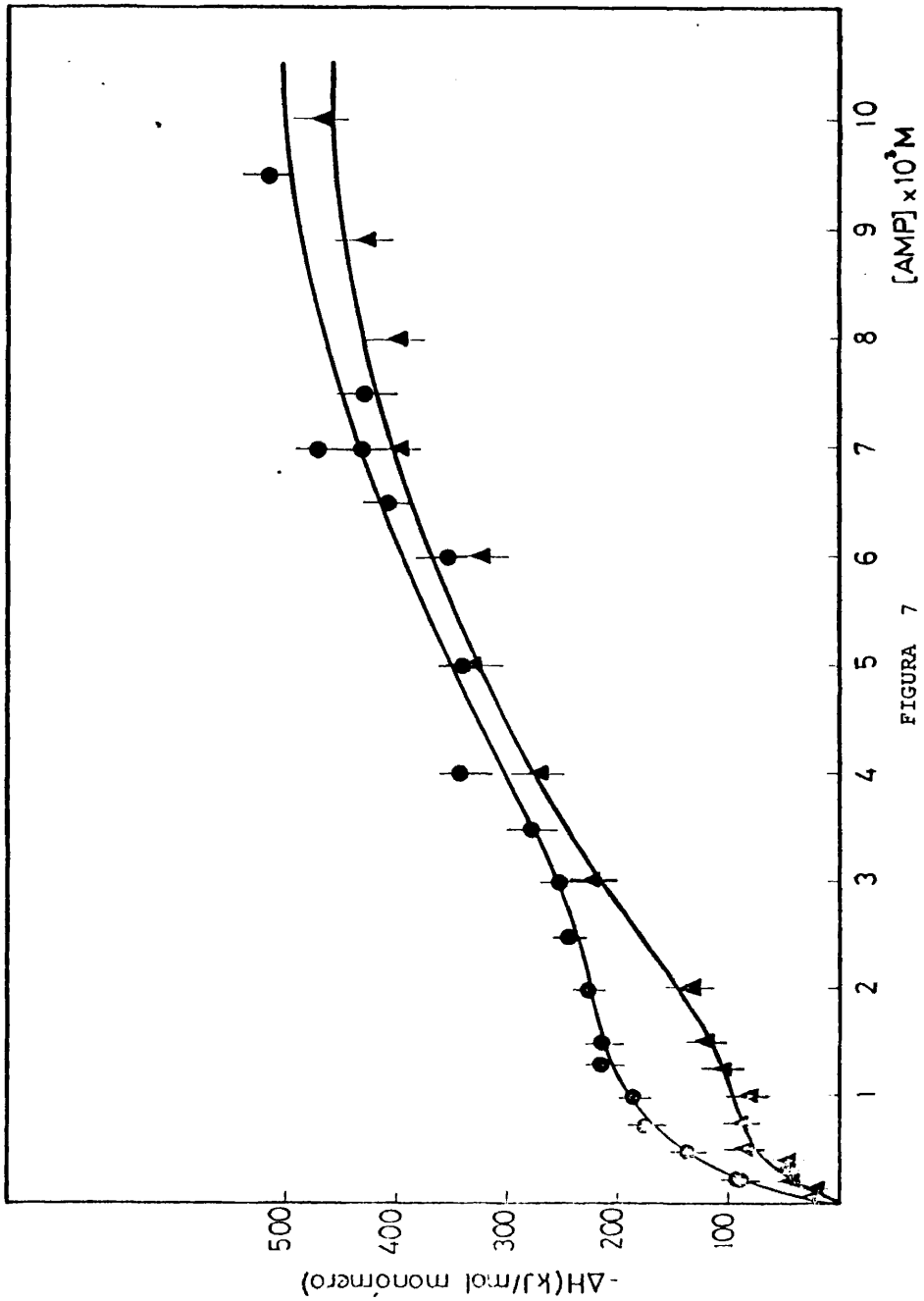


FIGURA 7

FIGURA 8 - Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 25°C.
Los experimentos indicados con-●- se realizaron en
ausencia de β-mercaptoetanol.

25°C

73

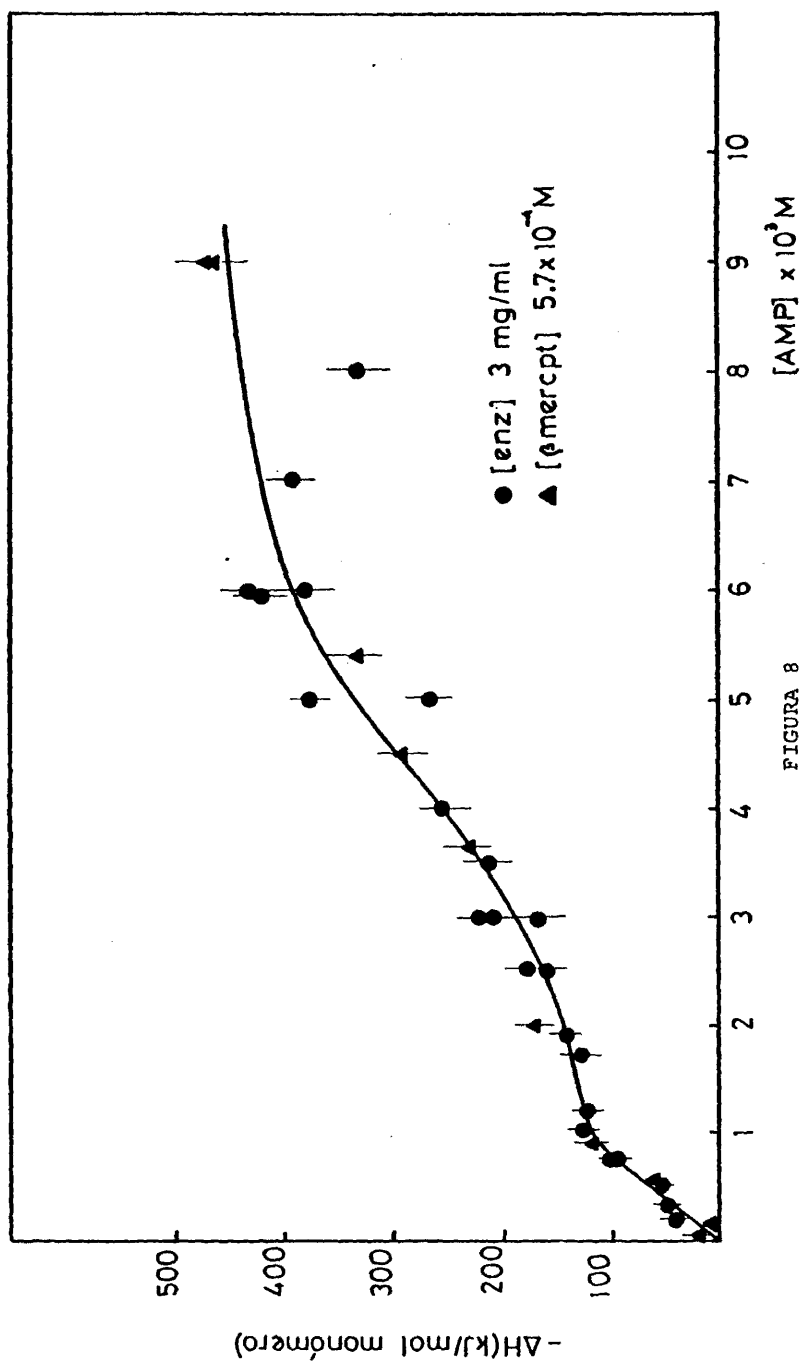


FIGURA 8

FIGURA 9.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 25°C.

25°C

75

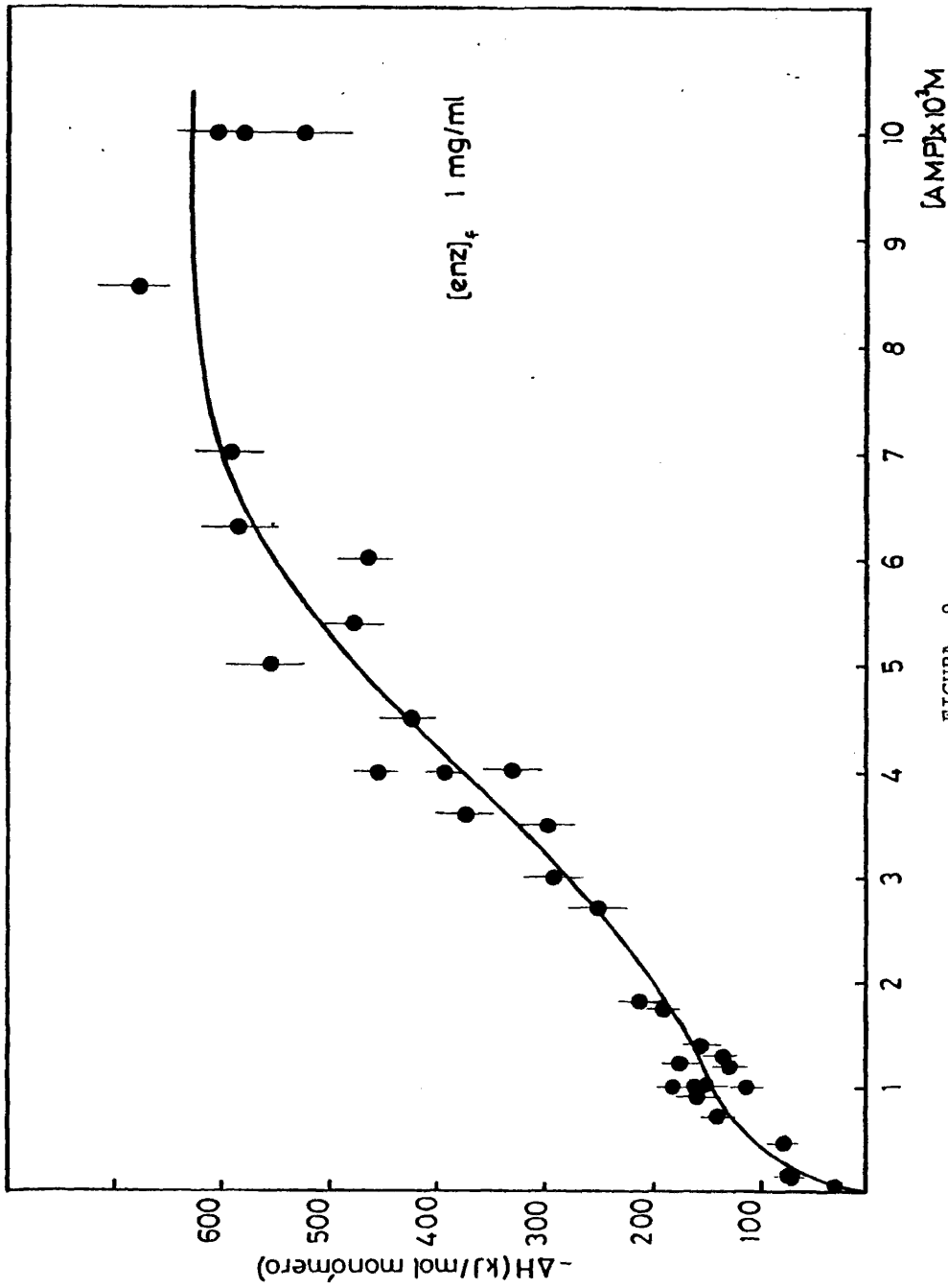


FIGURA 9

FIGURA 10.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 30°C.

30°C

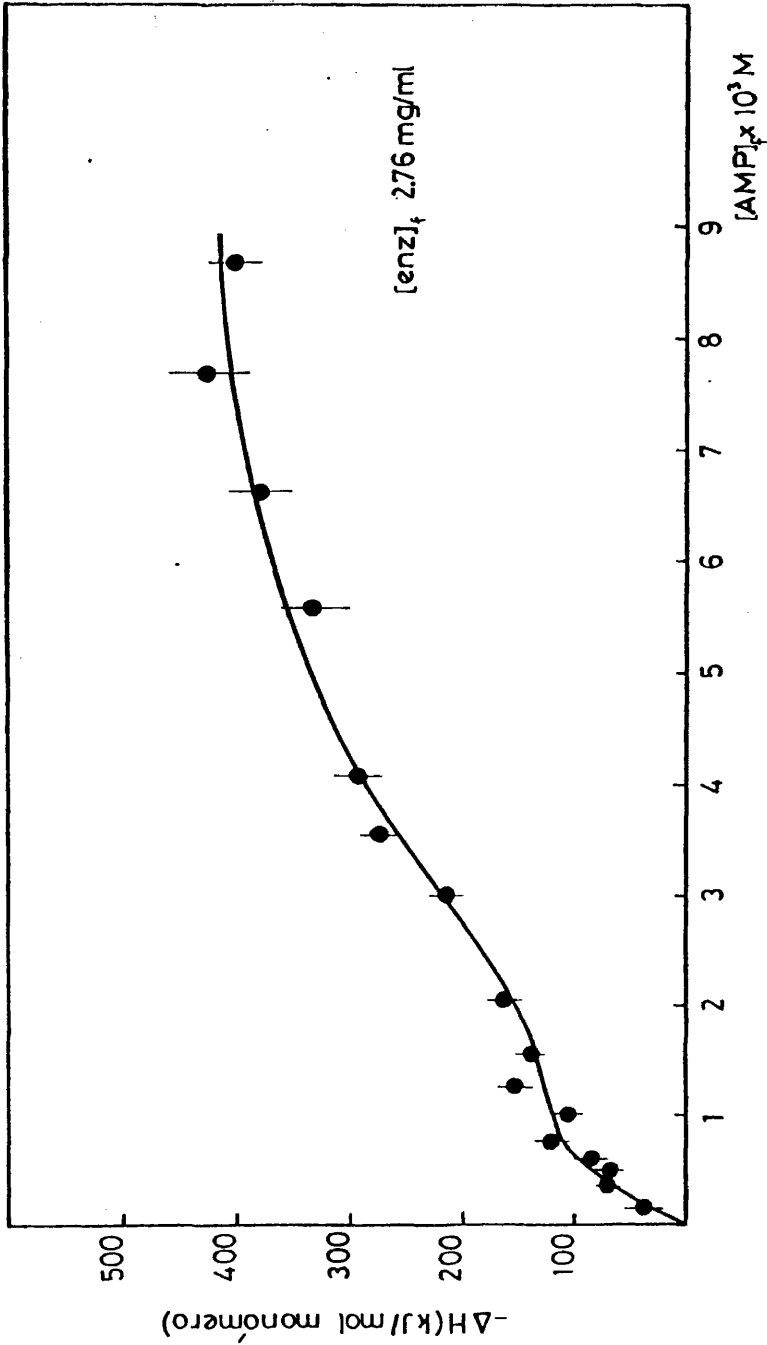


FIGURA 10

FIGURA 11.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 30°C.

30°C

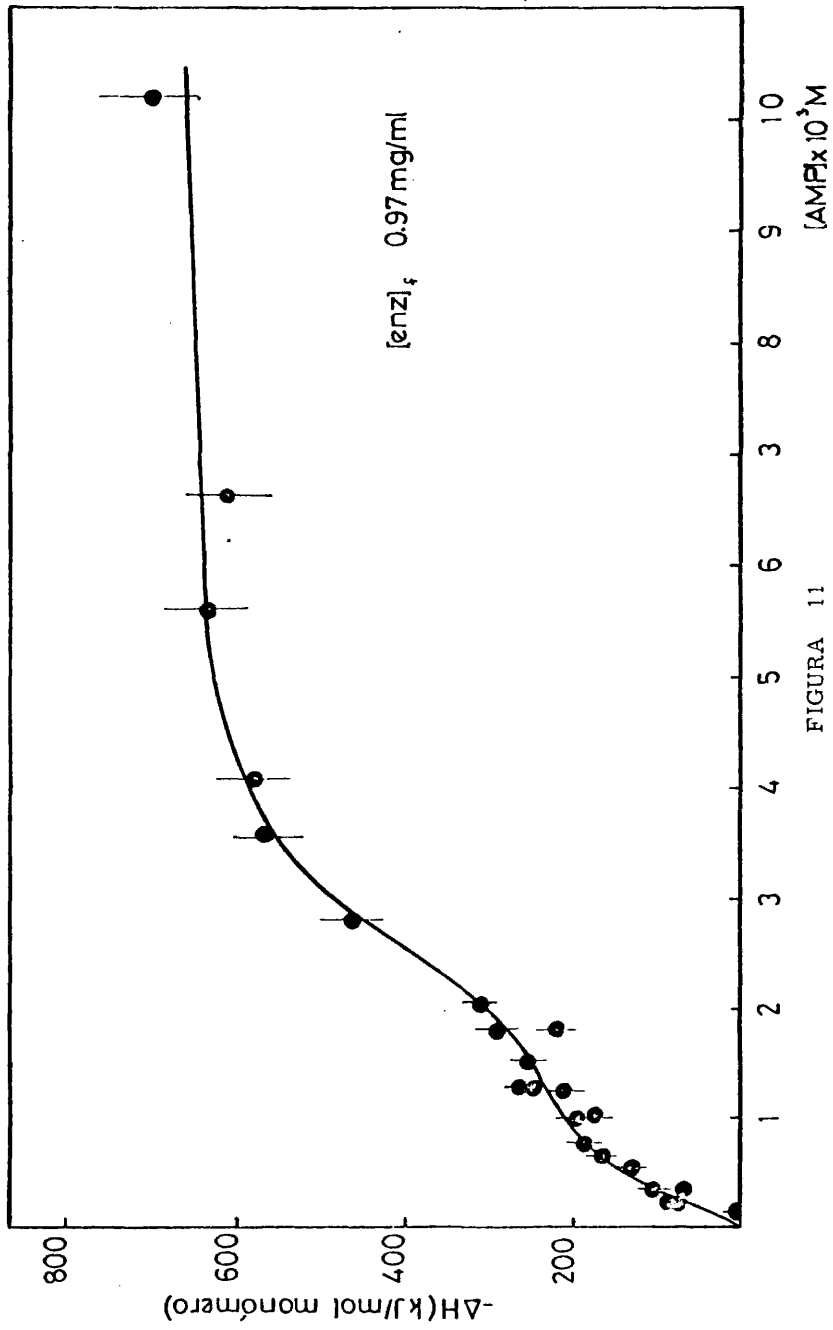


FIGURA 11

FIGURA 12. - Variación de la entalpía de interacción fosforilasa b - AMP con la temperatura. A) Saturación de la primera clase de sitios de unión: -o- [Enzima] 1 mg/ml; -Δ- [Enzima] 3 mg/ml; -▲- idéntico significado que -Δ- pero descontando la contribución debida a la entalpía de tetramerización. B) Saturación de la segunda clase de sitios de unión: -●- [Enzima] 1 mg/ml; -▲- [Enzima] 3 mg/ml.

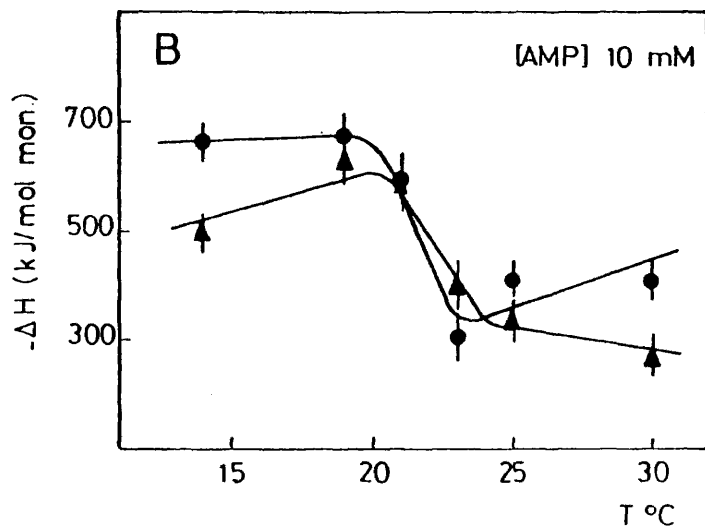
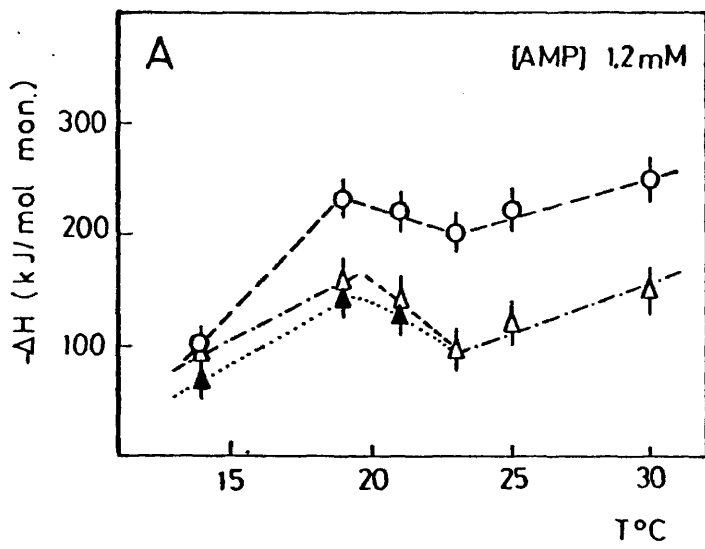


Figura 12

la ecuación de Hill (29).

La afinidad del AMP hacia la enzima, aumenta al descender la temperatura desde (21-23)°C hasta 14°C; por encima de 25°C existe un descenso de la constante de disociación aparente al aumentar la temperatura (TABLA I).

La cooperatividad es creciente a medida que desciende la temperatura, siendo máxima entre 23 y 19 °C. Los índices de Hill a 1,0 mg/ml son superiores a los obtenidos a 3,0 mg/ml a la misma temperatura.

En la figura 12 se ha representado la variación de entalpía de interacción AMP-enzima, para ambas clases de sitios de unión, en todo el intervalo de temperaturas medido.

El perfil de la curva de ΔH_{II} (saturación de la segunda clase de sitios de unión) en función de la temperatura, es similar al de la saturación de la primera clase de sitios de unión y presenta el aspecto de una transición entre dos estados.

La constante de disociación aparente para la segunda clase de sitios de unión, presenta un descenso al aumentar la temperatura, aunque las variaciones obtenidas son muy pequeñas (TABLA I).

III. 2 b.- EQUILIBRIOS DE ASOCIACION \rightleftharpoons DISOCIACION INDUCIDOS POR LA UNION DE AMP EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

El estudio de la variación en el estado de agregación de la enzima inducido por la unión de AMP, ha sido realizado por ultracentrifugación analítica, entre 12 y 30°C.

Los experimentos de velocidad de sedimentación se han realizado a 1,0 y 3,0 mg/ml a saturación de la primera y la segunda clase de

T A B L A I

VARIACION DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION DE AMP CON LA TEMPERATURA

T °C	[Enzima] 3,0 mg/ml		[Enzima] 1,0 mg/ml		
	$K_I \times 10^4$ M	$K_{II} \times 10^3$ M	T °C	$K_I \times 10^4$ M	$K_{II} \times 10^3$ M
14,0	3,2 ± 0,2	4,6 ± 0,2	14,0	3,0 ± 0,2	4,2 ± 0,2
19,0	4,0 ± 0,2	3,8 ± 0,2	19,0	5,0 ± 0,3	4,4 ± 0,2
21,0	4,2 ± 0,2	4,0 ± 0,2	21,0	4,0 ± 0,2	4,6 ± 0,2
23,0	3,5 ± 0,2	4,8 ± 0,2	23,0	3,5 ± 0,3	5,2 ± 0,3
25,0	5,0 ± 0,3	4,6 ± 0,2	25,0	4,0 ± 0,1	4,6 ± 0,3
30,0	4,3 ± 0,2	3,9 ± 0,2	30,0	4,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2

K_I Y K_{II} son las constantes de disociación aparentes asociadas a la primera y segunda clase de sitios de unión de AMP en la enzima.

sitios de unión de AMP a 20.000 y 60.000 r.p.m.

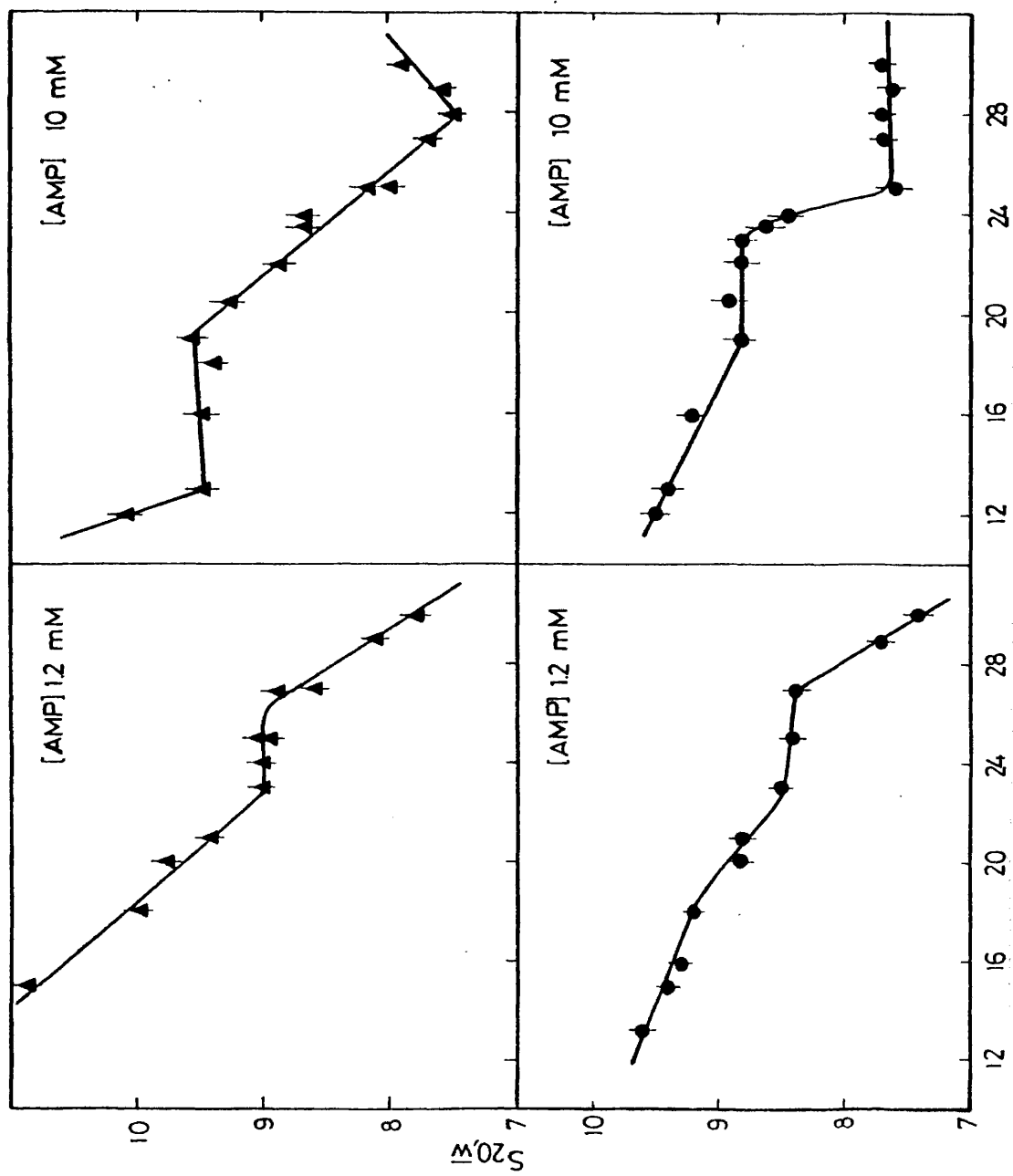
A 20.000 r.p.m. la velocidad de sedimentación no es suficientemente elevada para permitir la separación de las dos especies enzimáticas existentes, teniendo en cuenta sus pesos moleculares, por lo que la variación del porcentaje de agregación se manifiesta únicamente en un aumento del coeficiente de sedimentación promedio. La causa de realizar también a esta velocidad los experimentos de velocidad de sedimentación, ha sido la variación de volumen específico parcial aparente detectado en el primer apartado de resultados y discusión, entre 1,0 y 3,0 mg/ml. Si la variación de volumen específico sigue existiendo en presencia del activador alostérico, el estado conformacional estabilizado a 1,0 mg/ml podría desplazarse por acción de la presión hacia el estado de 3,0 mg/ml.

El estudio comparativo de los resultados obtenidos para la concentración mas baja de enzima, a 20.000 y 60.000 r.p.m., puede permitirnos determinar la existencia de un cambio de volumen específico, así como la posibilidad de que la constante del equilibrio por acción de la presión, se desplace de tal manera que se establezca el estado de menor volumen específico parcial aparente en todo el intervalo de concentraciones de enzima estudiado.

La asociación de la enzima a tetrámero, inducida por la unión de AMP presenta una dependencia bastante compleja con la temperatura, figura 13, y existen claras diferencias entre los resultados obtenidos a 3,0 y 1,0 mg/ml.

De acuerdo con los datos previamente publicados por Wang y col (24), la saturación de la primera clase de sitios de unión favorece el proceso de asociación a tetrámero, mientras que la saturación de los sitios de baja afinidad produce una disminución del % de tetrámero induci

FIGURA 13.- Variación del coeficiente de sedimentación en función de la temperatura, de la fosforilasa b en presencia de AMP 1,2 y 10 mM. Enzima : -●- 1mg/ml; -▲- 3mg/ml. Los ex_{per}imentos se realizaron a una velocidad de sedimentación de 20.000 r.p.m..



87

do por la unión de la primera molécula de AMP por monómero, y el % de tetrámero aumenta al disminuir la temperatura.

A 3,0 mg/ml y en presencia de AMP 1,2 mM el coeficiente de sedimentación aumenta desde valores de 8,0 S, a 30°C, (próximos al coeficiente de sedimentación medido para la enzima sola a 25°C) hasta 9,0 S a (25-26)°C, estabilizándose en este valor hasta temperaturas de 21-22°C por debajo de las cuales se produce un rápido incremento de la especie de mayor peso molecular, el tetrámero.

A concentración de 1,0 mg/ml, la variación de $S_{20,w}$ con la temperatura presenta dos etapas, en la primera se produce un incremento del coeficiente de sedimentación, al pasar de 30 a 27°C, estabilizándose en valores de 8,4-8,5 S desde 27 a 22°C; por debajo de esta temperatura se produce un nuevo incremento de $S_{20,w}$.

La saturación de dos sitios de unión de AMP por monómero de enzima, a 3,0 mg/ml, hace descender el % de tetrámero con respecto a los niveles obtenidos en presencia de AMP 1,2 mM. El coeficiente de sedimentación aumenta linealmente al descender la temperatura, para estabilizarse en valores de 9,4-9,5 S desde 20 hasta 13°C; por debajo de esta temperatura se produce un incremento del nivel de agregación.

La variación de $S_{20,w}$ en función de la temperatura, en presencia de AMP 10 mM, a 1,0 mg/ml, es similar a la de 3,0 mg/ml, aunque el aumento del coeficiente de sedimentación con la temperatura, se produce en un intervalo mucho más estrecho, 25-23°C, y el intervalo de temperatura en que se estabiliza se encuentra desplazado hacia temperaturas más altas.

Los datos obtenidos a 20.000 r.p.m. no nos permiten obtener más que resultados cualitativos de la evolución del equilibrio dímero \rightleftharpoons

tetrámero con la temperatura, por ello se realizaron experimentos paralelos a 60.000 r.p.m., figura 14.

En estas condiciones hay que resaltar dos hechos:

1.- La velocidad a la que se alcanza el equilibrio dímero tetrámero, inducido por la unión de AMP, es altamente dependiente de la temperatura, de forma que a las temperaturas experimentales mas bajas, es preciso dejar evolucionar el sistema durante una hora, aproximadamente, para que no exista variación en el % de tetrámero con el tiempo, mientras que a altas temperaturas el equilibrio se alcanza de forma casi inmediata.

2.- Existe un intervalo de temperaturas, comprendido entre 21 y 26°C, en el que a pesar de observarse una fuerte asimetría en los diagramas de Schlieren de la ultracentrífuga, no se separan las dos especies enzimáticas presentes. Este efecto puede ser debido a dos causas: a.-) el equilibrio de asociación \rightleftharpoons disociación es tan rápido que no es posible la separación de las dos especies en equilibrio, y se está produciendo una reordenación constante del equilibrio a lo largo del experimento de sedimentación. b.-) La existencia de interacciones de tipo físico muy fuertes entre el dímero y el tetrámero, de forma que no sea posible la sedimentación independiente de cada uno de ellos (25).

Los diagramas de Schlieren obtenidos a 60.000 r.p.m., han sido descompuestos en la suma de sus dos componentes utilizando un analizador de curvas Dupont, modelo 310. El porcentaje de agregación y la constante de asociación, K_T , se calcularon a partir de las areas bajo los picos correspondientes a cada especie enzimática, TABLA II. Este tratamiento solo ha sido posible para los datos a 3,0 mg/ml. Datos de Light Scattering (18), parecen indicar que los resultados obtenidos a esta concentración

T A B L A II

VARIACION DE LA CONSTANTE DE AGREGACION CON LA TEMPERATURA

T °C	[AMP] $1,2 \times 10^{-3}$ M		T °C.	[AMP] 10^{-2} M	
	$K_T \times 10^{-4} M^{-1}$	% T		$K_T \times 10^{-3} M^{-1}$	% T
14,0	9,0	55			
15,4	9,0	55			
16,0	5,5	47	16,0	12,4	23
19,0	3,4	39	20,0	8,4	18
22,0	2,1	31	22,0	5,3	12,5
24,0	1,1	20	23,0	6,3	14
25,0	0,6	14	24,0	4,6	12
26,0	0,7	16	28,0	4,1	10
27,0	0,4	10	29,5	5,7	13
28,0	0,8	17			
29,5	0,7	15			

$$K_T = [\tau]/[D]^2$$

de enzima, son similares a los de 1,0 mg/ml.

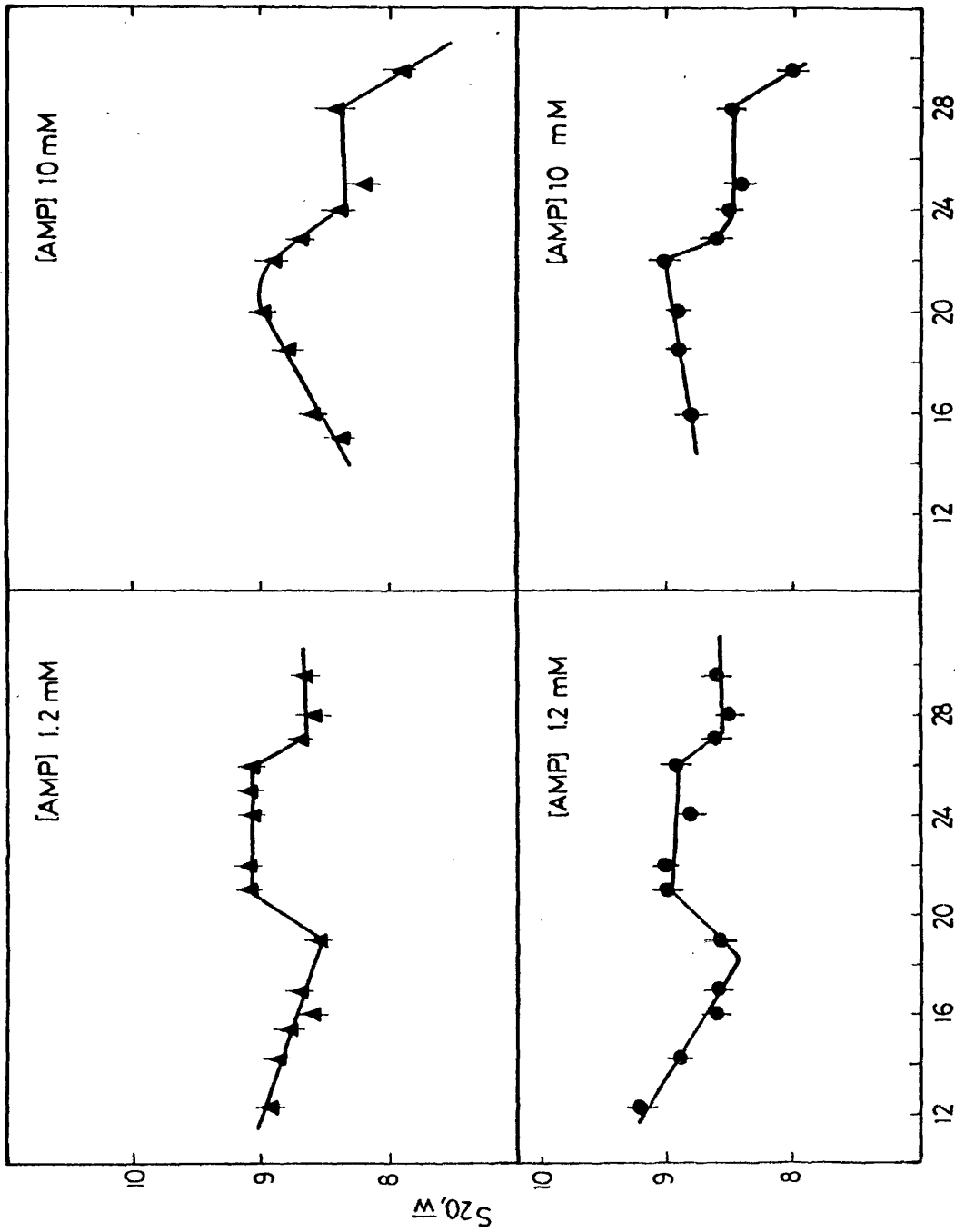
Entre 25 y 30°C aparecen dos picos con coeficientes de sedimentación $8,6 \pm 0,1$ S y 12 S, correspondientes al dímero y al tetrámero de fosforilasa b (24). La variación del % de tetrámero en este intervalo de temperatura es pequeña, siendo los niveles de tetrámero en presencia de AMP 10 mM ligeramente inferiores a los obtenidos en presencia de AMP 1,2 mM.

Al descender la temperatura por debajo de 25°C, se observa un aumento de la asimetría de los diagramas de Schlieren, sin que el sistema llegue a separarse en dos picos; este hecho que ya ha sido indicado anteriormente, plantea un problema en el cálculo de la constante de asociación, dado que aunque el análisis de las curvas ponía de manifiesto la existencia de dos especies enzimáticas con diferente peso molecular y un aumento de la población de tetrámero a medida que desciende la temperatura, el coeficiente de sedimentación medio observado es constante con la temperatura, hecho en principio en desacuerdo con el aumento del % de tetrámero; sin embargo, los valores de las constantes de agregación obtenidos concuerdan bastante bien con los valores de las constantes obtenidas a partir de medidas de "Light Scattering" (18).

A temperaturas inferiores a 21°C se sigue observando un incremento del porcentaje de agregación y aparecen dos picos con coeficientes de sedimentación de $8,8 \pm 0,1$ S para el dímero y 12-13 S para el tetrámero, existiendo una tendencia a aumentar el valor de $S_{20,w}$ de cada especie al descender la temperatura.

En presencia de AMP 10 mM no se observa a ninguna temperatura, el fenómeno existente a saturación de la primera clase de sitios de AMP entre 21 y 25°C, siendo la separación de los picos más neta a igual tiempo

FIGURA 14.- Variación del coeficiente de sedimentación de la fosforilasa b, en función de la temperatura, en presencia de AMP 1,2 y 10 mM. (Enzima: - ● - 1 mg/ml; - ▲ - 3 mg/ml. Los experimentos se realizaron a una velocidad de sedimentación de 60.000 r.p.m.



del experimento de sedimentación.

El coeficiente de sedimentación del tetrámero en estas condiciones es $13,0 \pm 0,2$ S.

Hay que señalar también, la existencia de un aumento del coeficiente de sedimentación del dímero a valores de $8,9 \pm 0,1$ S por debajo de 21°C .

En la figura 15 se encuentra representado $\ln K_T$ en función del inverso de la temperatura, pudiendo observarse una cortadura alrededor de $23-25^\circ\text{C}$.

Las entalpías de Van't Hoff, para la tetramerización, calculadas a partir de la figura 15 son:

a.- En presencia de AMP 1,2 mM

- $\Delta H_T = 45 \pm 5$ kJ/mol monómero $T > 25^\circ\text{C}$
- $\Delta H_T = 176 \pm 15$ kJ/mol monómero $T < 25^\circ\text{C}$

b.- En presencia de AMP 10 mM

- $\Delta H_T = 25 \pm 3$ kJ/mol monómero $T < 25^\circ\text{C}$
- $\Delta H_T = 0 \pm 2$ kJ/mol monómero $T > 25^\circ\text{C}$

La contribución de la entalpía de agregación a la entalpía de interacción AMP-enzima, es pequeña, salvo a 14°C , (ver figura 12).

Un hecho interesante es la diferencia en el comportamiento de sedimentación de la enzima a $1,0$ mg/ml a 60.000 y 20.000 r.p.m. El aumento de la velocidad de sedimentación produce un desplazamiento de la curva obtenida a $1,0$ mg/ml hasta obtener valores idénticos a los de $3,0$ mg/ml, a la misma temperatura. Este resultado como ya indicamos al comien-

FIGURA 15.- Representación de Van't Hoff de la constante de tetramerización K_T . - ▲ - AMP 1,2 mM; - ● - AMP 10 mM. Enzima 3,0 mg/ml.

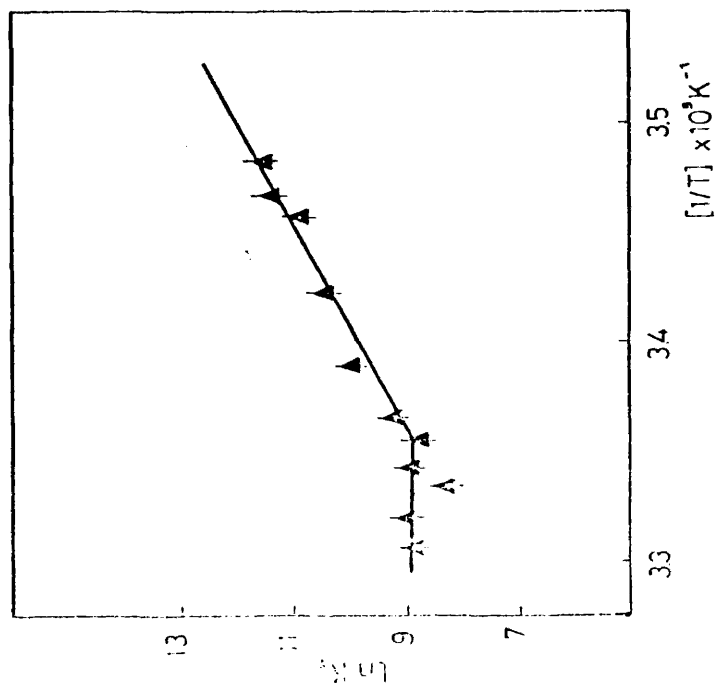
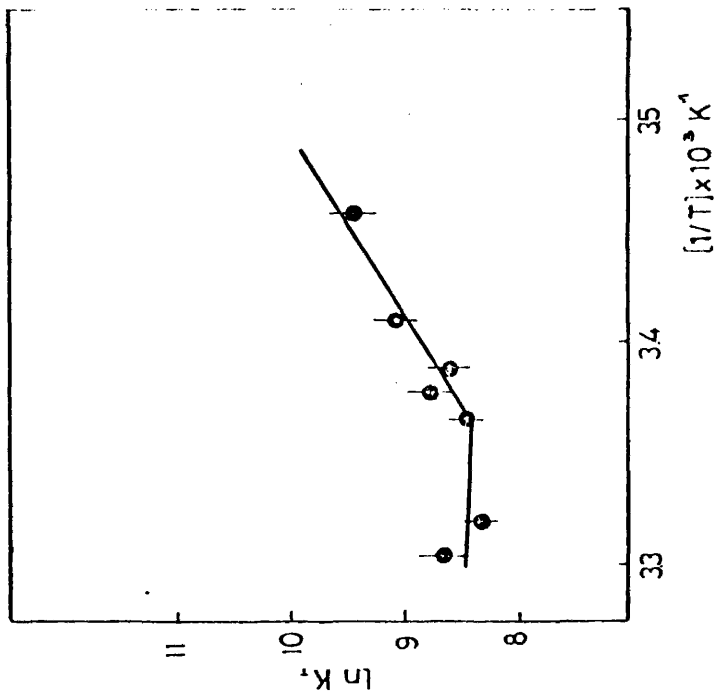


FIGURA 15

zo del presente apartado podría considerarse indicativo de la existencia de volúmenes específicos diferentes a 1,0 y 3,0 mg/ml y un desplazamiento por acción de la presión de los estados conformacionales estabilizados a baja concentración de enzima, hacia los estabilizados a concentraciones de fosforilasa b superiores a aquellas en que se producía la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima.

III. 2 c.- ESTUDIO CALORIMETRICO DE LA INTERACCION FOSFORILASA b - FOSFATO EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

La interacción entre la fosforilasa b y uno de sus sustratos, el P_i , ha sido estudiada a 14,0; 19,0; 21,0; 23,0; 25,0 y 30,0°C, en las mismas condiciones que para el activador alostérico AMP.

Los resultados obtenidos se encuentran representados en las figuras 16-22.

Una característica general de todos ellos, es el elevado valor de la entalpía de interacción, del orden de -1600 kJ/mol de monómero.

La existencia de interacciones iónicas que estabilizan la fijación del sustrato ha sido demostrada a partir de los diagramas de difracción de Rayos-X, tanto para la fosforilasa b (26), como para la fosforilasa a (27), no solamente para el sustrato sino para los grupos fosfato del nucleótido, la coenzima y el unido covalentemente a la serina 14.

El efecto debido al grupo fosfato en la interacción enzima-AMP parece estar de acuerdo con los resultados obtenidos para la fijación del sustrato. En la figura 24, pueden verse los datos obtenidos para la fijación del 5'-fosforamidoato de adenosina, un análogo covalente del AMP en el que un grupo -OH del fosfato ha sido sustituido por un grupo

FIGURA 16.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 14°C.

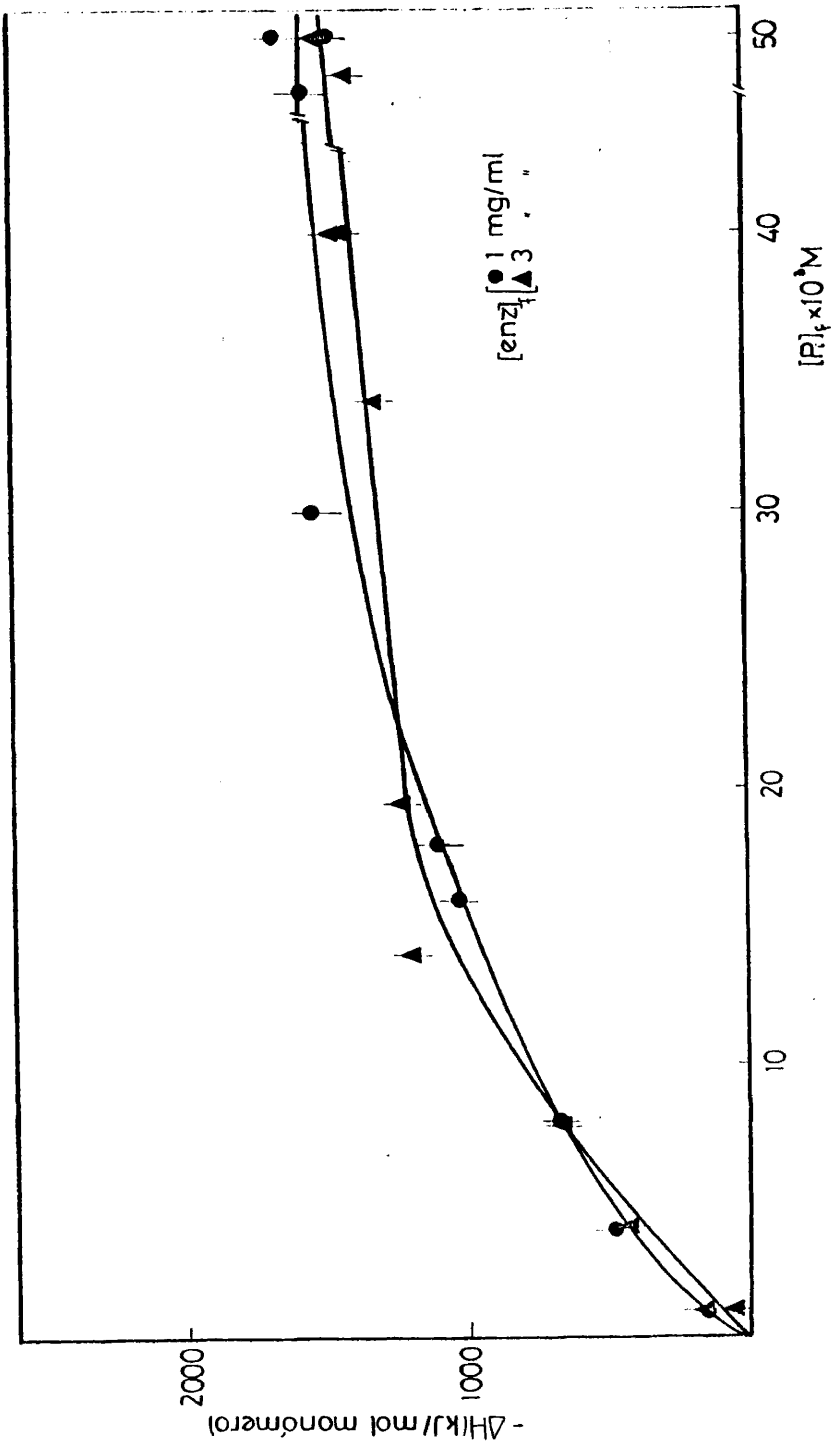


FIGURA 16

FIGURA 17.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 19°C.

19°C

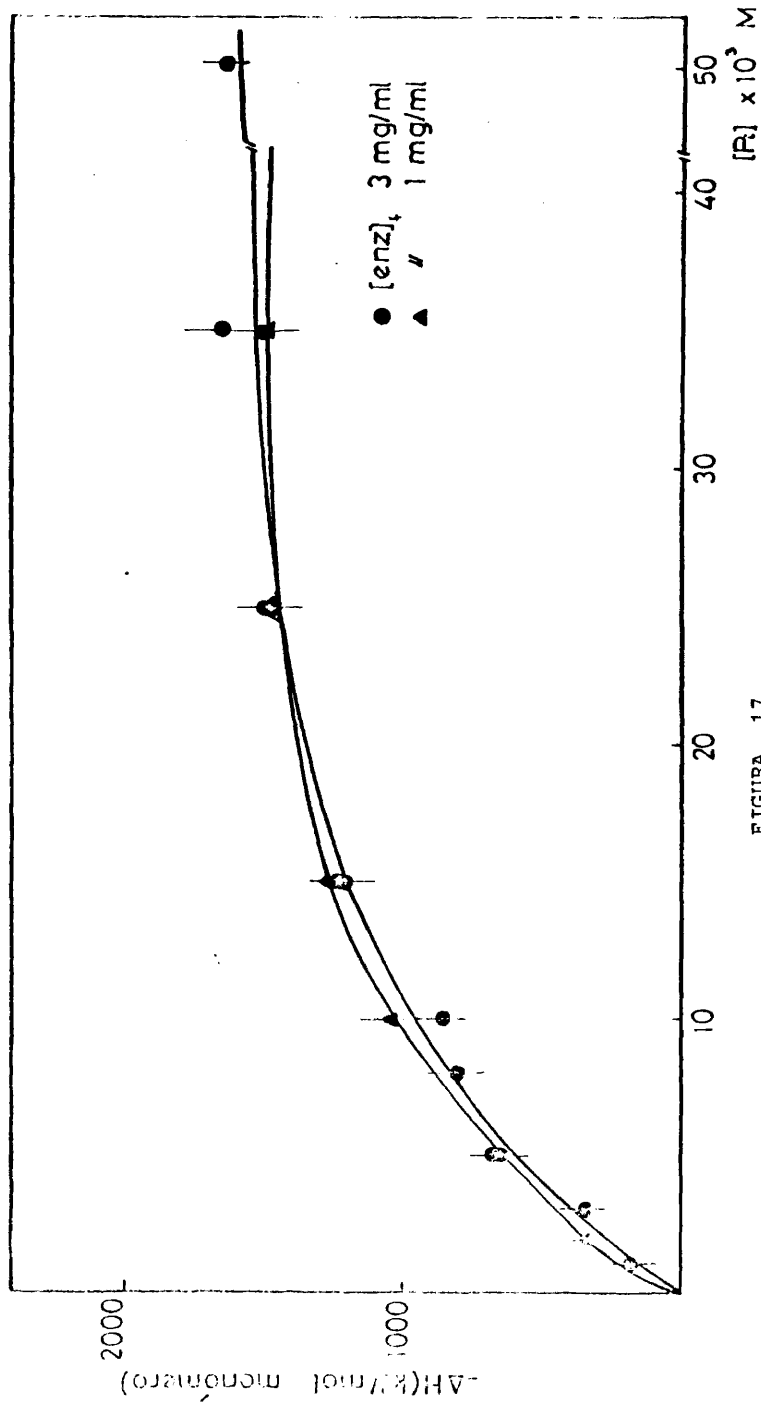


FIGURA 17

FIGURA 18.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 21°C.

21°C

102

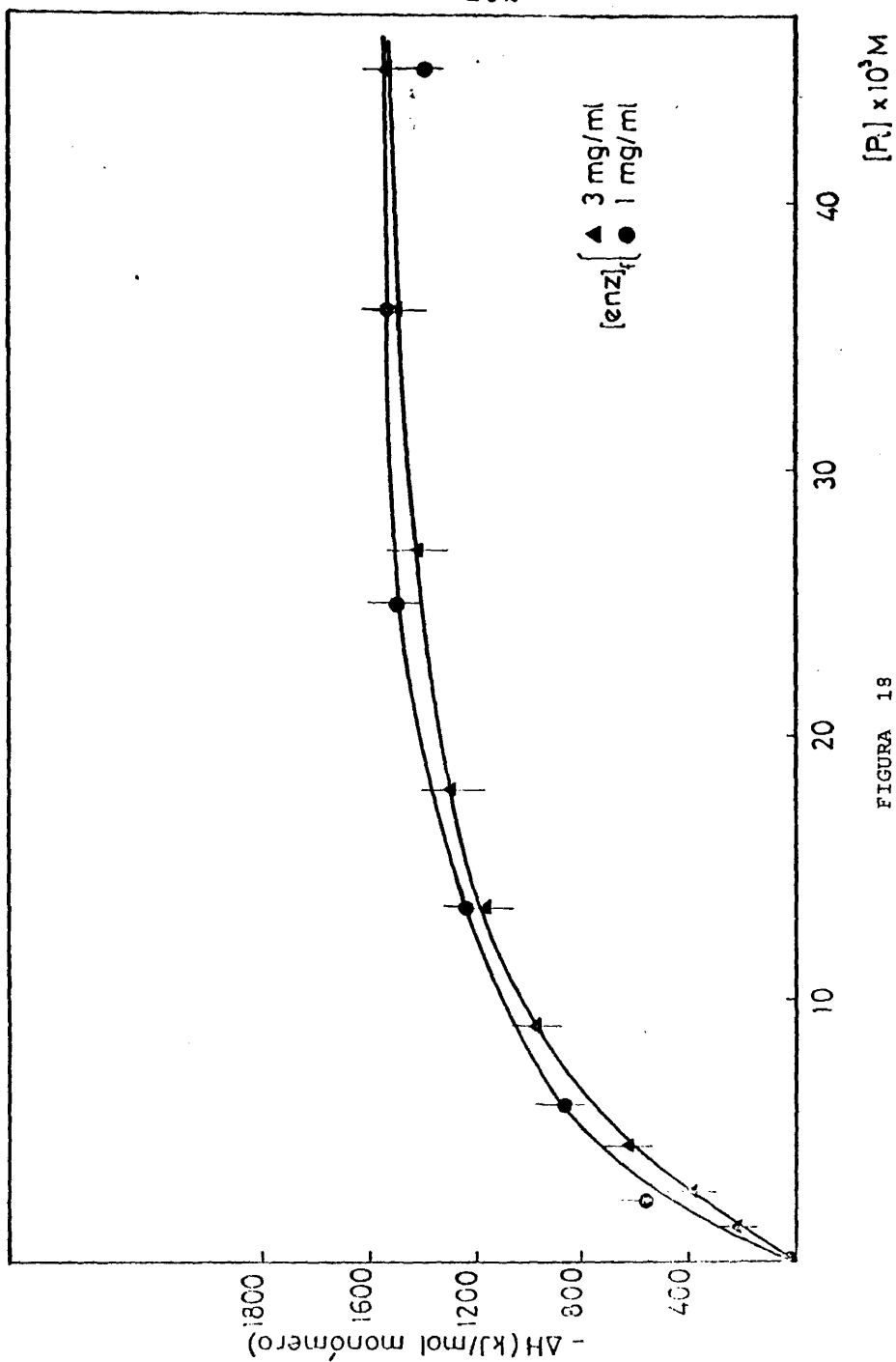


FIGURA 18

FIGURA 19.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 23°C.

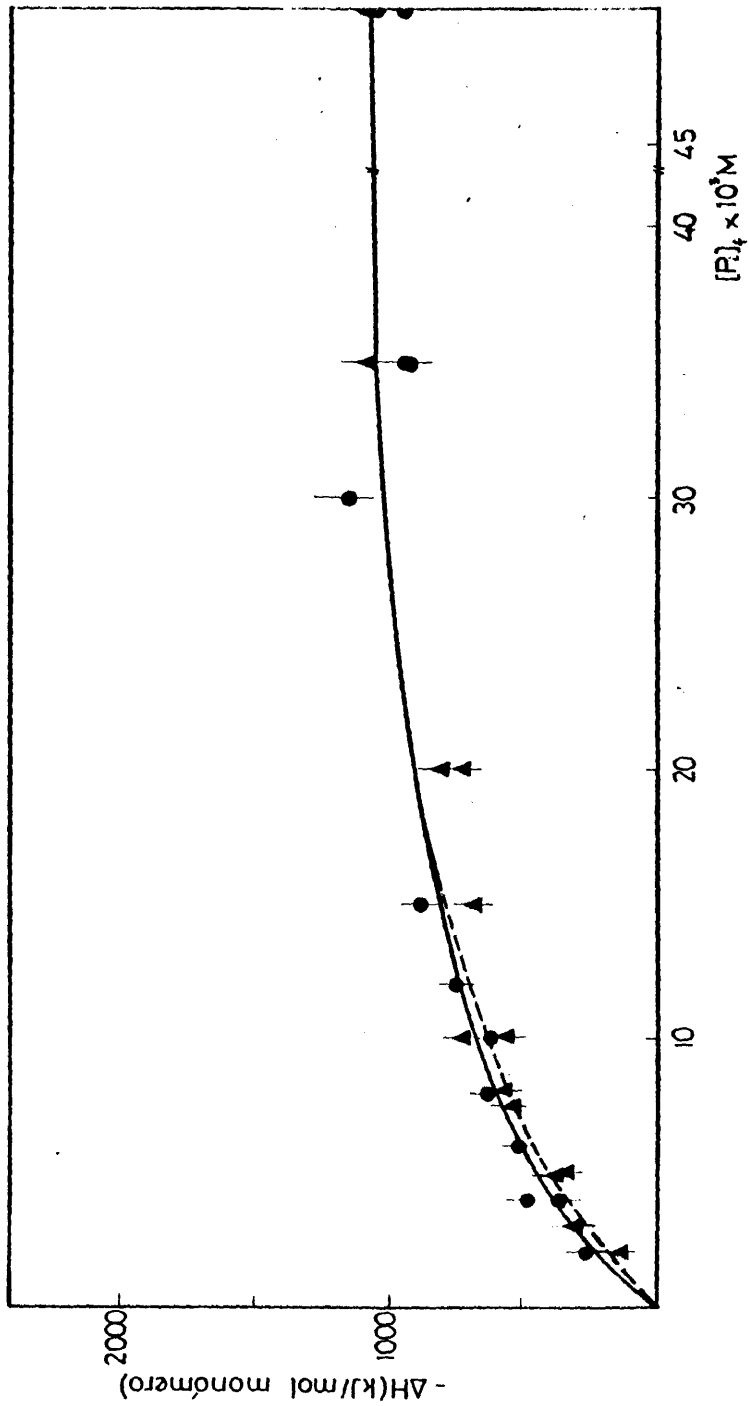


FIGURA 19

FIGURA 20.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 25°C.
- o - en presencia de Adenina 2 mM. - ● - en ausencia
de Adenina.

25°C

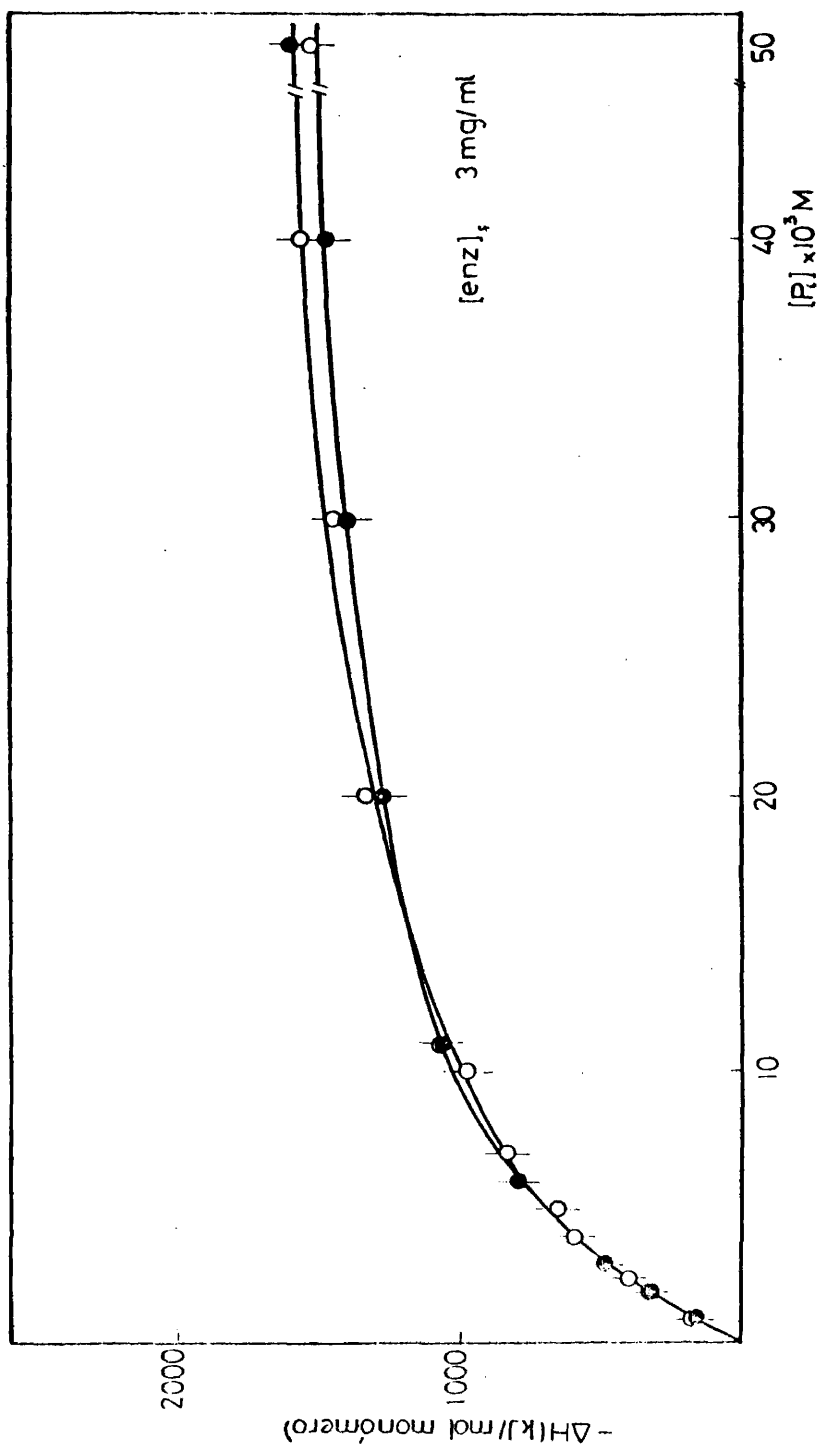


FIGURA 20

FIGURA 21.- Entalpía de interacción fosforilasa b - Fosfato a 25°C.
- o - en presencia de Adenina 2 mM. - ● - en ausencia de Adenina.

25°C

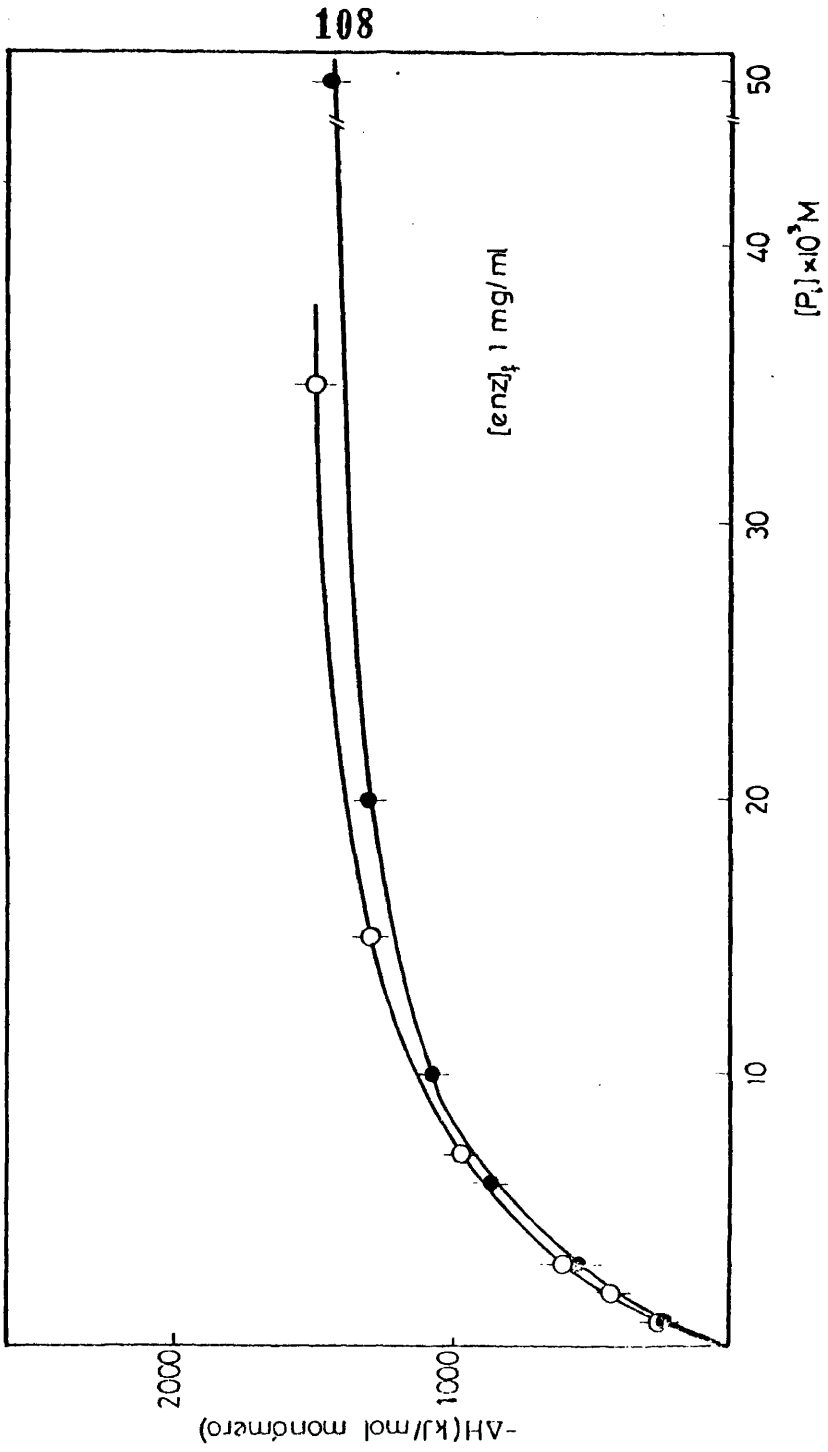


FIGURA 21

30°C

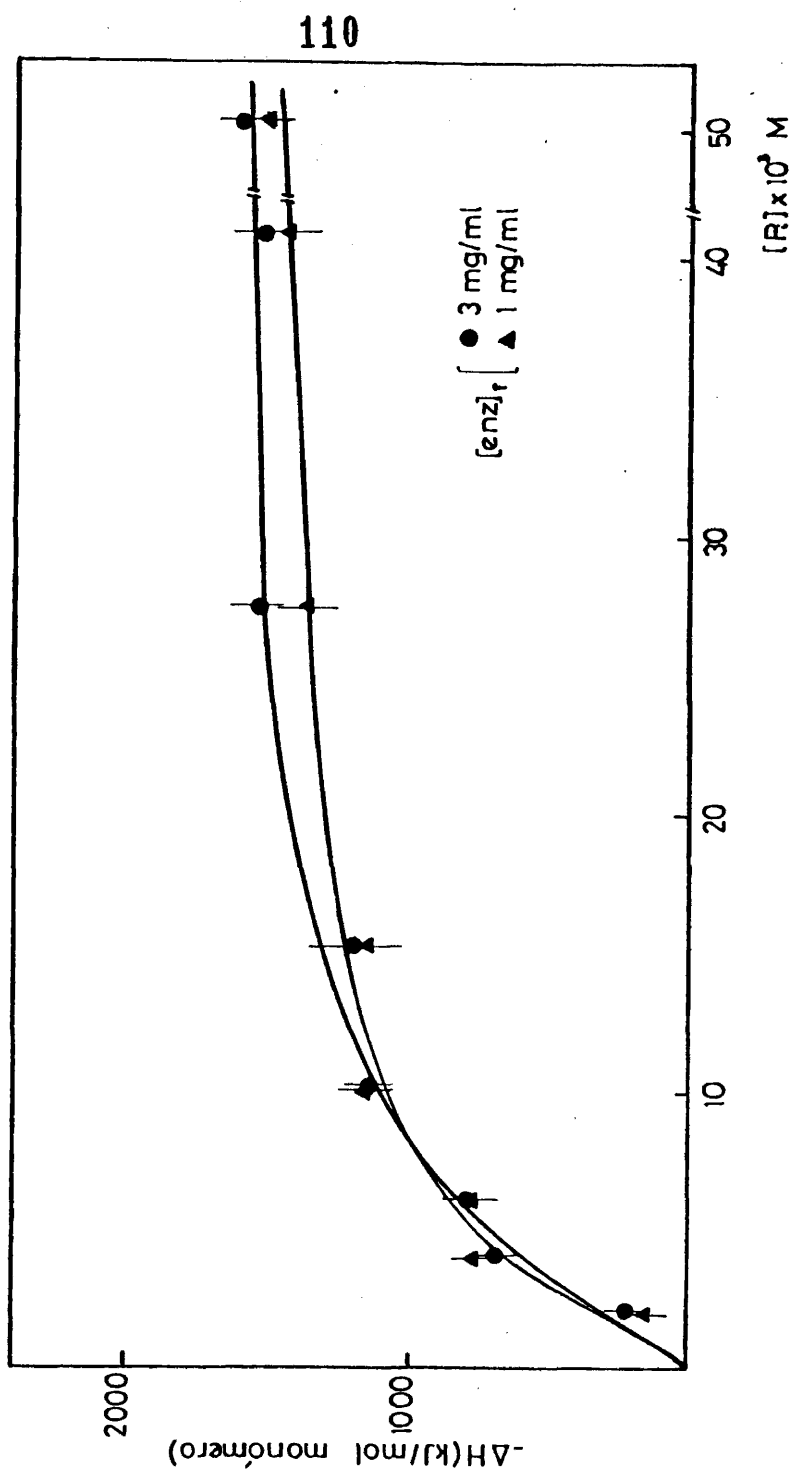


FIGURA 22

FIGURA 23.- Variación de la entalpía de interacción fosforilasa b - Fosfato, a saturación de sustrato, en función de la temperatura. Enzima : - o - 1 mg/ml; - ▲ - 3 mg/ml.



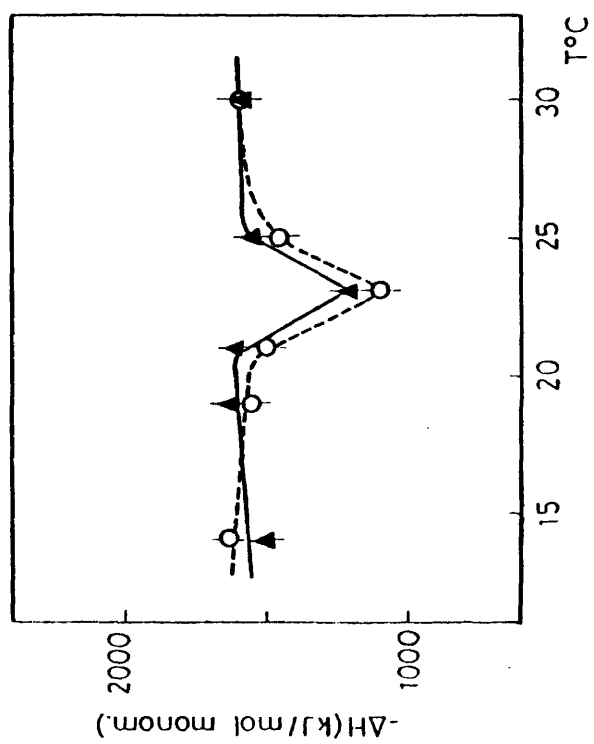


FIGURA 23

FIGURA 24.- Entalpía de interacción fosforilasa b - (5'-fosforamidato de Adenosina) a 25°C.

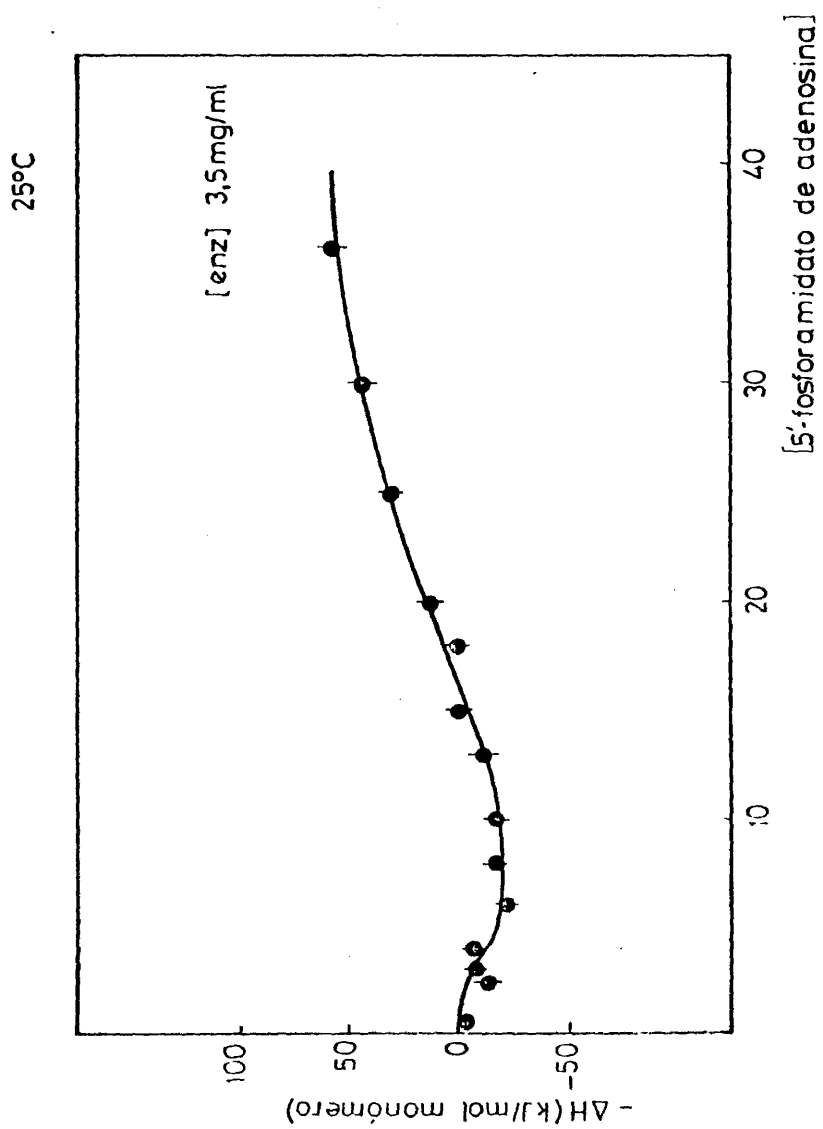


FIGURA 24

-NH₂. Hay dos hechos a destacar, el primero es el descenso en la afinidad del análogo de AMP hacia la enzima, ya indicado por Okazaki y col (28), a partir de experimentos cinéticos, ratificando así la importancia del papel desempeñado por el fosfato en la unión del nucleótido a su primera clase de sitios de unión y el segundo es, que la sustitución de un grupo protonable, ionizado en las condiciones de pH del medio de reacción, por un grupo amino, produce un importante descenso en la entalpía de interacción, tanto para la fijación a la primera clase de sitios de unión del activador, donde el proceso se hace endotérmico, como para la fijación a los sitios de menor afinidad, con respecto a los valores obtenidos para el AMP.

La entalpía de interacción fosforilasa-fosfato presenta valores muy próximos a 1,0 y 3,0 mg/ml, siendo el proceso de unión ligeramente más cooperativo a las concentraciones más bajas de enzima.

El hecho de observar una misma entalpía de interacción a ambas concentraciones de enzima, no significa que la transición conformacional dependiente de la concentración, no exista en presencia del sustrato; los valores obtenidos por Pocovi (9) para la viscosidad intrínseca de la enzima en presencia de P_i 20 mM, son idénticos a los obtenidos para la enzima sola (10). Este resultado, nos permite concluir un hecho y es la no necesaria correspondencia entre cambios conformacionales globales de la proteína, reflejados por ejemplo en su viscosidad intrínseca y cambios en zonas muy localizadas de la misma, que pueden permanecer invariantes a pesar de la existencia de cambios estructurales profundos.

En la TABLA III se encuentran recogidos los valores de las constantes de disociación del fosfato, calculadas mediante la ecuación de Hill.

T A B L A III

VARIACION DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION DEL P_i EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

T °C	[Enzima] 3,0 mg/ml K _d x 10 ³ M	[Enzima] 1,0 mg/ml K _d x 10 ³ M
14,0	9,3 ± 0,3	9,1 ± 0,2
19,0	7,1 ± 0,3	5,2 ± 0,4
21,0	6,2 ± 0,3	4,3 ± 0,2
23,0	8,3 ± 0,3	6,1 ± 0,3
25,0	5,7 ± 0,2	4,6 ± 0,2
30,0	5,6 ± 0,2	5,1 ± 0,2

III. 2 d.- EFEECTO DEL pH SOBRE LA INTERACCION FOSFORILASA b-AMP Y FOSFORILASA b - FOSFATO

Los resultados hasta ahora expuestos, se realizaron manteniendo el pH en 6,9 a 25°C; el tampón glicil-glicina tiene un coeficiente de variación del pH con la temperatura de -0.03 unidades de pH / °C, teniendo en cuenta estos datos, los experimentos en función de la temperatura han sido realizados en un intervalo de pH que va desde 6,75 a 30°C hasta 7,23 a 14°C.

Los valores de las entalpías de interacción enzima-ligando son por tanto una función doble de la temperatura y el pH. Un análisis mas profundo de los datos presentados hace necesario separar ambas contribuciones, para ello se han llevado a cabo experimentos calorimétricos y de sedimentación a 25°C y a pH 6,66 y 7,23, cubriendo todo el intervalo de variación de pH asociado al intervalo de temperaturas comprendido desde 14°C hasta 30°C.

En las figuras 25 y 26 se encuentran representados los resultados obtenidos para la unión de AMP a la enzima a pH 7,23 y 6,66 respectivamente.

El análisis comparativo de los resultados obtenidos en función del pH muestra un descenso de la entalpía de interacción asociada a cada una de las dos clases de sitios de unión, al variar el pH por encima o por debajo de 6,9 y un acercamiento entre los datos obtenidos a concentraciones de 1,0 y 3,0 mg/ml de enzima, (figura 27).

El descenso del pH a 6,66, muy próximo al de máxima actividad (14), produce un incremento considerable de la afinidad del AMP hacia sus clases de sitios de unión, de forma que a 1,0 mM de AMP se encuentran saturados practicamente dos sitios por monómero.

FIGURA 25.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP a 25°C y
pH 7,23.

25°C

119

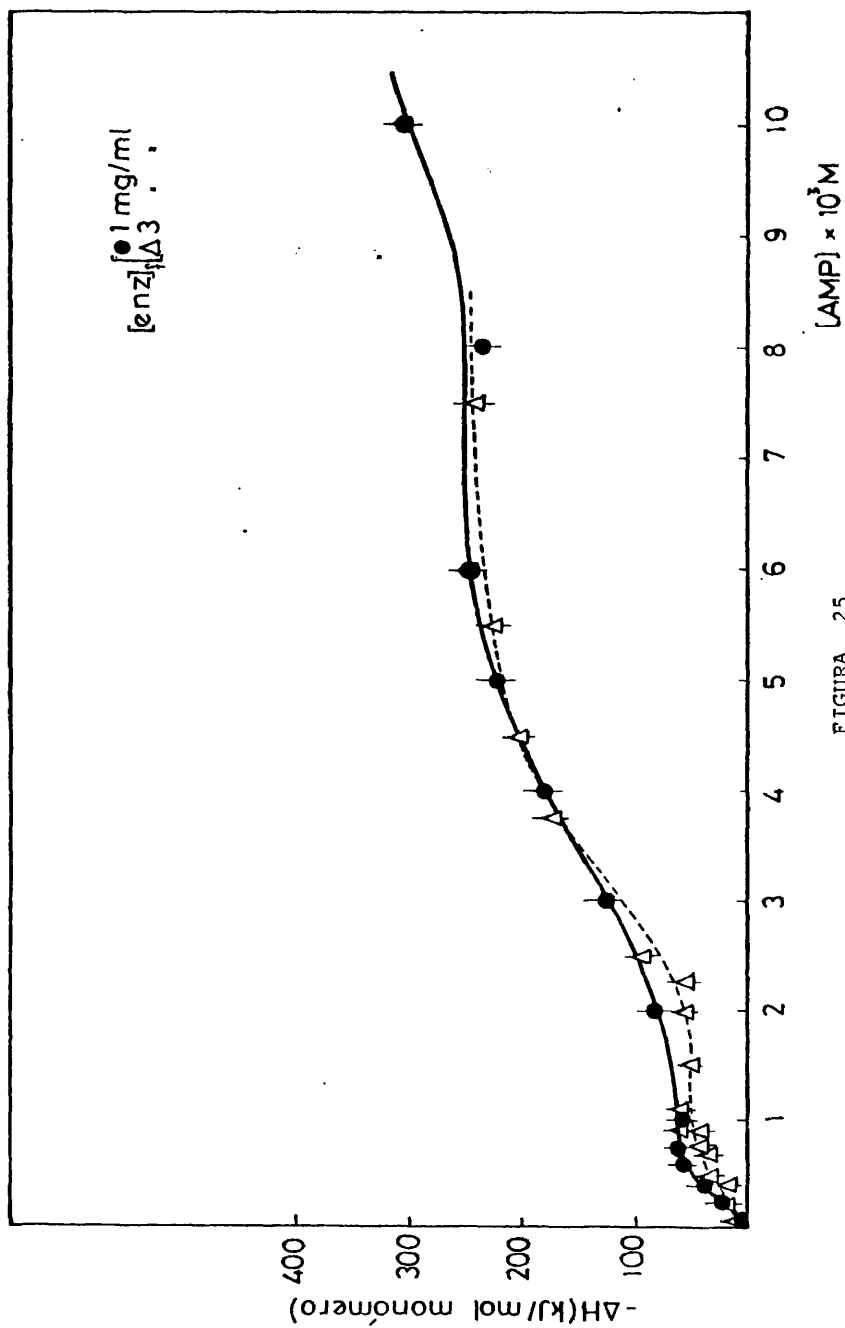


FIGURA 25

FIGURA 26.- Entalpfa de interacci3n fosforilasa b - AMP a 25°C y pH 6,66. Recuadro: Escala ampliada de los datos anteriores para la primera y segunda clase de sitios de uni3n.

25°C

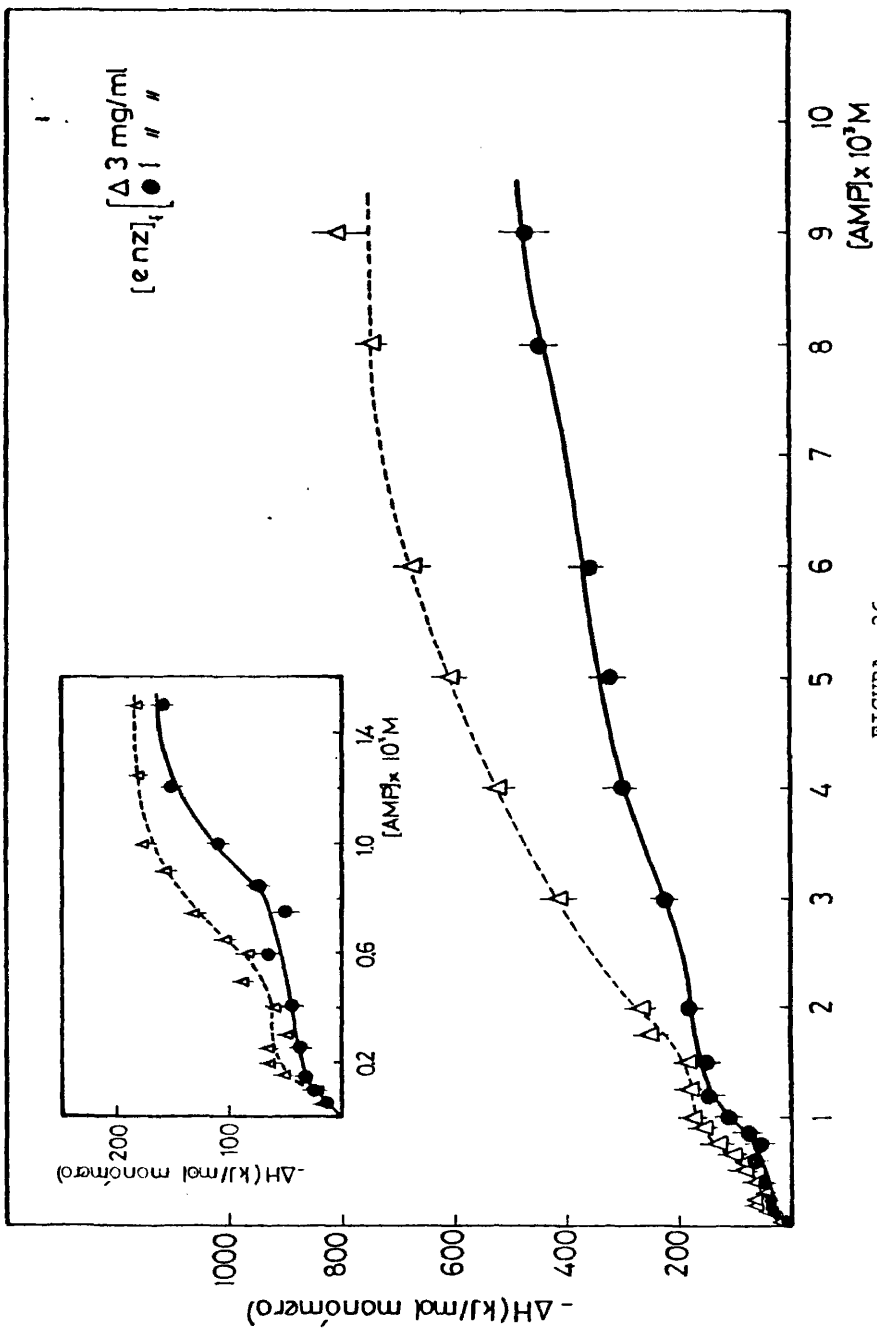


FIGURA 26

FIGURA 27.- Variación de la entalpía de interacción fosforilasa b - AMP en función del pH. En el recuadro superior se han re presentado los resultados obtenidos para la saturación de los sitios de mayor afinidad; -●- [Enzima] 1mg/ml; -▲- [Enzima] 3mg/ml. En el recuadro inferior se han re presentado los mismo datos pero para los sitios de débil afinidad; -○- [Enzima] 1mg/ml; -△- [Enzima] 3mg/ml.

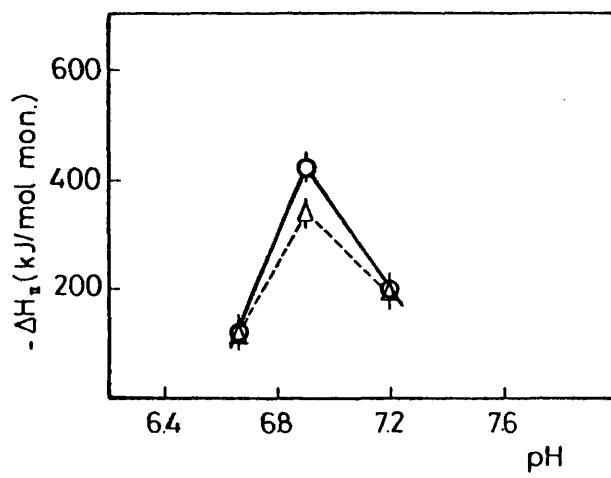
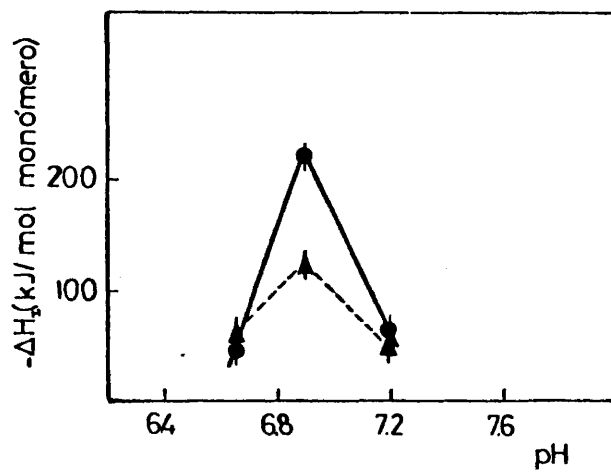


FIGURA 27

Otro hecho interesante, en estas condiciones de pH, es la aparición de una tercera región de saturación para AMP en la enzima, a concentraciones de nucleótido superiores a 2 mM.

En la TABLA IV se encuentran recogidos los valores experimentales obtenidos para las constantes de disociación aparentes del AMP a los tres pHs estudiados.

Los niveles de agregación inducidos por la unión del ligando a saturación de cada una de sus clases de sitios de unión, son también dependientes del pH, (figura 30), siendo menores a medida que el pH se hace mas alcalino.

La constante de velocidad del equilibrio dímero \rightleftharpoons tetrámero es dependiente del pH; mientras que a pH 6,9 y T=25°C, a saturación de los sitios de mayor afinidad, se obtenian diagramas de Schlieren asimétricos, a pH 6,66 y 7,2, a 60.000 r.p.m., aparecen dos picos con coeficientes de sedimentación de $8,2 \pm 0,2$ S y $12 \pm 0,2$ S. A saturación de la segunda clase de sitios de unión de AMP aparecen dos picos con coeficientes de sedimentación de $8,8 \pm 0,1$ y $12 \pm 0,2$ S.

En presencia de AMP 8 mM, a pH 6,66 se produce un incremento de la población del tetrámero del 8% con respecto del obtenido a saturación de dos sitios de unión por monómero.

El efecto del pH sobre la fijación de AMP puede tener lugar a través de una acción directa sobre el sitio de fijación del nucleótido o a través de un desplazamiento del equilibrio conformacional.

Los resultados calorimétricos obtenidos en el presente trabajo pueden justificarse basándonos en dos hipótesis diferentes, cada una de las cuales puede referirse a cada uno de los posibles modos de ac-

T A B L A IV

VARIACION DE LAS CONSTANTES DE DISOCIACION DE AMP
EN FUNCION DEL pH

[Enzima] 3,0 mg/ml			[Enzima] 1,0 mg/ml		
pH	$K_I \times 10^4$ M	$K_{II} \times 10^3$ M	pH	$K_I \times 10^4$ M	$K_{II} \times 10^3$ M
7,20	3,6 \pm 0,2	3,5 \pm 0,2	7,20	3,4 \pm 0,2	3,5 \pm 0,2
6,90	5,0 \pm 0,3	4,6 \pm 0,2	6,90	4,0 \pm 0,1	4,6 \pm 0,3
6,66	0,9 \pm 0,03	0,7 \pm 0,02	6,66	0,9 \pm 0,03	1,0 \pm 0,2

K_I y K_{II} son las constantes de disociación aparentes asociadas a la saturación de la primera y segunda clase de sitios de AMP en la enzima.

T A B L A V

VARIACION DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION DEL P_i EN
FUNCION DEL pH

[Enzima] 3,0 mg/ml		[Enzima] 1,0 mg/ml	
pH	K_d		K_d
7,20	5,7 \pm 0,2		7,0 \pm 0,3
6,90	5,7 \pm 0,2		4,6 \pm 0,2
6,66	5,5 \pm 0,3		5,5 \pm 0,3

ción del pH sobre la fijación de AMP indicados en el párrafo anterior.

1.- La fijación de AMP a la proteína depende o está relacionada con dos grupos ionizables, cuyos pKs han de ser inferior y superior a 6,9, de forma similar a la variación de $V_{m\acute{a}x}$ con el pH a 30°C (14).

2.- La fijación del nucleótido modifica el pK de un grupo enzimático, próximo a 6,9, de tal manera que a pHs próximos, pero inferiores, al pK del grupo enzimático, la unión del nucleótido induce una ionización del mismo, hecho que podría manifestarse en un aumento de la entalpía de interacción y de la constante aparente de disociación; a medida que aumentase el pH, el nivel de ionización de dicho grupo, en ausencia de ligandos, aumenta, y el efecto asociado a la unión del activador alostérico iría disminuyendo.

Los resultados obtenidos por nosotros a 25°C difieren de los obtenidos por Morange (30) para la fijación de AMP a 4°C, por diálisis en el equilibrio, en función del pH. Según este autor, la constante de fijación de AMP a su primera clase de sitios de unión y la cooperatividad del proceso es tanto mayor cuanto más alcalino es el pH. El análisis comparativo de los resultados obtenidos en función del pH y del efecto del marcaje de histidinas a 22°C (30), le lleva a postular que el efecto del pH se debe a un desplazamiento del equilibrio conformacional de la enzima y que una histidina del sitio de unión del nucleótido podría ser responsable o fundamental para la transmisión de los cambios conformacionales en la molécula.

Por otro lado, la discrepancia entre sus datos y los nuestros obtenidos a 25°C, hacen plantearse la validez de la extrapolación real

zada con respecto al marcaje de histidinas a 22°C, ignorando el efecto que la transición conformacional que la fosforilasa b experimenta con la temperatura puede tener sobre la fijación de AMP y el marcaje de histidinas.

Según el esquema conformacional propuesto por Buc y col (17), a pH 6,9 y 25°C, la conformación enzimática mas estable sería el estado E_1 ; un desplazamiento hacia pH ácidos puede producir una estabilización de la forma E_3 , fundamentalmente en presencia de AMP, lo que supondría un descenso en la constante transconformacional con el pH y un aumento de la afinidad aparente del AMP, al unirse al estado E_3 , el de mayor afinidad hacia el nucleótido, de acuerdo con nuestros resultados experimentales. Por otro lado, este hecho estaría de acuerdo con el mayor % de tetrámero, a saturación de la primera clase de sitios de unión, a pH 6,66.

El equilibrio de ionización de la enzima $E_3H_2 \rightleftharpoons E_3H^- \rightleftharpoons E_3^-$ tiene un pK de 6,52, con lo que a pH 6,66, el desplazamiento del equilibrio conformacional hacia E_3 , por unión de AMP, llevaría asociado la estabilización de las formas ionizadas del estado E_3 .

A pH básicos se produciría, en ausencia de ligandos, una estabilización del estado E_1 y de sus formas protonadas, tanto mayor cuanto mas alcalino sea el pH (17). Con respecto a nuestros resultados, este hecho, supondría que la unión de AMP sería menos cooperativa, ya que el desplazamiento del equilibrio conformacional hacia E_3 estaría menos favorecido, un descenso en la formación del tetrámero y menor afinidad hacia AMP, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados experimentales.

La saturación por el fosfato de sus sitios de unión, a pH 7,2

y 6,66 (figuras 28 y 29) no presenta apenas cooperatividad, existiendo un importante descenso en la entalpía de interacción, a saturación, a pH 7,2. En medios alcalinos, el comportamiento se hace mas dependiente de la concentración de enzima. La constante de fijación del fosfato a 3,0 mg/ml de enzima, permanece invariante en todo el intervalo de pH, mientras que a 1,0 mg/ml es altamente dependiente del pH, siendo tanto menor la afinidad cuanto mas alcalino es el medio de reacción, TABLA V.

El comportamiento de la constante de disociación del fosfato en función del pH es contrario al que podría esperarse, a partir de los datos publicados por Kasvinski y col (14) a 30°C; según estos autores, a esta temperatura la K_{p_i} depende unicamente del pK del segundo grupo ionizable del sustrato, cuyo valor es 6,56, por lo que la constante de disociación varía muy poco dentro de este intervalo de pH y aumenta a pHs ácidos. Estos resultados concuerdan mejor con los obtenidos por nosotros a una concentración de enzima de 3,0 mg/ml, sin embargo no hay que olvidar, que los resultados obtenidos por Kasvinski y col. corresponden a la unión del sustrato en presencia de AMP y glucógeno quienes pueden haber modificado la unión del fosfato (31-33).

Si consideramos conjuntamente el efecto que el pH ejerce sobre la entalpía de interacción enzima-fosfato y sobre las constantes de fijación, tenemos:

- 1.- A 3,0 mg/ml, la entalpía de interacción desciende desde valores de -1600 kJ/mol de monómero a -800 kJ/mol de monómero, al pasar de pH 6,9 a 7,2, sin observar apenas cambio en la constante de afinidad.
- 2.- A 1,0 mg/ml se produce un aumento de la constante de disociación del complejo enzima-fosfato al pasar de pH 6,9 a 7,2, co

FIGURA 28.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 25°C y
pH 7,23.

25°C

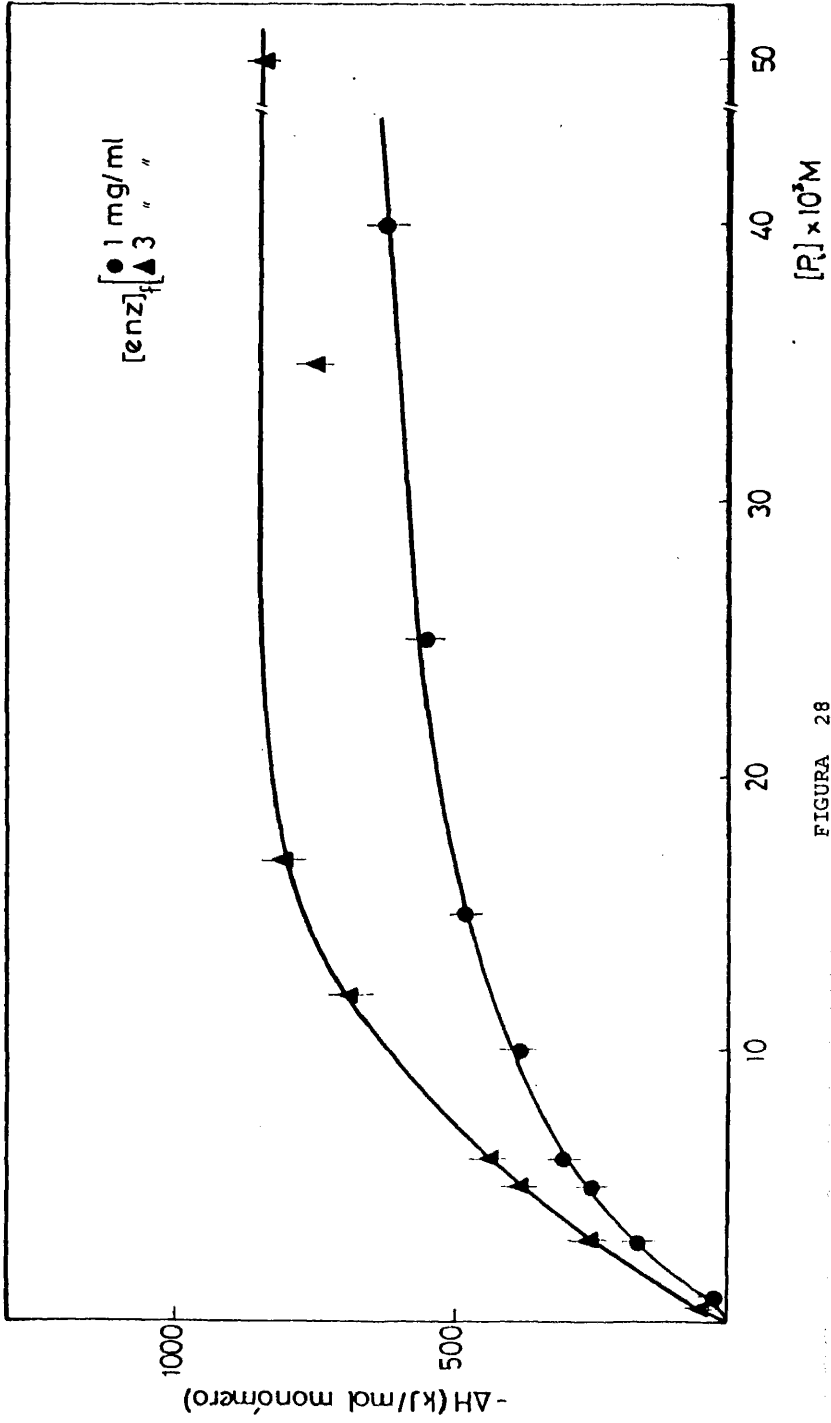


FIGURA 28

FIGURA 29.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 25°C
y pH 6,66.

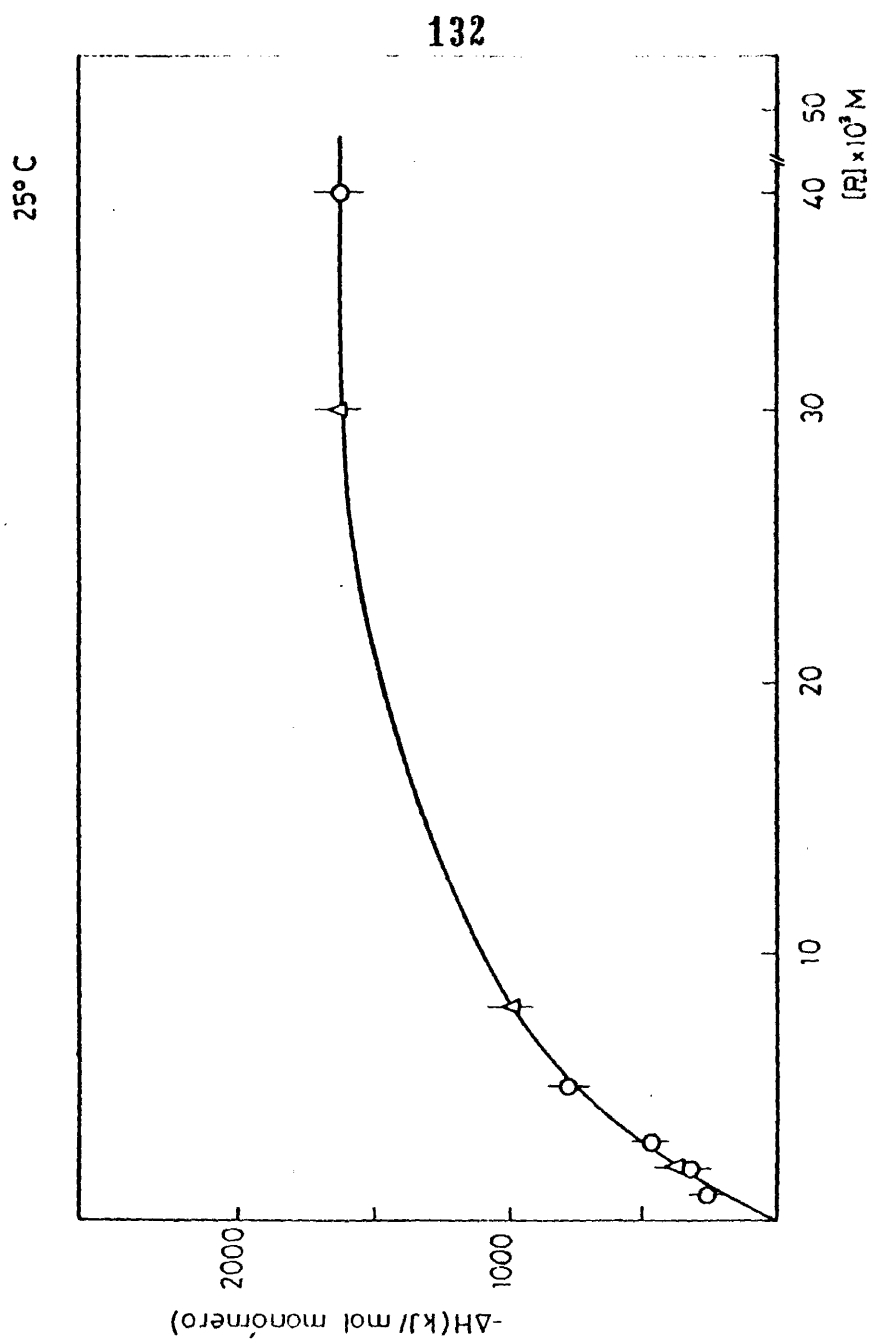


FIGURA 29

un descenso en la entalpía de interacción, sobre la obtenida a 3,0 mg/ml de -200 kJ/mol de monómero.

En base a estos datos habría que pensar en la existencia de dos efectos al variar el pH, un primer efecto que hace descender la entalpía de interacción desde -1600 a -800 kJ/mol monómero y que no se manifiesta en ninguna variación sobre la constante de disociación aparente, aunque si podrían existir variaciones en las constantes de los procesos asociados a la unión del ligando y un segundo efecto que se manifestaría únicamente a bajas concentraciones de enzima, al que iría asociado un aumento de la constante de disociación aparente del P_i y un descenso en la entalpía de interacción de -200 kJ/mol de monómero.

Un análisis comparativo de nuestros resultados y el esquema conformacional propuesto por Buc y col (17) permitiría justificar los datos a 3,0 mg/ml como el efecto del pH sobre los equilibrios conformacionales de la enzima. A temperaturas altas, el estado E_3 (17), estabilizado por la unión de los sustratos se encuentra muy desfavorecido, pero sería estabilizado ligeramente a pHs ácidos. Si consideramos los efectos contrarios que el pH ejercería sobre L_0 y sobre la constante de ionización del segundo grupo ácido del fosfato, podríamos justificar la existencia de cambios en la interacción enzima-sustrato sin encontrar una variación paralela en la constante de afinidad aparente del sustrato, si el descenso en L_0 en medios ácidos se compensara con el aumento de K_{p_i} debido a la protonación del sustrato.

Más difícil de explicar es el comportamiento en función del pH a 1,0 mg/ml; en estas condiciones se presentan dos posibilidades:

a.- que el desplazamiento entre los diferentes estados conformacionales de la enzima sea diferente del que se produce

a concentraciones superiores de enzima.

b.- que a bajas concentraciones de fosforilasa b el sitio catalítico sea mas accesible al medio, permitiendo mayores variaciones en su entorno por efecto del pH; esta segunda hipótesis podría verse apoyada por parte de los resultados experimentales expuestos mas adelante y por el hecho de que la conformación enzimática a bajas concentraciones de enzima parece presentar una estructura menos compacta, lo cual podría suponer una mayor permeabilidad al disolvente.

La representación conjunta de los datos obtenidos a temperatura variable para AMP y fosfato, a sus respectivos pHs y los datos obtenidos a pH variable a 25°C, (figuras 30-32), nos llevan a formular la siguiente hipótesis con respecto a los datos a temperatura variable.

Según los resultados expuestos en las figuras 30 a 32, las variaciones con la temperatura de la interacción entre la enzima y AMP o fosfato, entre 23 y 30°C, podrían corresponder mas al efecto de la variación de pH del medio, asociado a este incremento de la temperatura, que a un efecto directo de la misma sobre la estructura enzimática. Por debajo de 23°C el efecto de la temperatura sería predominante sobre el efecto de pH, apesar del efecto que la variación de este pueda tener sobre los resultados experimentales.

A 15°C la fijación del fosfato induce en el pK de un grupo enzimático, probablemente una histidina (14) una variación desde 6,6 a 7,35. el pH del tampón glicilglicina utilizado es 7,23 a 14°C, en estas condiciones el grupo enzimático con pK 6,6 se encontrará practicamente ionizado, por lo que la saturación por el fosfato de sus sitios de unión puede llevar asociada la protonación de la histidina, efecto que no se

FIGURA 30.- Variación del % de tetrámero en función del pH , a saturación de la primera (- \blacktriangle -) y segunda clase de sitios de unión (- \blacksquare -) para AMP. Los símbolos vacíos corresponden a los experimentos realizados a temperatura variable y los rellenos a los realizados a 25°C y pH variable. [Enzima] 3,0 mg/ml.

FIGURA 31.- Variación de la entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato en función del pH a 3,0 mg/ml (- \blacktriangle -, - Δ -) y (- \bullet -, - \circ -) 1 mg/ml de enzima. Los símbolos vacíos corresponden a los experimentos realizados a temperatura variable y los rellenos a los realizados a 25°C y pH variable.

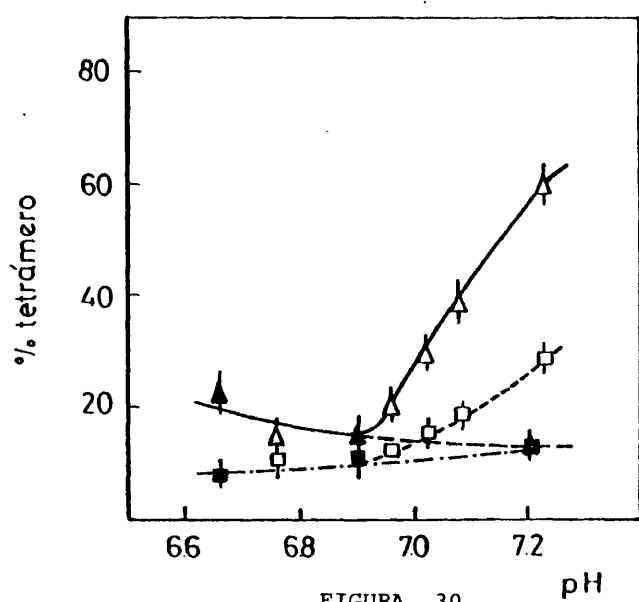


FIGURA 30

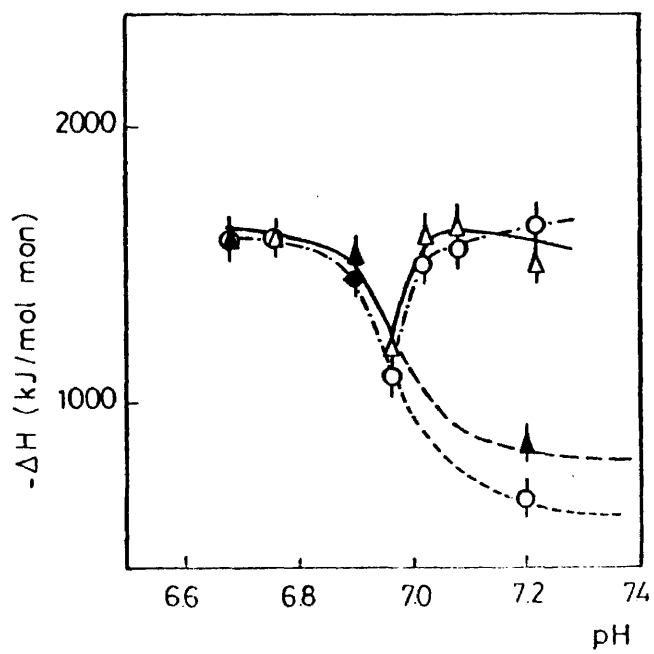


FIGURA 31

FIGUFA 32.- Variación de la entalpía de interacción fosforilasa b - AMP en función del pH, a saturación de la primera y segunda clase de sitios de unión, A y B respectivamente. (-Δ-, -▲-) [Enzima] 3,0 mg/ml; (-o-, -●-) [Enzima] 1,0 mg/ml. Los símbolos vacíos o rellenos tienen el mismo significado que en las figuras 30 y 31.

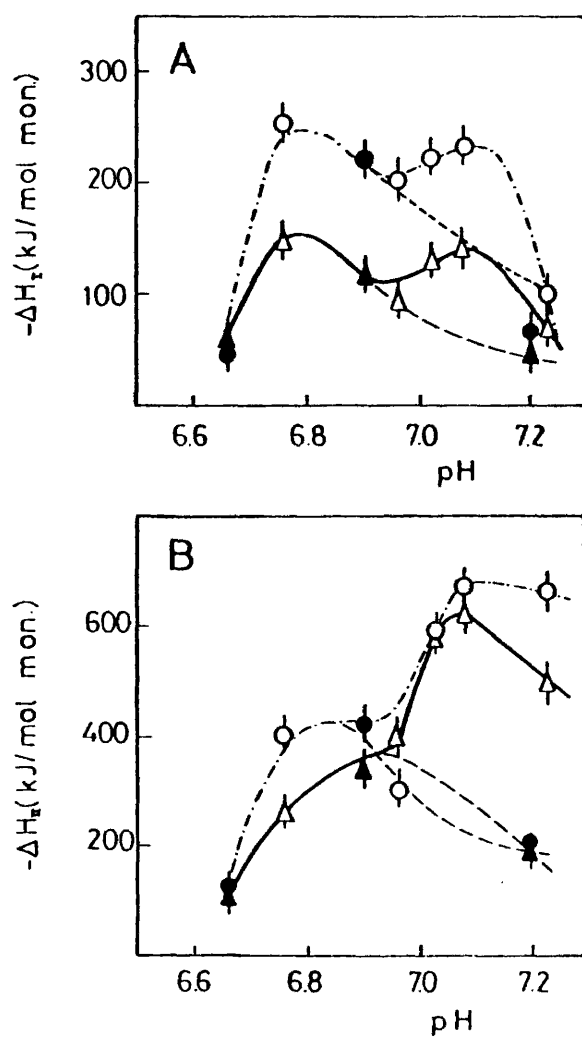


FIGURA 32

produciría a altas temperaturas donde el pK 7,03 permanece invariable aun en presencia del sustrato.

Los valores calculados para las constantes de disociación aparentes del fosfato son del orden de los determinados por Helmerich y col (31), por medios cinéticos y del obtenido por Radda y col a $22^{\circ}C$ para la fijación del sustrato, utilizando como detector de la unión un marcador de $spín$ (34).

Establecer un estudio comparativo de los valores obtenidos para la constante de fijación de AMP y la constante de tetramerización, en función de la temperatura, con los datos de otros autores (16,24,34,35) es bastante difícil por la gran dependencia que presenta la fijación del ligando y los equilibrios conformacionales de la enzima con respecto a la composición, pH y fuerza iónica del tampón utilizado (16,34-36).

El análisis de los datos obtenidos para la interacción AMP-enzima y fosfato-enzima en función de la temperatura, desde el punto de vista de los diferentes estados conformacionales que presenta la fosforilasa b , parece ajustarse bastante aceptablemente al esquema propuesto por Buc y col (17).

A temperaturas superiores a $23-25^{\circ}C$ el estado mas favorecido sería el E_1H_2 , pudiendo estabilizarse parcialmente el E_3 a pH ácido y en presencia de sustratos o AMP. Por debajo de $23^{\circ}C$ aumenta la población del estado E_2 y a temperaturas inferiores a $21-20^{\circ}C$ comienza a estabilizarse el estado E_3 , sobre todo en presencia de sustratos y AMP.

Dado que, según los datos de Buc y col (17,35) el estado E_2 presenta una afinidad muy baja hacia AMP, prácticamente hay unión exclusiva a E_3 a bajas temperaturas, para justificar los datos de las constantes de fijación aparente de AMP, obtenidos experimentalmente, habría -

que admitir una constante transconformacional L_0 entre los estados E_2 y E_3 inferior a la del equilibrio $\Sigma E_1 \rightleftharpoons E_3$, ya que la fijación aparente de AMP a la enzima entre 23 y 20°C es mejor que a temperaturas superiores a 23°C; este hecho puede estar de acuerdo con el comportamiento encontrado, como veremos mas adelante, para L_0 en función de la temperatura por medios cinéticos.

La estabilización del estado E_3 a bajas temperaturas, en presencia de AMP, está de acuerdo con el incremento de la población del tetrámero que se produce en presencia del activador alostérico al descender la temperatura desde 21°C hasta 12°C. Si a temperaturas intermedias (inferiores a 25°C y superiores a 20°C) los estados mas favorecidos en ausencia de ligandos son E_1 y E_2 , la unión de AMP debe estabilizar progresivamente el estado E_3 , considerando el incremento de los niveles de tetrámero observado desde temperaturas inferiores a 25°C en presencia de AMP (ver TABLA III). La estabilización de E_2 entre 25 y 21°C podrá estar relacionada con el aumento que se produce en el coeficiente de sedimentación de la enzima a saturación de AMP en el mismo intervalo de temperaturas (figura 14).

Podemos concluir por tanto en base a los resultados obtenidos la existencia de dos transiciones conformacionales por acción de la temperatura, centradas a 23°C y 20°C aproximadamente, entendidas como la estabilización preferente de diferentes niveles de cada población enzimática por acción de la temperatura.

El cambio producido en la estructura enzimática por acción de la temperatura afecta a los dos sitios de unión de AMP y al sitio catalítico, tanto a 3,0 como a 1,0 mg/ml, modificando la afinidad de los ligandos hacia la enzima y la entalpía de interacción asociada a la satu-

ración de los respectivos sitios de unión. Este hecho está de acuerdo con los resultados obtenidos por Madsen y col para la fosforilasa a mediante difracción de Rayos-X, los cuales indican la conexión a través de la cadena polipeptídica de todos los sitios reguladores de la enzima y el sitio catalítico (27).

Un análisis de los resultados obtenidos para la entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato en función de la temperatura, sin considerar el efecto debido a la variación de pH que lleva consigo, podrían hacernos pensar que el desplazamiento del equilibrio conformacional hacia los estados enzimáticos estabilizados a baja temperatura, no modifica la interacción con el sustrato, salvo a 23°C, desde un punto de vista calorimétrico, sin embargo, si consideramos el descenso en la variación de entalpía que se produce a los respectivos pHs de reacción (a temperaturas inferiores a 25°C), la transición conformacional dependiente de la temperatura puede suponer un incremento en la entalpía de interacción de -(800-1000) kJ/mol de monómero.

Según los datos calorimétricos obtenidos a 14°C para la fijación de AMP, a sus sitios de mayor afinidad, el sitio del activador y los cambios producidos por su fijación a la enzima parecen muy similares a 1,0 y 3,0 mg/ml, sin embargo los resultados de Palou (37) indican una gran diferencia en el nº de tirosinas y triptófanos modificados por la unión de AMP a 1,0 y 3,0 mg/ml a esa misma temperatura.

Con los datos hasta ahora presentados es difícil establecer diferencias entre los estados conformacionales estabilizados a 1,0 y 3,0 mg/ml, ajustándonos al esquema general de equilibrios conformacionales propuesto por Buc (17) para la fosforilasa b; de idéntica manera ocurre con los estados estabilizados a saturación de la primera y segunda clase

de sitios de unión para AMP; estudios realizados por diferentes autores (30,37,38) indican la existencia de cambios asociados a la saturación del sito de unión de menor afinidad como son la aparición de un espectro de diferencias en la zona del PLP (30,37) y variación en los niveles de agregación con respecto a los inducidos por la fijación de la primera molécula de AMP por monómero, este último efecto puede ejercerse por modificación de la constante del equilibrio $E_3 \rightleftharpoons 1/2 T_4$, lo cual podría suponer pequeñas modificaciones en la estructura general de la enzima con respecto a los estados estabilizados por la primera molécula de AMP aunque puedan producirse modificaciones locales relativamente importantes; es decir, que cada estado de la enzima correspondería más a un conjunto de microestados termodinámicamente próximos que a una estructura cuaternaria única (30).

III. 3.- ESTUDIO CINÉTICO DE LA ACTIVACION DE LA FOSFORILASA b POR AMP EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

El estudio del comportamiento cinético de la fosforilasa b, en presencia de AMP o IMP, realizado por Black y Wang (32) mostraba que el mecanismo de activación por acción de los nucleótidos tenía lugar en dos etapas, en la primera de ellas se producía un incremento de la eficiencia catalítica de la enzima y en la segunda un aumento de la afinidad de la enzima hacia los sustratos. Según estos autores, la fosforilasa b, en presencia de AMP, se comportaba como un sistema tipo K, V, mientras que la activación por IMP correspondía a la de un sistema tipo V exclusivamente.

Buc (33) encontraba sin embargo que el comportamiento catalítico en presencia de AMP, correspondía al de un sistema tipo K y que la variación de la constante de afinidad del sustrato hacia la fosforilasa b, por acción del activador, era la correspondiente a un proceso de ac-

tivación alostérico de transición entre dos estados (39). Por otro lado, Helmreich y col (16) encontraron desviaciones en el comportamiento cinético de la fosforilasa \underline{b} con respecto a la teoría de Monod, sobre todo para las concentraciones mas bajas de AMP utilizadas.

En el presente trabajo hemos estudiado el comportamiento cinético de la fosforilasa \underline{b} , a cinco temperaturas diferentes, 10,0; 14,8; 18,6; 21,4 y 25,0°C y a tres concentraciones de sustrato (P_i), 5×10^{-3} M, $10,7 \times 10^{-3}$ M y 24×10^{-3} M.

Los resultados obtenidos, figuras 33 a 37, muestran que la activación inducida por AMP es de tipo K, V, de acuerdo con los resultados previamente expuestos por Black y Wang (32).

Los parámetros termodinámicos asociados al proceso de activación de la enzima, TABLA VI, se calcularon mediante el procedimiento descrito previamente por Buc para sistemas alostéricos (33), utilizando la siguiente ecuación:

$$\left[\frac{V}{(V_{\text{máx}} - V)} \right]^{1/2} = \left(1/L_0 \right)^{1/2} \left(1 + \frac{[P_i]}{K_{P_i}} \right) \left(1 + \frac{[AMP]}{K_{AMP}} \right)$$

K_{P_i} \equiv constante de disociación del fosfato.

K_{AMP} \equiv constante de disociación del AMP.

$L_0 = \frac{T}{R}$ en ausencia de fosfato y AMP, a concentración constante de cualquier otro ligando.

V \equiv velocidad inicial a una concentración dada de AMP y fosfato.

$V_{\text{máx}}$ \equiv velocidad inicial máxima a saturación de AMP y fosfato.

Las representaciones de Van't Hoff para las constantes de di-

FIGURA 33.- Activación de la fosforilasa b por AMP a 10,0°C.

10°C

145

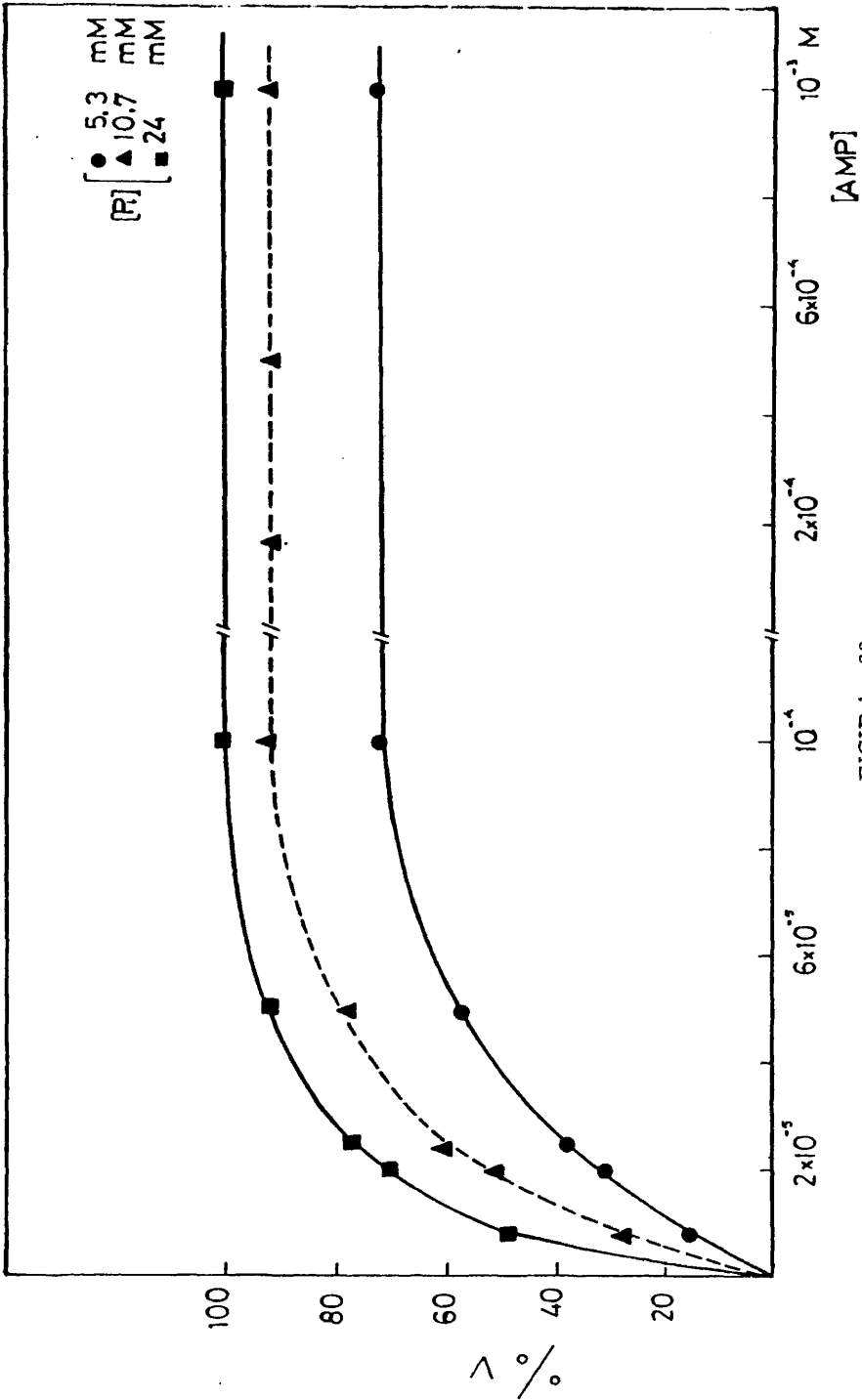


FIGURA 33

FIGURA 34.- Activación de la fosforilasa b por AMP a 14,8°C.

14.8°C

147

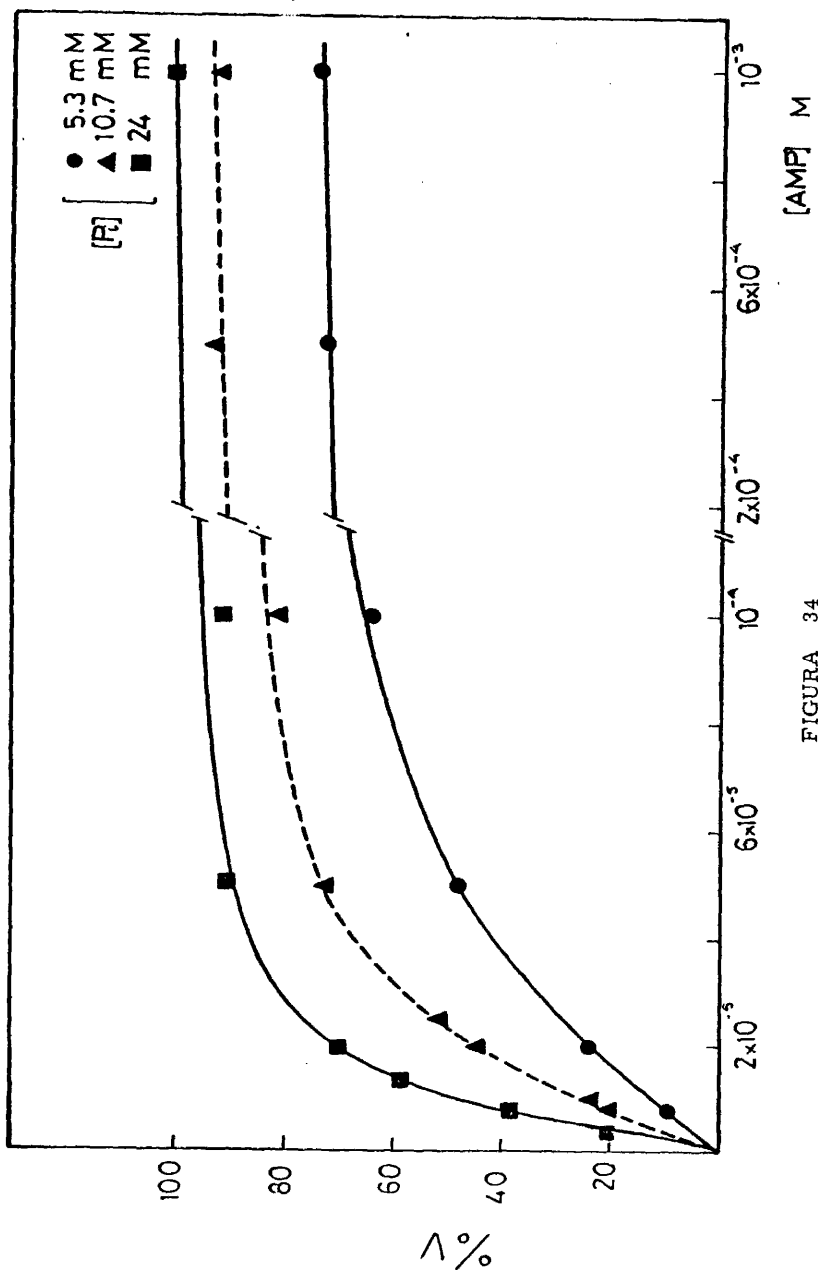


FIGURA 34

FIGURA 35.- Activación de la fosforilasa b por AMP a 18,6°C.

18.6°C

149

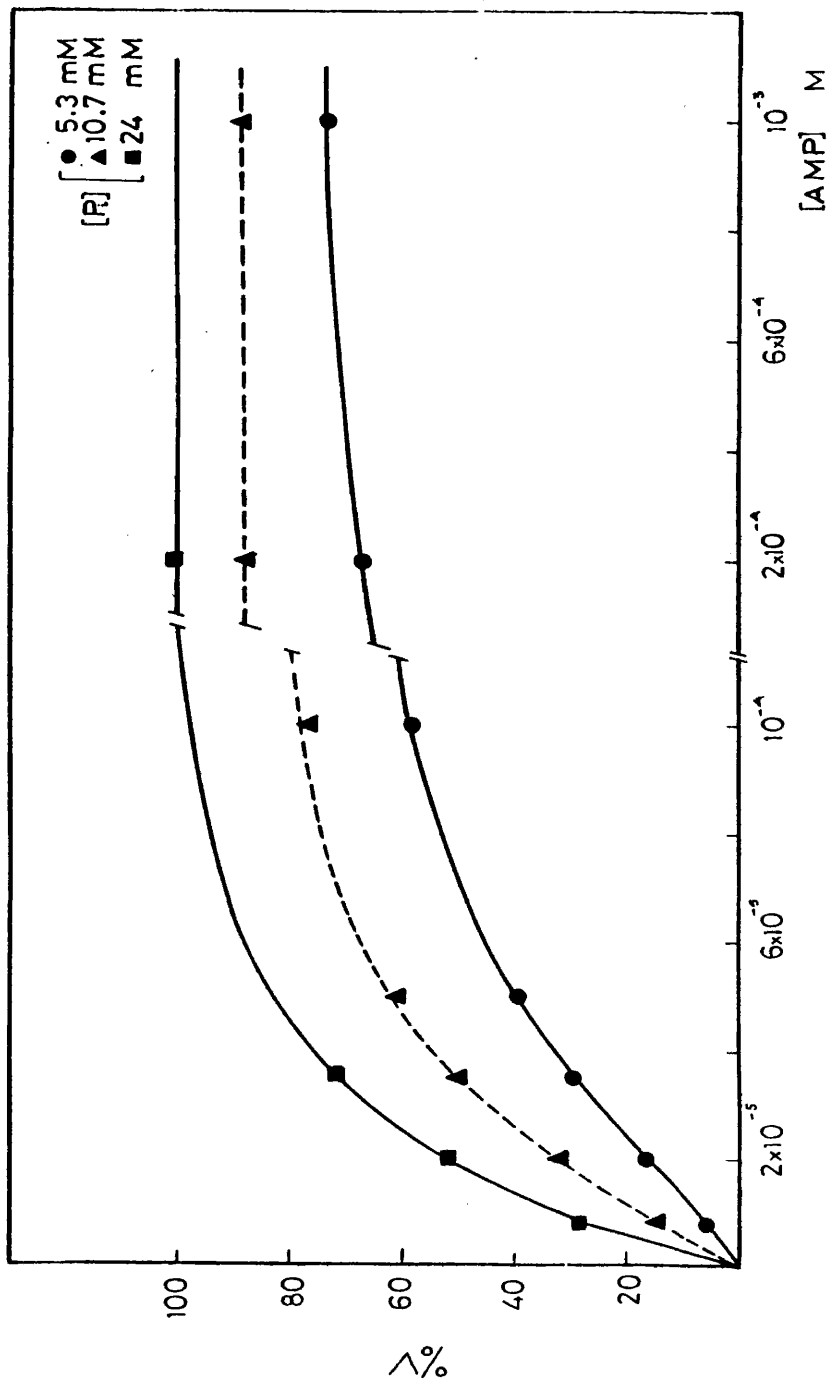


FIGURA 35

FIGURA 36.- Activación de la fosforilasa b por AMP a 21,4°C.

21.4°C

151

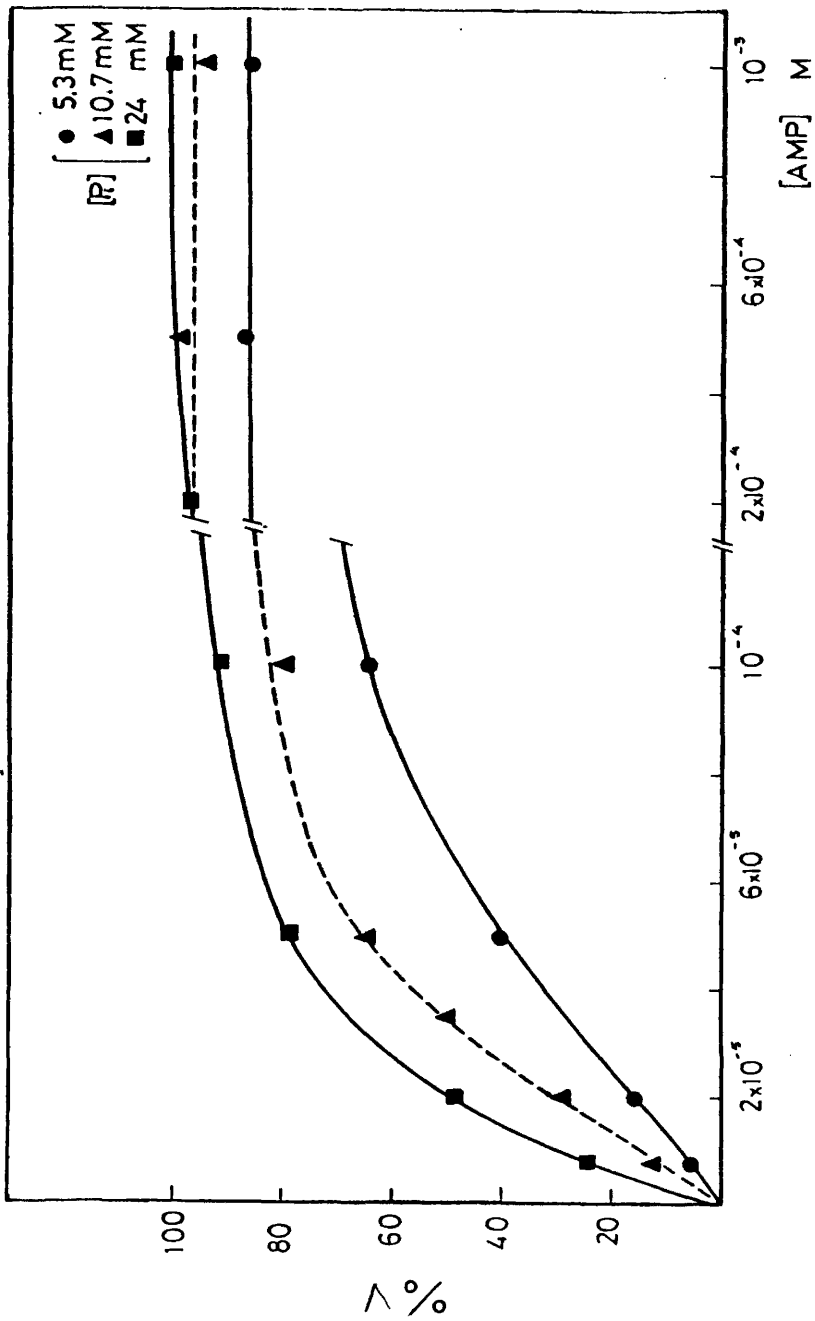


FIGURA 36

FIGURA 37.- Activación de la fosforilasa b por AMP a 25,0°C.

25°C

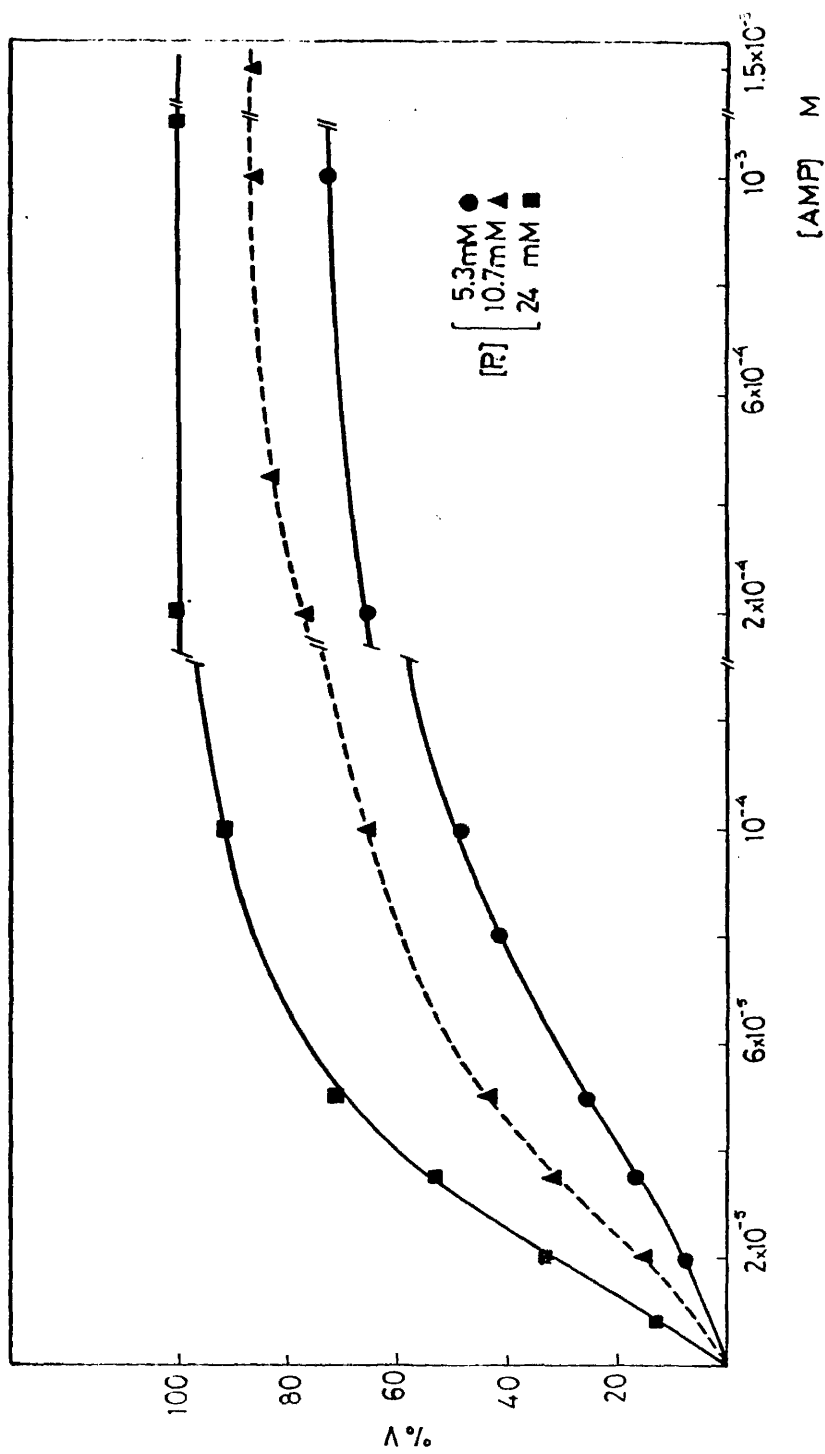


FIGURA 37

T A B L A VI

CONSTANTES TERMODINAMICAS DE LOS COMPLEJOS FOSFORILASA b - LIGANDO
EN FUNCION DE LA TEMPERATURA

T°C	L ₀	K _{P₁} x 10 ³ M	K _{AMP} x 10 ⁶ M
10,0	69	9,2 ± 0,5	6,5 ± 0,5
14,8	83	9,0 ± 0,5	8,3 ± 0,5
18,6	100	10,0 ± 0,5	9,0 ± 0,5
21,4	204	7,5 ± 0,5	9,2 ± 0,5
25,0	600	6,0 ± 0,5	8,5 ± 0,5

$L_0 = \frac{T_0}{R_0}$ es la constante transformacional definida según Monod (39)
en ausencia de ligandos.

sociación del AMP y el Fosfato a la enzima y la constante transconformacional L_0 , (figuras 38 y 39) presentan un cambio en la pendiente entre 14 y 18°C. Esta discontinuidad aparece a temperaturas mas bajas que el cambio de pendiente encontrado en el presente trabajo para la constante de tetramerización, K_T , situado en torno a 23-25°C y aproximadamente a la misma temperatura a la que se produce el primer cambio de pendiente en la variación de la entalpía de interacción AMP - fosforilasa b y en la constante de disociación del complejo binario, obtenidas a partir de los datos calorimétricos al pasar de 14°C a 30°C.

Este cambio en las propiedades termodinámicas del sistema se produce practicamente a la misma temperatura que el encontrado por Helmerich y col (16) para la constante de unión del AMP a la enzima obtenida por diálisis en el equilibrio, en tampón glicerofosfato, en ausencia de ligandos y en presencia de G-1-P.

Según el esquema conformacional propuesto por Buc (17), la transición conformacional dependiente de la temperatura, detectada en el presente trabajo por procedimientos cinéticos y por tanto en presencia de glucógeno, debe corresponderse con el desplazamiento del equilibrio conformacional entre los estados B_2 y A_2 (17) por acción de la temperatura. Sin embargo, el hecho de que la representación de Van't Hoff para L_0 no sea lineal en todo el intervalo de temperaturas estudiado indica que las dos poblaciones conformacionales E_1 y E_2 englobadas por dicho autor en el estado B_2 no son indiscernibles respecto de su tránsito al estado A_2 ; teniendo en cuenta que según los mismos autores, el equilibrio conformacional entre los estados E_1 y E_2 es dependiente de la temperatura, siendo 20°C, la temperatura crítica que determina la estabilización del estado E_2 a pH 6,9, la evolución del equilibrio $E_1 \rightleftharpoons E_2$

- FIGURA 38.- A) Representación de Van't Hoff para la constante de disociación de AMP, K_{AMP} .
- B) Representación de Van't Hoff para la constante de disociación del fosfato, K_{P_i} .

157

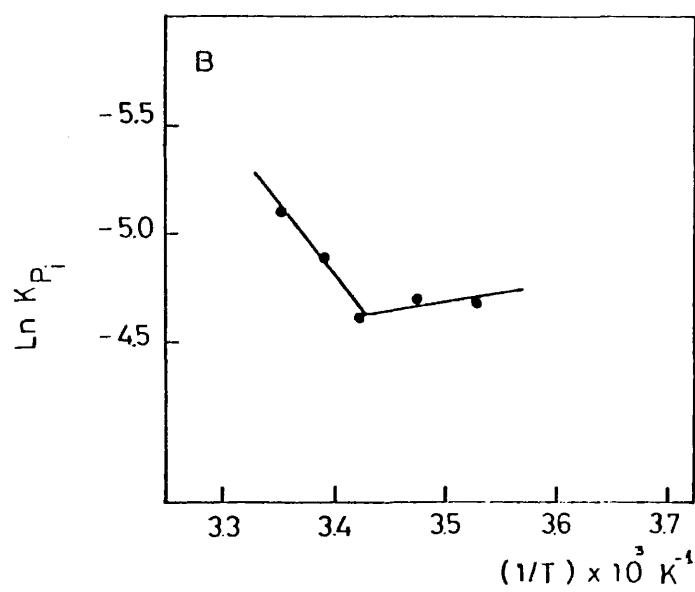
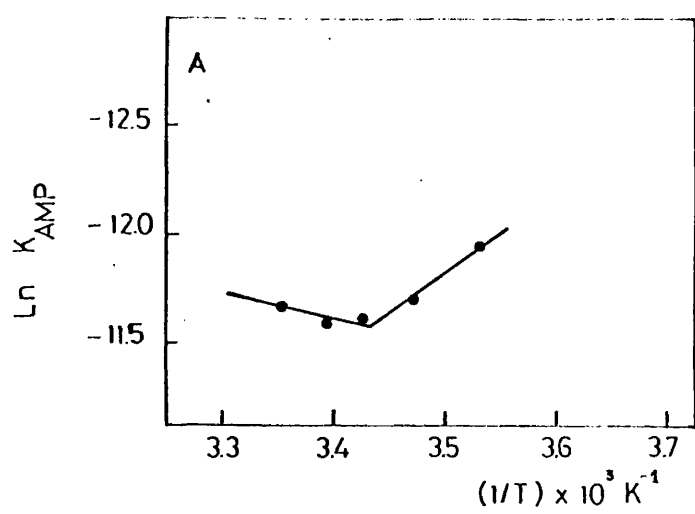


FIGURA 38

FIGURA 39.- A) Representación de Van't Hoff para la constante trans-
conformacional L_0 .

B) Representación de Van't Hoff para $V_{\text{máx.}}$.

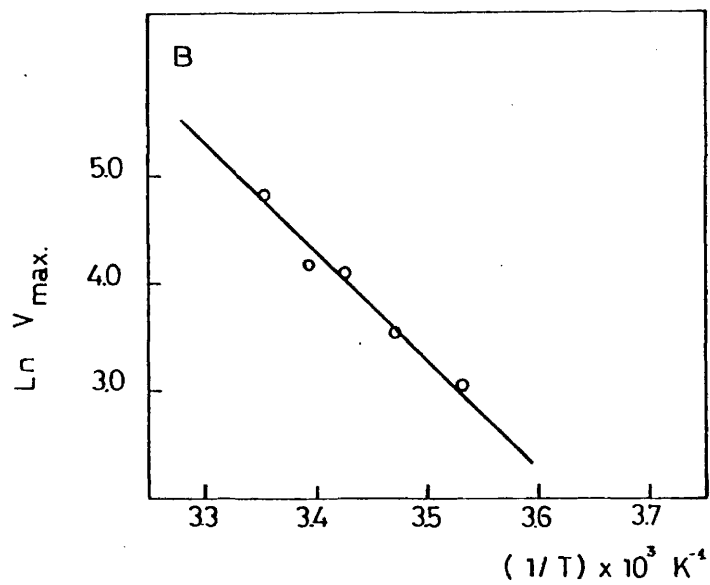
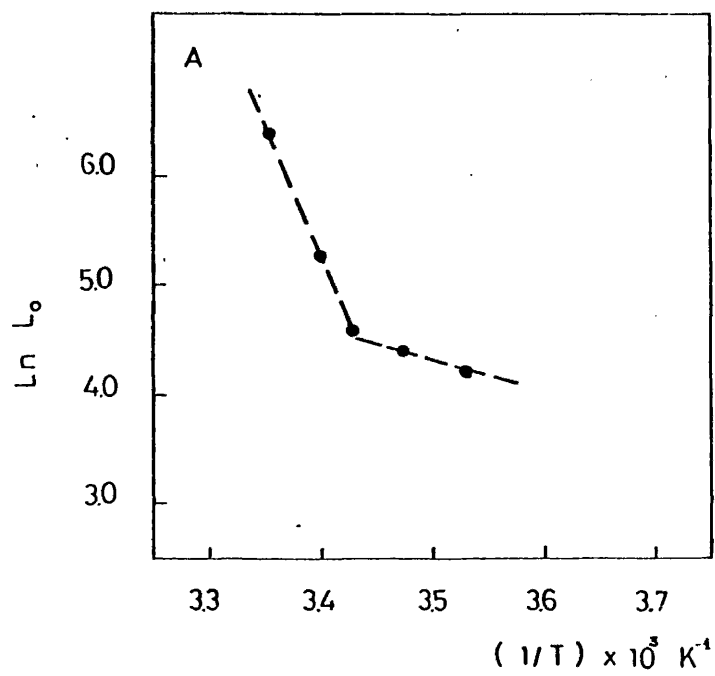


FIGURA 39

con la temperatura, acoplado al equilibrio entre ambas especies y A_2 , si las constantes transconformacionales que definen el paso de $E_1 \rightleftharpoons A_2$ y $E_2 \rightleftharpoons A_2$ no son idénticas, son los únicos procesos que pueden justificar el comportamiento de L_0 encontrado experimentalmente.

Por otro lado el que la representación de Van't Hoff para $V_{má}$ en glicilglicina sea lineal induce a pensar que en presencia de los sustratos y el activador, en el tampón por nosotros utilizado se estabiliza la conformación enzimática con mayor eficiencia catalítica, independientemente de la temperatura.

Las entalpías de unión para AMP y fosfato, en presencia de glucógeno, calculadas a partir de los datos cinéticos, y el incremento entálpico asociado al desplazamiento del equilibrio conformacional (TABLA VII), son diferentes de los obtenidos a partir de medidas microcalorimétricas, lo que indica la existencia de modificaciones en las interacciones estudiadas por acción del glucógeno, con respecto a las existentes para cada uno de los complejos binarios aislados.

T A B L A VII

	$-\Delta H_{AMP}$ (kJ/mol mon.)	$-\Delta H_{P_i}$ (kJ/mol mon.)	$-\Delta H_{L_0}$ (kJ/mol mon)
T >18°C	10 ± 2	54 ± 5	-(98 ± 10)
T <18°C	-30 ± 2	7 ± 3	-(22 ± 3)

Según los datos de la TABLA VII, la unión de AMP a la enzima es un proceso exotérmico a temperaturas inferiores a 18°C y endotérmico por debajo de la temperatura de transición.

III. 4.- EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE EL COMPORTAMIENTO CATALITICO DE LA FOSFORILASA b

Una de las propiedades mas atractivas que podía presentar la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima, era la de ejercer un efecto regulador sobre el comportamiento catalítico de la fosforilasa b en presencia de AMP.

El hecho de que la actividad catalítica máxima de la fosforilasa b se alcance a niveles de saturación de la primera clase de sitios de unión del activador alostérico, AMP, hizo que durante mucho tiempo la mayoría de los autores no considerasen la posibilidad de que la saturación de los sitios de menor afinidad hacia AMP produjese alguna modificación en el comportamiento catalítico, a pesar del efecto que ejercía el glucógeno sobre la fijación de AMP a su segundo sitio de unión (40). Recientemente Madsen y col (41) mediante estudios cinéticos y estructurales determinaron que la saturación del sitio específico de las bases por AMP producía una inhibición de la actividad catalítica de la fosforilasa a, por competición exclusiva con el sustrato por estados conformacionales diferentes. Sin embargo Johnson y col (26) encontraron únicamente que la fijación de la adenina a sus sitios de mayor afinidad bloqueaba el canal de acceso al sitio catalítico y que mediante este efecto podría ejercer un efecto inhibitor de la catálisis. Dos hechos importantes a tener en cuenta en la fosforilasa b son:

- 1.- En ausencia de ligando, el arsenato, análogo del fosfato (31), a concentraciones de 100 mM no se une mas que al sub sitio fosfato del sitio de mayor afinidad para el nucleotido en la fosforilasa b cristalina, pero no se detecta su unión al sitio catalítico. En presencia de AMP 5 ó 100

mM no se detecta competición entre el arsenato y el fosfato del nucleótido, ni su unión a ningún sitio de la molécula de enzima (26).

- 2.- La G-1-P, a concentraciones de 100 mM, se une a dos sitios en presencia de IMP 2 mM, uno de ellos, hacia el que presenta mayor afinidad, es el sitio catalítico y el otro el sitio denominado N del activador alostérico (el de mayor afinidad par AMP).(26).

Todos estos hechos hacen bastante problemático el establecer de una manera inequívoca la existencia de una competición entre el sustrato y la segunda molécula del activador, bien por impedimentos estéricos de sustrato para penetrar hasta el sitio catalítico o por unión exclusiva del sustrato y el nucleótido a estados conformacionales diferentes, ya que:

- a.- En ausencia de nucleótidos el arsenato, análogo del fosfato, es incapaz de unirse al sitio catalítico.
- b.- La G-1-P es capaz de unirse al sitio catalítico incluso en presencia de IMP, que presenta mayor afinidad hacia el sitio de las bases (26, 42, 43) sin que parezcan existir impedimentos estéricos.
- c.- El resultado experimental indicado en el apartado b) no puede justificarse en base a que el IMP al unirse a su segundo sitio de unión lleve a la enzima a un estado conformacional diferente que AMP (competición exclusiva entre estados), permitiendo así la unión de la G-1-P, ya que no se detectan cambios conformacionales inducidos por la unión de ninguno de ellos a la fosforilasa b en el estado cristalino (26).

En el presente trabajo hemos estudiado el efecto que la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima podía ejercer sobre la catálisis enzimática, bien de una forma directa o a través de los procesos asociados a la saturación de cada una de las clases de sitios de unión de AMP en la enzima.

Debido a la imposibilidad de realizar los experimentos cinéticos a concentraciones de enzima de 1,0 y 3,0 mg/ml por los procedimientos cinéticos normalmente utilizados, ya que en estas condiciones se produciría un agotamiento casi inmediato de los sustratos, la cinética de actividad en el sentido de síntesis del glucógeno, se siguió mediante el crecimiento del peso molecular del polisacárido según se indicaba en Materiales y Métodos.

A 25°C, 1,0 y 10 mM son las concentraciones de AMP necesarias para saturar los sitios de mayor y menor afinidad del nucleótido a concentraciones de fosforilasa b superiores e inferiores al intervalo de concentraciones de enzima en que se produce la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima.

Los resultados obtenidos para la síntesis del polisacárido, a saturación de cada una de las clases de sitios de unión, se encuentran representados en las figuras 40 y 41; a la vista de los datos experimentales podemos deducir las siguientes conclusiones:

1.- La síntesis del polisacárido por acción de la fosforilasa b presenta dos etapas diferentes, a la segunda de las cuales le corresponde una mayor velocidad de síntesis.

2.- La velocidad de síntesis en el segundo paso, así como el tiempo necesario para que comience son muy sensibles a las diferentes condiciones experimentales utilizadas.

FIGURA 40.- Cinética de síntesis del polisacárido por la fosforilasa b a 25°C seguido por "dispersión de luz". Condiciones experimentales: -▲- [G-1-P] 10 mM, [AMP] 1 mM; -●- [G-1-P] 10 mM, [AMP] 10 mM. La concentración de enzima en ambos casos era 1,0 mg/ml.

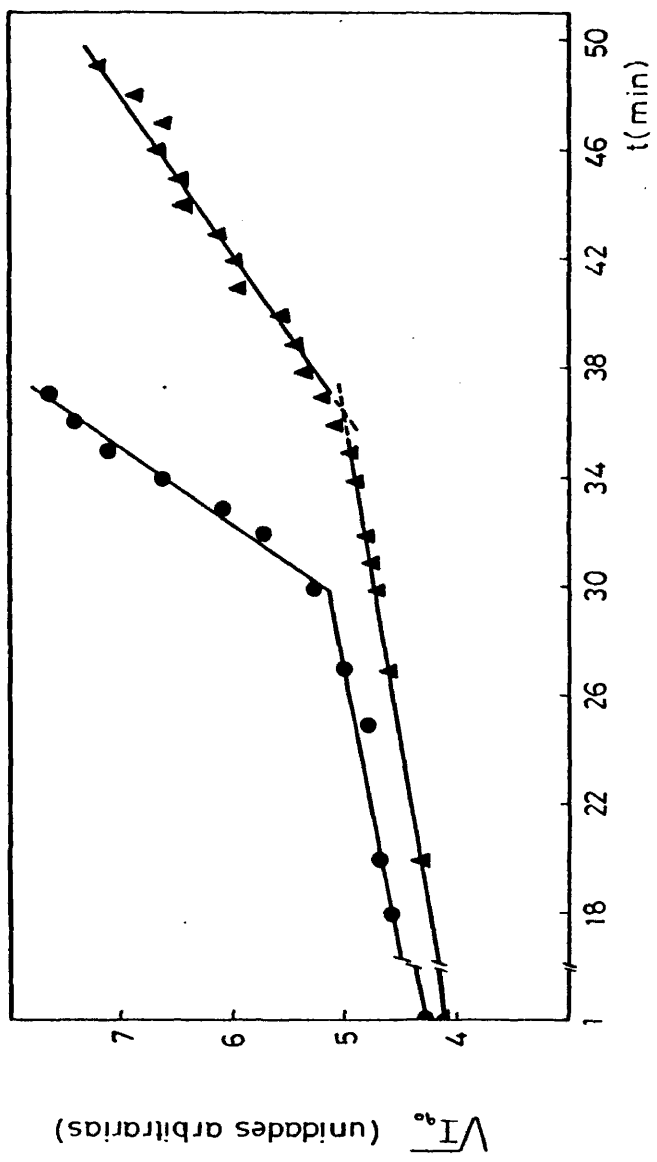


FIGURA 40

FIGURA 41.- Cinética de síntesis del polisacárido por la fosforilasa b a 25°C seguido por "dispersión de luz". Condiciones experimentales: -▲- [G-1-P] 10 mM, [AMP] 1mM y [Enzima] 3,18 mg/ml; -●- [G-1-P] 10 mM, [AMP] 10 mM y [Enzima] 2,72 mg/ml (escala superior).

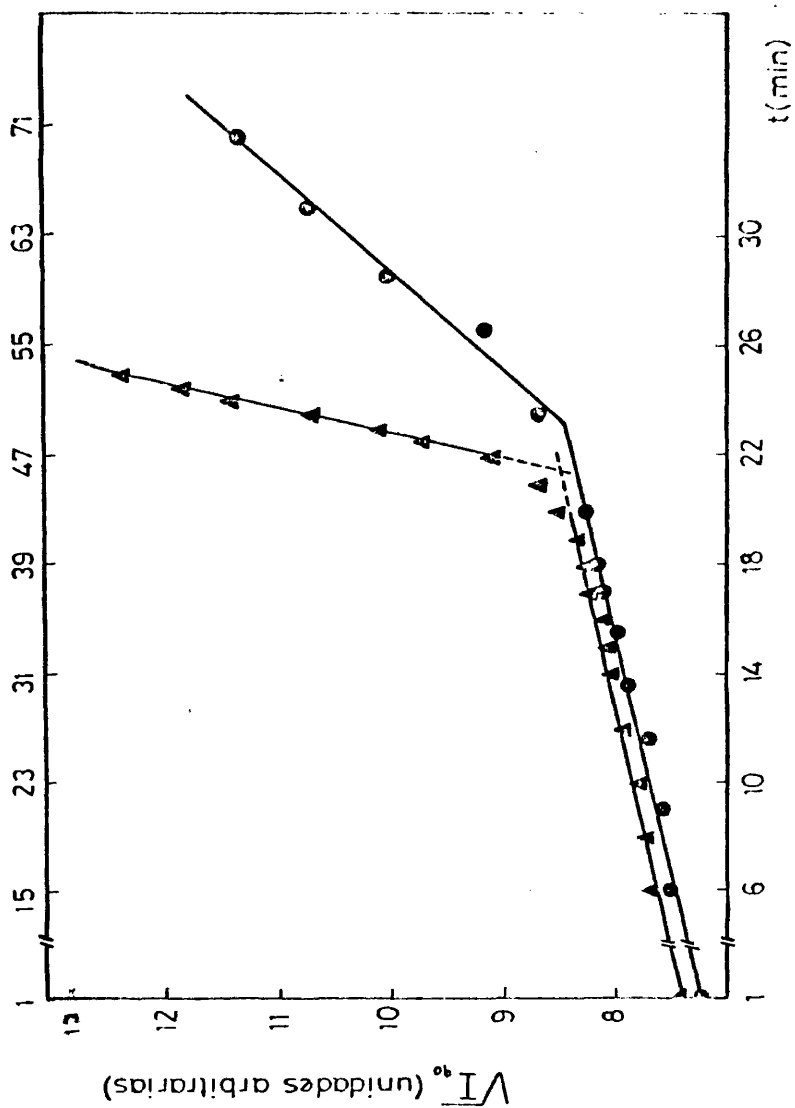


FIGURA 41

3.- El efecto de inhibición asociado a la saturación por AMP de sus sitios de unión de menor afinidad, a una concentración de enzima de 3,0 mg/ml, desaparece a 1,0 mg/ml. A esta concentración de enzima, la saturación de la segunda clase de sitios para AMP, aumenta la velocidad de síntesis del polisacárido.

En la tabla VIII se encuentran recogidas las velocidades relativas y específicas para la síntesis del polisacárido por acción de la enzima, en las diferentes condiciones experimentales utilizadas. El valor absoluto de la velocidad de síntesis no puede conocerse debido al desconocimiento del valor de n (nº de moléculas que difunden luz), por in determinación del peso molecular del almidón utilizado como aceptor de moléculas de glucosa (ver Materiales y Métodos).

T A B L A VIII

[Enzima] mg/ml	[AMP] x 10 ³ M	V _r (%)	V _{espec.} (%)
1,0	1	14± 1	40± 4
1,0	10	36± 4	100
3,18	1	100	92± 5
2,72	10	14± 1	13± 2

V_r y V_{espec.} son las velocidades relativas y específicas a cada concentración de AMP calculadas con respecto a la velocidad máxima a una concentración dada de AMP. Los experimentos se realizaron a una concentración de G-1-P de 10⁻² M.

A partir de los datos presentados puede deducirse los siguientes hechos:

1.- Incluso en presencia de AMP, la G-1-P, en disolución, es capaz de unirse al sitio catalítico, a diferencia de los resultados obtenidos para la enzima en el estado cristalino (26).

2.- La fijación de AMP al sitio de mayor afinidad hacia la base ejerce un efecto sobre la catálisis enzimática.

3.- La transición conformacional dependiente de la concentración de enzima produce un cambio de las funciones relativas de los sitios de AMP en la velocidad de síntesis del polisacárido.

4.- La inhibición parcial asociada a la saturación de los sitios de baja afinidad de AMP a una concentración de fosforilasa b de 3,0 mg/ml, podría indicar que el estado conformacional estabilizado en glicilglicina a concentraciones de enzima superiores a aquellas en que se produce la transición conformacional es similar al que presenta la fosforilasa a en glicerofosfato (41).

III. 5.- INTERACCIONES HETEROTROPICAS ENTRE LA UNION DE AMP Y FOSFATO

A LA FOSFORILASA b

La mayoría de los ligandos que se unen a la fosforilasa b producen efectos importantes sobre la unión de otros ligandos, asociados generalmente a cambios conformacionales en la estructura de la proteína.

Las interacciones entre el fosfato, el glucógeno y la G-1-P - por un lado y AMP por otro han sido estudiadas por métodos enzimáticos (32, 33), relajación de protones (15, 45), marcadores de spin unidos covalentemente a la enzima (34, 43, 44), dicroísmo circular (21), difracción de Rayos-X (26, 41) y diálisis en el equilibrio (16).

Los métodos enzimáticos indicaban la existencia de interacciones heterotróficas positivas entre la unión del fosfato y AMP (32, 33) debidas principalmente al desplazamiento del equilibrio conformacional de la enzima hacia el estado mas activo (el de mayor afinidad hacia AMP y fosfato) por fijación de cada uno de ellos.

Helmreich y col (16) estudiaron mediante experimentos de diálisis en el equilibrio el efecto que la presencia de los diferentes sustratos ejercía sobre la fijación de AMP a 23°C. Los resultados mostraba que a fuerza iónica constante el efecto del fosfato sobre la fijación de AMP era altamente dependiente de la naturaleza del tampón utilizado, as en glicerofosfato la presencia del sustrato disminuía la afinidad de la enzima hacia AMP, mientras que en glicil-glicina producía un descenso e la constante de disociación del activador alostérico, atribuyéndo la diferencia en el comportamiento al carácter de auténtico efector que tiene el glicerofosfato sobre los equilibrios conformacionales de la fosforilasa b (16, 43)

Radda y col (43) utilizando R.S.E. no encontraron apenas modificaciones para la unión de AMP a la enzima en presencia de P_i 30 mM.

Morange y col (45) estudiando el efecto que los sustratos ejercían sobre la fijación de AMP y tempo-AMP así como la conformación que los nucleótidos adoptaban en presencia del sustrato, encontraron un desvío de ambos nucleótidos por concentraciones crecientes del sustrato, hasta valores de 30 y 80 mM respectivamente, por encima de estas concentraciones de sustrato se producía un nuevo aumento de la fijación del nucleótido por acción del fosfato, muy superior en el caso de AMP. Estos autores atribuían el primer efecto a una competición entre el sustrato y el subsitio fosfato del activador alostérico, hipótesis apoyada además por los resultados obtenidos para la fijación de ligandos mediante difracción

de Rayos X (26, 41), y el fortalecimiento de la unión de AMP a concentraciones superiores de sustrato al incremento de la fuerza iónica del medio basándose según ellos en los resultados obtenidos por Helmreich y col (16), sin embargo estos autores como indicamos anteriormente realizaron sus experiencias de diálisis a fuerza iónica constante e indican de una manera clara que el aumento en la fuerza iónica del medio produce un desplazamiento del equilibrio conformacional hacia el estado T; por otro lado, Helmreich y col (46) estudiando la unión de diferentes ligandos a la fosforilasa a y su efecto sobre la unión de AMP encontraron que a fuerzas iónicas crecientes se producía un incremento de la constante de disociación, dependiente además de la naturaleza del tampón en que se realizaban las medidas.

Resultados similares a los de Morange y col (45) fueron obtenidos por Vandebunder y col (20) para la fijación de ϵ -AMP en presencia de fosfato. La fijación del sustrato ejercía un doble efecto sobre la unión del activador. A concentraciones crecientes de fosfato se producía un desplazamiento progresivo del ϵ -AMP, seguido de una recaptación del nucleotido por la enzima en un proceso cinético lento, hasta alcanzar un estado enzimático, a altas temperaturas, con propiedades similares a las que presenta el complejo AMP-enzima a bajas temperaturas y a las de la unión de AMP a la fosforilasa a.

El estudio cristalográfico de las fosforilasas b y a supuso un avance fundamental en la caracterización topográfica de los diferentes sitios de unión de la enzima (26, 41).

En ausencia de ligandos el fosfato se une al subsitio fosfato del activador alostérico, no detectándose su unión al sitio catalítico (26), este hecho llevó a Morange y col a establecer las bases de la posi-

ble competición entre el sustrato y el activador alostérico por los sitio de mayor afinidad hacia éste (45). Madsen y col (41) mediante estudios cinéticos con fosforilasa a determinaron la existencia de una competición exclusiva entre la fijación de la G-1-P al sitio catalítico y la fijación de AMP a sus sitios de unión de menor afinidad, sin embargo, como ya indicamos en el apartado anterior del presente capítulo, la G-1-P no es capaz de fijarse al sitio catalítico en presencia de AMP, aún a bajos niveles de ocupación del segundo sitio por monómero que el activador alostérico tiene en la enzima, fijándose sin embargo en presencia de IMP, no existiendo en ningún caso cambios conformacionales en la estructura enzimática en el estado cristalino (26). Por otro lado los resultados obtenidos en el presente trabajo para el comportamiento cinético de la enzima a 1mg/ml, 25°C y a saturación de las dos clases de sitios de unión de AMP indican la fijación simultanea del sustrato y AMP a los sitios de menor afinidad.

Otro hecho problemático sobre la posible competición entre AMP y el fosfato por los sitios hacia los que presenta mayor afinidad el nucleotido es, la ausencia de competición entre ambos en la catálisis enzimática (31, 32, 33).

Tenemos por tanto, que los datos cinéticos y de diálisis en el equilibrio indican la existencia de un efecto heterotrópico positivo entre la fijación del sustrato al sitio catalítico y la fijación de AMP a su primera clase de sitios de unión, mientras que los resultados de Morange y col (45) y Vandebunder y col (20) indican la existencia de una competición entre el AMP y el fosfato hacia los sitios de mayor afinidad para AMP a concentraciones intermedias del sustrato (efecto que como indicamos anteriormente podría ser debido al incremento de la fuerza iónica del medio por 1

presencia del sustrato), seguida de un aumento en la afinidad de AMP (a concentraciones mas altas de fosfato) hacia sus sitios de unión y la generación de un estado enzimático, a altas temperaturas, en presencia de AMP y fosfato con propiedades similares a las de la fosforilasa a.

Los datos cinéticos obtenidos por Madsen y col para la fosforilasa a indican la posible existencia de una competición, por unión a esta dos conformacionales diferentes, entre el sustrato y la segunda molécula de AMP por monómero (41).

En este punto podemos situar los estudios realizados hasta el momento sobre la fijación de AMP, en presencia de P_i , a la enzima y viceversa.

En nuestro caso hemos estudiado el efecto que ejerce, sobre la fijación de AMP, la presencia de concentraciones crecientes de fosfato, así como la fijación del sustrato a saturación de cada una de las clases de sitios de unión de AMP en la enzima, a dos temperaturas 14 y 25°C, inferior y superior al intervalo de temperaturas en que se produce la transición conformacional dependiente de la temperatura en la enzima.

Puesto que la adenina tiene mayor afinidad hacia los sitios de débil afinidad para AMP (35), hemos estudiado también el efecto que la sa turación de los sitios específicos de la base tiene sobre la fijación del fosfato.

El efecto del fosfato sobre la fijación de AMP a 25°C se estudió calorimétricamente a cuatro concentraciones diferentes de sustrato, 1,3 mM, 5 mM, 10 mM y 20 mM, (figuras 42 y 43). A concentraciones crecientes de fosfato se produce un descenso en la entalpía de interacción de AMP con el complejo binario para ambas clases de sitios de unión del activador alotérico, excepto a 1,33 mM donde se produce un incremento de la entalpía de

FIGURA 42.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP en presencia de fosfato 1,3 mM - ● - y 5,0 mM - o - . [Enzima] 3,0 mg/ml. T= 25°C.

25°C

175

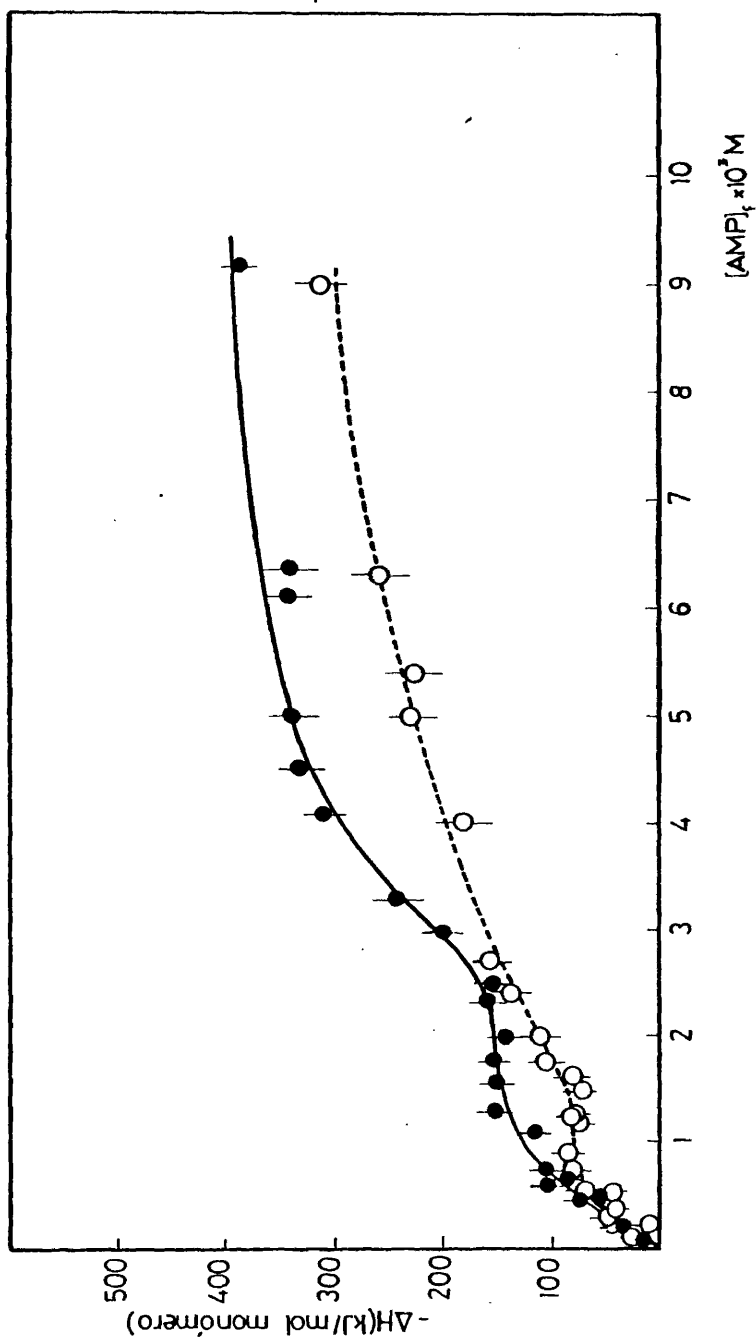


FIGURA 42

FIGURA 43.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP en presen-
cia de fosfato 10 mM - ● -, y 20 mM - ○ -. [Enzima] 3,0
mg/ml. T= 25°C.

25°C

177

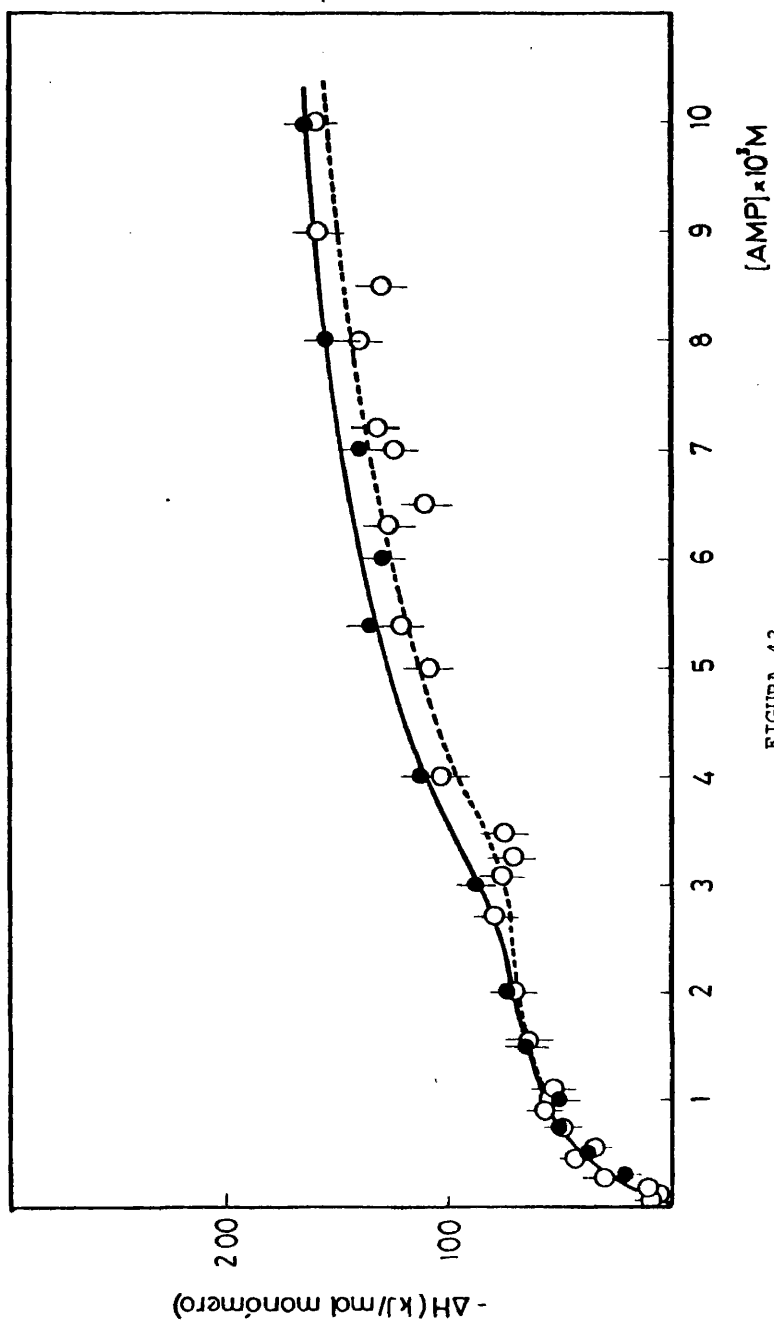


FIGURA 43

interacción para la primera clase de sitios de unión de AMP, con respecto al valor obtenido en ausencia de fosfato.

Los valores obtenidos para la constante de disociación aparente de AMP a su primera clase de sitios de unión presentan un descenso con relación al valor de la constante en ausencia de sustrato, si bien la mejor constante de fijación se obtiene en presencia de P_i 5 mM, el aumento de la concentración de sustrato a 10 y 20 mM produce cierto incremento en la constante de disociación, que es sin embargo inferior al valor obtenido en presencia de ligandos. La constante de fijación de AMP a su segunda clase de sitios de unión prácticamente no varía por acción del sustrato, observándose sin embargo un cierto descenso en presencia de P_i 1,3 mM.

Existe un descenso en la cooperatividad del proceso de unión de AMP a su segundo sitio de unión y un aumento de la misma para la saturación de la primera clase de sitios de AMP.

Los resultados obtenidos en presencia de P_i 10 y 20 mM son prácticamente idénticos, lo cual es indicativo de que concentraciones de P_i 10 mM son prácticamente saturantes con respecto al efecto que la presencia del sustrato ejerce sobre la fijación de AMP al complejo binario.

Según datos de García Blanco y col (18) en presencia de P_i 18 y AMP 1,5 mM, a 25°C y para una concentración de enzima de 3,0 mg/ml el porcentaje de tetrámero es del 28%, lo cual supone un incremento de aproximadamente el 12-13% con respecto del nivel de agregación en presencia de AMP solo. La fijación de AMP a su segundo sitio de unión produce, igual que en ausencia del sustrato, un desplazamiento del equilibrio de asociación \rightleftharpoons disociación hacia la formación del dímero, los niveles de tetrámero estabilizados son del orden del 18%, lo cual supone un incremento del % con respecto de los niveles alcanzados en ausencia del sustrato.

Los parámetros termodinámicos asociados a la interacción fosfo-
rilasa b - AMP en presencia del sustrato a 25°C se encuentran recogidos
en la TABLA IX.

En presencia de AMP, la fijación del sustrato a 25°C comienza
a presentar un carácter bifásico, tanto mas acusado cuanto mayor es la
concentración del activador alostérico y mas baja la concentración de -
enzima; así en presencia de AMP 10 mM, a saturación de los dos sitios
de unión del activador alostérico, la unión del fosfato a la enzima pre-
senta dos procesos de saturación entálpica. La afinidad del fosfato ha-
cia su primer sitio de unión aumenta en presencia de AMP, a saturación
de cada una de sus clases de sitios de unión (TABLA X), Figura 44.

Si tenemos en cuenta los valores entálpicos asociados a la sa-
turación de la enzima por fosfato en ausencia y en presencia de AMP, pa-
rece lógico pensar que la presencia del activador alostérico produce una
diferenciación entre dos sitios posibles de unión por monómero para el
fosfato, mediante un doble efecto, es decir aumentando la afinidad del P_i
hacia una de las dos clases de sitios de unión e inhibiendo su fijación
a la otra clase de sitios de unión.

Este hecho supondría que la variación de entalpía asociada a la
unión del fosfato, aún siendo muy exotérmico presentase valores mucho me-
nos elevados, además concordaría con la existencia del segundo proceso -
asociado a la presencia del sustrato sobre la unión de AMP a la enzima -
detectado por Vanderbunder y col (20) cuya constante aparente era supe-
rior a la de fijación del sustrato determinada por Radda (47).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la unión de
AMP a la enzima en presencia de fosfato parece difícil pensar en una com-
petición entre el sustrato y el nucleótido por el primer sitio de unión

T A B L A IX

PARAMETROS TERMODINAMICOS ASOCIADOS A LA INTERACCION FOSFORILASA

b - AMP EN PRESENCIA DE FOSFATO A 25°C

$[P_i]$	$K_I \times 10^4$ M	$K_{II} \times 10^3$ M	$-\Delta H_I$ (kJ/mol monóm.)	$-\Delta H_{II}$ (kJ/mol monóm.)
-	$5,0 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,2$	120 ± 10	340 ± 30
1,3 mM	$5,0 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,2$	150 ± 15	250 ± 20
5,0 mM	$2,5 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,2$	80 ± 5	270 ± 25
10,0 mM	$4,6 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,2$	65 ± 5	110 ± 10
20,0 mM	$4,0 \pm 0,4$	$4,9 \pm 0,3$	65 ± 5	110 ± 10

FIGURA 44.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato en presencia de AMP 1,18 mM (-▲ - [Enzima] 3,0 mg/ml y - ● - [Enzima] 1,0 mg/ml) y 10 mM (-Δ - [Enzima] 3,0 mg/ml y - o - [Enzima] 1,0 mg/ml). T = 25°C.

25°C

182

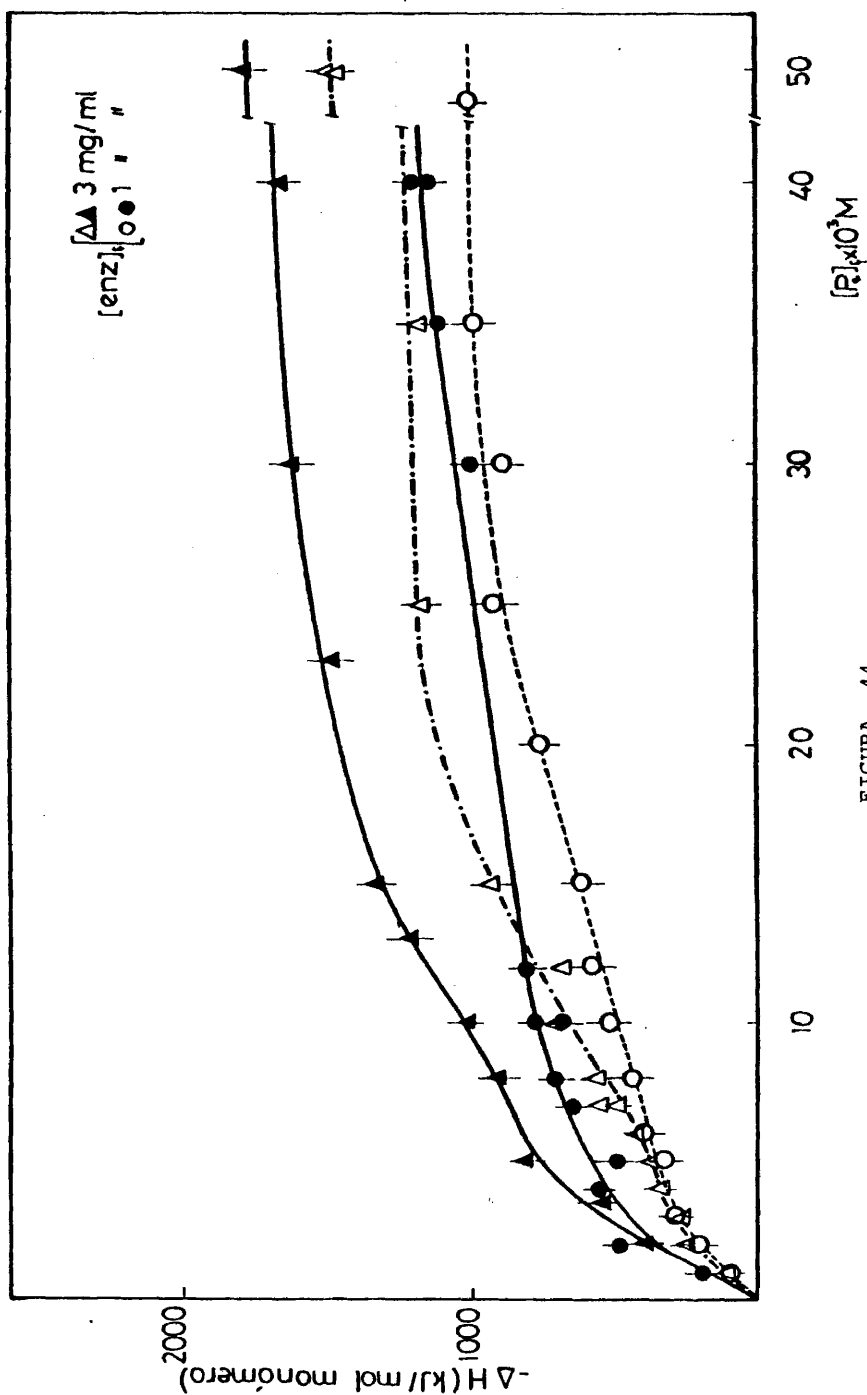


FIGURA 44

PARAMETROS TERMODINAMICOS PARA LA INTERACCION FOSFORILASA b - FOSFATO EN PRESENCIA

183

DE AMP A 25°C

[AMP]	$K_I \times 10^3$ M	$K_{II} \times 10^3$ M	$-\Delta H_I$	$-\Delta H_{II}$	$K_I \times 10^3$ M	$K_{II} \times 10^3$ M	$-\Delta H_I$	$-\Delta H_{II}$
-	$5,5 \pm 0,3$	-	1550	-	$4,6 \pm 0,3$	-	1450	-
1,18 mM	$2,1 \pm 0,2$	$17 \pm 0,5$	1000	700	$2,7 \pm 0,2$	26 ± 2	800	450
10,0 mM	$1,8 \pm 0,2$	$13 \pm 0,4$	400	800	$2,2 \pm 0,2$	$18,6 \pm 0,4$	460	540
Adenina 2 mM	$6,2 \pm 0,3$	-	1550	-	$4,4 \pm 0,3$	-	1500	-

La variación de entalpía va expresada en kJ/mol de monómero, y va afectada de un error del

5 %.

de AMP, siendo atribuible el efecto encontrado por Morange y col (45) y Vandebunder y col (20) posiblemente, al incremento de la fuerza iónica, como apuntamos anteriormente, cuyo efecto real sobre la fijación de AMP en nuestro caso es difícil de precisar.

El hecho de que la presencia de fosfato no produzca un descenso en la constante de fijación del AMP a su segunda clase de sitios de unión, hace difícil el pensar en una competición entre la fijación de este sustrato al sitio catalítico y la segunda molécula de AMP, por otro lado concentraciones de AMP 10 mM producen un incremento en la fijación del fosfato a su primera zona de saturación que debe de corresponder, por el orden de la constante de afinidad con el sitio catalítico. Pensar que la segunda zona de saturación por el sustrato pudiese corresponder a la fijación del sustrato al sitio catalítico, es bastante difícil de aceptar, puesto que nos llevaría al absurdo de admitir una competición entre la primera región de saturación para el fosfato y AMP por el sitio de mayor afinidad para el nucleótido, tanto mas efectiva cuanto mas saturado se encuentra este por AMP.

Considerando el hecho de que el primer sitio para la fijación de adenina a la enzima coincide con el sitio de débil afinidad para AMP (36, 41), y presenta un comportamiento igualmente competitivo con la fijación del sustrato al sitio catalítico en la fosforilasa a en glicerofosfato (41) hemos estudiado el efecto que la saturación del sitio específico de la base tiene sobre la fijación del sustrato a la fosforilasa b. Los resultados obtenidos en presencia de Adenina 2 mM a 25°C, para concentraciones de enzima de 3,0 y 1,0 mg/ml se encuentran representados en las figuras 20 y 21 junto con los resultados obtenidos para el fosfato en au

T A B L A X I

PARAMETROS TERMODINAMICOS ASOCIADOS A LA INTERACCION FOSFORILASA

b - AMP EN PRESENCIA DE FOSFATO A 14°C

[P _i]	K _I × 10 ⁴ M	K _{II} × 10 ³ M	-ΔH _I [*]	-ΔH _{II} [*]
-	3,2 ± 0,2	4,6 ± 0,3	93 ± 9	500 ± 50
20 mM	2,9 ± 0,2	6,9 ± 0,3	83 ± 8	95 ± 9

* La variación de entalpía va expresada en kJ/ mol de monómero.

T A B L A X I I

PARAMETROS TERMODINAMICOS ASOCIADOS A LA INTERACCION FOSFORILASA

b - FOSFATO EN PRESENCIA DE AMP A 14°C

[Enzima] 3,0 mg/ml

[AMP]	K _I × 10 ³ M	K _{II} × 10 ³ M	-ΔH _I [*]	-ΔH _{II} [*]
-	9,5 ± 0,5	-	1500 ± 100	-
1,18 mM	6,8 ± 0,4	-	1300 ± 70	-
10,0 mM	1,7 ± 0,2	14 ± 0,5	530 ± 40	620 ± 40
[Enzima] 1,0 mg/ml				
-	9,1 ± 0,5	-	1600 ± 100	-
1,18 mM	4,4 ± 0,3	-	1150 ± 60	-
10,0 mM	3,0 ± 0,2	39 ± 3	650 ± 40	-

sencia de ligandos.

Tanto por la variación de entalpía asociada a la unión del P_i como por los valores de las constantes de disociación aparentes, calculados mediante una representación de Hill (29), es difícil pensar en una competición entre el sitio de la base y el sitio catalítico por unión exclusiva de cada uno de los ligandos a estados conformacionales diferentes únicamente a 3,0 mg/ml se produce un pequeño incremento en la constante de disociación aparente, que pasa de un valor de 5,5 mM a 6,2 mM en presencia de Adenina. Estos resultados también hacen desechar la posibilidad de una competición entre el sitio de la Adenina y la fijación del sustrato al sitio que correspondería a la segunda región de saturación.

A 14°C hemos estudiado el efecto que ejerce la fijación de AMP a la enzima sobre la unión del fosfato en condiciones idénticas a las de 25°C y la fijación de AMP a la enzima en presencia de fosfato 20 mM.

Los resultados obtenidos para la fijación de AMP a 14°C, figura 45, son cualitativamente similares a los de 25°C. La entalpía de interacción AMP-enzima prácticamente no se modifica por la presencia del sustrato para la primera clase de sitios de unión, produciéndose un importante descenso en la entalpía de unión de AMP a su segundo sitio, asociada a un descenso en la constante de afinidad de $4,6 \times 10^{-3}$ M a $6,9 \times 10^{-3}$ M. La presencia del sustrato produce sin embargo un aumento en la afinidad para la fijación de la primera molécula de AMP (TABLA XI).

En presencia de AMP 1,18 mM (a saturación del primer sitio de unión de AMP) la fijación del fosfato a la enzima continúa presentando un carácter monofásico, tanto a 1,0 como a 3,0 mg/ml, observándose un descenso en la entalpía de interacción y un aumento en la constante de afinidad aparente, con respecto a los datos obtenidos en ausencia del nucleo

FIGURA 45.- Entalpía de interacción fosforilasa b - AMP en presencia de P_i 20 mM, a 14°C. [Enzima] 3,0 mg/ml.

14°C

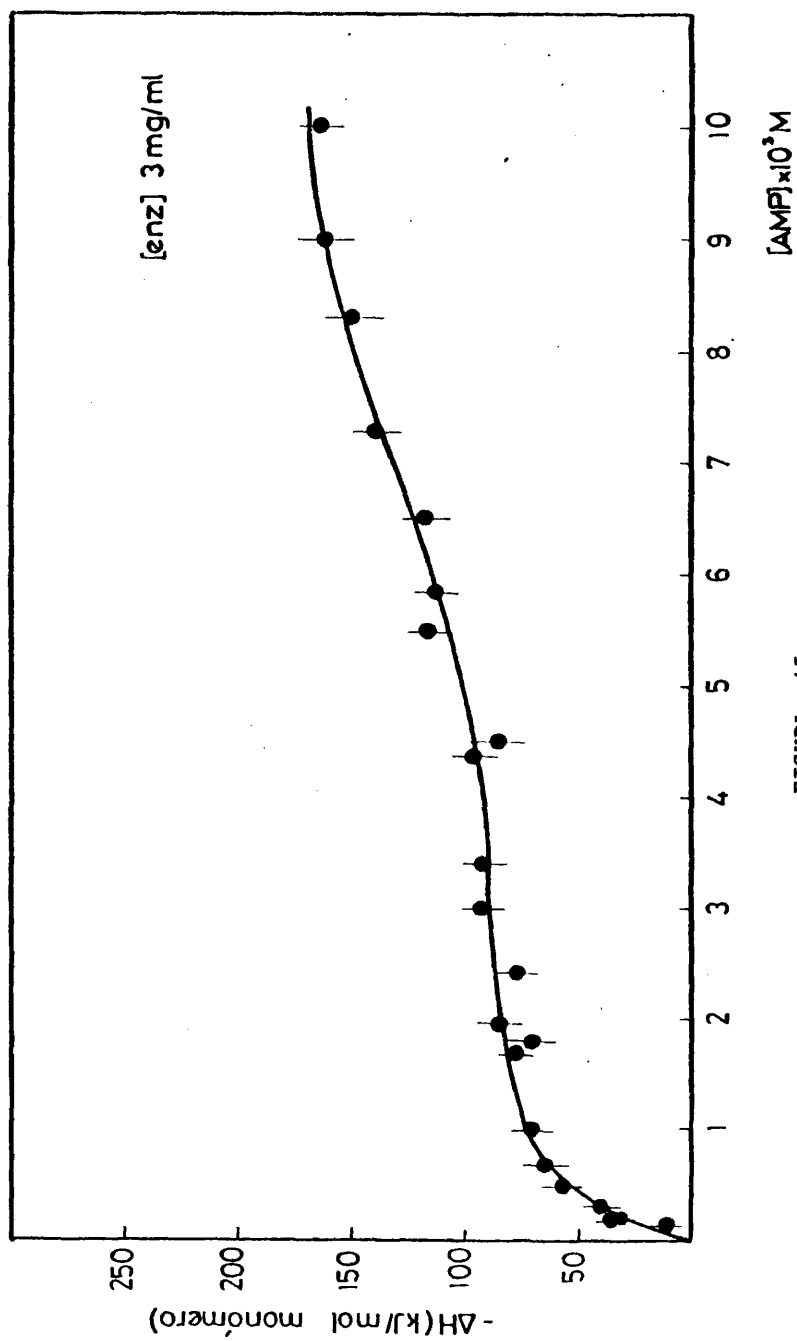


FIGURA 45

tido (TABLA XII), figuras 46 y 47.

A saturación de los sitios de débil afinidad de AMP la curva de fijación del sustrato presenta un claro aspecto bifásico y una gran diferencia entre los resultados obtenidos a 3,0 y 1,0 mg/ml.

Mientras que a 3,0 mg/ml la presencia de AMP 10 mM produce una cierta diferenciación entre los sitios de unión del fosfato, análoga a la que se producía a 25°C, a 1,0 mg/ml se produce prácticamente la inhibición de la fijación del sustrato a sus segundos sitios de unión y el aumento en la afinidad para la fijación a la primera clase de sitios de unión del sustrato es inferior al que se produce a 3,0 mg/ml.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a 14°C es lógico pensar en una competición entre la fijación de AMP a su segunda clase de sitios de unión y la fijación del sustrato a su segundo sitio, aunque no sea por el mismo sitio de unión, considerando los resultados obtenidos en presencia de Adenina a 25°C y el hecho de que no se detecta interacción entre el fosfato del nucleótido, cuando ocupa su segundo sitio de unión y la cadena polipeptídica (26).

Admitiendo la fijación del fosfato a dos sitios diferentes por monómero de enzima y desechando en base a los resultados obtenidos a saturación de la primera clase de sitios de unión, tanto a 14 como a 25°C, la competición por el primer sitio de AMP, se plantea el problema de la caracterización de este segundo sitio de unión, que además no podemos identificar con el sitio de unión de la G-6-P, ya que los datos de difracción de Rayos X indican que el sitio del inhibidor alostérico y el sitio de mayor afinidad hacia AMP son el mismo (48).

Aunque por estudios de difracción de Rayos X, no se ha podido caracterizar la unión del fosfato a ningún otro sitio de unión en la fos

FIGURA 46.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 14°C
en presencia de AMP 1,18 mM - ● -, y 10 mM - ▲ -.
[Enzima] 3,0 mg/ml.

14°C

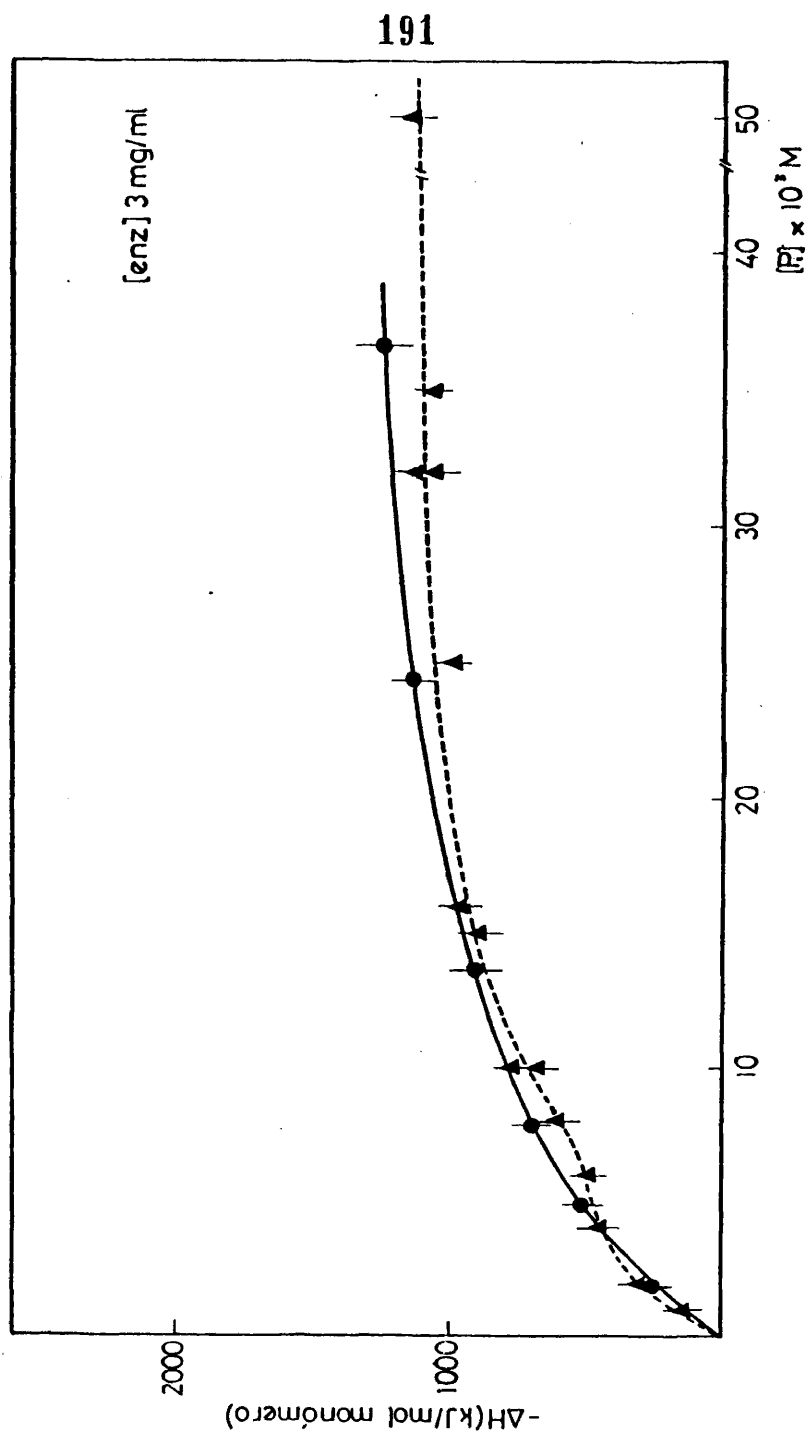


FIGURA 46

FIGURA 47.- Entalpía de interacción fosforilasa b - fosfato a 14°C
en presencia de AMP 1,18 mM -o-, y 10 mM - ● -.
[Enzima] 1,0 mg/ml.

14°C

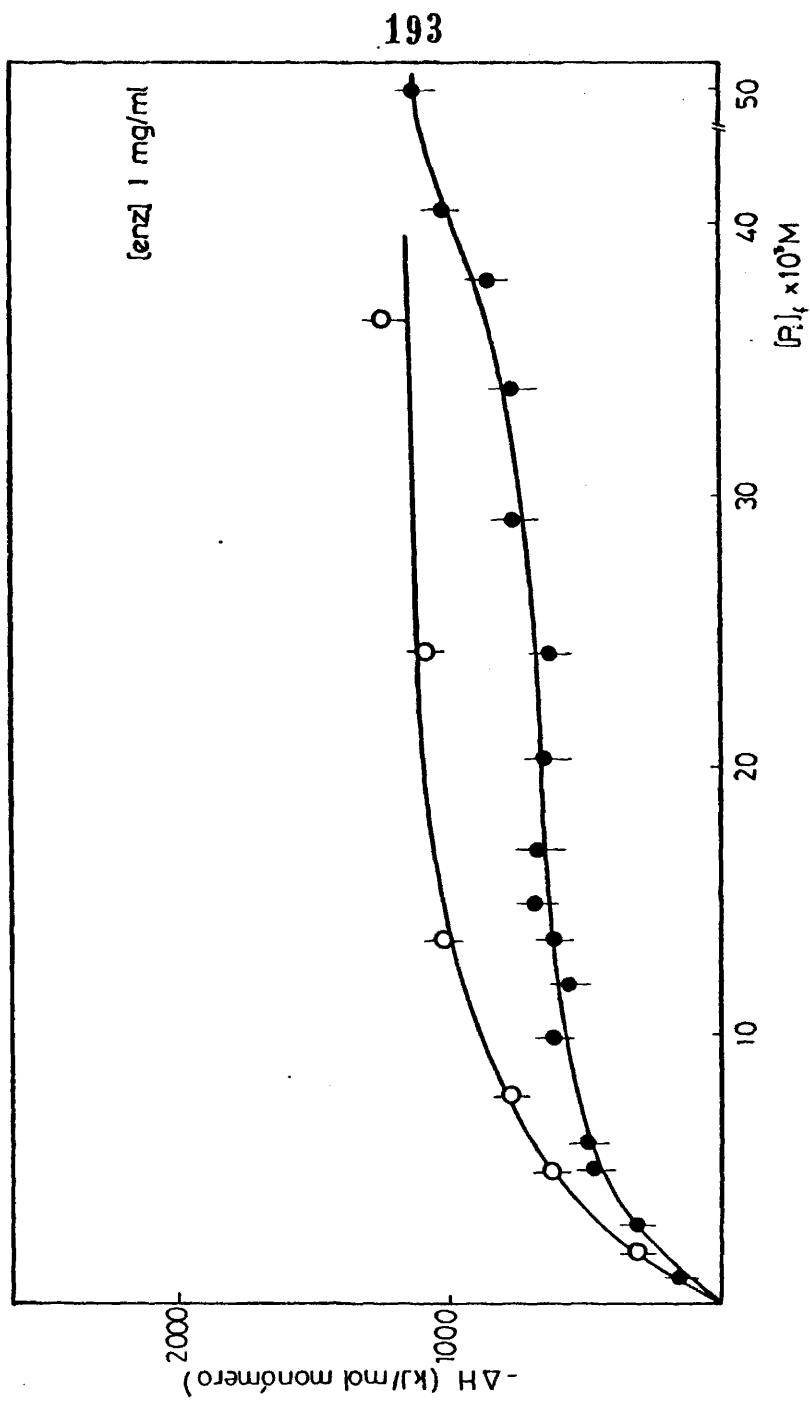


FIGURA 47

forilasa b, los datos obtenidos por Madsen y col (27) para la fosforilasa a en estado cristalino, así como los obtenidos por Helmreich y col (49) por RMN indican la existencia de una interacción de carácter iónico entre el grupo fosfato unido covalentemente a la serina-14 y la arginina 69, que inmoviliza el extremo N-terminal de la cadena. El paso de una conformación menos activa a otra más activa estabiliza esta interacción y produce un desplazamiento del extremo N-terminal hacia el interior de la cadena polipeptídica.

La inactivación de la enzima por efecto del pH o monomerización por tratamiento con anhídrido succínico (49) aumenta la movilidad del grupo fosfato, en estas condiciones la fijación de AMP produce una recuperación de la conformación activa y la inmovilización del grupo fosfato.

Los datos cristalográficos obtenidos por Johnson y col (26) para la fosforilasa b, no han permitido caracterizar la posición de los 19 primeros aminoácidos del extremo N-terminal, debido posiblemente a la movilidad de la cadena, la fijación de AMP no produce ningún cambio en dicho fragmento polipeptídico, sin embargo el hecho de la destrucción de los cristales de enzima en presencia de AMP y el no detectar cambios conformacionales en los cristales que se conservan, indujo a estos autores a admitir que los diagramas de difracción de Rayos-X debían de corresponder al estado T según la terminología de Monod.

El amplio estudio realizado por Morange y col (30) sobre el efecto que la presencia de diferentes efectores ejercía sobre la conversión de la fosforilasa b a fosforilasa a, por acción de la fosforilasa quinasa a 4 y 22°C, puede ofrecernos nuevos datos que permitan caracterizar o al menos plantear una hipótesis sobre la naturaleza del segundo s

tio de unión del sustrato. Las experiencias fueron realizadas a una concentración de fosforilasa b de 1,0 mg/ml.

A 0°C la fijación de AMP a la enzima produce un descenso en la velocidad de conversión del 90%, siendo este descenso dependiente del tiempo de incubación de la enzima con AMP; el tiempo de relajación del proceso es de aproximadamente 2 minutos. A 22°C el descenso en la velocidad de conversión en presencia de AMP es unicamente del 50%.

A 0°C el fosfato produce una inhibición del proceso de conversión del 70%, aumentando al 78% en presencia de AMP 3,7 mM, lo cual supone un descenso del 12% con respecto a los niveles alcanzados con AMP.

Sin embargo, la G-1-P no produce ningún efecto sobre la velocidad de conversión, incluso a concentraciones de 0,1 M.

A 22°C la inhibición producida por el fosfato es del 80%, alcanzando el 85% a una concentración de P_i 55 mM y AMP 5 mM, lo cual supone un incremento del 33% con respecto al efecto inducido por AMP solo. A esta temperatura la G-1-P produce un fuerte incremento de la velocidad de conversión.

Si tenemos en cuenta estos resultados y que según los datos - cristalográficos obtenidos por Madsen y col (27) el cambio conformacional asociado a la fijación del sustrato al sitio catalítico es debido al grupo fosfato, es difícil pensar que el efecto de inhibición del fosfato sea debido a su fijación al sitio catalítico o al sitio de mayor afinidad de AMP, ya que la presencia simultanea de ambos produce un incremento sobre los niveles de inhibición inducidos por cada ligando aisladamente; por otro lado según los datos cristalográficos la G-1-P también puede unirse a este sitio de fijación (26).

Esta diferencia en el comportamiento que presenta la G-1-P y

el P_i , unido al hecho de que Radda y col (43) detectásen la existencia de un complejo terciario fosforilasa b - G-1-P - P_i por RSE y que la entalpía de interacción G-1-P - enzima a 25°C (50) sea aproximadamente la mitad que la correspondiente a la interacción fosfato-enzima, pueden llevarnos a admitir la fijación del P_i a un segundo sitio de unión capaz de modificar el extremo N-terminal de la cadena.

Teniendo en cuenta todos estos datos, podríamos identificar este segundo sitio de unión del fosfato con la segunda región de saturación que presenta la enzima para el sustrato en presencia de AMP, considerando las concentraciones a las que el efecto de inhibición de la conversión es máximo, 55 mM.

Si consideramos el efecto que la unión de AMP a la fosforilasa a ejerce sobre el extremo N-terminal y la existencia de un tiempo de relajación a 4°C para el proceso de inhibición, la acción de AMP podría ejercerse a través de un cambio conformacional que hiciese menos accesible el residuo de serina 14 a la acción de la quinasa, hecho que estaría de acuerdo con el efecto inhibitorio que la fijación de AMP tiene sobre la acción de la fosforilasa fosfatasa (51).

Una de las zonas de la estructura que presenta mayores diferencias entre la forma b y a de la enzima es el extremo N-terminal (52), la fijación del fosfato a la serina-14 produce como indicamos anteriormente una inmovilización de la cadena y un desplazamiento de esta hacia el interior de la proteína (27); si el fosfato fuese capaz de unirse al sitio fosforilable mediante una interacción de carácter iónico con la arginina 69 y producir un cambio conformacional en la estructura enzimática similar al que produce por fosforilación de la enzima, tendríamos la base de un mecanismo bastante adecuado que permitiese justificar la inhibición

del proceso de conversión de la fosforilasa b en a, no asociado a la fi ja ci ón del sustrato al sitio catalítico, considerando los datos ob te ni dos por Morange (30) para la G-1-P.

La simulación por interacción iónica del efecto asociado a un grupo unido covalentemente a la enzima no es nueva en la fosforilasa b, puesto que la enzima reconstituida con piridoxal, completamente in ac ti va, es capaz de activarse en presencia de diferentes iones, análogos del fosfato, por interacción iónica con el subsitio del fosfato de la co en zi ma (53).

Esta hipótesis explicaría el comportamiento de la enzima en presencia de AMP y concentraciones altas de fosfato (50-60 mM) encontrado a 28°C por Vandebunder y col (20), atribuido a una interacción in es pe c í f i c a del fosfato y encajaría con los resultados encontrados por no s o t ros para la fijación del sustrato, indicativos de la existencia de dos diferentes sitios de unión para el P_i por monómero de enzima.

Nos encontramos pues ante un doble mecanismo de control para la conversión de la forma b en la a, ejercido por fijación de AMP a la enzima o por interacción del fosfato con el sitio fosforilable de la misma.

La inducción de un estado enzimático mas próximo al de la fosforilasa a, por fijación con carácter iónico del fosfato al sitio fosforilable estaría de acuerdo con los resultados de activación de la fosforilasa b, obtenidos por Graves y col (54), por acción de diferentes com pu es tos iónicos situados en la parte superior de la serie de Hofmeister y el fosfato, atribuido a su interacción con un sitio específico, en el extremo N-terminal de la cadena, cerca de la superficie de la molécula,

induciendo una modificación de los coeficientes de actividad de los aminoácidos de esta zona de la cadena polipeptídica, similar al ataque produciría la fosforilación de la serina-14, y con los niveles de activación encontrados por Buc (33) en presencia de P_i 200 mM, en ausencia de AMP.

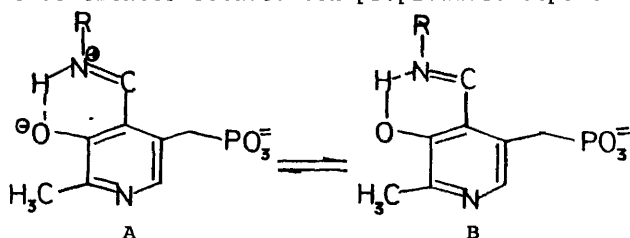
Según los datos de Morange (30) el efecto inhibitorio de la conversión ejercido por AMP, es máximo a saturación de sus dos clases de sitios de unión; si el efecto producido por el nucleótido tiene lugar a través de un cambio conformacional que protege el extremo N-terminal de la acción de la quinasa; a concentraciones saturantes de AMP debe producirse una inhibición progresiva de la fijación del fosfato a su segundo sitio de unión, tanto mayor cuanto más efectivo sea el AMP en promover el cambio conformacional. Todo ello está de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos por nosotros para la fijación del fosfato en presencia de AMP y con la inhibición máxima observada a 14°C para la fijación del sustrato a su segundo sitio de unión a 1,0 mg/ml en presencia de AMP 10 mM, considerando el hecho de que los estados enzimáticos estabilizados a bajas temperaturas por AMP parecen más próximos a los estabilizados para la forma a de la enzima (21).

Así pues y de acuerdo con nuestros datos y los de Morange (30) la inhibición de la conversión de la fosforilasa b en a por acción del fosfato es máxima a altas temperaturas y superior a la inducida por AMP (mayor afinidad del fosfato hacia su segunda clase de sitios de unión a 25°C y menor inhibición en presencia de AMP), mientras que a bajas temperaturas el efecto inducido por AMP es superior al del fosfato, siendo mayor la inhibición producida por la fijación del nucleótido sobre la fijación del fosfato a su segundo sitio de unión, que podría coincidir con el sitio fosforilable de la enzima.

III. 6.- EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA RESOLUCION CON
HIDROXILAMINA

El fosfato de piridoxal se encuentra unido a la fosforilasa b a través de una base de Schiff en un entorno hidrofóbico (55), siendo completamente necesario para la actividad catalítica de la enzima (56).

El estudio del enlace PLP-enzima realizado por diferentes autores (12,13,57,58) puso de manifiesto la existencia de un equilibrio tautomérico entre diferentes estados con propiedades espectroscópicas diferentes.



R \equiv cadena polipeptídica

Las formas A y B del fosfato de piridoxal presentan máximos de absorción a 415 y 330 nm respectivamente y un máximo en la fluorescencia de emisión a 535 nm (13). En entornos hidrofóbicos el equilibrio tautomérico entre ambas formas de la coenzima se encuentra desplazado hacia la forma B (13,57).

En ausencia de agentes deformantes de la conformación enzimática, el intercambio entre el PLP marcado radioactivamente y la coenzima unida a la proteína o su resolución por L-Cisteína es inferior al 7% (57).

A pHs ácidos o en presencia de agentes deformantes se produce un aumento en la banda de absorción centrada a 415 nm y una atenuación de la banda de emisión a 535 nm por excitación a 335 nm (12,59).

García Blanco y col (60) estudiando la fluorescencia de la coenzima a 535 nm, con excitación a 425 nm, en función de la concentración de enzima, encontraron una disminución de la fluorescencia a concentraciones de enzima superiores a 1,4-1,5 mg/ml; teniendo en cuenta las propiedades fluorescentes de la coenzima, este resultado ha de interpretarse como una modificación del entorno del PLP por efecto de la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima. Según estos resultados, a concentraciones de fosforilasa b inferiores a aquellas en que se producía la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima, la coenzima se encuentra en un entorno mas hidrofílico.

Basándonos en estos datos hemos estudiado, en función de la concentración de enzima, la exposición del PLP al medio mediante su reactividad con Hidroxilamina 0,1 M, en las condiciones indicadas previamente en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos para la actividad catalítica de la enzima con respecto a los controles, a tiempos de reacción de 60 y 90 minutos, se encuentran representados en la figura 48 y corresponden a tres preparaciones diferentes de enzima.

A concentraciones inferiores a 2,8 mg/ml se produce una inactivación progresiva de la enzima por tratamiento con hidroxilamina, alcanzándose niveles de actividad enzimática del 76% y del 60% después de 60 y 90 minutos de incubación con el reactivo, a concentraciones de fosforilasa b inferiores a 1,8 mg/ml.

Aunque la hidroxilamina es un reactivo específico de grupos carbonílicos, hemos determinado los niveles de resolución de la enzima mediante valoración del PLP unido a la proteína después de 60 minutos de incubación con hidroxilamina, obteniendo un porcentaje del 76,6% de PLP

FIGURA 48.- Inactivación de la fosforilasa b por resolución de la enzima con hidroxilamina 0,1 M en función de la concentración de enzima. T= 28,6° C. - ● - tiempo de reacción 60 min., - o - tiempo de reacción 90 min.

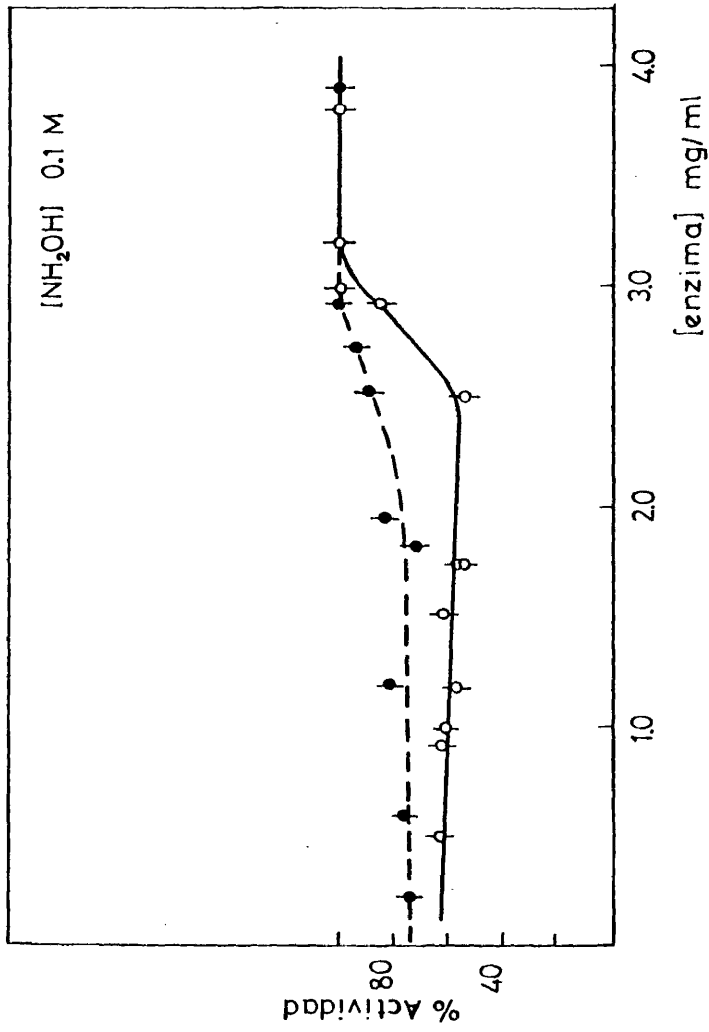


FIGURA 48

unido a la enzima, completamente de acuerdo con los datos de inactivación.

Según los resultados obtenidos, la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima, lleva asociada la estabilización de una conformación enzimática en la cual la coenzima es capaz de reaccionar con reactivos específicos de grupos carbonílicos, en ausencia de agentes distorsionantes, a pH 6,5, condiciones en las que la actividad catalítica es máxima.

Los datos obtenidos no nos permiten determinar el nivel de población de esta conformación enzimática, ya que la acción de la hidroxilamina puede ejercerse por desplazamiento del equilibrio transconformacional, aunque la especie enzimática esté termodinámicamente poco favorecida.

Pfeuffer y col (57) mediante estudios con diferentes análogos del PLP, encontraron que la estabilidad del enlace entre la coenzima y la proteína dependía fundamentalmente del nitrógeno del anillo de piridina, del -OH en posición 3 y de la existencia del grupo fosfato en posición 5; por modificación de uno cualquiera de los dos primeros aumentaba la reactividad del doble enlace de la base de Schiff con BH_4Na y L-Cisteína, estos datos y el aumento en la banda de absorción a 415 nm, hacen pensar que las interacciones entre estos grupos y la proteína, son directamente responsables del mantenimiento de la coenzima en un entorno hidrofóbido. Por todo ello y teniendo en cuenta que no existe modificación en el grupo -OH en posición 3, la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima, podría suponer un cambio en la posición relativa del anillo de PLP con respecto a la proteína que modificase las interacciones entre el N del anillo de la coenzima y la cadena proteica.

III. 7.- EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA CONVERSION DE LA FOSFORILASA b EN FOSFORILASA a POR ACCION DE LA FOSFORILASA QUINASA

Los resultados obtenidos en el apartado cuatro del presente capítulo, indicaban la existencia de diferencias en el proceso de activación por AMP de la fosforilasa b, según la concentración de enzima fuese 1,0 ó 3,0 mg/ml. En el presente apartado se encuentran recogidos los resultados preliminares obtenidos sobre el efecto que la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima ejerce en el proceso de activación por modificación covalente de la enzima.

Las experiencias fueron realizadas, en las condiciones indicadas en materiales y métodos, a dos concentraciones de enzima, 1,0 y 3,0 mg/ml. El proceso de conversión fue seguido midiendo la variación de la actividad catalítica de la fosforilasa en función del tiempo, en ausencia de AMP.

Los resultados obtenidos, para la velocidad inicial de fosforilación y para los niveles máximos de conversión alcanzados, se encuentran recogidos en la TABLA XIII.

T A B L A XIII

[Enzima] mg/ml	V_{inicial} (U.A.A.) / m.	% Conversión
1,0	0,85	40
3,0	2,05	100

U.A.A. \equiv unidades arbitrarias de actividad catalítica para la fosforilasa a.

Teniendo en cuenta los valores iniciales de la velocidad de conversión y la diferencia en la concentración de fosforilasa b en el medio de reacción, caben dos posibilidades, que el proceso de conversión sea mas rápido a 1,0 mg/ml ó que nos encontremos fuera de la zona lineal de concentraciones del sustrato.

El nivel máximo de conversión alcanzado a 1,0 mg/ml es unicamente del 40 % con respecto del valor obtenido a 3,0 mg/ml.

Estos resultados, aunque bastante preliminares, puesto que habría que ampliar el estudio del proceso de conversión a mas concentraciones de enzima y estudiar el efecto que ejercen sobre él diferentes efectores, parecen indicar de una manera bastante clara, la existencia de diferencias en el proceso de fosforilación de la enzima por acción de la quinasa, según la concentración de fosforilasa b sea superior o inferior al intervalo de concentración en que se produce la transición conformacional dependiente de la concentración de enzima.

Cuanto mayor es la concentración de enzima, mayores son los niveles de actividad alcanzados por modificación covalente o por la unión de AMP a su primera clase de sitios de unión, mientras que a bajas concentraciones de enzima y altos niveles de AMP (saturación de dos sitios por monómero), la enzima presenta niveles de actividad similares a los del estado existente a altas concentraciones de enzima a niveles inferiores de AMP (ocupación de una sola clase de sitios de unión), siendo este estado inhibido por niveles de AMP que permitan saturar sus dos clases de sitios de unión.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Merino, C. G., García Blanco, F., y Laynez, J., (1976), *Febs Letters* 68, 129-131.
- 2.- Merino, C.G., (1977), Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- 3.- Buc, M. H., y Buc, H., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 52, 575-588.
- 4.- Merino, C.G., Menéndez, M., Pocovi, M., García Blanco, F. y Laynez, J., *J. Biochem.*, "in press".
- 5.- Keller, P. J., Cori, G.T., (1953), *Biochem. Biophys. Acta*, 12, 235-238.
- 6.- Cohen, P., Dwever, T., y Fischer, E. H., (1971), *Biochem.*, 10, 2683-2694.
- 7.- Seery, V., Fischer, E. H., y Keller, D. C., (1967), *Biochem.*, 6, - 3315-3327.
- 8.- Buc, M. H., Ullman, A., Goldberg, M., y Buc, H., (1971), *Bochimie*, 53, 283-289.
- 9.- Pocovi, M., (1979), Tesis Doctoral, Universidad de Palma de Mallorca
- 10.- Menéndez, M., Usobiaga, P., Laynez, J., Pocovi, M., y García Blanco, F., (1978), *Studia Boiphysica*, 70, 229-236.
- 11.- Kent, A. B., Krebs, E. G. y Fischer, E. H., (1958), *J. Biol. Chem.* 232, 549
- 12.- Cortijo, M., Steinberg, I. Z., y Shaltiel, S., (1971), *J. Biol. Chem* 246, 933-938.
- 13.- Cortijo, M., Llor, J., Jiménez, J. S. y García Blanco, F., (1976), 65, 521-527.
- 14.- Kasvinski, P. J. y Meyer, W. L., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.* 181 616-631.

- 15.- Birkett, D. J., Dwek, P. A., Radda, G. K., Richards, R. E. y Salmon, A. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, 20, 494-508.
- 16.- Kastenschmidt, L. L., Kastenschmidt, J., y Helmreich, E., (1968), *Biochem.* 7, 4543-3556.
- 17.- Buc, H., Buc, M. H., García Blanco, F., Morange, M., Winkler, H., (1973), in *Metabolic Interconversion of Enzymes*, New York, N. Y., Springer Verlag, 21-31.
- 18.- García Blanco y col. Comunicación privada.
- 19.- Kastenschmidt, L. L., Kastenschmidt, J., y Helmreich, E., (1968), *Biochem.*, 7, 3590-3608.
- 20.- Vandebunder, B., Dreyfus, M., y Buc, H., (1978) *Biochem.*, 17, 4153-4160.
- 21.- Shimomura, S., y Fukui, T., (1976), *Biochem.* 15, 4438-4446.
- 22.- Madsen, N. B., Avramovic-Zikic, O., Lue, P. F., y Honikel, K. O., (1976), *Mol. Cell. Biochem.*, 11, 35-50.
- 23.- Buc, H., Morange, M., García Blanco, F., y Danchin, A., (1975), *Mechanics of Action and Regulation of Enzymes*. (T. Kletli, ed.) North-Holland, Amsterdam, 57-76.
- 24.- Ho, H. C. y Wang, J. H., (1973), *Biochem.*, 12, 4750-4755.
- 25.- Leach., *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*, Part B, 1-98.
- 26.- Johnson, L. N., Stura, E. A., Wilson, K. S., Samson. M. S. P., y Weber, I. T., (1979), *J. Mol. Biol.*, 134, 639-653.
- 27.- Madsen, N. B., Kasvinski, P. J., y Fletterick, R. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 9097-9101.
- 28.- Okazaki, T., Nazakawa, A., y Hayaiishi, O., (1968), *J. Biol. Chem.*, 243, 5266-5271.
- 29.- Brown, W. E. L., y Hill, A. V., *Proc. Roy. Soc., (London)*, B 94, 297, 1929.

- 30.- Morange, M., (1979), These de Doctorat, D'Etat. Université de Paris VII.
- 31.- Helmreich, E., y Cori, C. F., (1964), Proc. Natl. Acad. Sci., 51, 131-138.
- 32.- Black, W. J., y Wang, J. H., (1968), J. Biol. Chem., 243, 5892-5898.
- 33.- Buc. H., (1967), Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 59-64.
- 34.- Griffiths, J. R., Dwek, R. A., y Radda, G. K., (1976), Eur. J. Biochem., 61, 237-242.
- 35.- Morange, M., García Blanco, F., Vandebunder, B., Buc. H., (1976), Eur. J. Biochem., 65, 553-563.
- 36.- Steiner, R. F., Greer, L., y Bhat, R., (1979), Biochem., 18, 1380-1385.
- 37.- Palou, J., (1979), Tesis Doctoral, Universidad de Palma de Mallorca.
- 38.- Wang, J. H., Kwok, S., Wirch, E., y Suzuki, I., (1970), Biochem. Biophys. Res. Comm., 46, 1340-1347.
- 39.- Monod, J., Wyman, J., y Changeux, J. P., (1965), J. Biol. Chem., 240, 88-118.
- 40.- Merino, C. G., García Blanco, F., y Laynez, J., (1977), Febs Letters 73, 97-100.
- 41.- Kasvinski, P. J., Madsen, N. B., Sygusch, J., y Fletterick, R. J., (1978), J. Biol. Chem., 253, 3343-3351.
- 42.- Morange, M., García Blanco, F., Merino, C. G., Comunicación privada.
- 43.- Griffiths, J. R., Dwek, R. A., Radda, G. K., (1976), Eur. J. Biochem., 61, 243-251.
- 44.- Campbell, I. D., Dwek, P. A., Price, N. C. y Radda, G. K., (1972), Eur. J. Biochem., 30, 339-347.
- 45.- Chachaty, C., Forchioni, A., Morange, M., Buc, H., (1978), Eur. J. Biochem., 82, 363-372.

- 46.- Helmreich, E., Michaelides, M. C., y Cori, C. F., (1967), *Biochem*, 6, 3695-3710.
- 47.- Busby, S. J. W., y Radda, G. K., (1976), *Curr. Top. Cell. Regul.*, 10, 89-160.
- 48.- Johnson, L. N., Weber, I. T., Wild, D. L., Wilson, K. S., y Yeates, D. G. R. (1978), *J. Mol. Biol.*, 118, 579-591.
- 49.- Hoerl, M., Feldmann, K., Schnackerz, K., y Helmreich, E., (1979), *Biochem.*, 18, 2457-2464.
- 50.- Leyva J. C., (1979), Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- 51.- Yan, S. C., Uhing, R. J., y Parrish, R. F., Metzler, D. E., y Graves, D. J., *J. Biol. Chem.*, 254, 8263-8269.
- 52.- Fletterick, R. J., Sygusch, J., Murray, N., Madsen, N. B., y Johnson L. N., (1976), *J. Mol. Biol.*, 103, 1-13.
- 53.- Parrish, R. F., Uhing, R. J., y Graves, D. J., (1977) *Biochem.*, 16, 4824-4831.
- 54.- Sealock, R. W., y Graves, D. J., (1967), *Biochem*, 6, 201-207.
- 55.- Shaltiel, S., y Cortijo, M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 41, 594-600.
- 56.- Illingworth, B., Jansz, H. S., Brown, D. H., y Cori, C. F., (1958), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 44, 1180-1191.
- 57.- Pffeuffer, T., Ehrlich, J., y Helmreich, E., (1972), *Biochem.*, 11, 2136-2146.
- 58.- Shimomura, S., y Fukui, T., (1977), *J. Biochem.*, 81, 1781-1790.
- 59.- Hedrick, J. L., Shaltiel, S., y Fisher, E. H., (1969), *Biochem*, 8, 2422-2428.
- 60.- García Blanco, F., Sanchez, C., Palou, J., Laynez, J., y Gutierrez

Merino, C., "75 Aniversario de la Real Sociedad Española de Física y Química, (1978), Sección de Bioquímica, 15-16.

CONCLUSIONES

C O N C L U S I O N E S

La fosforilasa b de músculo de esqueleto de conejo, presenta una transición conformacional, dependiente de la concentración de enzima, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 1,5 y 2,5 mg/ml, que modifica sus propiedades hidrodinámicas y termodinámicas en todo el intervalo de temperaturas estudiado (14 a 30°C)

En todo el intervalo de temperaturas estudiado (14 a 30°C), los estados enzimáticos estabilizados a concentraciones de enzima superiores e inferiores a aquellas en que se produce la transición conformacional dependiente de la concentración, presentan dos sitios de unión con diferente afinidad para el activador alostérico AMP.

El estudio de la interacción fosforilasa b-AMP y fosforilasa b-fosfato realizado en función de la temperatura muestra la existencia de dos transiciones conformacionales inducidas por la temperatura, tanto a 1,0 mg/ml como a 3,0 mg/ml, centradas a 23 y 20°C aproximadamente que modifican los parámetros termodinámicos asociados a la interacción del nucleótido y el sustrato con la enzima, en ausencia y en presencia de glucógeno.

El equilibrio dímero \rightleftharpoons tetrámero es desplazado por la unión de AMP hacia la formación de este último, tanto más cuanto menor es la temperatura. Los niveles de agregación inducidos por la unión de la primera molécula de AMP disminuyen a saturación de la segunda clase de si

tios de unión.

El equilibrio dímico \rightleftharpoons tetrámero en presencia de AMP, es modificado por efecto de la temperatura, tanto en los valores de la constante de equilibrio, cuya representación de Van't Hoff presenta una discontinuidad hacia 23-25°C, como en la velocidad a que se alcanza el equilibrio, siendo este particularmente rápido entre 20 y 25°C.

La afinidad de AMP hacia sus dos sitios de unión en la enzima a 25°C, aumenta al disminuir el pH desde 7,23 a 6,5, posiblemente debido a un desplazamiento por efecto del pH de los equilibrios conformacionales que la fosforilasa b presenta en disolución, hacia el estado con mayor afinidad hacia el nucleótido y los sustratos.

El estudio comparativo del comportamiento de la fosforilasa b en función de la temperatura y el pH parece indicar, que en las condiciones en que se realizó el estudio en función de la temperatura, la transición conformacional detectada en torno a 23-25°C es inducida por la variación del pH del tampón asociada al incremento de temperatura.

La presencia de AMP, a concentraciones crecientes, en el medio de reacción, parece poner de manifiesto la existencia de dos sitios para la fijación del sustrato, uno de los cuales correspondería al sitio catalítico, cuya afinidad hacia el fosfato aumenta en presencia de AMP, y un segundo sitio de unión por monómero, cuya afinidad hacia el fosfato desciende en presencia del nucleótido, y que podría coincidir con el sitio de unión para el fosfato unido covalentemente en la fosforilasa a, existiendo en nuestro caso únicamente una interacción iónica con la arginina 69.*

La interacción del fosfato con este segundo sitio de unión se ve modificada por efecto de la temperatura y de la transición conforma

cional dependiente de la concentración de enzima.

No parece existir una competición entre el sustrato y AMP por el sitio de mayor afinidad hacia el nucleótido, ni competición, por unión a estados conformacionales diferentes, entre la fijación del sustrato al sitio catalítico y la fijación de AMP o Adenina al sitio mas específico de las bases.

La fijación de AMP a su segunda clase de sitios de unión mo modifica el comportamiento catalítico de la enzima, produciendo una inhi bición de la catálisis a concentraciones de enzima de 3,0 mg/ml y ac tivándola a concentraciones de fosforilasa b de 1,0 mg/ml.

La transición conformacional dependiente de la concentración de enzima modifica el proceso de conversión de la fosforilasa b a fosforilasa a por acción de la fosforilasa quinasa, de tal forma que los niveles de transformación alcanzados a 1,0 mg/ml son del orden del 40% de los alcanzados a 3,0 mg/ml.

La transición conformacional dependiente de la concentración de enzima modifica la exposición del cofactor al medio, permitiendo la resolución del PLP unido a la enzima con hidroxilamina, en ausen cia de agentes distorsionantes de la conformación enzimática y a pH 6,5, a el cual la actividad catalítica es máxima, a concentraciones de enzima inferiores a aquellas en que se estabiliza el estado conformacio nal existente a altas concentraciones de enzima.



Ver referencia 27 de Resultados y discusión.