

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Topología del complejo multienzimático ácido graso  
sintetasa del insecto *Ceratitis capitata***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Mercedes Oñaderra Sánchez**

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

1  
TP  
1982  
087



84 - 600 - 2507 - 1

**Topología del complejo  
multienzimático  
ácido graso sintetasa  
del insecto  
Ceratitis capitata**

Tesis Doctoral

por

MERCEDES OÑADERRA SANCHEZ

Madrid, Diciembre 1981



BIBLIOTECA

I. S. B. N.: 84-600-2507-1  
DEPOSITO LEGAL: M-10776-1981  
IMPRESO EN ESPAÑA  
1981

*EDITA:* Departamento de Bioquímica - Facultad de Ciencias Químicas.  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
Ciudad Universitaria - Madrid-3

---

*Fotocompuesto e impreso por:* GRAFICAS LUCENTUM, S. A. - Soturno de Calles, 6 - MADRID-2 - 1981.

*La presente investigación se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, bajo la dirección del Prof. D. Angel Martín Municio y del Prof. D. José G. Gavilanes, a quienes deseo expresar mi agradecimiento por su constante apoyo y ayuda.*

*De igual manera quiero agradecer su colaboración a mis compañeros Dra. M.<sup>a</sup> Antonia Lizarbe, Dra. Rosalia Rodríguez, Gonzalo González de Buitrago y Nieves Olmo por su ayuda en las distintas fases de elaboración de este trabajo.*



## INDICE

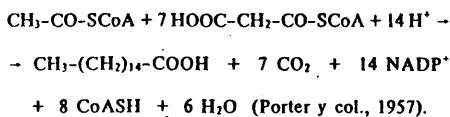
	<u>Página</u>
<b>INTRODUCCION</b> . . . . .	7
Acido graso sintetasa.	
Acido graso sintetasa de <i>Ceratitis capitata</i> .	
Objetivo de la presente investigación.	
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> . . . . .	15
Material biológico.	
Determinación de la actividad enzimática.	
Valoración de proteínas.	
Aislamiento.	
Espectro de absorción ultravioleta.	
Dicroísmo circular.	
Fluorescencia.	
Polarización de fluorescencia.	
Análisis de aminoácidos.	
Grupos -SH libres.	
Nitración.	
Aislamiento y separación de clases de lípidos. Cromatografía en capa fina.	
Preparación y análisis de esteres metílicos.	
Determinación cuantitativa de las distintas clases de lípidos.	
Deslipidación de la enzima.	
Adición de lípidos.	
Tratamiento con detergentes.	
Obtención del lipopolisacárido <sup>14</sup> C. de <i>E. coli</i> .	
Interacción ácido graso sintetasa-lipopolisacárido de <i>E. coli</i> .	
Preparación de dansilfosfatidiletanolamina (DPE).	
Incorporación de marcadores de fluorescencia.	
Disociación de la proteína.	
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> . . . . .	23
Aislamiento de ácido graso sintetasa.	
Caracterización espectroscópica de ácido graso sintetasa del insecto.	
Estudio topológico de los componentes del complejo enzimático.	
Función de los fosfolípidos en la estructura de la enzima.	
Relaciones estructura-función y su dependencia con los fosfolípidos del sistema.	
Estudio topológico de los sitios activos de la enzima.	
Separación de las subunidades de <i>ácido graso sintetasa</i> de <i>C. capitata</i> .	
<b>CONCLUSIONES</b> . . . . .	41
<b>BIBLIOGRAFIA</b> . . . . .	45



## INTRODUCCION

### Acido graso sintetasa.

Recibe el nombre de ácido graso sintetasa el complejo enzimático que cataliza la biosíntesis "de novo" de ácidos grasos a partir de malonil-CoA, acetil-CoA y un agente reductor. La estequiometría global de la síntesis (Porter et al., 1957), de ácido palmítico es:



Reacción que transcurre con arreglo a mecanismos análogos en sistemas enzimáticos de diferentes materiales biológicos (Lynen, 1961; Porter et al., 1971), existiendo sin embargo diferencias esenciales en cuanto a la estructura macromolecular y a la organización de las actividades enzimáticas del conjunto de refferere. Atendiendo a estas diferencias, los sistemas enzimáticos ácido graso sintetasa se han clasificado en dos grandes grupos:

*Acido graso sintetasa tipo I*, o complejos multienzimáticos. En organismos como *S. cerevisiae* (Lynen, 1961 y 1967; Carey et al., 1970), aves (Hsu et al., 1965 y 1970a; Yang et al., 1967), mamíferos (Burton et al., 1968; Smith y et al., 1970; Larrabee et al., 1965) y en algunos microorganismos como *M. smegmatis* (Brinley et al., 1970) o *C. diptheriae* (Knoche et al., 1973) la enzima ha sido aislada como un complejo multienzimático que lleva a cabo el proceso global de biosíntesis de ácidos grasos. Estos sistemas enzimáticos presentan distintas características en cuanto a requerimientos de sustratos, especificidad de cofactores, aspectos estructurales, etc. según los diferentes orígenes.

*Acido graso sintetasa tipo II*, o sistemas fácilmente disociables. De manera diferente a como sucede en los casos anteriores, cuando se trata de vegetales como mesocarpio

de aguacate (Vagelos et al., 1966), cloroplastos de lechuga (Overath et al., 1964) y espinacas (Brooks et al., 1966) o de bacterias como *E. coli* (Simoni et al., 1967; Saito et al., 1980), *C. kluyveri* (Huang et al., 1971) y *B. subtilis* (Majerus et al., 1964) el sistema se obtiene como un conjunto de proteínas no asociadas fuertemente, en el que cada una de ellas cataliza alguna de las correspondientes reacciones individuales del proceso. (Hendren et al., 1980). En todos los casos, estos sistemas utilizan NADH y NADPH como agentes reductores, siendo diferente el esquema de los ácidos grasos biosintetizados en función de la entidad biológica correspondiente.

Dentro del esquema de biosíntesis de ácidos grasos hay que destacar el papel central de la proteína transportadora de grupos acilo (ACP). Dicha proteína ha sido identificada y ampliamente caracterizada en los sistemas enzimáticos tipo II, teniendo como características más significativas su bajo peso molecular, su abundancia en residuos ácidos y la presencia de 4'-fosfopanteteína, cuyo resto -SH final se une a los grupos acilo a través de un enlace tioéster y actúa como receptor en la transacilación de grupos acético y malónico (Vanamau et al., 1968; Overath et al., 1964; Simoni et al., 1967).

Los intentos realizados para el aislamiento de la ACP de los complejos multienzimáticos no han dado resultados totalmente satisfactorios. De *S. cerevisiae* (Qureshi et al., 1974 y 1976) se ha aislado una proteína capaz de aceptar grupos acetilo y malonilo a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, en presencia de una transacilasa. Esta ACP posee β-alanina, lo que parece indicar la existencia del grupo de 4'-fosfopanteteína; su peso molecular 9100 es similar al de *E. coli* (9750).

El mecanismo de las reacciones de biosíntesis de ácidos grasos, semejante en las diversas especies estudiadas, ha sido ampliamente descrito por Lynen en *S. cerevisiae* (Lynen, 1961 y 1967) y por Porter en hígado de pichón (Porter et al., 1971).



Lynen (Lynen, 1961) ha identificado la existencia de dos tipos diferentes de grupos sulhidrilo, uno perteneciente a la 4'-fosfopanteteína, que denomina grupo central (C), y otro periférico, perteneciente a un residuo de cisteína (P), a los que se une acético y malónico respectivamente. El grupo tiólico de la 4'-fosfopanteteína estaría situado en el centro del complejo formado por las subunidades enzimáticas activas. Los restos acilo que permanecen unidos covalentemente a este grupo van siendo modificados sucesivamente por los diferentes centros catalíticos.

Estudios posteriores, llevados a cabo sobre los puntos de enlace de los restos acetilo y malonilo en las cadenas de ácido graso sintetasa de *S. cerevisiae* señalan dos tipos de localizaciones, uno tiólica y otro no tiólica (Schweizer et al., 1970a; Engeser, 1977). El grupo acetilo se uniría a tres localizaciones caracterizadas químicamente como dos grupos tiólicos diferentes (A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>) y un grupo hidroxílico (B<sub>1</sub>); el grupo malonilo sólo se une a dos localizaciones (A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub>).

En hígado de pichón, Porter (Porter et al., 1971) propone un mecanismo similar al descrito por Lynen, en el que además hace una serie de consideraciones conformacionales con las que trata de explicar dicho mecanismo de biosíntesis. Las tres localizaciones han sido identificadas como dos grupos tiólicos -pertenecientes a una cisteína de la enzima condensante y a la 4'-fosfopanteteína (Chesteron et al., 1968; Phillips et al., 1970)- y el grupo hidroxílico de una serina (Ziegenhorn et al., 1972).

La importancia de los grupos -SH dentro del complejo ácido graso sintetasa se pone de manifiesto en el tratamiento con iodoacetamida, que lleva a la completa desaparición de la actividad enzimática por pérdida de la actividad condensante (Oesterhelt et al., 1977; Kresze et al., 1977), siendo el grupo tiólico periférico más sensible a la iodoacetamida que el grupo tiólico central. Este grupo periférico identificado como un residuo de cisteína, está presumiblemente implicado en la catálisis de la reacción de condensación. Dado que el mecanismo químico para la síntesis de ácidos grasos no parece presentar diferencias esenciales en los organismos estudiados (Linn et al., 1980), la diferencia fundamental entre los dos tipos de sistemas enzimáticos ácido graso sintetasa estriba en la estructura macromolecular y en la organización de las actividades del conjunto.

La organización del complejo multienzimático constituye un aspecto de especial controversia; el conjunto puede estar formado por enzimas individuales, polipéptidos unidos por interacciones no covalentes con ACP formando un complejo multienzimático. Esta estructura se describe en *S. cerevisiae* (Lynen, 1961), hígado de pichón (Yang et al., 1967), e hígado de pollo (Bratcher et al., 1976), en los que se detectó la presencia de varias cadenas polipeptídicas de bajo peso molecular.

Se propone, por otro lado, una estructura formada por dos cadenas polipeptídicas multifuncionales, bien idénticas y poseedoras ambas de todos los centros catalíticos, o funcionalmente independientes, de igual o similar peso molecular, conteniendo cada una de ellas varias de las actividades parciales del complejo. En *M. smegmatis* (White, 1978) y en glándula mamaria de rata (Smith et al., 1979), se ha descrito un complejo formado por dos cadenas polipeptídicas polifuncionales idénticas. (Poulou et al., 1980). Igualmente se propone un modelo similar en eritrocitos de pichón (Jenik et al., 1981). Un modelo para la ácido graso sintetasa de *S. cerevisiae* fue postulado por Lynen en 1967. El complejo estaría formado por un agregado de siete componentes monofuncionales, de peso molecular 110 000 presentes cada uno de ellos en más de una copia, pensándose en una estructura a base de tres conjuntos funcionalmente idénticos, de peso molecular 700 000, ya que se había observado la presencia de tres moles de 4'-fosfopanteteína por mol de enzima.

Un nuevo modelo surgió para la ácido graso sintetasa de *S. cerevisiae* basado en el análisis genético de auxótrofos de ácidos grasos llevado a cabo por Schweizer et al. (1970b, 1971 y 1978) que muestra que el complejo está codificado por dos loci no unidos entre sí en el genoma y designados como fas 1 y fas 2. Cada uno de estos genes policistronicos codificaría para un conjunto de funciones secuenciales cuya suma constituye la catálisis del complejo; por tanto, la ácido graso sintetasa de *S. cerevisiae* estaría formada por múltiples copias de sólo dos polipéptidos multifuncionales.

El tratamiento del complejo de *S. cerevisiae* con 3, 4, 5, 6-anhidrido tetrahidrofólico, seguido de cromatografía en DEAE-biogel, ha permitido a Stoops et al. (1978a) la separación del complejo en dos subunidades funcional y estructuralmente distintas. Las dos subunidades están presentes en igual proporción y sus pesos moleculares han sido estimados en 210 000 y 200 000. Se ha propuesto un modelo (Stoops et al., 1978b) para la ácido graso sintetasa de *S. cerevisiae*, a base de una estructura de conjuntos de tetrámeros y hexámeros, dependiendo la actividad enzimática del grado de agregación.

La disociación del complejo de *S. cerevisiae* con anhidrido dimetilmalcico, conduce también a la separación en dos subunidades de diferente composición en aminoácidos. La subunidad B posee las actividades de malonil, palmitoil y acetil transferasa, enoil reductasa y dehidrasa; la subunidad A posee las actividades de B-cetoacil sintetasa y B-cetoacil reductasa (Wieland et al., 1979). Se propone una estructura macromolecular de A<sub>4</sub>B<sub>6</sub>. (Stoops et al., 1980).

La ácido graso sintetasa de hígado de pichón (Kumar et al., 1970), rata (Burton et al., 1968) y pollo (Iisu et al., 1970b) no se ha logrado separar en subunidades activas, aunque se ha conseguido disociar el complejo, con pérdida de la actividad total, en dos subcomplejos de peso molecular mitad. Los subcomplejos catalizan todas las reacciones

parciales del complejo intacto, excepto la reacción de condensación. Estas subunidades parecen no ser idénticas, ya que sólo se ha encontrado un mol de 4'-fosfopantetina por mol de complejo sin disociar, pudiendo ser subcomplejos idénticos en tamaño molecular, pero diferentes en carga.

El complejo multienzimático de hígado de pichón se ha conseguido separar en dos formas apo y holo enzima. La separación se ha realizado por cromatografía de afinidad en Sepharosa- $\epsilon$ -aminocaproil pantetina (Qureshi et al., 1975a; Kim et al., 1977). La diferencia entre estas dos enzimas es la presencia o ausencia de 4'-fosfopantetina. Debido a la ausencia de este grupo la ácido graso sintetasa pierde la facultad de sintetizar ácidos grasos, al no poseer actividad condensante.

Del mismo modo, Qureshi et al. (1975b) separan el complejo multienzimático de hígado de pichón en una forma apo y dos formas holo (holo a y holo b). La forma holo a (defosforilada), presenta una elevada actividad específica y la forma holo b (fosforilada), una baja actividad. La forma apo, sin 4'-fosfopantetina, es inactiva para la síntesis de ácidos grasos. El mecanismo de regulación de la actividad podría tener lugar por modificación covalente del complejo en un equilibrio, fosforilación-defosforilación.

La acción de reactivos que actúan modificando ciertos residuos de la proteína, ha sido estudiada por Porter et al. (1979) y ha permitido la separación por cromatografía de intercambio iónico de las dos subunidades del complejo de hígado de pichón. Lornitzo et al. (1974 y 1975) han separado el complejo multienzimático de hígado de pichón en dos subunidades por cromatografía de afinidad en Sepharosa- $\epsilon$ -aminocaproil-pantetina. La subunidad I, -reductasa-contiene las actividades de  $\beta$ -cetaacil y enoil reductasa y la subunidad II-transacilasa- las de acetil y malonil-transacilasa. Ambas subunidades poseen las actividades parciales de deshidratasa y desacilasa. La inhibición de varias de estas actividades catalíticas ha sido estudiada

como efecto de la interacción antígeno-anticuerpo (Kattigar et al., 1980).

#### Ácido graso sintetasa de *Ceratitis capitata*.

El punto de partida de esta investigación ha sido el conjunto de trabajos sobre el metabolismo del insecto *Ceratitis capitata* (\*) y, en particular sobre el aislamiento, purificación de características estructurales y funcionales del complejo multienzimático ácido graso sintetasa de dicho insecto (Municio et al., 1977).

La actividad de ácido graso sintetasa a lo largo del desarrollo del insecto muestra un máximo en el tercer estadio del desarrollo larvario, para descender a continuación progresivamente hasta anularse en la apolisis larva-pupa y durante todo el estado de adulto farato. Después de la emergencia del insecto adulto, reaparece la actividad enzimática, que aumenta hasta alcanzar un valor del 40% del máximo exhibido por la larva de cinco días de edad (Lizarbe et al., 1977). La carencia de actividad enzimática en el estado de adulto farato viene justificada por la ausencia de niveles de la enzima en dicho estado. Sin embargo, las diferencias de actividad en los estados de larva y adulto, no son el reflejo de diferencias en el contenido de enzima, por lo que deben interpretarse en orden a la presencia de mecanismos especiales de regulación (Relaño, 1978).

Estos resultados condujeron al aislamiento del sistema enzimático. El sistema enzimático ácido graso sintetasa aislado a partir de larvas de 5-6 días de desarrollo se comporta, al igual que en aves y mamíferos como un complejo multienzimático. A partir de acetil-CoA y malonil-CoA el principal ácido graso sintetizado es el ácido palmítico, siguiéndole en importancia los ácidos láurico y mirístico todos ellos en su forma libre. Para su actuación requiere como nucleótido reducido NADPH, siendo la actividad muy baja en presencia de NADH. En

\* Municio, A. M., Odriozola, J. M., Piñeiro, A. y Ribera, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 248, 212.; Municio, A. M., Odriozola, J. M. y Ribera, A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 280, 248.; Municio, A. M., Odriozola, J. M., Piñeiro, A. y Ribera, A. (1973) *Insect. Biochem.* 3, 19.; Municio, A. M., Odriozola, J. M., Pérez-Albarsanz, M. A., Ramos, J. A., y Relaño, E. (1974) *Insect. Biochem.* 4, 401.; Municio, A. M., Odriozola, J. M., Pérez-Albarsanz, M. A. y Ramos, J. A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 360, 289. Municio, A. M., Lizarbe, M. A., Relaño, E. y Ramos, J. A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 487, 175; Lizarbe M. A., Municio, A. M., Ramos, J. A., Relaño, E. (1977) *Insect. Biochem.* 7, 415; Gavilanes, J. G., Lizarbe, M. A., Municio, A. M. y Oñaderra, M. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 998.; Gavilanes, J. G., Lizarbe, M. A., Municio, A. M., Ramos, J. A. y Relaño E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4015.; Lizarbe, M. A., Megías, A., Municio, A. M. y Oñaderra T. (1980) *Comp. Biochem. Physiol.* 65 687. HISTONAS [Franco, L., Montero, F., Navlet, J., Perera, J. y Rojo, C. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 53; Franco, L., Montero, F. y Rodríguez-Molina, J. J. (1977) *FEBS Lett.* 78, 317; Franco, L., Nieto-Sandoval, R. M. y Perera, J. (1979) *Insect. Biochem.* 9, 31]; Barbero, J. L., Franco, L., Montero, F. y Morán, F. (1980) *Biochemistry* 19, 4080. CITOCROMO c [Fernández-Sousa, J. M., Gavilanes, J. G., Municio, A. M., Paredes, J. A., Pérez-Aranda, A. y Rodríguez, R. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 393, 358]; LISOZIMA [Fernández-Sousa, J. M., Gavilanes, J. G., Municio, A. M., Pérez-Aranda, A. y Rodríguez, R. (1977) *Eur. J. Biochem.* 72, 25]; L-GLICEROL-3-FOSFATO DESHIDROGENASA [Fernández-Sousa, J. M., Gavilanes, J. G., Municio, A. M. y Pérez-Aranda, A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 481, 6]; FRUCTOSA 1, 6 BISFOSFATO ALDOLASA [Fernández-Sousa, J. M., Gavilanes, J. G., Gavilanes, F. G., y Paredes, J. A. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 188, 456]; Gavilanes, F., Gavilanes, J. G. y Municio A. M. (1981) *Int. J. Prot. Pep. Res.* 17, 539. Gavilanes, F., Gavilanes, J. G. y Municio, A. M. (1981) *Int. J. Prot. Pep. Res.* 18 (en prensa).

la tabla I se recogen algunas de las características de la enzima de *Ceratitis capitata*. (Relaño, 1978; Lizarbe, 1979).

Tabla I. Características del sistema enzimático ácido graso sintetasa de *Ceratitis capitata*.

Sustratos	Acetil-CoA, malonil-CoA
Producto mayoritario	Acido palmítico
Productos minoritarios	Acidos laurico y mirístico
Cofactores	NADPH
Peso molecular	650000 (baja concentración de proteína) 1000000 (alta concentración de proteína)
$K_M$ (NADPH)	15,4 $\mu$ M
$K_M$ (acetil-CoA)	10,5 $\mu$ M
$K_M$ (malonil-CoA)	80 $\mu$ M
$\epsilon^{9,1\%}$ 1 cm, 280 nm	1.11
Punto isoeléctrico	6.0
Volumen específico parcial ( $cm^3/g$ )	0.731

Estudios de los valores de la función de variación de Marchanalis y Weltman (1971) para la ácido graso sintetasa de diferentes especies dan una mayor homología, en lo que a composición de aminoácidos se refiere, entre las enzimas de *C. capitata* y *S. Cerevisiae* que incluso entre las de pichón y glándula mamaria de rata. Por el contrario, la menor homología se da entre la enzima de insecto y la de glándula mamaria.

La presencia de lípidos va ligada a la actuación catalítica del sistema, siendo esta característica estructural de especial significación, pues identifica el complejo multienzimático de *C. capitata* como una lipoproteína cuya actividad depende de la asociación lípido-proteína. El componente

lipídico es esencial para la actividad y la relación lípido/proteína aumenta con la purificación del complejo, y es próxima a la unidad en muestras activas después del último paso de purificación, mientras que la enzima deslipidizada por disolventes orgánicos es totalmente inactiva (Gavilanes et al., 1979).

La especificidad del componente lipídico de la enzima del insecto se pone de manifiesto al comparar su composición con la de fracción soluble de larva. La tabla II muestra los datos obtenidos en el análisis cualitativo y cuantitativo para ambos componentes lipídicos.

El análisis de estos datos revela el carácter específico del componente lipídico, ya que la composición de los lípidos presentes en el complejo enzimático es diferente de la de la fracción soluble de larva (Tabla II), a partir de la cual se aísla el sistema enzimático. La composición en ácidos grasos de los lípidos presentes en el sistema enzimático es también cualitativa y cuantitativamente diferente de la de la fracción soluble de larva, salvo en el caso en el caso de los triacilgliceroles, en los que aparece una gran analogía. Las mayores diferencias se observan en fosfoglicéridos y ácidos grasos libres, siendo en general bastante superior el grado de insaturación de los ácidos grasos de la fracción soluble de larva que los presentes en el complejo ácido graso sintetasa.

Por otro lado la actividad enzimática, independientemente de la relación lípido/proteína, parece depender únicamente de los porcentajes de ácidos grasos libres y fosfoglicéridos. Preparaciones enzimáticas de baja actividad presentan un incremento en ácidos grasos libres y un simultáneo descenso en la cantidad de fosfoglicéridos, manteniéndose constantes los valores de las restantes clases de lípidos. (Gavilanes et al., 1978).

Tabla II. Composición y grado de insaturación de la fracción lipídica de ácido graso sintetasa de *C. capitata*.

ácido graso	ácido graso sintetasa					fracción soluble de larva				
	LT	TG (82,2%)	DG (10,1%)	AGL (4,8%)	PL (2,9%)	LT	TG (36,1%)	DG (9,0%)	AGL (12,5%)	PL (42,4%)
10:0	tr	—	—	—	tr	1.3	2.0	—	—	—
12:0	1.2	tr	tr	0.6	tr	3.0	2.3	0.5	1.1	tr
12:1	tr	—	—	—	—	tr	tr	—	—	—
14:0	8.4	7.0	6.3	4.1	6.3	4.9	5.2	3.4	2.9	0.8
14:1	2.2	1.3	3.6	2.3	2.9	tr	0.5	tr	—	—
16:0	35.7	38.8	35.6	37.0	34.0	32.4	36.9	30.9	19.8	19.4
16:1	21.1	20.9	12.5	19.0	16.1	24.8	24.3	24.9	31.4	16.5
18:0	8.6	4.9	10.4	14.0	7.4	2.4	4.3	2.6	2.9	3.8
18:1	15.7	17.0	15.6	17.5	21.2	14.4	16.0	19.1	17.9	31.6
18:2	5.1	7.0	6.2	2.0	8.7	15.7	8.5	18.0	20.8	25.2
18:3	2.0	3.1	6.8	3.5	3.4	tr	—	—	3.1	—
20:0	tr	—	tr	—	tr	0.7	—	tr	—	2.4
$\Delta$	0.55	0.63	0.65	0.53	0.68	0.71	0.58	0.80	1.00	0.98

El grado de insaturación se calcula como  $\Delta = (\% \text{ monoenoicos}/100) + 2 (\% \text{ dienoicos}/100) + 3 (\% \text{ trienoicos}/100)$ .

LT: lípidos totales; TG: triacilgliceroles; DG: diacilgliceroles; AGL: ácidos grasos libres; PL: fosfolípidos.

Análogamente, la adición de fosfoglicéridos o sus clases aisladas a preparaciones disminuidas en su actividad por tratamiento con fosfolipasa A<sub>2</sub> recupera la funcionalidad del complejo. Actuando sobre el sistema nativo, colesterol, esteres de colesterol y diacilglicérol, así como triacilglicérol, no se modifica la actividad enzimática. La adición de ácidos grasos libres inhibe al sistema enzimático (se conserva solamente el 25 % de la actividad cuando la relación ácido graso libre/proteína es de 0.5). Un efecto contrario provoca la adición de fosfoglicéridos en una relación fosfolípido/proteína de 0.5, la actividad se incrementa al 135 %, descendiendo hasta el 80 % de la actividad inicial para relaciones fosfolípido exógeno/proteína mayores de 2, debido a la protección de la enzima por el exceso de lípidos que dificulta la accesibilidad del sustrato al centro activo, impidiendo así la actuación catalítica. (Lizarbe, 1979).

En presencia de lípidos totales, la activación es menor que el incremento debido a la proporción de fosfolípidos en la mezcla total (a una relación lípido exógeno/proteína de la unidad se alcanza un valor del 124 %). Esta activación indica una contribución de la fracción lipídica total a la actividad enzimática. (Municio et al., 1979).

Un estudio particular utilizando clases de fosfoglicéridos indica que la clase minoritaria en la fracción lipídica, la fosfatidiletanolamina (33 %), ejerce un efecto similar al de los fosfolípidos totales, no modificándose la actividad en presencia del componente mayoritario, fosfatidilcolina (66 %), e inhibiéndose por las dos formas lisos correspondientes. (Gavilanes et al., 1979).

El efecto de la *sonicación* confirma el carácter esencial desde el punto de vista de la actividad enzimática, que presenta la fosfatidiletanolamina. La *sonicación*, a la que la fosfatidilcolina es muy resistente (Attwood y Saunders, 1966), libera fosfatidiletanolamina rápidamente, inactivándose la ácido graso sintetasa a los 10 minutos de *sonicación*, mientras que la estructuración de la proteína, seguida por *dicroísmo circular*, se afecta débilmente. (Lizarbe, 1979).

Dada la importancia del componente lipídico presente en el preparado enzimático, se estudió la influencia que dicho componente ejerce sobre la conformación de la enzima. Para ello se sometió al complejo multienzimático a una serie de tratamientos desnaturalizantes, como son los relativos a la acción del dodecilsulfato sódico (SDS), colato sódico, urea, cloruro de guanidinio, así como al efecto de la fuerza iónica y de la temperatura, estableciéndose una correlación entre estructura-función en base a resultados espectroscópicos y valoraciones de actividad.

Estudios previos de *dicroísmo circular* realizados sobre la enzima nativa, muestran que la proteína presenta un elevado grado de ordenación. La estructura secundaria calculada a partir de dicho espectro revela un contenido del 43 % de  $\alpha$ -hélice, 26 % de estructura  $\beta$  y un 31 % de ordenación aperiódica (Gavilanes et al., 1978), mientras

que la enzima deslipidizada con cloroformo-metanol mantiene sólo un 3 % de  $\alpha$ -hélice.

El tratamiento de la enzima nativa con concentraciones crecientes de dodecilsulfato sódico y colato sódico disminuye la actividad enzimática hasta la completa inactivación de la proteína a concentraciones de 0.05 y 0.5 % respectivamente. A pesar de la inactivación producida, el sistema enzimático retiene su conformación después del tratamiento con *colato sódico* al 1 %. El detergente promueve la eliminación de los fosfolípidos, disminuyendo la actividad enzimática para la que esta clase de lípidos es esencial. La adición de lípidos totales al complejo tampoco modifica la estructura secundaria, siendo prácticamente idéntico el espectro de *dicroísmo circular*. (Lizarbe, 1979).

Un cambio sustancial en la estructura secundaria se aprecia tras el tratamiento con *dodecilsulfato sódico* al 4 %. La enzima presenta en estas condiciones un contenido del 42.8 % de  $\alpha$ -hélice, 8.4 % de estructura  $\beta$  y 48.8 % de ordenación aperiódica. En este sentido es importante reseñar que la variación de la estructura  $\beta$  se debe posiblemente al efecto de los detergentes aniónicos, produciendo transiciones estructura  $\beta$ -ordenación aperiódica- $\alpha$  hélice (Jirgensons, 1969). La pérdida de actividad se justifica por un cambio conformacional, pese a que globalmente no se afecta al contenido en  $\alpha$ -hélice. (Gavilanes et al., 1978).

El tratamiento con *urea* y *cloruro de guanidinio*, origina un efecto desnaturalizante irreversible sobre la enzima, lo que confirma el papel estabilizante de los lípidos en la estructura nativa, no pudiéndose reconstruir la conformación nativa en presencia del agente desnaturalizante. La *elipticidad* se reduce a medida que se incrementa la concentración de cloruro de guanidinio y urea, de tal manera que a concentraciones 7.5 M de urea y 4.0 M de cloruro de guanidinio, prácticamente no existe  $\alpha$ -hélice. A un valor 3.0 M de urea y 1.5 M de cloruro de guanidinio se observa una transición conformacional, la pérdida de actividad se produce antes de esta transición, ya que la enzima a estas concentraciones no presenta actividad. (Gavilanes et al., 1979).

El incremento de la *fuerza iónica* origina un gradual descenso de la actividad enzimática. A fuerza iónica 1.5 M la enzima presenta aproximadamente el 40 % de actividad, no correspondiendo este valor con la pérdida de estructura secundaria, no superior al 10 %. Esto indica una baja exposición de los residuos cargados de la proteína, asignando de este modo a las mitades polares de los lípidos un papel en la solubilidad enzimática en sistemas acuosos, ya que los restos cargados de la proteína estarán poco expuestos.

La modificación de la actividad y de la estructura se ha estudiado también en función de la *temperatura* de incubación y a diferentes tiempos de incubación a 37°C. El contenido en  $\alpha$ -hélice disminuye en función del tiempo de incubación, o de la temperatura, existiendo una transición conformacional a 50°C coincidente con la transición

térmica de actividad, que está influenciada por su alto contenido en ácidos grasos saturados. (Lizarbe, 1979).

El estudio de la influencia de la temperatura indica también que las condiciones de máxima actividad se alcanzan para 10 minutos y 37°C de incubación, mostrando la enzima un 20% de  $\alpha$ -hélice, un 37% de estructura B y un 47% de cadena estadística, tras 180 minutos de incubación a 37°C.

La contribución, tanto estructural como funcional, de la fracción lipídica se ha evaluado por medio de *tratamientos lipolíticos*. Tanto por la acción de triglicérido lipasa, como fosfolipasa A<sub>2</sub> o mezcla de ambas enzimas se observa un descenso en la elipticidad. El tratamiento conjunto por ambas enzimas lipolíticas produce una desestructuración mayor a la producida por cada una de ellas individualmente, alcanzándose una situación límite al cabo de 90 minutos de incubación, que se corresponde con un contenido del 8% en  $\alpha$ -hélice. (Municio et al., 1981).

Con respecto a la actividad enzimática, el efecto producido por la triglicérido lipasa es superior (se pierde el 75% de la actividad a los 30 minutos de incubación) al de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (en el mismo tiempo de incubación sólo pierde el 20%). La pérdida de actividad, cuando las dos enzimas actúan conjuntamente, es similar a la producida por la triglicérido lipasa.

Teniendo en cuenta estos hechos y que la fosfatidiletanolamina es la única clase lipídica que ocasiona una apreciable activación, se puede intuir que los triacilglicérols proporcionen el soporte conformacional básico del complejo, mantenido de forma más específica por los fosfoglicéridos. Por otro lado, los diferentes componentes lipídicos del complejo ácido graso sintetasa no se encuentran distribuidos al azar en la estructura de la lipoproteína, sino que podrían encontrarse en zonas distintas, con diferentes estados físicos (Lizarbe, 1979).

El grado de exposición de las cadenas polipeptídicas se ha estudiado por *tratamientos proteolíticos* con tripsina y

quimotripsina. Tras 4 horas de incubación con ambas enzimas proteolíticas el contenido en  $\alpha$ -hélice es similar en ambos casos. Las estructuras residuales que se obtienen son semejantes y más ordenadas de lo que se puede esperar a la vista de la composición de aminoácidos, lo que indicaría un número aproximadamente igual de puntos de ruptura por parte de las dos enzimas y que el componente lipídico protege determinados enlaces o zonas de la cadena polipeptídica quedando sólo un número reducido de enlaces expuestos a la acción proteolítica. (Lizarbe, 1979).

La identidad observada entre los mapas tríplico y quimotríptico, así como el escaso número de péptidos obtenidos, apoyan estas deducciones; los péptidos resultantes del tratamiento proteolítico tienen una estructura y tamaño semejantes, mientras que el número de péptidos visualizados tras el revelado con ninhidrina, en el caso de la proteína deslipidada y digerida con quimotripsina, es netamente superior al que se obtiene con la proteína nativa, o tras una digestión lipolítica. El componente lipídico debe, por tanto, tener una localización precisa y no al azar en el complejo enzimático ácido graso sintetasa de *Ceratitis capitata*.

El estudio estructural que se viene realizando acerca de la ácido graso sintetasa del insecto *Ceratitis capitata*, debido al carácter de lipoproteína que presenta el complejo, obliga a un constante estudio relativo a interacciones lípido-proteína.

Por este motivo existe una gran cantidad de información relativa a tales interacciones que se ha de considerar en este trabajo, habida cuenta de la naturaleza de la enzima. Estos datos, referidos a muy diversos sistemas y con el único nexo común de la existencia de interacciones lípido-proteína, presentan una muy difícil generalización en la introducción que se viene desarrollando. Ello ha obligado a su inclusión en la tabla III relativa a interacciones lípido-proteína y funcionalidad biológica. Esta recopilación completa y continua, hasta la fecha de impresión de este trabajo, las presentadas por Lizarbe (1979) y Gavilanes (1980).

Tabla III. Interacciones lípido-proteína y funcionalidad biológica.

(Na <sup>+</sup> - K <sup>+</sup> ) - ATPasa riñón de conejo	La reactivación de la enzima deslipidada requiere una disposición lamelar de las moléculas de lípidos con una densidad de carga negativa suficiente, pero no necesariamente moléculas de fosfolípidos cargados negativamente.	Isern de Caldentey et al. (1979)
Monomero oxidasa corazón de bucy	El entorno lipídico influye en la actividad catalítica y en la especificidad del sustrato.	Naoi et al. (1980)
$\alpha$ -lactalbúmina	Estudios de microcalorimetría y fluorescencia muestran la influencia del cambio conformacional de la proteína inducido por el pH sobre la interacción de la misma con fosfatidilcolina.	Hanssens et al. (1980) Herreman et al. (1981)
Receptor asialoglicoproteínico hepatocitos de conejo	El receptor en solución acuosa se inserta espontáneamente en vesículas unilamelares, restaurándose la actividad receptora.	Klausner et al. (1980)

Citocromo C oxidasa corazón de bucy	La actividad transportadora de electrones es función de la cantidad de lisofosfatidil glicerol unido a la enzima. Podrían existir tres localizaciones de unión a fosfolípidos con diferente afinidad.	Robinson et al. (1980)
Lipoproteínas de alta densidad (HDL) suero bovino	Las apoproteínas C en presencia de fosfatidilcolina exhiben cambios en la estructura secundaria y terciaria estudiados por fluorescencia. El diroisismo circular muestra un incremento en el contenido en $\alpha$ -hélice.	Patterson et al. (1980)
Lipasa Rhizopus delemar	El tratamiento con fosfolípidos modifica la enzima, aumenta la actividad sobre lipoproteínas. El espectro de diroisismo circular muestra un descenso en el contenido en $\alpha$ -hélice.	Iwai et al. (1980)
Apoproteína del protolípido de mielina bovina	Diferente comportamiento de bicapas saturadas e insaturadas de fosfolípidos recombinados con la apoproteína.	Lavialle et al. (1980)
Receptor $\beta$ -adrenérgico corazón de conejo	Los fosfolípidos son importantes no sólo para la actividad de la adenilato ciclasa sino también necesarios para la unión de la hormona al receptor $\beta$ -adrenérgico.	Thang et al. (1980)
Glucagón bovino y porcino	Interacciona rápidamente con vesículas de lecitinas. El péptido une directamente solo el 40% de las moléculas de lípido, pero es capaz de modificar las propiedades de transición de fase de todos los lípidos de la partícula.	Epano et al. (1980)
Glicerol fosfato-DH y aril sulfatasa hígado y cerebro de rata	Los valores de $K_M$ aparente aumentan en presencia de fosfolípidos cargados negativamente y disminuyen en presencia de aminas orgánicas.	Nalecz et al. (1980)
Monoamino oxidasa Acetilcolinesterasa hígado y cerebro de rata	Los valores de $K_M$ aparente disminuyen en presencia de fosfolípidos cargados negativamente y aumentan en presencia de aminas orgánicas. La actividad de enzimas unidas a membrana puede ser modulada por fosfolípidos cargados, debido al incremento o disminución de la concentración de sustrato no desplazado de la membrana.	Nalecz et al. (1980)
Monofosfatidilinositol-fosfoliesterasa. diversos tejidos de mamíferos	Fuertemente inhibida por $C_{12}$ , $C_{14}$ , $C_{16}$ ... lisofosfatidilcolina. Sin embargo $C_{10}$ lisofosfatidilcolina activa la reacción.	Dawson et al. (1980)
Péptidos sintéticos	Estudios con péptidos sintéticos confirman la hipótesis de la hélice anfipática, cada aminoácido contribuye inicialmente a la asociación lípido-proteína por interacciones electrostáticas.	Kanellis et al. (1980)
Enzimas dependientes de calmodulina	Ciertos lípidos activan a la 3'-5' nucleótido cíclico fosfoliesterasa y a la miosina quinasa (enzimas dependientes de calmodulina) en ausencia de $Ca^{2+}$ .	Tanaka et al. (1980)
Proteína quinasas dependientes de $Ca^{2+}$ corazón bovino y cerebro de rata	Regulación por fosfolípidos de la fosforilación dependiente de $Ca^{2+}$ de una manera independiente o complementaria a la regulación dependiente de calmodulina.	Wrenn et al. (1980)
Escualeno epoxidasa hígado de perro	Se requieren fosfolípidos aniónicos para que se produzca la respuesta al factor proteico soluble que estimula a la enzima.	Lin (1980)
Rodopsina cefalópodos	Los fosfolípidos modifican el pK de protonación de la base de Schiff, por la que se une el retinal a la proteína.	Nashima et al. (1980)
ATPasa <i>Schizosacharomyces pombe</i>	Lecitinas y lisolecitinas recuperan la actividad enzimática perdida por deslipidización parcial. Cardiolipinas se unen a la proteína, pero no restauran la actividad.	Dufou et al. (1980)
Citocromo P <sub>450</sub> hígado de conejo	Requerimiento específico por ciertas vesículas de fosfolípidos para la actividad enzimática.	Ingelman-Sundberg et al. (1980)
Monaminoxidasa cerebro de rata	Digestiones con lipasas ponen de manifiesto que los estados funcionales de las diferentes formas de monoaminoxidasa están reguladas por distintos tipos de interacciones lípido-proteína.	Huang et al. (1980)
Toxina de la difteria	Enlaza fosfato de determinado tipo de fosfolípidos. Los fosfolípidos de la membrana podrían tener un importante papel en la unión de la toxina a las células.	Alving et al. (1980)
Fosfatasa alcalina riñón de cerdo	La fosfatasa alcalina se une a membranas por una fuerte interacción con fosfatidilinositol.	Low et al. (1980)

<b>Lipoproteínas de alta densidad (HDL)</b> suero humano	Transferencia de fosfolípidos desde liposomas a HDL.	Allen (1981)
<b>Citocromo oxidasa</b> corazón de buy	Estudios de fluorescencia muestran un cambio conformacional en la enzima en vesículas de fosfatidilcolina inducido por la transición de fase de los lípidos.	Kawato et al. (1981)
<b>Bacteriorodopsina</b> <i>Halobacterium halobium</i>	La fase lipídica induce transiciones en la segregación proteica. Por debajo de la temperatura de transición de fase (T <sub>c</sub> ) la proteína es monomérica y por encima de T <sub>c</sub> es un agregado exagonal.	Heyn et al. (1981)
<b>Factor X</b> bovino	El efecto estimulante de los fosfolípidos en la activación del factor X es debido a un efecto sobre la K <sub>m</sub> para dicho factor.	Dicljen et al. (1981)
<b>Rodopsina</b> <i>Paroctopus defleini</i>	Variaciones en los lípidos presentes pueden afectar la velocidad de las transformaciones fotoquímicas.	Tsuda et al. (1981)
<b>Diacilglicerolaciltransferasa</b> hígado de ratas	Los fosfolípidos tienen un efecto directo sobre el sistema aciltransferasa.	Parthasarathy et al. (1981)
<b>Ubiquinona-citocromo c</b> óxido-reductasa corazón bovino	La fosfatidiletanolamina es específicamente requerida para la reconstitución del complejo en vesículas capaces de mantener el control respiratorio.	Nelson et al. (1981)
<b>5'-nucleotidasa</b> hígado de rata	La enzima interacciona con esfingomiélinas y fosfatidilcolina resultando afectados la estabilidad y la energía de activación.	Merisko et al. (1981)
<b>(Ca<sup>2+</sup> - Mg<sup>2+</sup>) - ATPasa</b> eritrocitos humanos	La fosfatidilserina produce en la enzima los mismos efectos que la presencia de calmodulina.	Niggli et al. (1981)
<b>Citocromo b<sub>5</sub></b> hígado de caballo y cerdo	El segmento COOH-terminal conteniendo 2 de los 4 grupos carboxílicos del dominio enlazante a membrana del citocromo b <sub>5</sub> es crucial en la interacción lípido-proteína.	Dailey et al. (1981)
<b>Proteína del microtúbulo</b> cerebro de rata	La fosfatidilserina y cardiolipinas de las membranas hepáticas son responsables de la unión de la proteína a la membrana.	Reaven et al. (1981)
<b>Acetilcolinesterasa</b> eritrocitos humanos	Liposomas de fosfolípidos aumentan la actividad del dímero de acetilcolinesterasa debido a una modulación por un entorno hidrofóbico.	Di Francesco et al. (1981)
<b>Factor de crecimiento epidérmico</b> glándulas submaxilares de mosca	Los lípidos tienen un importante papel en la interacción del factor de crecimiento-receptor.	Shoyab et al. (1981)
<b>Citocromo P<sub>450</sub></b> corazón buy	Las cardiolipinas son el estimulante más efectivo. La acción de los fosfolípidos es debida a la modulación del enlace de unión de colesterol al citocromo.	Lambeth (1981)
<b>Acrosina</b> espermatozoide de verraco	La proteinasa se une a fosfolípidos por interacción electrostática indicando que la enzima tiene propiedades de proteína extrínseca de membrana.	Straus et al. (1981)
<b>Tubulina</b> hígado bovino	La asociación de fosfatidiletanolamina a la proteína ocurre solamente en la transición de fase lipídica. Se observan cambios en el espectro de fluorescencia y de dichroísmo circular.	Kumar et al. (1981)
<b>Lisil oxidasa</b> noria bovina	Sales de ácidos grasos y sales biliares inhiben la oxidación de la elastina y del colágeno por la enzima.	Kagan et al. (1981)

#### Objetivo de la presente investigación.

Los estudios previos sobre el complejo ácido graso sintetasa del insecto (Cavilanes et al., 1978-1979; Mucicio et al., 1977; Lizarbe, 1979) se han centrado en la caracterización de los componentes lipídico y polipeptídico del sistema. Análisis de aminoácidos y modificación de las distintas

clases lipídicas han sido los objetivos iniciales de aquel estudio que se completó con el análisis conformacional del sistema. El problema ha quedado establecido a nivel topológico, relativo a la distribución del componente lipídico en el sistema. El objetivo de la investigación que se va a describir se ha centrado precisamente en este aspecto, como etapa posterior hacia el conocimiento de la relación estructura-función de este sistema lipoproteico.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material biológico.

El díptero *Ceratitis capitata*, utilizado a lo largo de toda la experimentación, se cultiva en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (El Encín, Alcalá de Henares), bajo condiciones controladas de temperatura, dieta y humedad (Fernández-Sousa et al., 1971).

Una vez eliminada la dieta, las larvas de 5 a 7 días se congelan en aire líquido y se conservan a  $-60^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

### Determinación de la actividad enzimática.

La actividad enzimática de la ácido graso sintetasa de *C. capitata* se determina mediante los métodos espectrofotométrico o radiactivo.

### Método espectrofotométrico.

El ensayo se basa en la disminución de la absorción a 340 nm, debida a la oxidación del NADPH en el proceso de biosíntesis "de novo" de los ácidos grasos.

La mezcla de incubación contiene fosfato potásico 0.25M, 2-mercaptoetanol 0.2 mM, EDTA 0.4 mM, acetil-CoA 12 nM, NADPH 300 nM, malonil-CoA 43 nM y 1-10 miliunidades de enzima, en un volumen total de 2 ml. Se determina el descenso de la absorción de un blanco a base de todos los elementos de la reacción a excepción de malonil-CoA; después de 3-4 minutos se adiciona el sustrato y se mide el grado de oxidación del NADPH.

Una miliunidad de enzima es la cantidad que bajo las condiciones del ensayo espectrofotométrico, consume 1 nmol de malonil-CoA por minuto, correspondiente a 2 nmoles de NADPH o a una disminución de absorbancia de 0.006 unidades.

### Método radiactivo.

Se basa en la incorporación de  $(1-^{14}\text{C})$  acetil-CoA en ácidos grasos.

La mezcla de incubación contiene: malonil-CoA 50 nM, NADPH 300 nM, 2-mercaptoetanol 3 mM, EDTA 3 mM, fosfato potásico 0.25 M y 13.5 nmoles ( $0.05 \mu\text{Ci/ml}$  de incubación) de  $(1-^{14}\text{C})$ -acetil-CoA. La reacción se inicia por la adición de 0.3 ml de la preparación enzimática, de concentración variable, a 0.2 ml de la mezcla de cofactores. La mezcla de incubación se mantiene a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño de agua durante 10 minutos con agitación constante. Al cabo de este tiempo se detiene la reacción a  $0-4^{\circ}\text{C}$  por adición de: a) 0.15 ml de KOH al 50%, realizándose a continuación la extracción de los ácidos grasos con hexano o b) 1.05 ml de metanol y 0.5 ml de cloroformo, si la extracción se lleva a cabo por el método de Bligh-Dyer (1959), que permite trabajar a concentraciones de proteína superiores a las del método a) o en presencia de lípidos o detergentes.

### Extracción con hexano (Golberg et al., 1972).

Las mezclas de incubación tratadas con KOH al 50% se introducen en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos, al cabo de los cuales, se enfrían en hielo. La mezcla fría se acidifica con HCl hasta viraje del naranja de metilo más 3-4 gotas de exceso para asegurarse un pH 1.0. Se añaden 5 ml de hexano (la extracción puede hacerse igualmente con eter de petróleo), y la mezcla se agita por vibración durante dos periodos de 30 segundos cada uno. La fase acuosa se congela introduciendo los tubos en aire líquido, y la fase orgánica se traslada a viales de centelleo. Se repite la extracción una vez más y se elimina el disolvente a  $60^{\circ}\text{C}$ .

La utilización de este método de extracción requiere una baja concentración de lípidos y detergentes y que la proteína se encuentre a concentración inferior a 0.3 mg por ml de incubación; a niveles superiores, la agitación



de las fases acuosa y orgánica origina una gelificación que impide continuar el proceso de extracción.

#### Método de Bligh-Dyer (1959).

La mezcla de incubación tratada con 2.1 volúmenes de metanol y 1.0 volúmenes de cloroformo se agita por vibración durante 90 segundos. Tras la adición de otro volumen de cloroformo y un volumen de agua destilada, se agita nuevamente durante 1 minuto y se centrifuga procediéndose a la extracción de la fase clorofórmica. La fase acuosa se vuelve a extraer con dos volúmenes de cloroformo.

Las fases clorofórmicas que contienen los ácidos grasos formados se reúnen, se secan sobre sulfato sódico anhidro durante una noche (4°C) y se filtran por papel Whatman nº 1 a viales de centelleo, llevándose después a sequedad por evaporación del disolvente a 60°C.

#### Medida de la radiactividad incorporada a los ácidos grasos.

La radiactividad incorporada se determina por centelleo líquido utilizando como sistemas de centelleo a) 4 g de PPO (2,5-difeniloxazol), 100 mg de POPOP [1,4 bis-(5 fenil-oxazolil)-benceno] en un litro de tolueno o b) 1.5 g de PPO, 0.45 g de POPOP, 150 g de naftaleno, dioxano hasta 1500 ml de disolución y 300 ml de agua. A los viales que contienen las muestras secas se añaden 10 ml de una solución de centelleo, efectuándose la medida en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb 3255.

La actividad enzimática es la media de tres determinaciones expresada en nanomoles de ácido graso formado durante 10 minutos a 37°C.

#### Valoración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se realiza según el método de Lowry et al. (1951).

En algunas etapas de la purificación, el exceso de fosfato potásico en el medio origina la aparición de un precipitado blanco que se separa por centrifugación (Bensadoun et al., 1976), realizando la medida de absorción en el sobrenadante.

En preparaciones purificadas de ácido graso sintético, la determinación de la concentración se realiza mediante el empleo del coeficiente de extinción molar a 280 nm, previamente determinado, y según la expresión:

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot l \cdot c$$

siendo:

$A_{280}$  = absorción de la muestra a 280 nm  
 $l$  = paso óptico en cm  
 $c$  = concentración molar de la muestra  
 $\epsilon_{280}$  = coeficiente de extinción molar de la muestra ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

Las medidas de absorción se efectúan en un espectrofotómetro Cary 118, empleándose cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

#### Aislamiento.

##### Extracción.

250 g de larvas se homogeneizan en Omni-Mixer (Sorvall, USA) frente a 100 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.5, que contiene 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM, durante 6 minutos en períodos de 2 minutos. El homogeneizado se centrifuga a 34 800 g durante 15 minutos en una centrifuga Sorvall RC2B (rotor SS34) termostaticada a 2-4°C. El sobrenadante, previa filtración por gasa, se somete a la etapa siguiente.

##### Fración soluble. Precipitación con sulfato amónico.

El filtrado obtenido en la etapa anterior se centrifuga a 95 000 g durante 90 minutos en ultracentrifuga Beckman modelo L-4 clase Q con rotor tipo 40. Se desecha el precipitado, y al sobrenadante previamente filtrado por gasa se añade lentamente y bajo agitación constante sulfato amónico finamente pulverizado hasta una saturación del 50%. La adición de sulfato amónico se realiza con agitación magnética a 4°C durante 45 minutos, al cabo de los cuales se centrifuga a 34 800 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se desecha y el sedimento se conserva a -20°C bajo atmósfera de nitrógeno para su posterior utilización.

##### Redisolución y diálisis.

El precipitado conservado a -20°C se redisuelve en 100 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM con ayuda de un homogeneizador de vidrio-terflón. Se mantiene durante 45 minutos con agitación magnética constante, eliminándose el material que no se disuelve por centrifugación a 34 800 g durante 30 minutos a 4°C.

La disolución se dializa frente a 3 litros de tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM en un ultrafiltrador b/H-U-1 de acetato de celulosa de fibra hueca. La duración de esta etapa oscila entre dos horas y dos horas y media.

#### Cromatografía en DEAE-celulosa.

##### a) Preparación del cambiador.

El cambiador, DEAE-celulosa, se trata con 15 volúmenes de HCl 0.5 N durante 30 minutos, lavándose a continuación con agua destilada hasta pH 5. El proceso se repite dos veces con NaOH hasta pH 8. El cambiador se suspende en tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 3.0, renovándose el tampón hasta un pH de 4.5. En esta forma se desgasifica el cambiador a la trompa de vacío con agitación ocasional durante 3-4 horas, al cabo de las cuales se lleva a pH 7.5 por sucesivos lavados con tampón fosfato 0.01 M pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM. El cambiador se conserva hasta su utilización a 4°C.

##### b) Adsorción y elución.

Unos 150 ml de DEAE-celulosa en tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM, se agitan lentamente durante 1 hora, a 4°C, con los 100 ml de la solución dializada obtenida en la etapa anterior. Al cabo de este tiempo se filtra la resina para eliminar las proteínas no retenidas. La resina se lava dos veces con 100 ml de tampón de equilibrado, agitando cada vez y filtrando. Los filtrados se desechan.

La elución de la *ácido graso sintetasa* de la resina se lleva a cabo con tampón 0.3 M, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM. Se lava la resina a 4°C y con agitación lenta durante 1 hora con 100 ml de este tampón. Este proceso se repite tres veces conservándose los eluidos para su posterior concentración.

La resina se trata con 250 ml de tampón fosfato potásico 1 M, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM para eliminar todas las proteínas que han quedado retenidas fuertemente.

##### c) Regeneración.

La resina se lava 5 veces con 4 volúmenes de agua destilada y a continuación con tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 4.5. Se desgasifica y se equilibra nuevamente con tampón fosfato potásico 0.01 M a pH 7.5, conservándose a 4°C.

#### Concentración en células de ultrafiltración Amicon.

Las fracciones del primero y segundo lavado con tampón fosfato potásico 0.3 M (200 ml) se reúnen y concentran en una célula de ultrafiltración Amicon. La disolución a concentrar se deposita en el interior de una célula de

ultrafiltración modelo UF52 en cuyo fondo se coloca una membrana de diálisis (PM 10, 62 mm de diámetro). Se pasa una corriente de N<sub>2</sub> a una presión máxima de 3 atmósferas hasta que el volumen de la disolución se haya reducido a 18-27 ml. Se divide el concentrado en fracciones de 3 ml que se conservan a -60°C.

#### Cromatografía en Sephadex G-150.

##### a) Preparación del gel.

La hidratación del gel se consigue manteniendo el sólido comercial durante 3 días a temperatura ambiente en un exceso de medio de elución. El proceso puede acelerarse manteniendo durante 3 horas el gel en baño de agua hirviendo. Para su desgasificación, el gel se somete a vacío en trompa de agua agitando ocasional y cuidadosamente.

El gel así tratado se deposita en una columna cromatográfica (2.5 x 50 cm) y se lava exhaustivamente con el sistema de elución, tampón fosfato potásico 0.25 M, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM.

##### b) Cromatografía de la fracción de ácido graso sintetasa.

Las fracciones obtenidas en la etapa anterior, conservadas a -60°C, se descongelan y se aplican en la columna previamente equilibrada. Se eluye con el mismo tampón de equilibrado a un flujo de 35-40 ml/h. Las fracciones con actividad de *ácido graso sintetasa* se combinan y se conservan a -60°C. El perfil de absorción ultravioleta del eluido se registra a 280 nm mediante un fotómetro de flujo continuo Uvicord II.

##### c) Regeneración del Sephadex G-150.

Una vez realizada la cromatografía, se lava la columna con el mismo sistema de equilibrado, quedando así dispuesta para su posterior utilización.

#### Espectro de absorción ultravioleta.

La determinación del espectro de absorción ultravioleta de la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* se ha llevado a cabo en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, empleándose un espectrofotómetro Cary 118. El espectro se ha obtenido a una velocidad de barrido de 0.2 nm/s. Para la determinación se ha empleado una solución de enzima 0.2 mg/ml en tampón fosfato potásico 0.25 M, pH 7.5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 2 mM.

Debido a la dispersión óptica que origina el componente lipídico de la enzima, el espectro obtenido se corrige en base a la relación existente entre  $1/\lambda^4$  y dispersión óptica.

#### Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen en un dicrografo Jovin Yvon R. J. Mark III equipado con lámpara de xenon de 250 w a una velocidad de barrido de 0.2 nm/s. Todas las disoluciones de proteína se filtran en Millipore (diámetro de poro de 5 micras) o se centrifugan previamente a la determinación espectroscópica. La concentración empleada en todos los casos es de 0.2-0.4 mg/ml en células cilíndricas de 0.05 cm de paso óptico. La concentración de proteína se determina espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción molar de la proteína.

La elipticidad a cada longitud de onda se expresa como elipticidad molar por residuo de aminoácido, en unidades de grado.  $\text{cm}^2 \text{decimol}^{-1}$ , corregida para la elipticidad de la disolución tampón. El peso molecular medio por residuo de aminoácido que se considera para este cálculo es de 110. La elipticidad molar por residuo se calcula a partir del registro de elipticidad observada, según la expresión:

$$\Theta_{\text{MWR}} = \frac{\text{MWR} (\Theta_{\text{prot}} - \Theta_{\text{tampón}}) \cdot 100}{l \cdot c} \text{ grados} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$$

siendo:

- $\Theta_{\text{MWR}}$ , elipticidad molar por residuo
- MWR, peso molecular medio del residuo de aminoácido
- $\Theta_i$ , elipticidad observada
- l, paso óptico
- c, concentración de proteína en mg/ml.

#### Fluorescencia.

Los espectros de fluorescencia se realizan en un fluorímetro FICA 55 MK II, equipado con una lámpara de xenon de 450 w, utilizando una anchura de rendija de 2.5 y 7.5 nm para los haces de excitación y emisión respectivamente. El espectro se registra en un XY Ohnigratic 200 a 10 nm/min. Todas las disoluciones de proteína empleadas se centrifugan a 1500 g durante 10 minutos o se filtran a través de Millipore (5 micras) previamente a su estudio espectroscópico. La concentración de proteína empleada se determina espectrofotométricamente, en base a su coeficiente de extinción molar a 280 nm, encontrándose en todos los casos entre 0.03 y 0.05 mg/ml. La absorción de las disoluciones de proteína empleadas en ningún caso superan un valor de absorción de 0.05 a la longitud de onda de excitación.

#### Polarización de fluorescencia.

La polarización de fluorescencia, se determina en un espectrofluorímetro Fica 55 MKII. Las cubetas para fluorescencia empleadas son de 1 cm de paso óptico. La fluorescencia se mide a un ángulo de 90 grados. En todos los casos la absorción de la muestra a la longitud de onda de excitación ha de ser inferior a 0.05 para evitar efectos de filtro interno, si esto no se cumple hay que corregir las medidas de intensidad de fluorescencia. El espectrofluorímetro termostalizado a 20°C mediante baño de agua circulante, se adapta para medidas de polarización por montaje de prismas de Glan-Thomson directamente a la entrada y salida de portacubetas. Los valores de polarización de fluorescencia se corrigen para la respuesta del monocromador según la siguiente expresión:

$$P = \frac{EE - BE \cdot EB}{EE + BE \cdot EB} \cdot \frac{BB}{BB}$$

siendo:

- P = polarización de fluorescencia.
- EE = intensidad de fluorescencia en el plano vertical para una radiación de excitación polarizada asimismo en el plano vertical.
- BE = intensidad de fluorescencia en el plano vertical para una radiación de excitación polarizada en el plano horizontal.
- EB = intensidad de fluorescencia en el plano horizontal para una radiación de excitación polarizada en el plano vertical.
- BB = intensidad de fluorescencia en el plano horizontal para una radiación de excitación polarizada en el plano horizontal. (Rank, 1947)

#### Análisis de aminoácidos.

Los análisis se llevan a cabo en un analizador automático Durrum modelo D 500, equipado con un computador PDP-8M que automatiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamente seleccionado.

#### Hidrólisis.

La hidrólisis de la proteína (0.2 mg) se lleva a cabo en vacío con 0.5 ml de HCl tridestilado azótropo, 5.7 N, conteniendo 0.1% (v/v) fenol, a 108°C durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Para cada tiempo de hidrólisis se realizan tres determinaciones independientes. La hidrólisis se lleva a cabo con muestras de proteína aislada de diferentes lotes de larva de *C. capitata*. Finalizado el proceso, las muestras se llevan a sequedad en rotavapor, con adición repetida de 1 ml de agua destilada y correspondiente secado.

#### Análisis automático.

Las muestras secas se disuelven en 0.5 ml del tampón de aplicación que contiene: citrato sódico 19.61 g, 20.0 ml de diodiglicol, 16.5 ml de HCl concentrado, 1.0 ml de fenol en un volumen final de 1 litro, pH 2.20  $\pm$  0.01. La muestra se pasa a un tubo de teflón (4 x 0.3 cm), y previa centrifugación se aplican a la columna del analizador entre 10 y 30  $\mu$ l de la muestra. La duración del análisis es de aproximadamente 100 minutos. Tanto el tampón de aplicación como los de elución son suministrados por Pierce Ch. y se esterilizan mediante filtro Millipore (0.45 micras). Finalizado el análisis la resina se regenera con lavados de NaOH 0.3 N conteniendo 0.25 g/l de EDTA. La composición de aminoácidos en % molar se determina a partir de los datos de los análisis.

#### Grupos -SH libres.

La determinación está basada en el método de Ellman (1959). Se prepara una disolución (0.4 mg/ml) de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) en tampón tris-HCl 0.1 M, pH 7.5, conteniendo EDTA 1 mM. Se añaden 0.1 ml de esta disolución a 3 ml de una disolución de proteína (0.2 -0.4 mg/ml) en tampón fosfato sódico 0.25 M, pH 7.5 conteniendo EDTA 2 mM. La mezcla de incubación se mantiene a temperatura ambiente registrándose gráficamente el incremento de absorción a 412 nm, utilizando como referencia la disolución de muestra. Al valor de absorción obtenido cuando esta se estabiliza se resta el de un blanco carente de proteína pero con DTNB. A partir de esta absorción neta y utilizando un coeficiente de extinción molar de 13 600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, a 412 nm, se determina la concentración del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico formado. A partir de este dato y de la concentración de proteína utilizada para el ensayo, se determina el contenido en grupos -SH libres. La exactitud de la medida se comprueba con soluciones de glutatión reducido recién preparadas.

#### Nitración.

La nitración del complejo enzimático se lleva a cabo en tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 8.0, incubando la enzima en presencia de tetranitrometano a temperatura ambiente y utilizando un exceso dos veces molar sobre el número de tirosinas. El reactivo se emplea en forma de una disolución 0.1M en etanol al 95% (v/v). El curso de la reacción se sigue midiendo la absorción a 428 nm dándose ésta por finalizada cuando A<sub>428</sub> adquiere un valor constante. El cálculo de la concentración de nitrotirosina, y por tanto el número de tirosinas nitradas, se efectúa utilizando un coeficiente de extinción molar para la nitrotirosina a 428 nm de 4200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, (Glazer et al., 1975) teniendo en cuenta que el 86% de la absorción neta, absorción de la muestra menos absorción de un blanco que no contiene proteína, es debida a nitrotirosina siendo

el 14% restante debido al nitroformiato originado durante la reacción (Bustir, 1971).

#### Aislamiento y separación de clases de lípidos. Cromatografía en capa fina.

Las distintas clases de lípidos utilizados se obtienen de larva de *C. capitata*. El insecto se homogeneiza en tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.5, conteniendo EDTA 2 mM y 2-mercaptoetanol 1mM. El homogeneizado se centrifuga a 27000 g durante 15 minutos y en el sobrenadante se realiza una extracción de lípidos, según el método de Bligh y Dyer (1959).

La separación de las distintas clases de lípidos se realiza por cromatografía en capa fina. El soporte utilizado es Silicagel-G (SGG: Keissegel-G, Merck) que contiene CaSO<sub>4</sub> como aglomerante. Se utilizan placas de 20 x 20 cm de distintos espesores, según la finalidad perseguida: 1.0 mm (90 g SGG/160 ml agua destilada), 0.5 mm (40 g SGG/80 ml agua destilada y 0.3 mm (30 g SGG/60 ml agua destilada). Las placas se activan a 110°C durante una hora. Los lípidos extraídos por el método de Bligh-Dyer (1959), se aplican disueltos en cloroformo/metanol (2:1, v/v), siendo las cantidades aplicadas variables en función del análisis a realizar.

Como sistemas de desarrollo se utilizan hexano/éter/ácido acético (70:30:1, v/v/v) y hexano/éter/ácido acético/metanol (60:40:1:1, v/v/v/v) para separar lípidos neutros, y cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v/v) para la separación de clases de fosfolípidos. La identificación de las distintas localizaciones de lípidos se lleva a cabo mediante la utilización de patrones conocidos.

Los lípidos se visualizan mediante vapores de yodo (Mangold et al., 1961; Sims et al., 1962), disolución de rodamina 6G al 1% en metanol (Mangold et al., 1961) o reactivo Dittmer (Dittmer, 1964).

#### Preparación y análisis de esteres metílicos.

Los extractos de lípidos totales o las distintas clases de lípidos, previamente separados por cromatografía en capa fina se metanolizan de acuerdo con el método de Metcalfe et al., (1966).

Los lípidos totales disueltos en cloroformo o las zonas de silicagel que contienen las clases de lípidos, se disponen en tubos de vidrio de paredes gruesas (20 x 150 mm). En el primer caso el disolvente se evapora con corriente de nitrógeno y en ambos casos se agregan 0.1 ml de metanol reactivo, 0.1 ml de trifluoruro de boro al 14% en metanol (p/p) y 0.09 ml de benceno / mg de lípido. Los tubos se cierran bajo atmósfera de nitrógeno y se mantienen a 110°C durante 90 minutos.

A la solución de esteres metílicos se adicionan 2 volúmenes de hexano y 1 volumen de agua. La mezcla se agita por vibración y se toma la capa superior de hexano. Se repite el proceso otras dos veces con dos volúmenes de hexano, los extractos reunidos se secan sobre sulfato anhidro. La disolución se filtra y se concentra en rotavapor hasta un volumen pequeño que se transfiere a tubos de fondo cónico, donde se evapora a sequedad el disolvente bajo atmósfera de nitrógeno. Estas mezclas de esteres metílicos se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

La composición de los esteres metílicos de ácidos grasos se determina con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5750, equipado con un detector de ionización de llama de hidrógeno y columnas de acero inoxidable de 2 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, rellenas de succinato de polietilenglicol al 20% sobre Chromosorb W(80-100 mallas).

Las áreas de los picos se determinan con un integrador-impresor Hewlett-Packard, modelo 3370A.

Se opera a  $170^{\circ}\text{C}$ , siendo las temperaturas del detector e inyector de  $250^{\circ}\text{C}$  y  $300^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

La entidad de los picos y la validez cuantitativa de las concentraciones calculadas para los distintos ácidos grasos se establecen por comparación con patrones de esteres metílicos de los diferentes ácidos grasos.

#### Determinación cuantitativa de las distintas clases de lípidos.

Se ha llevado a cabo por los tres métodos siguientes:

##### Medidas gravimétricas.

El ácido silícico correspondiente a cada clase de lípido separadas por cromatografía en capa fina se transfiere a un tubo de vidrio de boca esmerilada B-29, con el fin de proceder a su extracción y determinación cuantitativa. La extracción de triacilgliceroles y esteres de colesterol, se realiza con cloroformo, la de ácidos grasos libres y diacilgliceroles con cloroformo/metanol (2:1, v/v), y la de fosfolípidos con mezclas de cloroformo/metanol 2:1, 1:1 y 1:9 (v/v) y finalmente metanol absoluto.

##### Valoración de fosfolípidos.

Se lleva a cabo por el método de Rouser y col. (1966). El ácido silícico en el que van adsorbidos los fosfolípidos se transfiere a un matraz Kjeldal que se calienta suavemente para eliminar restos de disolventes cromatográficos. Se adicionan 0.9 ml de ácido perclórico al 70% y se introduce el matraz en baño de arena a  $250-260^{\circ}\text{C}$  durante 25 minutos, dejando enfriar a continuación la muestra a temperatura ambiente. Se añaden 7 ml de agua destilada,

1 ml de solución de molibdato amónico al 2.5% y 1 ml de ácido ascórbico al 10%. El conjunto se calienta durante 7 minutos en baño de agua hirviendo. La reacción se detiene por inmersión en baño de hielo, se elimina el ácido silícico por centrifugación y se leen las absorbancias del sobrenadante a 820 nm en un colorímetro Coleman Junior II, modelo 6/20. Se utiliza un blanco contenido en ácido silicagel de una zona de la placa de cromatografía de lípidos.

##### Cromatografía de gases.

La determinación cuantitativa de las clases de lípidos se ha llevado a cabo asimismo mediante el empleo de patrón interno por cromatografía de gases según el método de Christie et al., (1970). Se utiliza a este objeto ácido pentadecanoico (15:0) ya que no está presente en los ácidos grasos existentes en los lípidos constitutivos de *C. capitata*. Los factores utilizados para el cálculo de triacilgliceroles, diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos libres y fosfolípidos son respectivamente: 0.994, 1.054, 1.211, 0.945 y 1.378.

##### Deslipidización de la enzima.

La deslipidización del sistema enzimático se realiza por los métodos siguientes:

##### Disolventes orgánicos.

Preparaciones de ácido graso sintetasa (2 mg/ml) se tratan con los siguientes disolventes o mezclas de disolventes:

- Un volumen de éter etílico, o mezclas de éter etílico/etanol en proporciones 3:1, 1:1, 1:3 (v/v) o de etanol a  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- Nueve volúmenes de acetona enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Cinco volúmenes de etanol/acetona 1:1 (v/v), o de etanol/éter etílico/agua 90:30:1 (v/v/v) a  $4^{\circ}\text{C}$  o de butanol a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

En todos los casos la mezcla se mantiene bajo agitación magnética durante 30 minutos. El precipitado obtenido se separa por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos o por filtración en papel Whatman n.º 1, repitiéndose el proceso de extracción sobre el precipitado.

La deslipidización con cloroformo/metanol 2:1 (v/v) se realiza por el método de Bligh-Dyer (1959), anteriormente descrito. En el caso de utilizar mezclas de disolventes detergentes, el tratamiento se lleva a cabo por el mismo método empleado con el disolvente puro.

La fase orgánica se concentra en rotavapor, determinándose por el método gravimétrico la cantidad total de lípidos extraídos. El residuo proteico sólido se somete a distintos tratamientos para su redisolución, detallados en el apartado de Resultados, y se ensaya actividad de *ácido graso sintetasa* en las condiciones estándar de valoración, con extracción final de lípidos con cloroformo/metanol 2/1 (v/v).

#### Adición de lípidos.

La modificación de la relación lípido/proteína se lleva a cabo con preparaciones de la enzima nativa.

Los lípidos exógenos, lípidos totales o clases de lípidos, se adicionan mediante sonicación en el tampón estándar de valoración, durante 2 minutos a temperatura ambiente en sonificador MSE (20 kc).

#### Tratamiento con detergentes.

Preparaciones del complejo multienzimático se tratan a diferentes concentraciones, según el ensayo, con colato sódico, y dodecilsulfato sódico.

Previamente el dodecilsulfato sódico se purifica y recristaliza. Las incubaciones se realizan en tampón fosfato sódico 0.25 M, conteniendo EDTA 2 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 7.5, a 37°C durante 10 minutos.

#### Obtención del lipopolisacárido-<sup>14</sup>C de *E. coli*.

El lipopolisacárido se ha aislado y purificado de una cepa de *E. coli* serotipo O111 a, O111 b : K58 : H21 procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), y que se cultivó en un medio que contenía glucosa-<sup>14</sup>C como única fuente de carbono. La extracción del lipopolisacárido-<sup>14</sup>C se realiza en fenol-agua (Westphal, 1952). El lipopolisacárido-<sup>14</sup>C así obtenido presentaba una actividad específica de 2.23  $\mu$ Ci/mg.

#### Interacción ácido graso sintetasa-lipopolisacárido de *E. coli*.

La proteína en tampón fosfato potásico 0.25 M, pH 7.5, se ha tratado con una disolución de lipopolisacárido de *E. coli* (1 mg/ml) preparado recientemente por agitación durante 10 minutos.

La cromatografía de penetrabilidad del complejo lipopolisacárido-ácido graso sintetasa se lleva a cabo en columnas de Sepharosa 6B (1x50 cm) equilibrada con tampón fosfato 0.25 M, pH 7.5 recogiendo fracciones de 0.6 ml.

#### Preparación de dansilfosfatidiletanolamina (DPE).

La fosfatidiletanolamina se obtiene de larva de *C. capitata* siguiendo el método general descrito para el aislamiento de las distintas clases de lípidos.

La dansilación se lleva a cabo por el método de Gray (1967). A 1  $\mu$ g de fosfatidiletanolamina (PI) en 200  $\mu$ l de bicarbonato sódico 0.2 M se añaden 200  $\mu$ l de cloruro de dansilo (2.5 mg/ml) en acetona y la mezcla de reacción se incuba a 45°C durante 30 minutos. La reacción de dansilación se controla por cromatografía en placas de poliamida con ácido fórmico (1.5% v/v) como sistema de desarrollo.

La purificación de la DPE se lleva a cabo en placas de sílica gel por el mismo método utilizado para el fraccionamiento de fosfolípidos. La DPE se eluye de la placa con etanol.

#### Incorporación de marcadores de fluorescencia.

Se prepara una disolución  $2 \times 10^{-3}$  M de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) en tetrahidrofurano, inmediatamente antes de su uso; esta disolución se diluye 1:100 con tampón fosfato potásico 0.24 M, pH 7.5, conteniendo EDTA 2 mM mediante fuerte agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se obtiene una dispersión acuosa de DPH  $2 \times 10^{-3}$  M, fluorescente, clara y estable. Un volumen de disolución del complejo ácido graso sintetasa (0.1 mg/ml) en el mismo tampón fosfato se incuba con un volumen de la dispersión de DPH, a diferentes temperaturas y durante diferentes intervalos de tiempo, con agitación constante. Para el marcaje del complejo enzimático con DPE se utiliza el mismo procedimiento descrito, empleando inicialmente DPE  $2 \times 10^{-3}$  M en etanol.

#### Disociación de la proteína.

La disolución se lleva a cabo por diálisis durante 5 horas a 0°C frente a tampón Tris 5 mM, glicocola 35 mM, pH 8.4, conteniendo EDTA 2 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM.

#### Preparación del soporte cromatográfico.

El soporte utilizado para el fraccionamiento de la proteína disociada es CH-Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno. Dicho soporte se lava primeramente con 1 litro de ClNa 0.5 M, para eliminar las posibles moléculas de lactosa y dextranos presentes; a continuación se realizan sucesivos lavados con agua destilada para eliminar el cloruro sódico.

La Sepharosa-*c*-aminocaproilpanteteína se prepara por el método de Lornitzo et al. (1975) incubando el soporte con la panteteína (1.5  $\mu$ mol/lg de gel húmedo) durante 18 horas a temperatura ambiente y agitación constante manteniendo

do el pH entre 4.5 y 6. Para la unión del ligando al soporte se utiliza 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida a una concentración final de 0.1 M. La panteteína se obtiene a partir de pantetina por reducción con amalgama de sodio.

La panteteína unida se ensaya mediante hidrólisis alcalina de 0.1 ml de Sepharosa-*e*-aminocaproilpanteteína lavada con 0.01 ml de KOH 0.1 N durante 15 minutos a temperatura ambiente y posterior neutralización con 0.01 ml de CIII 1 N, valorando grupos -SH libres. El soporte con el ligando unido se lava con tampones alcalino y ácido de alta concentración (1M) y posteriormente se dan lavados con agua destilada. El gel así tratado se deposita en una columna cromatográfica (1x10 cm) y se equilibra con

tampón Tris 0.1 M, fosfato potásico 0.1 M, pH 8.4 conteniendo EDTA 2 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM.

#### *Cromatografía de afinidad.*

Se cargan en la columna de Sepharosa 3 ml de una disolución de proteína disociada (2 mg/ml) realizándose la elución en dos condiciones sucesivas diferentes, primeramente a 0°C con tampón Tris 0.1 M, fosfato potásico 0.1 M, pH 8.4 conteniendo EDTA 2 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM y a continuación con tampón Tris 0.1 M, fosfato potásico 0.1 mM, pH 10, conteniendo EDTA 2 mM y 2-mercaptoetanol 1 mM a 25°C. Se recogen fracciones de 1 ml.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Aislamiento de ácido graso sintetasa.

El proceso empleado en la purificación del complejo multienzimático *ácido graso sintetasa* del insecto *C. capitata* proporciona una enzima con actividad específica de 77 unidades/mg. El rendimiento del proceso es del 40 % y la purificación de la enzima de 180 veces. Estos valores son esencialmente coincidentes con los previamente descritos para este sistema enzimático (Lizarbe, 1979; Muncio et al., 1977).

### Caracterización espectroscópica de ácido graso sintetasa del insecto.

Considerando el carácter de los estudios a realizar sobre el complejo multienzimático así como la metodología empleada, el primer requerimiento se centra en la caracterización espectroscópica del sistema nativo a fin de establecer los adecuados parámetros de referencia.

### Espectro de absorción ultravioleta.

En la figura 1 se recoge el espectro obtenido experimentalmente para la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* en condiciones nativas. Como se puede apreciar, el incremento de absorción en la región de 350-310 nm, en la que una cadena polipeptídica no presenta absorción, indica la existencia de un componente de dispersión. Por ello, también se recoge en la figura 1 el espectro teórico calculado considerando la linealidad existente entre  $1/\lambda^4$  y dispersión, tomando como base para la posterior extrapolación los valores de absorción en la zona en la que la proteína no debe absorber. Para ello se ha seguido un programa de mínimos cuadrados, determinándose valores a cada nm. El máximo de absorción del espectro teórico aparece a 280 nm, encontrándose un hombro a 290 nm. Estos dos hechos revelan una importante contribución de residuos de triptófano, que al pH al que se ha realizado el espectro, pH neutro, presentan la mayor aportación unitaria de entre los cromóforos aromáticos proteicos.

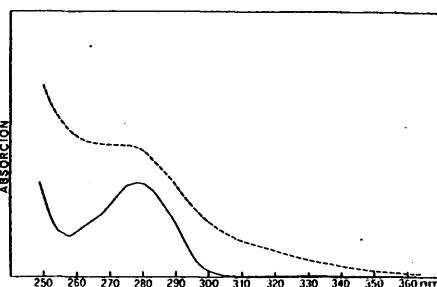


Figura 1. Espectro de absorción de *ácido graso sintetasa* de *C. capitata*. (---) espectro experimental; (—) espectro teórico considerando la dispersión (la escala en este caso es doble de la anterior).

### Dicroísmo circular.

En la figura 2 se recoge el espectro de dicroísmo circular de la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* en el ultravioleta lejano. En las condiciones en las que se ha obtenido dicho espectro, la enzima muestra su actividad total. Como se puede observar existe un mínimo centrado a los 210 nm, con un valor de  $-17700 \text{ grados} \times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$  para la elipticidad molar por residuo.

El análisis de la estructura secundaria de la enzima, de acuerdo con los parámetros de Greenfield y Fasman (1969), proporciona una composición de 43 % en  $\alpha$ -hélice, 26 % en estructura  $\beta$  y 31 % en ordenación aperiódica (fig. 3). Dichos parámetros de referencias se determinan a partir de los espectros de dicroísmo circular de polilisina, polipeptido con un número de residuos muy superior a 40. Este tamaño molecular se traduce en que las estructuras helicoidales de poli-lisina se puedan considerar como de longitud infinita. Teniendo en cuenta que la dependencia



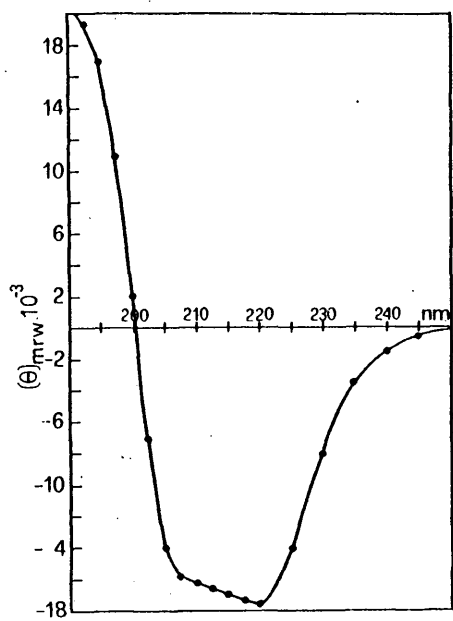


Figura 2. Espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de ácido graso sintetasa de *C. capitata*.

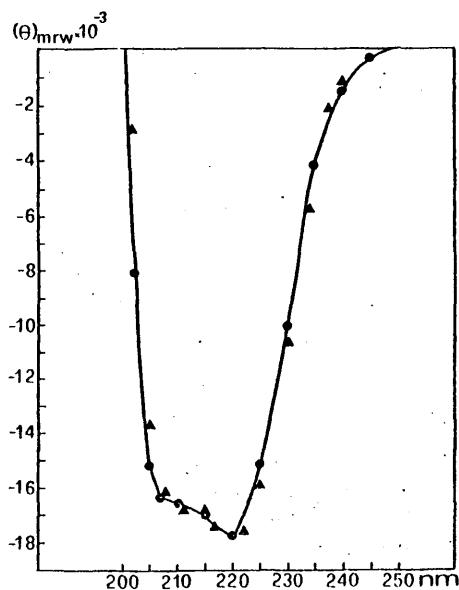


Figura 3. Espectro de dicroísmo circular de ácido graso sintetasa nativa (●) y el calculado en base a una composición de 43% de  $\alpha$ -hélice, 26% cadena estadística (▲).

existente entre elipticidad de la  $\alpha$ -hélice y longitud de la cadena polipeptídica en tal conformación (Chen et al. 1974), se ha procedido a analizar también la estructura secundaria de la sintetasa del insecto de acuerdo con los parámetros de referencia de Chen et al. (1974), que consideran dicha dependencia merced a la inclusión del parámetro  $n$ , número promedio de residuos por segmento helicoidal. Este tipo de análisis se ha realizado ante la posibilidad de que los cambios conformacionales producidos en la proteína, como consecuencia de los distintos tratamientos, se traduzcan precisamente en una distribución de la longitud promedio de los segmentos helicoidales. Los resultados obtenidos en este caso son 45% de  $\alpha$ -hélice, 16% de estructura B, 39% de estructura aperiódica y un  $n = 40$  (fig. 4). Este valor de  $n$  se puede considerar como longitud infinita en lo que se refiere a la citada dependencia de la elipticidad. Al presentar el sistema objeto de estudio longitud promedio de segmento helicoidal que se puede considerar de valor infinito, es por lo que ambos tipos de análisis conformacional de la proteína se realizaron según los parámetros de Chen et al. (1974) a fin de evaluar posibles modificaciones en el valor de  $n$ .

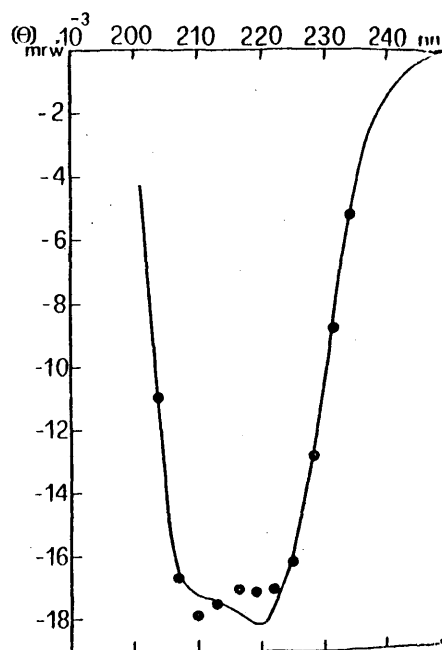


Figura 4. Espectro de dicroísmo circular de ácido graso sintetasa nativa calculado en base a una composición de 45%  $\alpha$ -hélice, 16% estructura B y 39% cadena estadística,  $n = 40$ .

#### Fluorescencia.

Los estudios de fluorescencia de proteínas se han utilizado en gran número de casos para establecer relaciones

estructura-función en estas macromoléculas. En general, las proteínas presentan fluorescencia intrínseca debido a sus residuos de triptófano y tirosina, dependiendo las características de la emisión fluorescente del microentorno de estos residuos. Los espectros de emisión de la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* con excitación a 280 y 295 nm aparecen en la figura 5. El espectro de emisión, excitando a 280 nm, muestra dos máximos, 340 y 325 nm, lo que indica una contribución predominante de los residuos de triptófano (fig. 5A). La presencia de los dos máximos parece indicar la existencia de, al menos, dos familias bien definidas de residuos de triptófano. Estos máximos de emisión, 340 y 325 nm, presentan una notable desviación hacia el azul cuando se comparan con el máximo de emisión del triptófano libre en solución acuosa ( $\lambda_{max}$ , 352 nm). Incluso el máximo a 325 nm aparece también significativamente más desviado hacia el azul que el máximo propuesto para la fluorescencia del triptófano (330–332 nm) en un modelo de fluorescencia intrínseca de proteínas en solución acuosa (Burnstein et al., 1973). A través de la posición de estos máximos de emisión se puede hablar de dos grupos de residuos de triptófano en un entorno hidrofóbico.

Previo excitación a 295 nm, longitud de onda a la que la absorción debida a tirosinas es menor del 10% (Teale 1960), no se resuelve la banda de emisión, apareciendo solamente un máximo centrado a 335 nm (figura 5B). Considerando que la fluorescencia por encima de 380 nm es debida solamente a los residuos de triptófano, ambos espectros, excitación a 280 nm y 295 nm, pueden superponerse en el intervalo de 380–400 nm. La diferencia de espectros después de la normalización, (fig. 5C) revela una débil contribución de tirosina centrada a 310 nm. Por todo ello, la fluorescencia del complejo *ácido graso sintetasa* del insecto presenta una contribución predominante de los residuos de triptófano, pese a que la enzima posee una relación tirosina/triptófano de 2.9.

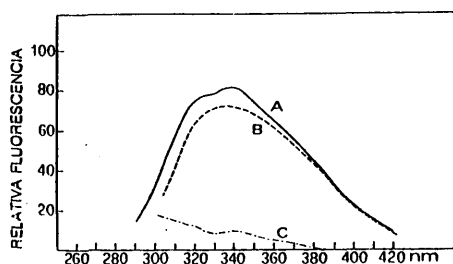


Figura 5. Espectro de emisión de fluorescencia de *ácido graso sintetasa* nativa de *C. capitata*. Excitación a 280 nm (A), y 295 nm (B) y su diferencia después de la normalización (C). Los espectros se han realizado en tampón fosfato sódico 0.25 M y borato sódico 0.1 M, pH 7.5. La concentración de proteína es 50  $\mu$ g/ $\mu$ l; temperatura 20°C.

Considerando que la enzima contiene una elevada proporción de residuos aromáticos, 5% del total de aminoácidos, así como la ausencia de transferencia de energía puesta de manifiesto por los dos máximos de emisión claramente definidos, se puede argumentar la existencia de dos dominios de residuos aromáticos, topológicamente independientes. Estos dos dominios son asignables a las dos familias de residuos de triptófano con emisiones diferenciadas espectroscópicamente. Tal independencia topológica surge del hecho de que a menos de 16 Å se puede presentar transferencias de energía entre residuos aromáticos (Chen et al., 1969).

#### Polarización de fluorescencia.

El estudio de la polarización de fluorescencia intrínseca de proteínas no es de fácil interpretación fundamentalmente por la ausencia de datos al respecto en la bibliografía. No obstante, debido a la naturaleza lipoproteica del sistema *ácido graso sintetasa* del insecto este estudio se ha considerado útil, ya que permitirá la correlación de parámetros estructurales con datos de movilidad intramolecular de los fluoróforos.

En la figura 6 se recoge el espectro de polarización de fluorescencia de la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata*. A 20°C como temperatura representativa para el estado nativo el valor del grado de polarización (P) a 295 y 275 nm es 0.17 y 0.08 respectivamente.

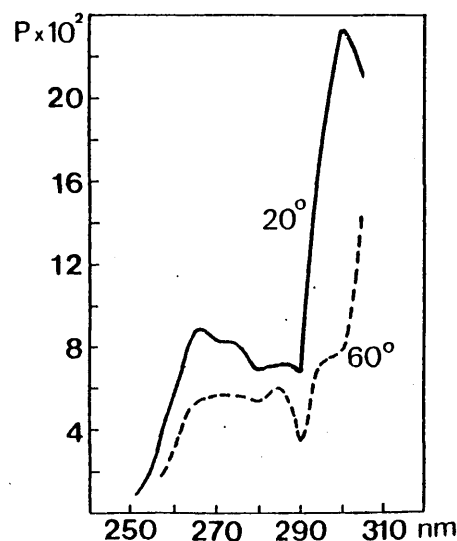


Figura 6. Espectro de polarización de fluorescencia de la sintetasa del insecto a 20°C (—) y 60°C (---) para emisión a 340 nm. La concentración de proteína es 0.05 mg/ml en tampón fosfato potásico 0.25 M, pH 7.5.

### Estudio topológico de los componentes del complejo enzimático.

Para realizar este estudio se ha considerado como referencia los residuos de tirosina y triptófano, ya que en definitiva son los únicos que permiten una valoración directa en el seno del complejo enzimático. El estudio relativo al entorno de los residuos de tirosina se ha llevado a cabo por nitración, y el de los residuos de triptófano mediante "quenching" de su emisión de fluorescencia. El sistema lipido-proteína se ha examinado mediante medidas de fluorescencia, tanto extrínseca como intrínseca, conjugadas con el empleo de detergentes y tratamientos térmicos.

### Influencia de la temperatura.

El complejo enzimático *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* experimenta una transición conformacional de carácter cooperativo como consecuencia del incremento de la temperatura. Tal transición estructural es paralela a la que experimenta la actividad enzimática (Gavilanes et al., 1981). Por este motivo se ha estudiado este efecto a nivel de la distribución de lípidos en el sistema.

En la figura 6 se recogen los espectros de polarización a 20°C y 60°C como temperaturas representativas de los estados nativo y desnaturizado. El incremento de temperatura se traduce en un descenso en el valor de P de 0.10 y 0.02 a 295 y 275 nm respectivamente. Considerando que la contribución de tirosinas a la absorción de la proteína a 295 es inferior al 10%, estos resultados indican un elevado incremento de libertad rotacional para los residuos de triptófano, como consecuencia del proceso de desnaturización térmica siendo el citado aumento de movilidad muy inferior para los residuos de tirosina. Este resultado sugiere una especificidad en la distribución del componente lipídico lo que se manifiesta a nivel de la

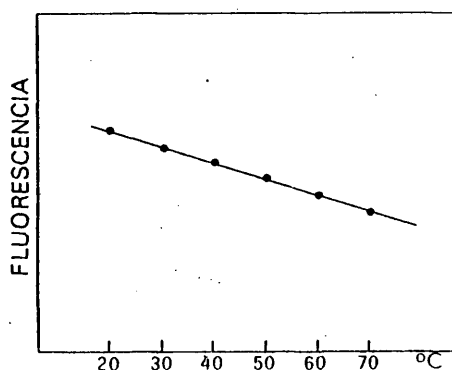


Figura 7. Variación de la emisión de fluorescencia a 380 nm en función de la temperatura. La concentración de proteína es 0.05 mg/ml en tampón fosfato potásico 0.25 M, pH 7.5.

diferente influencia de la temperatura sobre la movilidad de los cromóforos aromáticos.

Asimismo se ha considerado el efecto de la temperatura sobre la fluorescencia intrínseca de la proteína. En la figura 7 se recoge el resultado de dichos tratamientos. Para esta representación se ha considerado la emisión de fluorescencia a 380 nm, debido a que a dicha longitud de onda se puede considerar que la emisión de la proteína se debe únicamente a los residuos de triptófano. Gally y Edelmam (1964) encuentran un 50% de descenso en la emisión para triptófano libre, en el intervalo de 25°C a 50°C. El descenso observado, en el mismo margen de temperaturas, para la *ácido graso sintetasa* es solamente del 27%. Este dato indica claramente la protección ejercida por el componente lipídico sobre los residuos de triptófano, lo que puede interpretarse en términos de un carácter interno de tales residuos en la matriz de la lipoproteína, de acuerdo con los resultados observados previamente.

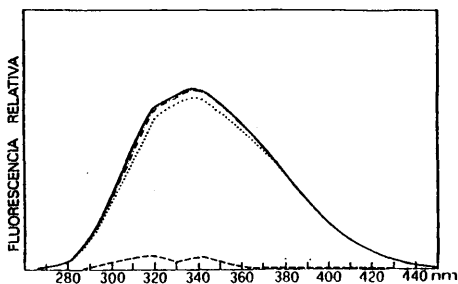


Figura 8. Espectros de emisión de fluorescencia de la enzima de *C. capitata* registrados a 20°C tras diez minutos de incubación a diferentes temperaturas, 20°C (—), 37°C (---), 60°C (— · —). Espectro de diferencia, calculado a partir de los obtenidos a 37 y 60°C (- - -). La concentración de proteína es de 0.05 mg/ml en tampón fosfato potásico 0.25M, pH 7.5.

A fin de considerar el posible carácter reversible de la modificación, se han estudiado los espectros de fluorescencia a 20°C tras incubación a diferentes temperaturas. En la figura 8 se recogen los espectros obtenidos a 20°C tras incubación durante diez minutos a diferentes temperaturas. Estos espectros no revelan una variación significativa como consecuencia del tratamiento térmico. Sin embargo, la enzima presenta una transición térmica a 50°C en estructura secundaria (Municio et al., 1981). Ambos resultados sugieren que la temperatura origina un cambio conformacional pero manteniendo una protección de los fluoróforos peptídicos por parte del componente lipídico. Asimismo en la figura 8 se recoge el espectro de diferencia calculado a partir de los datos obtenidos en los tratamientos a 37°C y 60°C. Como puede apreciarse, pese a tratarse de una variación muy pequeña la producida, afecta esta a la emisión a 320 y 340 nm, siendo mayor el "quenching" estructural para la emisión a 320 nm. Así los triptófanos situados en entornos de menor polaridad se

ven afectados en mayor proporción en su microentorno como consecuencia del tratamiento térmico. Todos estos datos abundan en la idea de la existencia de diferentes dominios de interacción lípido-proteína.

#### Nitración del complejo enzimático.

La figura 9 presenta el grado de nitración de las tirosinas del complejo *ácido graso sintetasa* en función del exceso molar de reactivo. La modificación máxima se obtiene alrededor de un exceso 10 M de tetranitrometano sobre el contenido de tirosinas; a esta concentración, los porcentajes molares de ambas, tirosina y nitrotirosina, son de 0.6 y 3.4 respectivamente. El alto grado de modificación y el carácter hidrofóbico del reactivo sugieren que los residuos de tirosina pueden estar implicados en un entorno apolar formado por el componente lipídico del sistema.

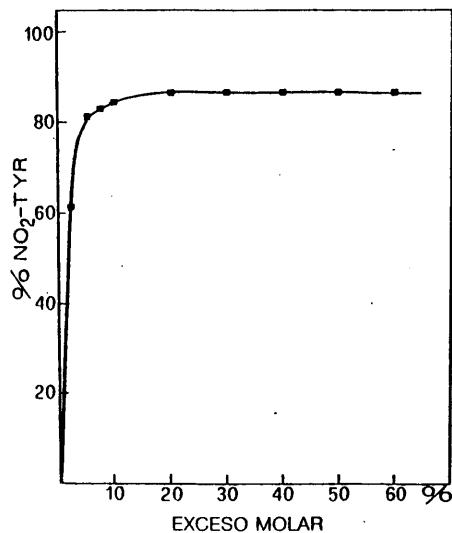


Figura 9. Contenido en 3-nitrotirosina frente al exceso molar de tetranitrometano. Los valores están referidos al contenido en tirosina en la enzima nativa (100%).

#### Acción de detergentes.

A fin de obtener mayor información sobre la naturaleza del entorno de los grupos de triptófano y tirosina en el sistema lípido-proteína, se ha estudiado el efecto del colato y del dodecilsulfato sódicos. El colato sódico no afecta la estructura de la enzima mientras que el dodecilsulfato sódico (SDS) disocia el complejo.

La proteína tratada con dodecilsulfato sódico al 0.1% (w/v) muestra máximos de emisión de fluorescencia a 365, 345 y 310 nm (fig. 10 A). La proteína tratada con colato al 2% (w/v) muestra dos máximos a 360 y 345 nm y un hombro a 310 nm (fig. 10B); en ambos casos se pone de manifiesto la existencia de dos tipos de poblaciones de triptófano. Sin embargo, el desplazamiento de la emisión hacia el rojo por el tratamiento con detergentes indica un incremento local en la polaridad para ambas familias, más alta para el SDS que para el colato. El punto medio de este proceso tiene lugar con dodecilsulfato sódico al 0.001%. La representación de los cocientes  $F_{310}/F_{360}$  ó  $F_{340}/F_{360}$  frente a la concentración de SDS muestra la existencia de una transición conformacional a esta concentración de detergente. Así pues, las transiciones inducidas por SDS en los diferentes niveles estructurales y el "quenching" observado para los residuos de triptófano por el tratamiento con detergentes, pueden deberse a la mayor exposición de estos residuos en las cadenas polipeptídicas disociadas.

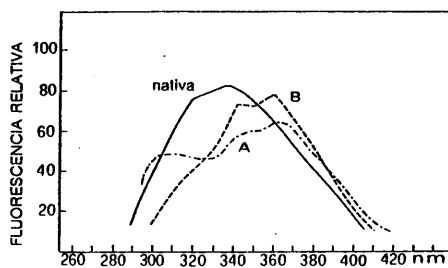


Figura 10. Espectro de emisión de fluorescencia de *ácido graso sintetasa* nativa y en presencia de SDS (A) al 0.1% (w/v) y colato sódico (B) al 2%. Excitación a 280 nm. El espectro está registrado a 20°C y la concentración de proteína es de 50 µg/ml en tampón fosfato sódico 0.25 M, pH 7.5.

En presencia de colato sódico se ha observado un intercambio entre el detergente y los fosfolípidos (Lizarbe, 1979). Los estudios de fluorescencia incrementando la concentración de colato muestran una transición conformacional con un punto medio a una concentración de 0.5% (w/v), en consecuencia con el descenso de la actividad enzimática inducido por colato.

Con estos datos, el desplazamiento de la emisión hacia el rojo indica que los fosfolípidos proporcionan un entorno más hidrofóbico para los residuos de triptófano que el colato (fig. 10). Dado que la estructura secundaria no se modifica por colato, el intercambio fosfolípidos-detergente modifica la estructura terciaria del complejo. Este hecho soporta la idea de que los fosfolípidos son esenciales para la conformación nativa, creando interacciones hidrofóbicas específicas que no podrían ser sustituidas en el sistema lípido-proteína por moléculas incluso de similar hidrofobicidad.

#### Influencia de acrilamida.

Para estudiar la heterogeneidad de la fluorescencia de triptófanos, se ha seguido el efecto de "quenching" ejercido por la acrilamida. La acrilamida es un eficiente agente de "quenching" de derivados indólicos y es capaz de penetrar en la matriz proteica interaccionando con residuos de triptófano (Eftink y Ghiron, 1976).

La *ácido graso sintetasa* nativa ha sido tratada con acrilamida hasta una concentración final de 0.6 M. Para considerar sólo la emisión de triptófano, las muestras se han excitado a 295 nm. La figura 11 representa el "quenching" por acrilamida de la fluorescencia de triptófano en el complejo enzimático. Se ha representado:

$$F_0/F = 1 + K_q(Q)$$

Donde:  
 $F_0$  y  $F$  son respectivamente las intensidades de fluorescencia a 340 nm en ausencia y en presencia de acrilamida a una concentración (Q).  
 $K_q$  es la constante de "quenching".

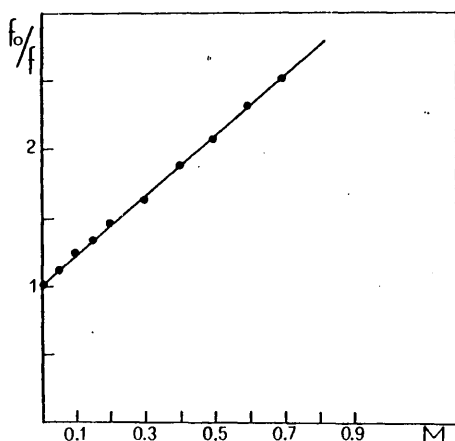


Figura 11. Representación del "quenching" por acrilamida. Los puntos son las intensidades experimentales recogidas a 20°C y 340 nm con excitación a 280 nm. Los datos están ajustados por el método de mínimos cuadrados.

El valor de  $K_q$  calculado gráficamente es  $2.19 M^{-1}$ . Este resultado es consistente con la presencia de residuos de triptófano ocultos en entornos no polares (Eftink y Ghiron, 1976). El "quenching" por acrilamida va acompañado de un desplazamiento hacia el azul en la banda de emisión y de ausencia de resolución en distintas contribuciones de triptófano. En presencia de acrilamida 0.6 M aparece sólo un máximo a 325 nm. El desplazamiento hacia el azul se puede interpretar como debido al menor "quenching" de los residuos de triptófano en entorno más hidrofóbico (contribución a 325 nm). Este dato de "quenching" corrobora el hecho de la existencia en la *ácido graso*

*sintetasa* de *C. capitata* de, al menos, dos poblaciones diferentes de residuos de triptófano, localizados en entornos de diferente polaridad.

La ausencia de desplazamiento hacia el rojo, indica que no se ha producido desnaturalización de la proteína, pues, de producirse esta, daría como resultado una exposición mayor de los residuos de triptófano.

#### Fluorescencia extrínseca.

El 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) es un marcador de fluorescencia hidrofóbico usado en estudios de regiones no polares de estructura lipídica. Así pues, el DPH puede ser un buen marcador de fluorescencia extrínseca esencialmente para los triglicéridos del complejo *ácido graso sintetasa*.

El papel específico de los fosfolípidos, tanto en la conformación como en la actividad enzimática del complejo, se ha estudiado usando dansilfosfatidiletanolamina (DPE) como marcador de fluorescencia, ya que la DPE se incorpora preferentemente en lípidos enlazantes de proteínas unidas a membrana. (Gupte et al., 1979). El grupo dansilo sirve para detectar los cambios estructurales producidos.

Los resultados de incorporación de estos marcadores (figura 12) indican que el sistema DPH-sintetasa alcanza una posición de saturación que no se afecta por la concentración de proteína ni de marcador. Este sistema se satura con  $10 \mu M$  de DPH a una concentración de proteína de  $15 \mu g/ml$ . A cada concentración de proteína la cantidad de DPH incorporada por la lipoproteína depende sólo de la concentración de DPH. Esto sugiere que la cantidad de DPH unida por el complejo depende del número de vesículas de DPH de tamaño necesario para su solubilización en el complejo enzimático, ya que el tamaño es dependiente de la concentración de marcador.

Por otro lado, DPE no alcanza esta situación en el mismo margen de concentraciones. Estos resultados indicarían que la solubilización de la DPE es mayormente dependiente del entorno hidrofóbico solubilizante, mientras que el DPH es en mayor medida dependiente de un factor tamaño.

En la figura 13 se dan las curvas de incorporación de DPE y DPH a 20°C, 25°C, 37°C, 45°C y 60°C. La incorporación de ambos marcadores es dependiente de la temperatura. La presencia de ambos marcadores en el sistema lipoproteico manifiesta un aumento de fluorescencia con una cinética de primer orden, alcanzando un equilibrio después de 10 minutos a cada temperatura. Cuando se mezcla marcador y complejo sintetasa, la incorporación del marcador incrementa con la temperatura de incubación. Los valores de incorporación a diferentes temperaturas aparecen en la tabla IV. La incorporación de DPH y DPE se incrementa 2.4 y 1.7 veces, respectivamente, en el intervalo 20-60°C. A 20°C, la incorporación de DPH y DPE es

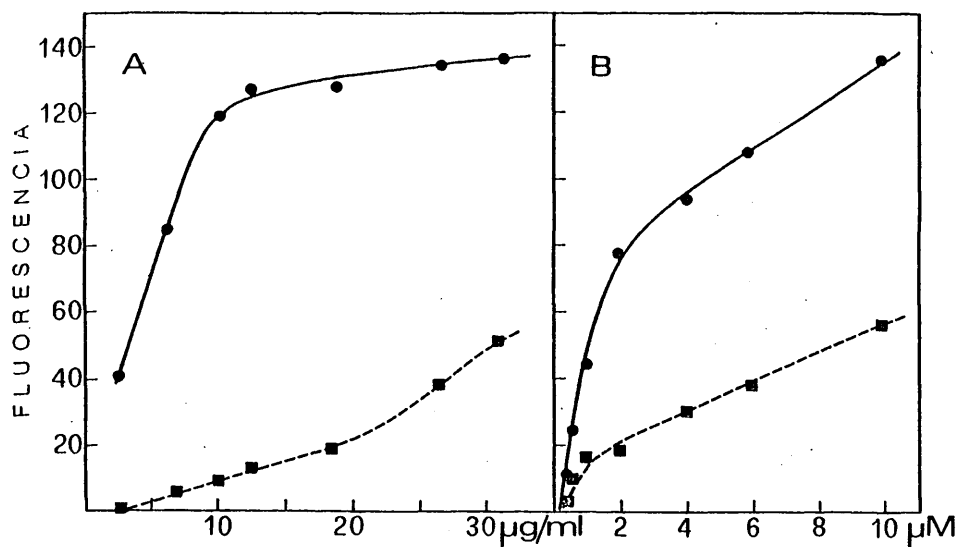


Figura 12. Incorporación de DPH (—●—) y DPE (---■---) en ácido graso sintético. La fluorescencia se mide a 20°C después de 30 minutos de incubación a 37°C. La intensidad de fluorescencia se obtiene para emisión a 425 nm y excitación a 365 nm. Fluorescencia frente a concentración de proteína a 10 μM de marcador (A) y fluorescencia frente a concentración de marcador a 30 μg/ml de proteína.(B).

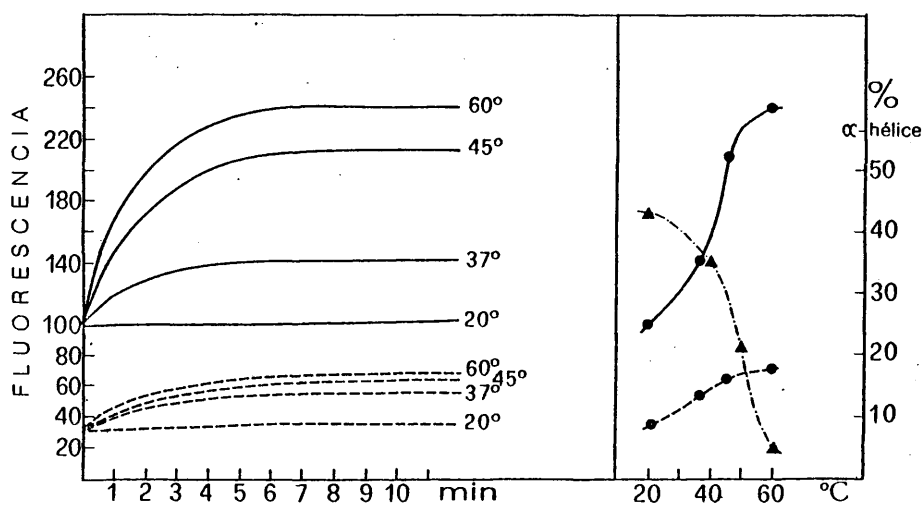


Figura 13. Intensidad de fluorescencia para emisión a 435 nm y excitación a 365 nm. Incorporación de DPH (—●—) y DPE (---■---) a lo largo del tiempo en ácido graso sintético a diferentes temperaturas (A). Las concentraciones de marcador son respectivamente 30 μg/ml y 10 μM. Valores máximos de  $F_{435}$  para DPH (—●—) y DPE (---■---) incorporados en ácido graso sintético y contenido en  $\alpha$ -hélice de la enzima frente a la temperatura (▲) (B).

independiente del tiempo. El carácter hidrofóbico del componente lipídico del complejo disminuye el efecto de "quenching" que el disolvente ejerce sobre el marcador y esto explica el incremento de intensidad de fluorescencia.

Los estudios de desnaturalización térmica muestran un descenso en el contenido en  $\alpha$ -hélice y actividad enzimática en el intervalo 20-60°C. Cuando se estudia la intensidad de fluorescencia como índice del marcador incorporado

Tabla IV. Velocidad de incorporación de DPH y DPE en el complejo ácido graso sintetasa de *C. capitata* a diferentes temperaturas.

temperatura (°C)	DPH (s <sup>-1</sup> )	DPE (s <sup>-1</sup> )
37	5.5 × 10 <sup>-3</sup>	6.3 × 10 <sup>-3</sup>
45	8.2 × 10 <sup>-3</sup>	6.2 × 10 <sup>-3</sup>
60	10.0 × 10 <sup>-3</sup>	6.3 × 10 <sup>-3</sup>

frente a la temperatura, se observa una transición térmica (fig. 13). La excitación a 280 y 295 nm para el sistema DPH-sintetasa muestra un máximo de emisión centrado a 445 nm. Este máximo corresponde a la banda de emisión del DPH. Estos resultados indican la existencia de transferencia entre grupos indólicos y DPH. Estudios similares en el complejo DPE-sintetasa no revelan la existencia de una banda de emisión en ese intervalo de longitudes de onda. Jonás (1977) ha estimado un intervalo de distancias entre 23 y 66 Å para que exista transferencia de energía entre donadores indólicos y DPH en lipoproteínas de suero, con lo cual la distancia entre residuos de triptófano del complejo sintetasa y moléculas de DPH es menor de 66 Å. Dado que no existe transferencia de energía para el sistema DPE-sintetasa, estos resultados pueden interpretarse en términos de una mayor proximidad entre residuos DPH y grupos indólicos que entre moléculas de DPE y la misma clase de residuos.

#### Microviscosidad.

De los estudios de polarización de fluorescencia a concentración saturante de DPH se obtiene un valor para la microviscosidad intrínseca de 5.4 poise a 20°C de acuerdo con la ecuación  $n = 2p/(0.46 - p)$  (Rossen et al., 1979) donde  $p$  es el grado de polarización de fluorescencia expresado en poise.

La polarización de la emisión de DPE es insignificante en las condiciones del ensayo. Estos resultados reflejan una mayor movilidad para los sitios de solubilización de la DPE que para los del DPH.

Por tanto, los datos de fluorescencia del complejo ácido graso sintetasa son consistentes con la presencia de dos familias de residuos de triptófano en la matriz del complejo. Este hecho se pone de manifiesto en todos los espectros realizados bajo diferentes condiciones, incluso empleando la enzima disociada, lo que permite suponer fundadamente la existencia de dos dominios polipeptídicos en el complejo. Dado que el complejo enzimático contiene abundantes residuos de triptófano (1.28% molar) la constancia en la diferencia entre ambos grados de exposición para fluoróforos de triptófano podría indicar dos cadenas polipeptídicas diferentes o entornos que originan dos dominios lipídicos diferentes.

En cualquier caso, la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* sería una estructura no simétrica, ya que aparecen dos tipos de fluorescencia.

De los tratamientos con detergentes se puede concluir el papel específico de los fosfolípidos en el soporte conformacional de la enzima a través de interacciones polares e hidrofóbicas. Así, cuando los fosfolípidos se intercambian por detergentes se modifica la estructura terciaria, incluso en presencia de colato que no afecta ni a la estructura secundaria ni a la cuaternaria. Los estudios de fluorescencia extrínseca indican que para cada concentración de DPH se alcanza un valor saturante, indicando la existencia de sitios específicos para la solubilización del DPH dependientes del tamaño. Teniendo en cuenta la composición lipídica del complejo a una concentración de enzima  $\mu\text{g/ml}$  con una saturación de 10  $\mu\text{M}$  de DPH corresponde una concentración de cadenas acilo de 27  $\mu\text{M}$ , la saturación del sistema a 20°C presenta una relación cadena de acilo/DPH de 2/3. Por otro lado los datos de incorporación de DPH y DPE abogan por el hecho de que los lípidos no están distribuidos al azar en la matriz enzimática. El carácter interno de los residuos de triptófano en el complejo enzimático y la transferencia de energía entre los grupos indólicos y el DPH sugieren una localización interna para los sitios de solubilización de este marcador. Dado que el DPH se distribuye mayormente dentro de los triacilglicerolos, estas moléculas podrían constituir el núcleo lipídico en el complejo. Por otro lado, al no observarse transferencia de energía entre grupos indólicos y DPE, el carácter interno de los residuos de triptófano y las cabezas polares de la DPE podrían sugerir una localización más superficial para los sitios de solubilización de este marcador.

El papel específico de la fosfatidiletanolamina en la actividad enzimática indica que los fosfolípidos no están distribuidos al azar en el complejo, significándose la implicación de la fosfatidiletanolamina en la conformación del centro activo, con una localización superficial.

El incremento en la incorporación de DPH con la temperatura es superior al observado para sistemas DPH<sub>2</sub> membrana biológica (Hubbart y Garrat, 1979). Este hecho indicaría un mayor dinamismo molecular para el complejo enzimático. Sin embargo, a pesar de la alta proporción de triglicéridos presentes en la sintetasa, el valor de la microviscosidad intrínseca obtenido para el sistema DPH-sintetasa es similar al obtenido para las HDL de suero (Jonás, 1977). Ello indicaría una estructura muy organizada para la matriz lipídica del complejo, pese a su elevado contenido en triacilglicerolos. En favor de este hecho habla el que el aumento de incorporación ocurre en el mismo intervalo de temperaturas que la desnaturalización térmica, pudiendo ser procesos concomitantes la transición de fase de la fase lipídica solubilizante del DPH y la desnaturalización térmica del sistema.

Todos estos datos reafirman la especificidad del compo-

mente lipídico en el complejo, a la vez que destacan el hecho de ser una estructura más ordenada de lo que la simple composición pudiera hacer suponer, pese al dinamismo molecular inherente a toda asociación lipídica. Dicho orden se manifiesta a nivel de los dos dominios de ordenación claramente definidos.

#### Función de los fosfolípidos en la estructura de la enzima.

Todos los datos acumulados acerca del complejo *ácido graso sintetasa* del insecto muestran un papel preponderante de los fosfolípidos en las relaciones estructura-función del sistema. De los datos hasta ahora descritos se deduce una ordenación específica, lo que se traduce en una estructura asimétrica con dos dominios diferenciables espectroscópicamente. En un orden lógico de razonamiento, el siguiente punto a tratar sería la función estructural de las distintas clases de lípidos y su relación con la actividad del complejo. Sin embargo, este estudio hay que reducirlo, al menos en los niveles actuales de conocimiento, al caso de los fosfolípidos, habida cuenta del difícil abordaje de los triglicéridos por su mayor proporción y menor reactividad específica.

La influencia de los fosfolípidos en el sistema se podría considerar si se consiguiese una forma carente de tales moléculas. El problema se establece a este nivel. Si se emplean tratamientos deslipidizantes convencionales, estos resultan poco específicos y los cambios observados no son asignables sólo a los fosfolípidos. Si se emplean tratamientos lipolíticos, los lisoderivados resultantes también ejercen su correspondiente influencia.

El tratamiento experimental para abordar dicha influencia se basó en los hechos siguientes: Cuando la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* se incubaba a temperatura ambiente y baja fuerza iónica (tampón fosfato sódico 0.01 M, pH 7.5), se observa un marcado descenso de la actividad enzimática. En la tabla V se presenta la variación de actividad enzimática a esta concentración de tampón fosfato, así como a una concentración de fosfato 0.1 M, pH 7.5, utilizada como control.

Después de 10 horas de incubación a baja fuerza iónica, la actividad remanente es 2% del valor a tiempo cero; sin embargo, el control exhibe un 87% de actividad para el

mismo tiempo de incubación. Cuando el complejo enzimático nativo se cromatografía en una columna de Sephadex G-25 medium (4.6x50 cm), equilibrada en tampón fosfato 0.01 M, la sintetasa se inactiva en la misma extensión que después de 10 horas de tratamiento a baja fuerza iónica.

Teniendo en cuenta la dependencia de la actividad enzimática con el contenido lipídico, la inactivación podría deberse a la pérdida de lípidos. Ciertamente, ambos tratamientos, envejecimiento de la enzima y cromatografía de penetrabilidad a baja fuerza iónica, liberan lípidos de la lipoproteína nativa. En la tabla VI se muestra el contenido de la enzima nativa y de la enzima deslipidizada en las distintas clases de lípidos después de los tratamientos citados. La diferencia más significativa radica en el contenido en fosfolípidos. La pérdida de fosfolípidos en la molécula da como resultado la inactivación del complejo.

Tabla VI. Composición lipídica del complejo *ácido graso sintetasa* nativo y parcialmente deslipidizado.

Enzima	PG	FFA	DG	TG
Nativa	5.0	2.8	10.0	82.2
No-activa	0	2.0	8.7	72.4

Valores referidos al total de lípidos de la enzima nativa. Los valores se dan como porcentaje de fosfoglicéridos (PG), ácidos grasos libres (FFA) diacilgliceroles (DG) y triacilgliceroles (TG).

Esta deslipidización selectiva, dependiente de la fuerza iónica, no tiene lugar ni con disolventes orgánicos como acetona o cloroformo/metanol ni con tratamientos lipolíticos. Dado que el tratamiento con colato sódico al 1% (w/v), que produce el intercambio colato-fosfolípidos permaneciendo intacta la estructura secundaria de la proteína, no puede explicar el papel estructural de los fosfolípidos, se ha estudiado el complejo enzimático *ácido graso sintetasa* parcialmente deslipidizado para observar dicha función.

Aparte de su influencia sobre la actividad enzimática, los fosfoglicéridos ejercen un efecto considerable sobre la

Tabla V. Actividad de *ácido graso sintetasa* a lo largo del tiempo a dos concentraciones de tampón fosfato (pH 7.5).

Tampón	Tiempo (min.)					
	0	30	60	120	300	600
0.1 M	43.33	43.33	43.33	43.33	39.16	37.60
0.01 M	43.33	37.17	32.00	18.83	5.17	0.83

La actividad se da como nmol de ácido graso sintetizado por mg de proteína.



estructura secundaria. La figura 14 muestra el espectro de dicroísmo circular de la enzima nativa y de la enzima no activa, parcialmente deslipidizada. Como ya se ha comentado anteriormente, el análisis conformacional resultante de los datos de dicroísmo circular puede realizarse por dos métodos. Uno de ellos utiliza polipéptidos sintéticos como modelos para las tres conformaciones (Greenfield y Fasman, 1969), mientras que el otro utiliza el conocimiento tridimensional para el espectro de dicroísmo circular (Chen et al., 1974).

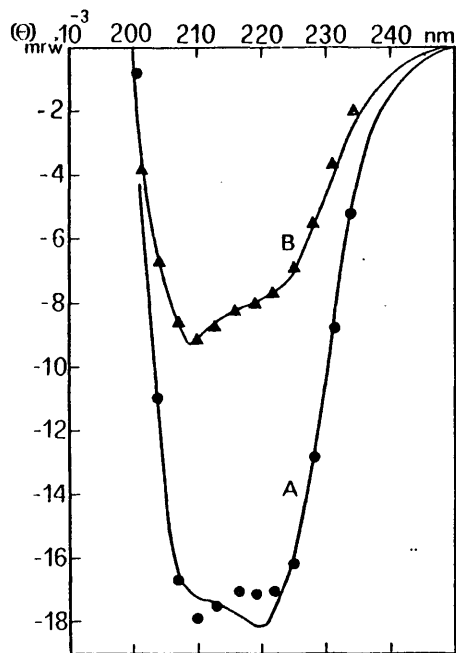


Figura 14. Espectro de dicroísmo circular de ácido graso sintetasa en su forma nativa (A) y parcialmente deslipidizada (B). Valores teóricos basados en la estimación de estructura secundaria dados en la tabla VII, para la enzima nativa (→) y parcialmente deslipidizada (→).

La hélice de los polipéptidos sintéticos de alto peso molecular es diferente de la hélice de los pequeños segmentos en el seno de una proteína, ya que el espectro de dicroísmo circular es dependiente de la longitud de la cadena. Así pues, de acuerdo con la dependencia de la longitud de la cadena, el valor referencia de elipticidad debería ser:

$$\Theta_n^0 = \Theta_n^{\infty} (1 - K/n)$$

Donde:  
 $n$  es el número promedio de residuos por segmento helicoidal.  
 $K$  es una constante dependiente de la longitud de onda.  
 $\infty$  representa una hélice de longitud infinita.

El análisis del espectro de dicroísmo circular, de acuerdo con este método, aparece en la tabla VII. La sintetasa nativa tiene una estructura helicoidal en largos segmentos con un promedio de 40 residuos por segmento de acuerdo con dicho análisis. El valor obtenido para  $n$  en la enzima nativa es equivalente a una hélice de longitud infinita porque la dependencia de la elipticidad con la longitud de la cadena alcanza una meseta a  $n = 40$  (Chen et al., 1974). Este hecho se corrobora con el método de Greenfield y Fasman (1969) que considera hélices de longitud infinita de polipéptidos sintéticos debido a su elevado peso molecular.

Tabla VII. Estructura secundaria del complejo ácido graso sintetasa nativa y parcialmente deslipidizada.

Enzima	$\alpha$ -hélice	estructura $\beta$	estructura aperiódica	$n$
Nativa	45	16	39	40
No-activa	30	25	45	7

La estructura secundaria de la enzima nativa de acuerdo con el método de Chen et al., (1974) es de 43% de  $\alpha$ -hélice, 26% de estructura  $\beta$  y 33% de estructura aperiódica, valores semejantes a los ya obtenidos con anterioridad.

De los resultados de la tabla VII se puede observar una variación estructural en la enzima no activa, referida a un pequeño descenso en el contenido en  $\alpha$ -hélice (30% frente a 45% en la enzima nativa) pero con una importante disminución del valor de  $n$  (longitud infinita a  $n = 7$  para la enzima no activa).

Así pues, la deslipidización parcial tiene como resultado esencial un descenso en el número promedio de residuos por segmento helicoidal. Las moléculas de fosfoglicéridos podrían estar implicadas en el mantenimiento de la conformación helicoidal de pequeñas regiones de la cadena polipeptídica. Así, los fosfoglicéridos no incrementan notablemente el contenido helicoidal de las lipoproteínas, pero podrían incrementar la longitud de los segmentos helicoidales estabilizando regiones entre segmentos en conformación helicoidal (fig. 15). Tal incremento en longitud es consistente con el ordenamiento modelo de la hélice anfipática, en la que los residuos polares podrían distribuirse en una cara de la hélice orientados hacia la fase acuosa mientras que los residuos no polares, situados en la cara opuesta, podrían estar ocultos en el núcleo hidrofóbico de la lipoproteína. (Segrest et al., 1974). De acuerdo con esta teoría los fosfolípidos mantendrían la  $\alpha$ -hélice, siendo el contenido helicoidal de una proteína dependiente de su asociación con fosfoglicéridos. En el caso de la *ácido graso sintetasa*, los fosfolípidos sustentarían regiones helicoidales entre fragmentos de  $\alpha$ -hélice, provocando así un aumento en la longitud de los segmentos en  $\alpha$ -hélice.

El hecho de que los fosfoglicéridos no sólo mantengan

hélices anfipáticas sino que sean también factores que incrementan la longitud de la hélice, explica que un número pequeño de moléculas de fosfolípidos suponga una modificación tan importante de la función de la proteína, ya que esas pequeñas regiones podrían participar en los sitios activos de la molécula.

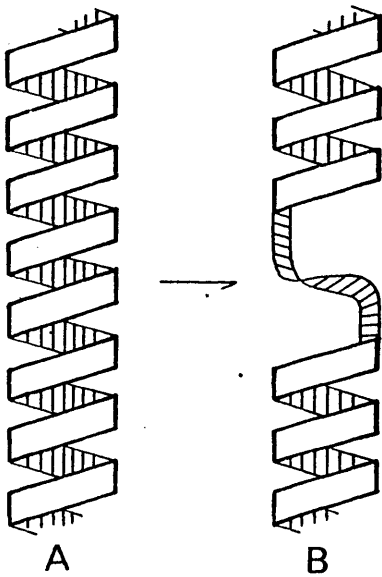


Figura 15. Modelo propuesto para el papel estructural de los fosfolípidos en la *ácido graso sintetasa* de insecto: (A) región helicoidal en la enzima nativa; (B) la misma región después de liberarse fosfolípidos; la región no-helicoidal podría estar estabilizada por fosfolípidos en la enzima nativa.

#### Relaciones estructura-función y su dependencia con los fosfolípidos del sistema.

Los resultados obtenidos con la enzima parcialmente deslipidizada muestran la función estructural de los fosfolípidos. La conclusión se refiere al mantenimiento de la estructura helicoidal en pequeñas regiones en  $\alpha$ -hélice. La esencialidad de los fosfolípidos para la actividad enzimática podría explicarse, como se concluye en el apartado anterior, si esas pequeñas regiones estabilizadas por los fosfolípidos se encontrasen relacionadas con los sitios activos de la enzima. A fin de estudiar esta posibilidad se ha considerado el efecto del lipopolisacárido de las paredes de *Escherichia coli*. El fundamento de este estudio se basa en las especiales propiedades de este tipo de sustancias. Está descrito que estos lipopolisacáridos pueden atravesar películas de fosfolípidos, fundamentalmente de fosfatidiletanolamina, de forma que la eliminación del fosfolípido de una membrana podría participar en el mecanismo del efecto endotóxico. (Romeo et al., 1970). En cual-

quier caso, se acepta generalmente que tal interacción tiene lugar a nivel de fosfatidiletanolamina, precisamente la clase de fosfolípidos esencial para la actividad del complejo enzimático del insecto (Gavilanes et al., 1979).

El efecto de la endotoxina de *E. coli* sobre la estructura y la actividad de la *ácido graso sintetasa* aparece en la figura 16. Teniendo en cuenta el alto contenido en  $\alpha$ -hélice de la proteína, la elipticidad a 220 nm es un parámetro que define suficientemente la estructura proteica. En la representación de  $\Theta_{220}$  en función de la relación en peso lipopolisacárido/enzima, se observan dos mínimos en el valor absoluto de  $\Theta_{220}$  a relaciones lipopolisacárido/ácido graso sintetasa de 0.2 y 2.0. El primero de estos mínimos va acompañado de un descenso paralelo de la actividad enzimática. Teniendo en cuenta los datos descritos en la relación fosfatidiletanolamina-lipopolisacárido (Romeo et al., 1970) y que la actividad de la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* es especialmente dependiente de esta clase de fosfolípido (Gavilanes et al., 1979), la variación señalada podría explicarse como una liberación de este fosfolípido del complejo enzimático con la pérdida de sus propiedades.

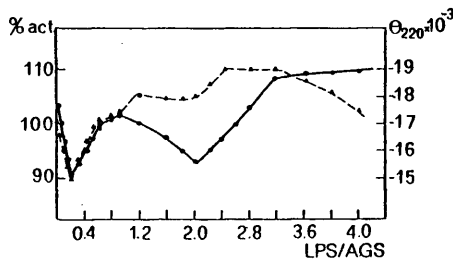


Figura 16. Efecto de la endotoxina de *E. coli* sobre *ácido graso sintetasa*: (  $\blacktriangle$  )  $\Theta_{220}$  y (  $\blacktriangle$  ) porcentajes de actividad enzimática.

El espectro de dicroísmo circular obtenido para una relación lipopolisacárido/sintetasa de 0.2 aparece en la figura 17. En la estimación de la estructura secundaria a partir del espectro aparece un descenso de 40 a 20 en el valor del número de residuos promedio por segmento helicoidal, ello está de acuerdo con el papel estructural propuesto para los fosfolípidos incrementando la longitud de los segmentos helicoidales. El espectro de dicroísmo circular del complejo a una relación lipopolisacárido/enzima superior a 0.2 (fig. 17) indica cambios estructurales basados en un incremento en el valor de la elipticidad a 210 nm, hecho que podría indicar un incremento en el porcentaje de estructura aperiódica.

Con el fin de verificar la interacción lipopolisacárido-enzima se ha estudiado el comportamiento de ambos componentes y su asociación por cromatografía de exclusión de tamaño. Para ello se ha empleado lipopolisacárido siguiéndose la actividad enzimática del complejo midiendo los valores de radiactividad en el eluido cromatográfico.



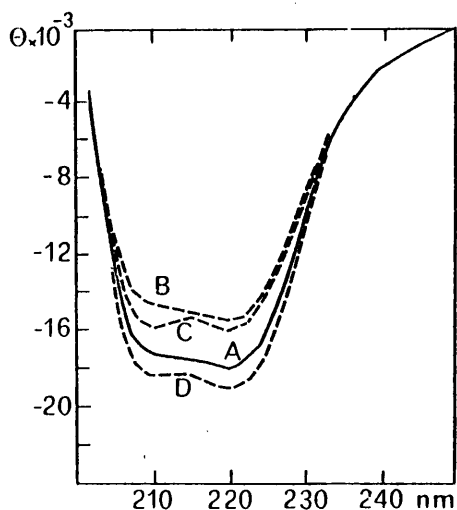


Figura 17. Espectro de dicroísmo circular de *ácido graso sintetasa* en presencia de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*: (A) enzima nativa; (B), (C) y (D) a una relación en peso LPS/enzima de 0.2, 2.0 y 4.0 respectivamente.

una relación en peso de 0.2, el perfil del eluido (fig. 18) muestra coelución del lipopolisacárido y del complejo enzimático, siendo consistente el perfil de elución con la interacción de ambas moléculas.

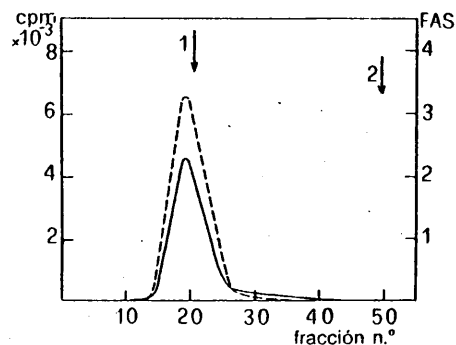


Figura 18. Perfil de elución de lipopolisacárido-sintetasa en columna de sepharosa 6B.  $^{14}\text{C}$  cpm (—) y concentración de *ácido graso sintetasa* en unidades arbitrarias (---). Los puntos 1 y 2 indican las posiciones del LPS y de la enzima respectivamente cuando se cromatografían independientemente.

El conjunto de los datos expuestos permite suponer la implicación de la fosfatidiletanolamina en el mecanismo de interacción entre el lipopolisacárido y el complejo *ácido graso sintetasa*.

Como consecuencia de tal interacción se liberaría fosfatidiletanolamina de forma específica, en consonancia con un descenso en la actividad enzimática -de acuerdo con el carácter esencial de la fosfatidiletanolamina- y una nueva disminución en la longitud promedio de los segmentos helicoidales -también de acuerdo con el papel estructural previamente asignado para los fosfolípidos del sistema-. Todo ello es un argumento claro en cuanto a la significación de los fosfolípidos en las relaciones estructura-función del complejo multienzimático.

La especificidad de la interacción lipopolisacárido-fosfatidiletanolamina podría servir para que el primero interactuase con la superficie celular en un proceso en el que tomarían parte interacciones hidrofóbicas entre grupos del interior de las moléculas de lipopolisacárido y grupos afines de la membrana, pudiendo participar tal interacción en el desencadenamiento del efecto endotóxico.

#### Estudio topológico de los sitios activos de la enzima.

Una vez asignada la misión de los fosfolípidos en la estructura y función del complejo *ácido graso sintetasa* del insecto, el siguiente aspecto a tratar habría de referirse a las implicaciones estructurales de los sitios activos de la enzima. Para ello, se ha considerado como sistema de tratamiento la inhibición ejercida por palmitoil-CoA sobre la actividad enzimática del complejo.

Precisamente, el producto final mayoritario de la actividad de la *ácido graso sintetasa* es el ácido palmítico o palmitoil-CoA (Burton et al., 1968).

El ácido palmítico se produce por hidrólisis del enlace tioéster de palmitoil-CoA. Esta actividad tioesterásica es un componente integral de la *ácido graso sintetasa* de mamíferos y aves (Smith et al., 1970); sin embargo palmitoil-CoA es el producto final en *S. cerevisiae* y en la reacción de otras enzimas microbianas. (Lornitzo et al., 1975). En conexión con esto se ha observado que la palmitoil-CoA y otros análogos de cadena larga inhiben la *ácido graso sintetasa* de hígado de pichón (Porter et al., 1958), cerebro de rata (Robinson et al., 1963) y *S. cerevisiae* (Lust et al., 1968) donde se ha encontrado que diferentes acil-CoA de cadena larga son inhibidores competitivos del sustrato, malonil-CoA. Estos datos se han interpretado como una regulación de la actividad enzimática, via inhibición por productos finales. Sin embargo, la retro inhibición de la *ácido graso sintetasa* de hígado de pichón (Porter et al., 1958) muestra que la regulación de la enzima es dependiente de la presencia de una concentración micelar crítica de palmitoil-CoA y de una cierta relación molar de tioéster a proteína. Estos argumentos están en contra de la posibilidad de sitios específicos para palmitoil-CoA en la inhibición del complejo enzimático, y soportan el hecho de que la molécula de acil-CoA inhiba la *ácido graso sintetasa* en virtud de su naturaleza detergente. Por otro lado, la albúmina de suero bovino estimula la síntesis de ácidos grasos por contrarrestar la inhibición por palmitoil-CoA.

toil-CoA formando complejos estables con los derivados del tipo de acil-CoA (Taketa et al., 1966).

#### Inhibición de ácido graso sintetasa por palmitoil-CoA.

La *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* produce ácido palmítico, laurico y mirístico como principales productos finales. Para una relación molar malonil-CoA/acetil-CoA de 0.5 en el ensayo de incubación, la cantidad de ácido palmítico sintetizado es el 66% del total. Por ello, se ha estudiado el efecto de la palmitoil-CoA sobre la actividad de la *ácido graso sintetasa* del insecto en un amplio margen de concentraciones (fig. 19). Como en otras sintetetas, la palmitoil-CoA inhibe la actividad de la enzima de *C. capitata*; sin embargo la concentración requerida para el 50% de inhibición es aproximadamente de 13  $\mu$ M, mientras que concentraciones menores de 4  $\mu$ M de palmitoil-CoA inhiben completamente la enzima de *S. cerevisiae*. El efecto del derivado de CoA implica un cambio estructural. En la figura 19 se puede observar la variación en el contenido en  $\alpha$ -hélice de la enzima, frente a la concentración de palmitoil-CoA; se puede destacar un importante incremento de 45 a 60%, en el contenido helicoidal de acuerdo con los valores de Chen et al. (1974) para la estimación de conformaciones proteicas. Para todas las concentraciones de acil-CoA en el intervalo estudiado, así como para la enzima nativa, el valor de  $n$  obtenido es 40, que podría ser considerado como representativo de una hélice de longitud infinita. De los resultados de la figura 19 es difícil establecer una relación clara entre los efectos cinéticos y estructurales de la palmitoil-CoA, ya que su efecto sobre el contenido en  $\alpha$ -hélice persiste en forma lineal cuando la actividad enzimática ha sido ya completamente inhibida. Así, la primera modificación estructural del complejo enzimático podría implicar interacciones no específicas con palmitoil-CoA, que a estas bajas concen-

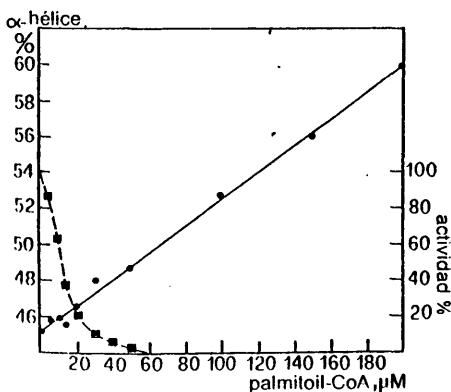


Figura 19. Efecto de palmitoil-CoA en la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata*. Variaciones de  $\alpha$ -hélice (—○—) de acuerdo con el método de Chen et al. (1974); actividad enzimática (—△—). Las actividades se refieren a la de la enzima en ausencia de palmitoil-CoA, considerando esta como el 100%. La concentración de proteína es 0.1 mg/ml.

traciones distorsionaría el centro activo produciendo la inhibición máxima. Es interesante resaltar la elevada concentración de acil-CoA necesaria para la total inhibición de la sintetasa del insecto comparada con la requerida por los sistemas enzimáticos de otros orígenes.

Estos resultados, y el hecho de una cinética no saturante para la variación estructural causada por la palmitoil-CoA, sugieren una interacción no específica. Sin embargo, considerando el carácter lipoprotéico de la sintetasa del insecto y la naturaleza anfífilica de los derivados acil-CoA, es posible la existencia en el sistema de efectos simultáneos específicos y no específicos.

La inhibición de la sintetasa del insecto por palmitoil-CoA no es dependiente del tiempo; así, se obtienen los mismos porcentajes de inhibición para una incubación, anterior al ensayo, de 5 y 30 minutos. Sin embargo, la inhibición es dependiente de la temperatura (tabla VIII). Con una preincubación de 10 minutos a 37°C, previa al ensayo de actividad, la inhibición se incrementa sensiblemente y una concentración de 13  $\mu$ M de palmitoil-CoA inhibe completamente la actividad enzimática.

Tabla VIII. Porcentajes de inhibición de *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* por palmitoil-CoA.

Palmitoil-CoA $\mu$ M	Condiciones experimentales	
	ensayo control	10 min. de incubación a 37°C, previos al ensayo
0	0	3
5	12	67
10	34	97
15	61	100
20	78	100
50	100	100

#### Efecto de la albúmina de suero bovino e Histona III sobre la inhibición por palmitoil-CoA.

Si el efecto de la palmitoil-CoA sobre el complejo enzimático fuera solamente debido a interacciones no específicas, su inhibición enzimática podría revertirse por moléculas capaces de unir acil-CoA (800  $\mu$ g/ml). Una de estas moléculas, la albúmina de suero bovino, restaura el 50% de la actividad enzimática, que se anula en presencia de 50  $\mu$ M de palmitoil-CoA. Sin embargo, no se ha observado una completa protección de la enzima en el margen de concentraciones de albúmina estudiado (200-1200  $\mu$ g/ml) (fig. 20). La representación de la concentración de palmitoil-CoA requerida para conseguir el 50% de inhibición de la *ácido graso sintetasa*, frente a la concentración de albúmina de suero, da idea de la interacción albúmina-palmitoil-CoA. De acuerdo con esta variación, la interacción albúmina-palmitoil-CoA alcanza un estado saturado al aumentar la concentración de albúmina de suero bovino; sin embargo no se observa una completa protección para la inhibición por palmitoil-CoA. Estos resultados indican que la interacción de acil-CoA con la sintetasa del insecto

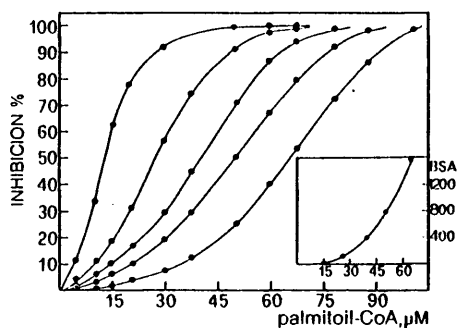


Figura 20. Protección de ácido graso sintetasa de *C. capitata* frente a la inhibición de palmitoil-CoA, por albúmina de suero bovino (de izquierda a derecha 200, 400, 800 y 1200  $\mu\text{g/ml}$ ). Recuadro interior: concentración de palmitoil-CoA requerida para 50% de inhibición frente a concentración de albúmina de suero bovino en  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores de actividad se refieren a los de la enzima en ausencia de palmitoil-CoA considerando ésta el 100%.

tiene un componente específico que no puede ser revertido por la albúmina.

Teniendo en cuenta el papel fisiológico de la albúmina de suero en el transporte de ácidos grasos, la unión hidrofóbica de los derivados del tipo de acil-CoA podría ser considerada en cierta forma específica. En este sentido, la histona III de timo de ternera es una proteína sin relación aparente alguna con los ácidos grasos y en la que es posible crear estructuras helicoidales en presencia de

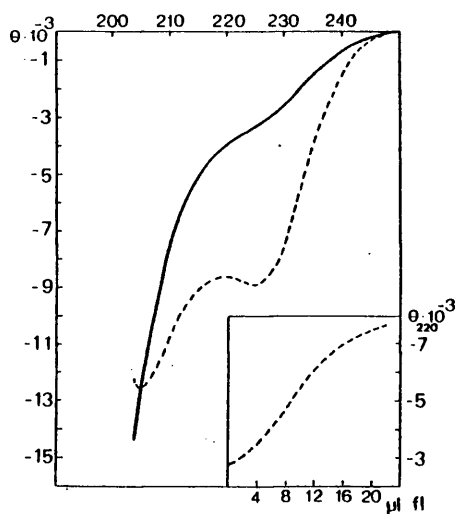


Figura 21. Espectro de diroísmo circular de la histona III nativa (—) y en presencia de fosfolípidos (20  $\mu\text{l}$ ) 10  $\mu\text{M}$  (---). Recuadro interior: Variación de  $\Theta_{220}$  en función de la cantidad de fosfolípidos (10  $\mu\text{M}$ ). La histona se encuentra en agua a pH 3.5.

moléculas de fosfolípidos. Esto se puede apreciar en la figura 21 en la que se recogen las variaciones en el espectro de diroísmo circular de la histona, en función de la concentración de fosfolípidos. El análisis estructural muestra un incremento en  $\alpha$ -hélice comparable con el obtenido por el incremento de la fuerza iónica o el pH. Por ello se ha considerado el efecto de la histona III en la inhibición ejercida por palmitoil-CoA, ya que se trata asimismo de una molécula anfipática y se uniría a la histona al igual que lo hacen los fosfolípidos.

El efecto de la histona III sobre la inhibición de la sintetasa de *C. capitata* por palmitoil-CoA aparece en la tabla IX. La histona III protege a la sintetasa frente a la inactivación por palmitoil-CoA, y el complejo enzimático retiene un 30% de su actividad en presencia de 800  $\mu\text{g/ml}$  de histona III y 50  $\mu\text{M}$  de palmitoil-CoA, concentración que inactiva completamente a la enzima en ausencia de la proteína. En presencia de 800  $\mu\text{g/ml}$  de albúmina la sintetasa retiene el 50% de su actividad a la misma concentración de acil-CoA. Considerando el peso molecular de ambas proteínas, albúmina e histona III, la primera es más eficiente para revertir la inactivación por palmitoil-CoA. Este hecho no es sorprendente si consideramos el carácter polar de la molécula de histona y el carácter hidrofóbico de las interacciones que implican al derivado del tipo de acil-CoA. Estos resultados indican claramente la existencia de interacciones no específicas, reversibles por III, entre palmitoil-CoA y la sintetasa del insecto.

Tabla IX. Reversión por histona III de la inhibición de ácido graso sintetasa en presencia de palmitoil-CoA. Los valores se expresan como porcentaje de la actividad en ausencia de acil-CoA en las condiciones del ensayo control.

Palmitoil-CoA $\mu\text{M}$	Inhibición (%)	
	Sin III	800 $\mu\text{g/ml}$ de III
0	0	0
5	12	6
10	34	25
15	61	40
20	78	53
50	100	70

#### Efecto de los fosfolípidos sobre la inhibición por palmitoil-CoA.

Los resultados de la inhibición de la sintetasa de *C. capitata* en presencia de dispersiones micelares de fosfolípidos aislados de la larva del insecto aparecen en la figura 22. A una concentración 50  $\mu\text{M}$  de acil-CoA se inhibe completamente la actividad enzimática, pero la enzima retiene el 30% de su actividad en presencia de 200  $\mu\text{g/ml}$  de fosfolípidos. Incrementando la concentración de fosfolípidos en el ensayo de incubación hasta 1  $\text{mg/ml}$  aparece una retención de la actividad enzimática del 40%. Así

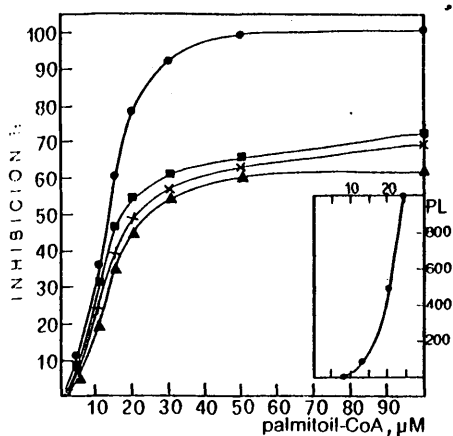


Figura 22. Protección de la *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* frente a la inhibición de Palmitoil-CoA por varias concentraciones de fosfolípido: 0  $\mu\text{g}$  (●), 200  $\mu\text{g}$  (■), 500  $\mu\text{g}$  (▲) y 1000  $\mu\text{g}$  (◆) por ml. Recuadro interior: Concentración de palmitoil-CoA requerida para el 50% de inhibición frente a la concentración de fosfolípidos ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los valores de actividad están referidos a la enzima en ausencia de palmitoil-CoA (100%). La concentración de proteína es 0.1 mg/ml.

pués, los fosfolípidos, como la albúmina y la histona H1, no revierten de forma total la inactivación de la sintetasa por palmitoil-CoA. Sin embargo, en el intervalo experimental de concentraciones de palmitoil-CoA. Los fosfolípidos permiten aun la existencia de inhibición por acil-CoA cosa que ocurría en el caso de la albúmina y la histona H1.

La representación de la concentración de palmitoil-CoA requerida para el 50% de inhibición de la sintetasa frente

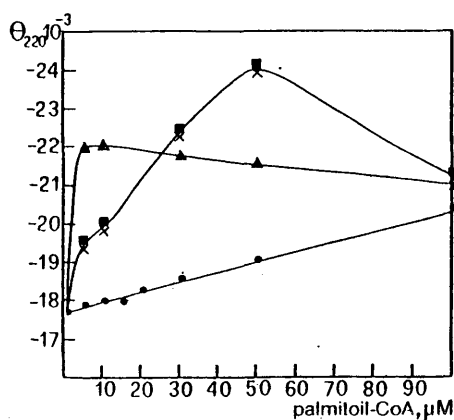


Figura 21. Variaciones de  $\Theta_{220}$  frente a concentración de palmitoil-CoA en presencia de fosfolípidos, 0  $\mu\text{g}$  (●), 200 (■), 500  $\mu\text{g}$  (▲) y 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (◆). La concentración de proteína es 0.1 mg/ml.

a la concentración de fosfolípidos aparece en la figura 22. De acuerdo con esto, se observa un estado saturante para la unión de palmitoil-CoA a estructuras de fosfolípidos. Estos resultados también muestran la existencia de inhibición específica no revertida por fosfolípidos.

Las variaciones estructurales del complejo *ácido graso sintetasa* de *C. capitata* inducida por fosfolípidos pueden seguirse por medidas de dicroísmo circular. La figura 23 representa elipticidad a 220 nm como índice de la estructura helicoidal de la proteína frente a la concentración de palmitoil-CoA. El incremento observado en la elipticidad a 220 nm en presencia de fosfolípidos es debido al papel estructural, ya comentado, de estas moléculas en el sistema lipoproteico. De manera similar, el cambio en la actividad enzimática y las variaciones causadas por los fosfolípidos alcanzan también un estado de saturación.

La inhibición por palmitoil-CoA de la *ácido graso sintetasa* provoca un incremento en el contenido de  $\alpha$ -hélice, y, dado que los fosfolípidos están implicados en el mantenimiento de la conformación helicoidal entre segmentos de  $\alpha$ -hélice, puede pensarse que acil-CoA de cadena larga producen en la enzima efectos similares a los de los fosfolípidos. De acuerdo con este hecho, en los efectos observados para derivados del tipo de acil-CoA tendría participación la interacción directa entre las cadenas polipeptídicas de la sintetasa y palmitoil-CoA. Sin embargo, de acuerdo con la naturaleza lipoproteica de la enzima del insecto, el efecto total observado podría ser debido a interacciones con la cadena polipeptídica, así como a la participación de los derivados de acil-CoA en el componente lipídico.

El efecto de la albúmina y la histona H1 puede ser fácilmente explicable en términos de un descenso en la concentración efectiva de palmitoil-CoA, lo que reduciría las interacciones hidrofóbicas no específicas del derivado de CoA con el componente lipídico. Pero además, la inhibición de la síntesis de ácidos grasos podría tener un componente específico no revertido con una disminución de la concentración de palmitoil-CoA por albúmina o H1, de acuerdo con un equilibrio entre interacciones hidrofóbicas del componente lipídico, las cadenas polipeptídicas, palmitoil-CoA y albúmina o histona H1. Esta idea vendría confirmada por el efecto de los fosfolípidos en la inhibición por derivados de acil-CoA. La inhibición del complejo sintetasa del insecto podría ser específica a baja concentración de acil-CoA por interacciones con la cadena polipeptídica, siendo las interacciones no específicas observadas a más elevadas concentraciones de acil-CoA.

Estas observaciones redundan en la idea de una estructura específica para la lipoproteína del insecto, con el ingrediente lipídico no distribuido al azar entre las cadenas polipeptídicas, indicaría, también, que la síntesis de ácidos grasos en la larva del insecto es muy sensible a la presencia de moléculas anfífilas como fosfolípidos, acil-CoA de cadena larga y sustancias con acción detergente. Pero más

importante aún, el centro activo -en su concepto amplio de región de la que depende la actividad del complejo- tendría una región estructurable por la acción de palmitoil-CoA, incrementándose así el contenido en  $\alpha$ -hélice y produciéndose la inhibición enzimática. Este efecto, que se manifestaría a baja concentración, sería de carácter específico, mientras que el resto de interacciones hidrofóbicas, las revertidas por albúmina o histona III o fosfolípidos, lo fueran de carácter inespecífico.

**Separación de las subunidades de ácido graso sintetasa de *C. capitata*.**

El complejo *ácido graso sintetasa* del insecto se ha separado en dos subunidades distintas, aparentemente carentes de lípidos, y que dan cuenta del total del componente polipeptídico de la enzima. Tal separación se ha llevado a cabo por cromatografía en Sepharosa-e-aminocaproil-panteteína, previa disociación de la enzima nativa por diálisis frente a tampón tris-glicocóla de la proteína pre-

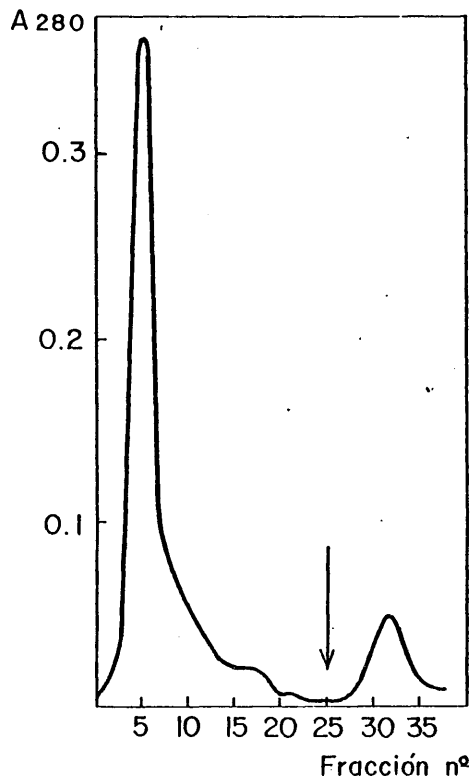


Figura 24. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad en Sepharosa e-aminocaproilpanteteína. La flecha indica el cambio de las condiciones de elución: tampón de pH 8.4 a 10 y temperatura de 0°C a 25°C.

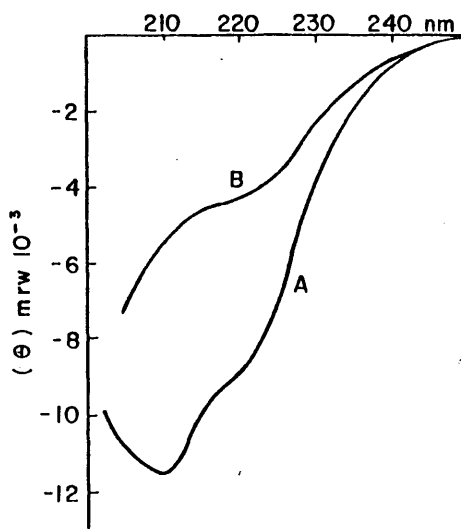


Figura 25. Espectro de dicroísmo circular de los dos componentes polipeptídicos de la *ácido graso sintetasa*. Subunidad I (A) y subunidad II (B).

viamente envejecida por mantenimiento durante dos semanas a -20°C.

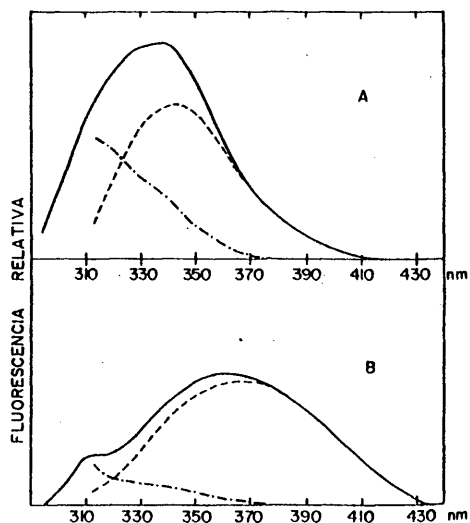


Figura 26. Espectros de fluorescencia de los dos componentes polipeptídicos de la *ácido graso sintetasa* del insecto. Excitación a 280 nm (—), excitación a 295 nm (---) y diferencia de ambos (.....) para el componente I (A) y excitación a 280 nm (—), excitación a 295 nm (---) y diferencia de ambos (.....) para el componente II (B).

El perfil del eluido de la cromatografía de afinidad se recoge en la figura 24. Como se puede apreciar se diferencian dos picos sin que pueda detectarse lípidos en cualquiera de ellos. Los dos componentes polipeptídicos así obtenidos I y II, se han caracterizado espectroscópicamente. En la figura 25 se recogen los espectros de dicroísmo circular de ambas porciones. En los dos casos existe una manifiesta pérdida de ordenación del carácter periódico, como se puede apreciar por el incremento en los valores de elipticidad a baja longitud de onda. La longitud de los fragmentos en estructura helicoidal también se han reducido, como se observa de las relaciones de elipticidad a 205 y 220 nm. En la figura 26 se muestran los espectros de fluorescencia de ambos componentes, los cuales exhiben características fluorescentes muy diferenciadas observándose máximos respectivos a 330 nm y 340 nm, previa excitación a 280 nm, con predominancia en ambos casos de la fluorescencia de triptófano. Hecho que se comprueba asimismo en los espectros realizados con excitación a 295 nm.

Estos datos tienden a confirmar el carácter distinto de ambas cadenas polipeptídicas, ya puesto de manifiesto con la enzima nativa. Esta tendencia también se observa en la composición de aminoácidos recogida en la tabla X, en la que la diferencia de mayor significación se aprecia

a nivel de arginina con 1.3% más en el componente II que en el I, lo que unido al elevado peso molecular del complejo resulta en una diferencia significativa.

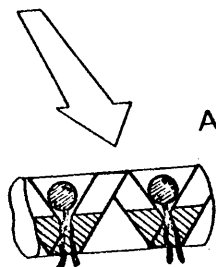
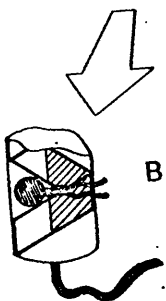
**Tabla X. Análisis de aminoácidos de la ácido graso sintetasa nativa y de las subunidades I y II resultantes de la disociación.**

Aminoácido	Subunidad I	Subunidad II	enzima nativa
ASX	9.86	10.56	10.92
THR	5.46	6.40	6.39
SER	6.60	5.75	6.43
GLX	12.91	11.65	13.28
PRO	5.73	5.39	4.26
GLY	14.06	10.46	7.18
ALA	7.80	7.85	7.83
VAL	6.86	7.10	5.87
MET	1.29	1.85	1.65
ILE	4.68	5.67	5.80
LEU	7.44	8.23	8.27
TYR	3.18	3.46	3.77
PIIE	3.86	3.56	3.26
HIS	1.43	1.83	1.79
LYS	5.88	6.00	5.72
ARG	2.95	4.24	4.56





## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

La *ácido graso sintetasa* del insecto *C. capitata* es una lipoproteína aislada de la fracción soluble celular de la larva. Presenta una relación en peso lípido/proteína de 1.0. El componente lipídico mayoritario lo constituyen los triacilglicérolos con un 81% en peso, estando presentes los fosfolípidos en un 5%. Tal componente no proteico es específico y esencial para la estructura-función del complejo. Pese a su elevado contenido lipídico, la sintetasa del insecto posee una estructuración comparable a la de las lipoproteínas de suero de alta densidad.

El sistema enzimático posee una estructura sumamente organizada con un 45% de  $\alpha$ -hélice, 16% de estructura B y 39% de ordenación aperiódica, con un valor promedio de residuos de segmento helicoidal igual a 40. Este último valor permite considerar a la proteína como organizada en fragmentos helicoidales de longitud infinita en su reflejo espectroscópico.

Como consecuencia de la caracterización del sistema por espectroscopía de fluorescencia, se definen dos dominios moleculares diferentes, que se manifiestan sólo en presencia del componente lipídico. Tales dominios son relativos a diferentes residuos de triptófano en la proteína.

El componente lipídico no se encuentra distribuido al azar en el conjunto del complejo. El núcleo de la estructura está constituido por los triacilglicérolos en contacto con regiones hidrofóbicas de la proteína como lo prueba el hecho de transferencia de energía entre triptófano y DPH. Los fosfolípidos poseen una localización superficial en la estructura del sistema, de acuerdo con su carácter

anfipático, y basado entre otros hechos en la ausencia de transferencia de energía entre cromóforos aromáticos y DPE.

Los fosfolípidos crean estructuras helicoidales en los fragmentos carentes de tal ordenación, situados entre fragmentos de  $\alpha$ -hélice. Así, la longitud teóricamente infinita de las hélices de la proteína es dependiente de la presencia de estos fosfolípidos. El carácter esencial que, para la actividad del complejo multienzimático, exhibe la fosfatidiletanolamina se debería a la estabilización de regiones helicoidales en el "sitio activo" de la enzima.

Tal "sitio activo" posee también regiones no estructuradas. La transición de estas regiones a porciones con estructura periódica se traduce en una inhibición de la enzima con cambios no significativos en la estructura interna de la macromolécula, en su repercusión en cuanto a fluorescencia intrínseca.

Estas ideas acerca de la topología del complejo multienzimático del insecto se resumen en la figura adyacente. Una partícula de peso molecular  $10^6$ D se organiza en dos cadenas polipeptídicas soportadas por el entorno hidrofóbico de los triacilglicérolos del sistema. Los fosfoglicéridos estabilizan estas cadenas bajo la forma de largos segmentos helicoidales (A), a la vez que conforman el "sitio activo" en el que también se sitúan regiones de ordenación no periódica, esenciales en tal conformación para la actividad de la enzima (B). La inhibición ejercida por moléculas de carácter anfipático se manifiesta, en su forma específica, a nivel de tales regiones no organizadas periódicamente del "sitio activo".



## BIBLIOGRAFIA

1. Allen, T. M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 640, 385.
2. Alving, C. R., Iglewski, B. H., Urban, K. A., Moss, J., Richards, R. L. y Sadoff, J. C. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1986.
2. Attwood, D. y Saunders, L. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 116, 108.
3. Beaven, G. H. y Holiday, E. R. (1952) *Adv. Protein. Chem.* 7, 319.
4. Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976) *Anal. Biochem.* 70, 241.
5. Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 39, 911.
6. Bratcher, S. C. y Hsu, R. Y. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 141.
7. Brindley, D. N., Matsumara, S. y Block, K. (1970) *Nature* 242, 666.
8. Brooks, J. L. y Stumpf, P. K. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 108.
9. Burnstein, E. A., Vedenkina, N. S. y Ikowa, M. N. (1973) *Photochem. Photobiol.* 16, 2325.
10. Burton, D. N., Haavick, A. G. y Porter, J. W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 141.
11. Bustin, M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 251, 172.
12. Carey, E. M. y Dills, R. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 210, 371.
13. Chen, Y. H., Yang, J. T. y Chau, K. H. (1974) *Biochemistry* 13, 3350.
14. Chen, R. F., Edelhoch, H. y Steiner, R. F. (1969) in *Physical principles and Techniques of Protein Chemistry Vol B 171* (S. Leach ed.) Academic Press. New York.
15. Chesterton C. J., Butterworth P.H.W., Abramovitz, A. S., Jacob, E. J. y Porter, J. W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 124, 386.
16. Christie, W. W., Noble, R. C. y More, J. H. (1970) *Analyst* 95, 940.
17. Dawson, R.M.C., Hemington, N. y Irvine, R.F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 112, 33.
18. Diejen, G. V., Tans, G., Rosing, J. y Hemker, H. C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3433.
19. Di Francesco, C. y Brodbeck, U. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 640, 359.
20. Dittmer, J. C. y Lester, R. L. (1964) *J. Lipid. Res.* 5, 126.
21. Dufour, J. P. y Soffeau, A. (1980) *J. Biol. Chem.* 225, 10591.
22. Edelhoch, H. (1967) *Biochemistry* 6, 1948.
23. Eftink, M. R. y Ghiron, C. A. (1976) *Biochemistry* 15, 672.
23. Engeser, H., Wieland, F. y Lynen, F. (1977) *FEBS Lett.* 82, 139.
24. Epand, R. M., Epand, R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 602, 600.
25. Fernández-Sousa, J. M., Muncio, A. M. y Ribera A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 231, 527.
26. Gally, J. A. y Edelman, G. M. (1964) *Biopolymers. Symp.* 1, 367.
27. Gavilanes, F. (1980) Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
28. Gavilanes, J. G., Lizarbe, M. A., Muncio, A. M. y Oñaderra, M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 998.
29. Gavilanes, J. G., Lizarbe, M. A., Muncio, A. M., Ramos, J. A. y Relaña, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4015.
30. Gavilanes, J. G., Lizarbe, M. A., Muncio, A. M. y Oñaderra, M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 668, 246.
31. Glazer, A. N., Delange, R. J. y Sigman D. S. (1975) in *Chemical Modification of Proteins* (T. S. Work y E. Work. ed.) pg. 98, (North-Holland. American Elsevier).
32. Goldberg, J. y Blockm, K. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7349.
33. Gray, T. (1967) *Methods Enzimol.* 11, 139.
34. Greenfield, N. y Fasman, G. D. (1969) *Biochemistry* 8, 4108.
35. Gupte, S. S., Lanc, L. K., Johnson, J. D., Wallick, E. T. y Schwartz J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 5099.
36. Hanssens, I., Houthu, Y. S., Herreman, W. y Van Cauwelaert, F. H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 602, 539.
37. Heyn, M. P. Cherry, R. J. y Dencher, N. A. (1981) *Biochemistry* 20, 840.
38. Hendren, R. W., y Bloch K. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1504.

39. Herremans, W. Van Tornout, P., Van Cauwelaert, F. H. y Hanssens, I. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 640, 419.
40. Hsu, R. Y., Wasson, G. y Porter, J. W. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3736.
41. Hsu, R. Y. y Hun, S. L. (1970a) *Biochemistry* 9, 239.
42. Hsu, R. Y. y Wagner, B. J. (1970b) *Biochemistry* 9, 245.
43. Huang, K. P. y Stumpf, P. K. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 412.
44. Hubbard, R. E. y Garratt, C. J. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* 7, 993.
45. Ingelman-Sundberg, M. y Johansson, I. (1980) *Biochemistry* 19, 4004.
46. Isern de Caldentey M. y Wheeler, K.P. (1979) *Biochem. J.* 177, 265.
47. Iwai, M., Shimada, Y. y Tsujisaka, Y. (1980) *J. Biochem.* 88, 533.
48. Jonas, A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 486, 10.
49. Jenik, R. A. y Porter, J. W. (1981) *Int. J. Biochem.* 13, 423.
50. Kagan, H. M., Tseng, L. y Simpson, D. E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5417.
51. Kanellis, P., Romans, A. Y., Johnson, B. J., Kercret, H., Chioretti, R. Allen, T. M. y Segrest, J. P. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11464.
52. Katiyar, S. S., Lornitzo, F. A., Dugan, R. E. y Porter, J. W. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 135.
53. Kawato, S., Yoshida, S., Orii, Y., Ikegami, A. y Kinoshita, K. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 634, 85.
54. Kim, M., Qureshi, A. A., Jenik, R. A., Lornitzo, F. A. y Porter, J. W. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 181, 580.
55. Klausner, R. D., Bridges, K., Tsunoo, H., Blumenthal, R., Weinstein, J. N. y Ashwell, G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5087.
56. Knoche, H. W. y Kiths, K. E. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3517.
57. Kresze, G., Steber, L., Oesterheld, D. y Lynen F. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79, 181.
58. Kumar, N., Klausner, R. D., Weinstein, J. N., Blumenthal, R. y Martin, F. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5886.
59. Kumar, S., Dorsey J. K. y Porter, J. W. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 825.
60. Lambeth, J. D., (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4757.
61. Larrabee, A. R., McDaniel, E. D., Backerman, H. A. y Vagelos, P. R. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1267.
62. Lavielle, F. y Levin, I. W. (1980) *Biochemistry* 19, 6044.
63. Lin, L. H. (1980) *Biochemistry* 19, 5135.
64. Linn, T. C. y Srere, P. A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10676.
65. Lizarbe, M. A., Muncio, A. M., Ramos, J. A. y Relaño, E. (1977) *Insect. Biochem.* 7, 415.
66. Lizarbe, M. A. (1979). Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
67. Lornitzo, F. A., Qureshi, A. A. y Porter, J. W. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1654.
68. Lornitzo, F. A., Qureshi, A. A. y Porter, J. W. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4520.
69. Low, M. G. y Zilversmit, D. B. (1980) *Biochemistry* 19, 3913.
70. Lowry, O. H., Poschbrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
71. Lust, G. y Lynen, F. (1968) *Eur. J. Biochem.* 7, 68.
72. Lynen, F. (1961) *Fed. Proc.* 20, 941.
73. Lynen, F. (1967) *Biochem. J.* 102, 381.
74. Majerus, P. W., Alberts, A. W. y Vagelos, P. R. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 1231.
75. Mangold, H. K. y Malnic, D. C. (1961) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37, 383.
76. Marchalonis, J. J. y Weltman, J. W. (1971) *Comp. Biochem. Physiol.* 38, 609.
77. Merisko, E. M., Ojorkian, G. K. y Widnell, C.C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1983.
78. Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A. y Pelka, J. R. (1966) *Anal. Chem.* 38, 514.
79. Muncio, A. M., Lizarbe, M. A., Relaño, E. y Ramos, J. A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 487, 175.
80. Muncio, A. M. y Gavilanes, J. G. (1981) *Methods Enzim.* 71, 127.
81. Nalecz, M. J., Zborowski, J., Famuiski, K.S. y Wojtczak, L. (1980) *Eur. J. Biochem.* 112, 75.
82. Naoi, M. y Yagi, K. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 18.
83. Nashima, K., Kawase, N. y Kito, Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 626, 390.
84. Nelson, B. D. y Fleischer, S. (1981) *Biochem. J.* 194, 783.
85. Niggli, V., Adunyah, E. S., Penniston, J. T. y Carafoli, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 395.
86. Overath, P. y Stumpf, P. K. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 4103.
87. Oesterheld, D., Brauer, H., Kresze, G., Stelher, L. y Lynen, F. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79, 173.
88. Parthasarathy, S., Murari, R., Crilly, K. S. y Baumann, W. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 664, 249.
89. Patterson, B. W. y Jonas, A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 619, 572.
90. Phillips, G. T., Nixon, J. E., Abramovitz, A. S. y Porter, J. W. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 357.
91. Porter, J. W. y Tietz, A. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* 25, 41.
92. Porter, J. W. y Long, R. W. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 20.
93. Porter, J. W., Kumar, S. y Dugan, R. E. (1971) *Progress Biochem. Pharmac.* 6, 1.
94. Porter, J. W., Jenik, R. A. (1979) *Int. J. Biochem.* 10, 609.
95. Poulou, A. J., Rogers, L. y Kolattukudy, P. E. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 591.
96. Qureshi, A. A., Lornitzo, F. A. y Porter, J. W. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 158.
97. Qureshi, A. A., Kim, M., Lornitzo, F. A., Jenik, R. A. y Porter, J. W. (1975a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1191.
98. Qureshi, A. A., Jenik, R. A., Kim, M., Lornitzo, F. A. y Porter, J. W. (1975b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 344.
99. Qureshi, A. A., Lornitzo, F. A., Hsu, R. Y. y Porter, J. W. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 7, 379.
100. Rank, D. H. (1947) *Anal. Chem.* 19, 766.
101. Reaven, E. y Azhar, S. (1981) *J. Cell Biol.* 89, 300.

102. Relañó, E. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
103. Robinson, J. D., Brady, R. O. y Bradley, R. M. (1963) *J. Lipid. Res.* 4, 144.
104. Robinsons, N. C., Strey, F. y Talbert, L. (1980) *Biochemistry* 19, 3656.
105. Romeo, D., Girard, A. y Rothfield, L. (1970) *J. Mol. Biol.* 53, 475.
106. Rouser, G., Siakotos, A. N. y Fleischer, S. (1966) *Lipid. I.* 85.
107. Saito, K., Kawaguchi, A., Okuda, S., Seyama, Y. y Yamakawa, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 618, 202.
108. Schweizer, E., Piccimini, F., Duba, C. Gunter, S. Ritter, E. y Lynen, F. (1970a) *Eur. J. Biochem.* 15, 483.
109. Schweizer, E. y Bolling, H. (1970b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 660.
110. Schweizer, E., Kuhn, L. y Castroroph, H. (1971) *Hoppe-Seyler's Z. Physio. Chem.* 352, 377.
111. Schweizer, E., Werkmeister, K. y Jain, M. K. (1978) *Mol. Cel. Biochem.* 21, 95.
112. Segrest, J. P., Jackson, R. L., Morrisett, J. D. y Gotto, A. M. (1974) *FEBS Lett.* 38, 247.
113. Shoyab, M. y Todaro, G. J. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 222.
114. Simoni, R. D., Criddle, R. S. y Stumpf, P. K. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 573.
115. Sims, R. P. A. y Larose J. A. G. (1962) *J. Amer. Oil Chem.* 39, 232.
116. Smith, S. y Abraham, S. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3209.
117. Smith, S. y Stern, A. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 379.
118. Stoops, J. K. y Walkil, S. J. (1978a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 225.
119. Stoops, J. K., Awaad, E. S., Arstianian, M. J., Gunsberg, S., Walkil, S. J. y Oliber, R. M. (1978b) *J. Biol. Chem.* 253, 4464.
120. Stoops, J. K. y Walkil, S. J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4544.
121. Sparrow, J. T., Gotto, A. M. y Morrisett, J. D. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2124.
122. Straus, J. W., Parrish, R. F. y Polakoski, K. L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5622.
123. Thang, N. X., Borsodi, A. y Wollemann, M. (1980) *Biochemical. Pharmac.* 29, 2791.
124. Taketa, K. y Pogell, B. M. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 720.
125. Teale, F. W. J. (1960) *Biochem. J.* 76, 381.
126. Tsuda, M. y Akino, T. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 643, 63.
127. Vagelos, P. R., Majerus, P. W., Alberts, A. W., Larrabee, A. R. y Ailhaud, G. P. (1966) *Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biol.* 25, 1485.
128. Vanamau, T. C., Walkil, S. J. y Hill, R. L. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2303.
129. White, F. H. (1978) *Biochemistry* 15, 2906.
130. Wieland, F., Renner, L., Verfurth, C. y Lynen, F. (1979) *Eur. J. Biochem.* 94, 189.
131. Wrenn, R. W., Katch, N., Wise, B. C. y Kuo, J. F. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 12042.
132. Yang, P. C., Butterworth, P. H. W., Bock, R. M. y Porter, J. W. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3501.
133. Ziegenhorn, J., Niedermeiner, R., Nussler, C., y Lynen, F. (1972) *Eur. J. Biochem.* 30, 285.

