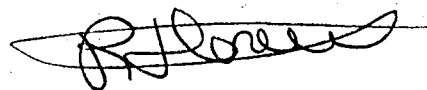


UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE CIÈNCIES

**"ESTUDI DE LA TOPOGRAFIA  
DELS SETIS DE FIXACIÓ DE LA  
RIBONUCLEASA A PER MARCATGE  
AMB NUCLEOSIDS I NUCLEOTIDS  
PURÍNICS HALOGENATS"**


Treball de Tesi presentat per adquirir el grau de doc-  
tor en Ciències Biològiques per RAFAEL DE LLORENS  
DURAN, llicenciat en Ciències Biològiques.

Treball realitzat al Departament de Bioquímica de la  
facultat de Ciències de la UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE  
BARCELONA i a l'INSTITUT DE BIOLOGIA FONAMENTAL VILLAR  
PALASÍ, sota la direcció del Dr. C.M. CUCHILLO i la co-  
direcció del Dr. X. PARÉS.



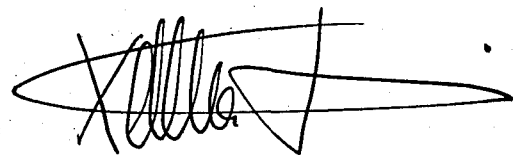
signat: R. DE LLORENS DURAN

Vist i plau del director



Dr.  
CLAUDI M. CUCHILLO

Vist i plau del co-director



Dr.  
XAVIER PARÉS CASASAMPERA

Barcelona, a 21 de Juny de 1983.



[ DISCUSSIÓ FINAL ]

**-IV-DISCUSSIÓ FINAL**

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

Per dilucidar el paper jugat per la Lys-1 en la fixació dels substrats amb un nucleòtid purínic en la posició 5' (veure apartat I-3) es va procedir a analitzar els resultats obtinguts (CUCHILLO, 1974; PARÉS, 1977; ARÚS, 1981 i part del present treball):

- El Cl6-RMP presenta una constant d'associació amb la RNAasa A ( $K_a = 1,2 \times 10^3 M^{-1}$ ) del mateix ordre de magnitud que la corresponent als nucleòtids purínics naturals. A més a més, quan s'incuba nucleòtid clorat amb l'enzim, durant 48 hores a pH 7,4 i 40°C de temperatura, dona lloc a una reacció més enèrgica que en emprar marcadors amb una menor afinitat per la RNAasa A (6-Cloropurina i 6-Cloropurina ribosa), doncs roman menys quantitat d'enzim sense reaccionar. Per altre part, la reacció amb el nucleòtid determina una major especificitat, ja que s'obté un sol derivat covalent majoritari mentre que són varis derivats els que s'obtenen en les reaccions amb el nucleòsid i la base halogenada.
- La presència de l'AMP en la barreja de reacció no impedeix totalment la reacció, doncs s'obté encara un 50% de Derivat II. Aquest fet està d'acord amb el criteri d'en GLAZER (1975) - apartat I-2.8- doncs la presència d'un lligand natural disminueix la proporció de reacció amb l'anàleg químicament reactiu. De totes maneres, el bloqueig de la reacció per l'AMP es relativament baix. L'AMP i el Cl6-RMP presenten una constant d'associació amb l'enzim de  $5,3 \times 10^3 M^{-1}$  i  $1,2 \times 10^3 M^{-1}$  respectivament (a pH 5,5  $I = 0,2$  i 25°C PARÉS et al., 1978; o sigui unes 4,5 vegades més elevada per l'AMP), i per altre part, l'AMP està present en la barreja de reacció a una concentració 7 vegades superior (apartat II-11). Es podria suposar, doncs, que l'AMP, si interaccionés en el mateix lloc que el Cl6-RMP, inhibís fortament la reacció de l'enzim amb el nucleòtid clorat, però només s'observa una inhibició del 50%.

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

- En augmentar el pH de la reacció entre la RNAasa A i el Cl6-RMP, per tractar d'afavorir el marcatge en un altre residu, s'observa que l'únic derivat monosubstituit que continua formant-se amb certa quantitat segueix essent el Derivat II, la qual cosa reforça els criteris d'especificitat i direccionalitat del marcat. El Derivat II presenta una menor Kcat amb 2', 3' Cp i front d'RNA, indicant que el marcador impedeix la correcta acció catalítica de l'enzim. Les dades cinètiques del Derivat II front del 2',3' Cp demostren que aquest té la mateixa Km que l'enzim natiu, el que indica que el grup fosfat del marcador no està ocupant el seti fixador de fosfat de l'enzim.
- Quan es porta a terme la reacció amb la 6-Cloropurina ribosa, un dels derivats majoritaris, l'F, segueix essent un derivat monosubstituit per reacció en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, o sigui, idèntic al Derivat II, però sense fosfat. Aquest derivat F presenta la mateixa Km i Kcat front de 2',3' Cp, que l'enzim natiu, indicant que el grup fosfat present en el Derivat II, encara que no estigui ocupant el seti catalític de l'enzim, és el responsable de la disminució de la Kcat del Derivat II a l'hidrolitzar el 2',3' Cp, i el responsable de la menor afinitat del Derivat II per l'RNA.

Tots els fets esmentats semblen indicar que el nucleòtid marcador unit a l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, resta allunyat del seti catalític de l'enzim. Aquesta sèrie de dades han portat al grup del Dr. CUCHILLO a postular l'existència d'un sub-seti secundari, fixador de fosfat, anomenat, d'acord amb la terminologia de RICHARDS & WYCKOFF (1971) (Figura 7), B3 R3 P2. En la Figura 40 (PARÉS et al. 1980 a) estan esquematitzats els possibles sub-setis de fixació dels diferents grups del poli-nucleòtid que s'ha d'hidrolitzar, així com els aminoàcids implicats.

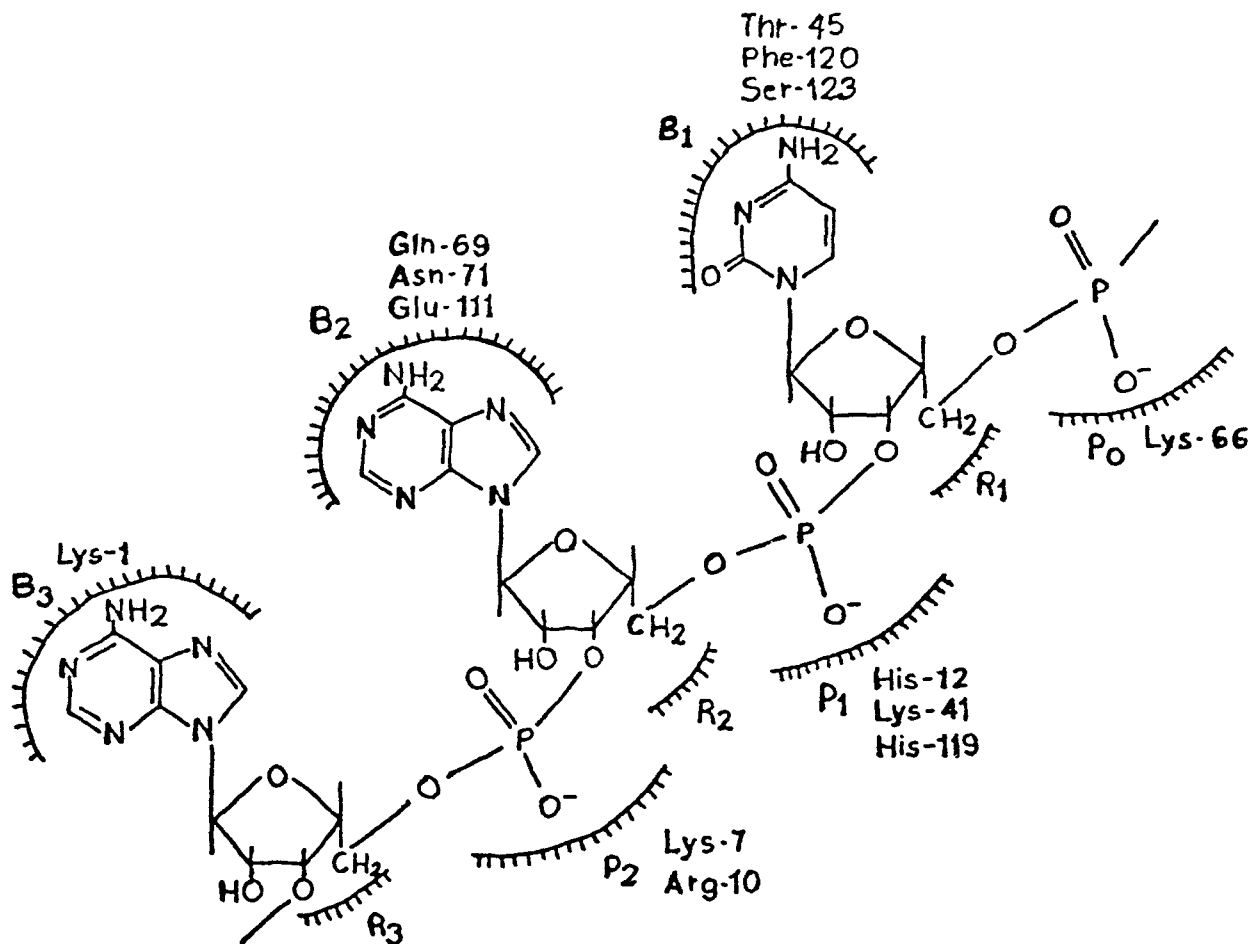


FIGURA-40

Representació esquemàtica de la interacció d'un fragment d'RNA amb els sub-setis de fixació de lligand de la RNAasa A.

- B : indica el seti fixador de la base nitrogenada.
- R : seti fixador de la ribosa.
- P : seti fixador del fosfat.

Al costat de cada sub-seti estan indicats els aminoàcids que formarien part de cada sub-seti. Les bases pirimidíniques, com el 3'-CMP, interaccionarien a B1 R1 P1, mentre que l'AMP ho faria primàriament a B2 R2 P1. El nucleòtid marcador del Derivat II ocuparia les posicions B3 R3 P2.

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

B1 R1 P1 correspon al seti principal de fixació dels nucleòtids 3'-pirimidínics. El B2 R2 P1 al de fixació dels nucleòtids 5'-purínics. El P0 correspondria al seti de fixació del fosfat descrit per SAWADA & IRIE (1969) i el B3 R3 P2 seria el sub-seti descrit en els treballs del nostre laboratori (PARÉS et al., 1980 a). La Lys-1 formaria part del B3, doncs és on reacciona el C-6 de l'anell d'adenina del C16-RMP. A més, la 6-Cloropurina ribosa, també reacciona amb la Lys-1 en una elevada quantitat (Derivat F), el que indica que no és absolutament necessària la presència del grup fosfat del marcador per dirigir la reacció vers la Lys-1. Això suggereix que la Lys-1 formaria part d'un sub-seti fixador de la base purínica.

De fet, ja existien en la literatura indicacions i evidències de l'existència de sub-setis addicionals:

Així, ja en el 1961 NELSON & HUMMEL van estudiar la inhibició de la RNAasa A pel 2'-CMP, emprant com a substrat el 2',3' Cp i l'RNA. Per explicar les diferències observades en el grau d'inhibició pel 2'-CMP emprant un o l'altre substrat, van postular l'existència de més setis d'interacció de l'enzim amb l'RNA que amb el 2',3' Cp. Amb el substrat polianiónic, l'RNA, la interacció inclouria, a més a més del seti catalític, d'altres setis no catalítics d'interacció. Els autors afegeixen que aquesta hipòtesi explicaria els resultats de KALMAN et al. (1955) que indicaven que en tractar la RNAasa A amb subtilisina, l'enzim perdia més ràpidament l'activitat en front de l'RNA que del 2',3' Cp. NELSON & HUMMEL (1961) assenyalen, finalment, que l'activitat de l'enzim front de l'RNA no és inhibida per la presència del 2',3' Cp, indicant una possible menor afinitat de l'enzim pel substrat de baix pes molecular, apuntada per HERRIES (1960).

Mitjançant estudis de la interacció de la RNAasa A amb l'RNA MQRA (1962) arriba a la conclusió de que d'altres forces específiques, no electrostàtiques, provoquen una marcada afinitat entre l'enzim i l'RNA.

## C DISCUSSIÓ FINAL ]

Al 1962 MYER & SCHELLMAN, mitjançant l'equilibri de diàlisi, van indicar l'existència de 2 sub-setis d'unió diferents entre l'enzim i el 5'-AMP, no trobant-ne més que un per al 2'-CMP mitjançant la gel filtració.

Al 1964 LOEB I SAROFF, medint la interacció entre l'enzim i l'ion  $Cl^-$  a diversos pH's, van postular l'existència de 6 setis formats per càrregues positives i negatives en els que hi estarien implicats:

per l'1	Lys-1, His-12, -119, Asp-14 i 121
2	His-48, 105, Glu-49, Asp-53 i Lys-104
3	Lys-37, 98, Asp-38, Arg-39 i Val-124
4	Lys-31, Arg-33, -85, Asp-83 i Glu-86
5	Lys-1 ( $\alpha$ i $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> ), 61, Glu-2 i 111
6	Lys-7, -66, Glu-9 i Arg-10

Cal assenyalar que l'estructura tridimensional, trobada posteriorment per difracció de raigs X, va mostrar regions on es localitzava una càrrega positiva particularment elevada, regions en les que hi estaven inclosos molts dels aminoàcids citats en els grups abans esmentats, el que venia a indicar que moltes de les assignacions fetes eren encertades.

Anàlisis cinètiques de l'acció de l'enzim emprant el seu substrat natural, l'RNA, van portar a proposar a IRIE (1965) l'existència de varis setis inespecífics d'interacció amb anions. Aquest mateix autor (SAWADA & IRIE, 1969) estudia la interacció de la uridina 2'(3'),5' difosfat (pUp) amb la RNAasa A. Van trobar que el fosfat en 5' incrementa la força d'interacció, tant amb l'enzim natural com amb els derivats alquilats en la His-119 i en la His-12 (HEINRIKSON et al., 1965), la qual cosa suggereix l'existència d'un sub-seti responsable de la interacció amb el fosfat en 5' del nucleòtid pirimidínic.

## [ DISCUSSION FINAL ]

De fet, es pot suposar que una molècula d'RNA interaccionarà i serà hidrolitzada pel centre actiu de la RNAasa A de la mateixa manera que un dinucleòsid monofosfat, i aquest procés és granment facilitat per la interacció addicional dels grups fosfat de la cadena polinucleotídica en setis bàsics de la superfície enzimàtica. Aquest factor incrementa la concentració efectiva de substrat prop del seti catalític i pot, per ell mateix, fomentar la desestabilització local de la molècula d'RNA (BARNARD, 1969).

RIDLINGTON & BUTLER (1969), emprant la tècnica de la diàlisi (COLOWICK & WOMACK, 1969), van medir i quantificar la interacció de l'enzim amb el pirofosfat, trobant que l'enzim presenta un seti de forta interacció, i al menys un seti addicional d'interacció menys forta. Cal assenyalar que la gràfica de Scatchard (SCATCHARD, 1949) que els autors publiquen, indica bastant clarament de 2 a 3 sub-setis d'interacció dèbil (Figura 41).

En el 1974 HAAR et al. estudiaren per RMN la interacció de la RNAasa amb diferents nucleòtids pirimidínics i purínics, determinant que el 3'-AMP i el 5'-AMP presentaven una unió diferent amb l'enzim. Aquests resultats donarien suport a las dades obtingudes per CARLSON (1976) que estudià, per difracció de raigs X, el complex RNAasa S - 5'-AMP, en el que el nucleòtid ocupa B2 R2 P1, mentre que en el complex RNAasa A - 3'-AMP resten ocupats el B2 R2 però el fosfat sembla ocupar un seti diferent al P1.

Al 1977 WHITE et al. (a) van suggerir que en els complexos RNAasa A - adenilil(3'-5')4-tiouridina 3'-fosfat, el fosfat en 3' interacciona en el P1 del seti actiu, mentre que el fosfat situat entre els nucleòtids interacciona en un seti addicional (probablement el P0). En un treball posterior (WHITE, 1977 b) van determinar que la interacció dels dinucleòtids ApUp i GpCp amb l'enzim es més forta que la dels seus corresponents dinucleòtids monofosfat, ApU i GpC.

Els estudis de LEVIT & BERGER (1976) indicaren la importància dels primers aminoàcids de l'extrem N-terminal de l'S-pèptid (Lys-1, Glu-2 i Thr-3) en la interacció de la RNAasa A amb l'RNA.



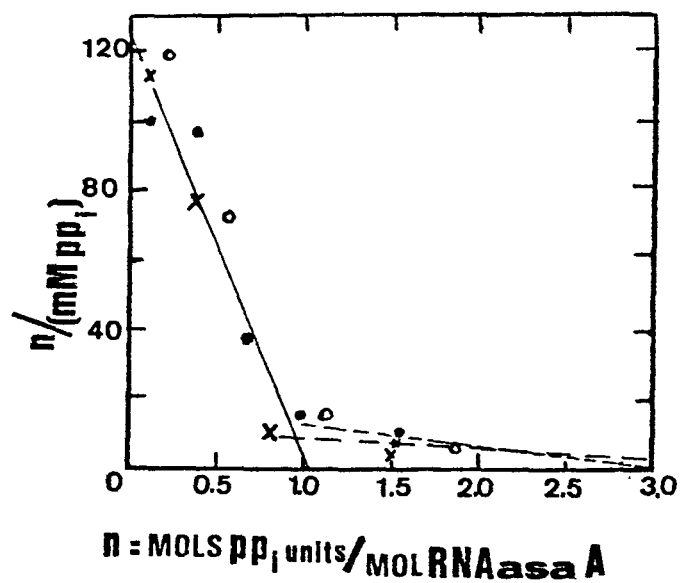


FIGURA-41

Gràfica d'Scatchard de la interacció del pirofosfat (P32 P32 i) amb la RNAasa A.

Condicions: acetat 0,1 M, pH 5,2, 8 °C de temperatura.

Es presenten les dades de tres experiments independents.

La línia s'ajusta mitjançant una anàlisi dels mínims quadrats per a tots els punts, excepte per aquells en els que 1,5 mols de PPi, o més, hagin interaccionat per mol d'RNAasa A.

(Extreta de RIDLINGTON & BUTLER, 1969).

## C. DISCUSSIÓ FINAL ]

MERRIFIELD & HODGES (1974) també observaren, per estudis cinètics emprant mono i dinucleòtids, la importància dels 5 residus N-terminals.

No va ésser fins al 1981 en que, de nou l'equip de IRIE (IWAHASHI et al., 1981), mitjançant estudis cinètics i de cristal·lografia de raigs X, determinà que el fosfat en 5' de la timidina 3',5' difosfat (pTp) ocupava el seti PO (postulat per MITSUI et al. 1978, i corresponent al sub-seti ja indicat pel mateix IRIE (SAWADA & IRIE, 1969), formant-se probablement un pont d'hidrogen entre un dels oxígens del grup fosfat i l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-66.

Com a punt final, cal fer esment dels treballs duts a terme pel grup del Dr. CUCHILLO en aquests darrers temps i resumits per NDUÉS (1982) en els que s'indica que els nucleòtids purínics 5'-AMP i 5'-GMP presenten un seti de fixació fort o primari i quatre de febles per al 5'-AMP (SOLÀ, 1981) i dos a tres de febles per al 5'-GMP (GUASCH, 1982) determinats per gel filtració (mètode de HUMMEL & DREYER, 1962). El lloc de forta interacció correspondria, lògicament, al seti de fixació principal descrit per RICHARDS & WYCKOFF (1971, FIGURA 40). Aquest lloc seria el detectat per experiments a l'ultra-violat (PARES et al., 1978). Els setis de fixació feble correspondrien als subsetis de fixació adjacents al centre principal.

Per elució competitiva en columna d'afinitat, amb RNAasa immobilitzada, el 5'-AMP presenta 1 seti primari i tres de febles i 1 primari i tres de febles per al 5'-GMP (NDUÉS, 1982).

Aquests mateixos estudis van confirmar que l'enzim no presenta més que un sol seti de fixació per als nucleòtids pirimidínics, la qual cosa està d'acord amb totes les dades bibliogràfiques referents a aquests nucleòtids (RICHARDS & WYCKOFF, 1971; BENZ & ROBERTS, 1973; SPERLING & HAVRON, 1976; HAVRON & SPERLING, 1977).

Mitjançant estudis per ressonància magnètica nuclear (ARÚS, 1981 b; ARÚS et al., 1982) de la interacció de varis lligands amb la RNAasa A i el Derivat II, es va concloure que:

## C DISCUSSIÓ FINAL ]

- a) el fosfat del marcador present en el Derivat II no interacciona en el P1, ans en el P2.
- b) es proposen la Lys-7 i la Arg-10 com a aminoàcids constituents d'aquest subseti P2.
- c) la interacció de nucleòsids i nucleòsids 5' fosfat purínics no té lloc tan sols a la posició B2 R2 P1, ans també a B1 R1 P0. La intensitat de la interacció segueix l'ordre següent:



per als nucleòsids 5' fosfat i GMP > AMP per als 3' fosfat (en aquests dos darrers casos les interaccions són a B2 R2 P2 i B1 R1 P1).

- d) el fosfat del lligand actua, molt probablement, situant el nucleòtid en el seti actiu, mentre que els substituents de la base són els generadors de l'especificitat de la interacció i controlen l'equilibri d'unió entre els sub-setis B2 R2 i B1 R1.

## IV-1 EXPERIMENTS AMB DNA

Al 1963 FELSENFELD et al. van emprar el DNA per a mesurar la seva interacció amb la RNAasa A per tal d'estudiar la interacció proteïna-àcid nucleic. Observaren que en condicions ben definides de força iònica i pH, aquesta interacció comporta la desestabilització del DNA. Es degut a aquest fenomen que els complexos DNA-RNAasa A han estat escollits per diversos autors com a sistema model per a l'estudi de la interacció àcid nucleic-proteïna. Donat que el DNA no presenta l'OH en 2' de la ribosa, necessari per a la hidròlisi enzimàtica de la cadena nucleotídica per part de la RNAasa, tot conservant els trets fonamentals necessaris per a la interacció amb l'enzim, hom esperava obtenir informació d'aquests estudis.

De fet, WALZ (1971) havia observat que la RNAasa A té la mateixa afinitat, fins i tot potser més elevada, per als desoxiribonucleòtids que per als ribonucleòtids.

Així, SEKINE et al. (1969) observaren que tant el DNA natiu com desnaturalitzat (monocatenari) inhibien competitivament la hidròlisi de l'RNA, essent el monocatenari més efectiu. Aquesta competitivitat indicava l'especificitat de la interacció. La sedimentació en gradient de sacarosa va indicar també una major afinitat per al monocatenari (FELSENFELD et al., 1963). Mitjançant la gel filtració es determina que interaccionaven uns 12 nucleòtids de DNA desnaturalitzat per molècula de RNAasa (RAJU & DAVIDSON, 1969), un resultat que estaria d'acord amb el tamany de la molècula enzimàtica (VON HIPPEL & Mc GHEE, 1972), però si s'examinen les dades cristal·logràfiques, hom observa que en l'esclletxa que inclou el centre actiu és impossible d'encaixar-hi 12 nucleòtids. Potser cal pensar en interaccions fora d'aquesta esclletxa. Els mateixos autors consideren necessaris estudis més detallats per a resoldre aquest problema. Aquests estudis es van portar a terme al 1976 per JENSEN & VON HIPPEL. En ells indiquen, en primer lloc, que el resultat de 12 nucleòtids, donat per RAJU & DAVIDSON (1969), podria ésser degut a que no s'hagi tingut en compte una potencial sobreposició de setis d'interacció, que ells observen en els seus estudis.

JENSEN & VON HIPPEL troben que una molècula d'enzim interacciona amb 4 parells de bases del DNA natural i amb 11 nucleòtids de DNA monocatenari, i que la força d'interacció enzim-DNA monocatenari és dos cops més elevada que la força d'interacció amb el natural. Respecte del significat d'aquesta potencial sobreposició de setis d'interacció, comenten que: "el tamany de la molècula de RNAasa pot fer que la molècula cobreixi un cert nombre de nucleòtids de la cadena de DNA, fent que aquesta regió quedi inaccessible a la fixació d'una altra molècula de proteïna. Així, encara que només un quants nucleòtids estiguin directament involucrats en l'interacció, el vertader tamany de la part de DNA natiu o desnaturalitzat que interacciona pot ésser bastant gran. El desplaçament d'una molècula de proteïna al llarg de la molècula de DNA situarà la proteïna en un altre seti d'interacció. Per la qual cosa, el setis de fixació potencials es sobreposen".

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

Mitjançant estudis per centrifugació, espectrofotometria ultraviolada i de dispersió rotatorià òptica LACOMBE et al. (1974, a i b) van determinar que una molècula de RNAasa interacciona amb cinc a sis nucleòtids de la cadena de DNA natiu (xifra ja molt més pròxima a l'esperada pel tamany de l'esclletxa de l'enzim segons les dades cristal·logràfiques). Els autors suggereixen que entre l'enzim i el DNA no hi estaria involucrat un sol tipus d'interacció, i proposen un model per explicar el mecanisme de desestabilització provocat per la RNAasa: "existirien en la molècula d'enzim al menys 2 setis de fixació per al DNA, situats en dues zones distants de la molècula". Aquests estudis foren fets emprant RNAasa S, que no provoca la desestabilització del DNA, la qual cosa suggereix la localització d'un d'aquests setis a l'extrem N-terminal (aminoàcids 1 a 20). Donat l'efecte de la força iònica i el pH en el procés, hi estaven involucrades forces electrostàtiques que fan suposar que aquests setis contindrien càrregues positives, i actuarien cooperativament. En el cas de la RNAasa S, l'extrem N-terminal es desplaçaria sota l'efecte del DNA natural, que no es deformaria (ja que el bicatenari és molt més rígid que l'RNA), restant localment separat de la S-proteïna, explicant-se així l'absència de desestabilització. Per contra, en el cas de la RNAasa A, en estar fermament fixat l'extrem N-terminal, la interacció amb el DNA bicatenari provocaria la deformació d'aquest i la seva desestabilització.

Estudis posteriors (CHINSKY & TURPIN 1982), emprant l'espectrofotometria Raman, interpretaven els resultats de la interacció RNAasa A-DNA desnaturalitzat en termes d'una interacció específica proteïna-base. Emprant poli (dA-dT) indiquen que unes 15 bases del polímer bicatenari estarien en una situació de NO-stacking entre elles en el complex RNAasa-polímer. S'establiria una interacció entre la RNAasa i l'amí de la posició 6 de l'adenina del polímer, trencant-se el pont d'hidrogen entre aquest grup i el carbonil-4 de la timina, el que provocaria la desestabilització del polinucleòtid.

De fet, doncs, d'acord amb els resultats dels treballs exposats, podem concloure que la RNAasa interacciona amb el DNA. Sota condicions ben definides, aquesta interacció comporta la desestabilització del DNA. Aquesta interacció és específica, donat que tant el DNA bicatenari com el monocatenari inhibeixen competitivament la hidròlisi de l'RNA.

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

La interacció s'estableix, en gran mida, entre els grups fosfat del DNA i zones positives de l'enzim. Donat que una molècula de RNAasa interacciona amb 5 a 6 nucleòtids de la molècula de DNA natiu, en aquesta interacció hi estarien involucrats 5 setis carregats positivament de l'enzim, de fixació pel DNA, que actuarien cooperativament. Un (o més) d'aquests setis de fixació estaria situat en l'extrem N-terminal de l'enzim (aminoàcids 1 a 20), donat que la RNAasa S no provoca la desestabilització del DNA.

---

La postulació del sub-seti fixador de nucleòtids B3 R3 P2 permet d'enfocar les dades obtingudes sota una altra perspectiva.

En primer lloc, permet donar una possible explicació a la activació observada en els experiments de cinètica de saturació, i a la gran disminució d'activitat en front d'RNA (apartat III-5).

### IV-2 EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE MARCADOR SOBRE L'ACTIVITAT DE LA RNAasa A EN SOLUCIÓ

La activació observada en els estudis de l'efecte del marcador sobre l'activitat de la RNAasa A front del 2',3' Cp (apartat III-5) indica que es forma un complex enzim-lligand, dependent del temps. També indica que el Cl<sub>6</sub>-RMP interacciona en un seti diferent que el 2',3' Cp, amb una actuació que, probablement, és similar a la activació que observaren WIEKER & WITZEL (1964) i HAFFNER & WANG (1973), produïda per l'adenina, el seu nucleòsid i el seu nucleòtid.

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

Aquest efecte en la segona fase de la catàlisi ha estat postulat que vindria donat per la formació d'un complex ternari enzim-lligand-substrat, que seria hidrolitzat més ràpidament que el complex binari enzim-substrat. ARUS (1982) proposa, d'acord amb els estudis de DEAKYNE & ALLEN (1979), l'existència d'un canvi conformacional induït per la presència d'un nucleòsid purínic en el sub-lloc B2' R2 (figura 42) i en el que l'aspàrtic 121 interaccionaria amb la base nitrogenada, mentre que aquesta col·locaria la His-119 en posició òptima per a la catàlisi.

En el nostre cas, el marcador C16-RMP, es un anàleg de l'adenina. El marcador interacciona amb una part específica de la molècula d'enzim, el sub-seti fixador principal de purines B2' R2 P1, tal com suggereixen els estudis espectrofotomètrics (PARES et al., 1978). La interacció del C16-RMP en el B2' R2 P1 provoca també l'efecte d'un canvi conformacional (ARUS, 1981). Aquests fets venen a demostrar que la interacció inicial del C16-RMP en el sub-seti B2' R2 P1 pot provocar un efecte similar al que provoca l'adenina, activant la hidròlisi del 2',3' Cp que es posiciona en el sub-seti fixador de pirimidines B1 R1 P1.

L'efecte d'activació produït per la presència de C16-RMP seria una prova de que el centre fixador de fosfat P1 es prou gros per allotjar més d'un fosfat, sense que es produïxin repulsions entre ells, probablement degut al gran nombre de càrregues positives que hi han al voltant de P1.

El següent sub-seti ocupat pel C16-RMP seria el B3 R3 P2, pel que presenta menys afinitat, però que pot ocupar en ésser molt elevada la relació nucleòtid clorat/RNAasa en la solució.

És en aquest sub-seti secundari, B3 R3 P2, fixador de nucleòtids, on el grup reactiu, el C-6 del C16-RMP, correctament posicionat, es troba amb un grup nucleòfil susceptible de reaccionar, l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1. Es va produïnt derivat en funció del temps, i molt probablement, i de manera simultània, resta ocupat el B2' R2 P1 per una altra molècula de C16-RMP, ja que el marcador en B3 R3 P2 (Derivat II), no interfereix amb el sub-seti B2' R2 P1 (ARUS, 1981).

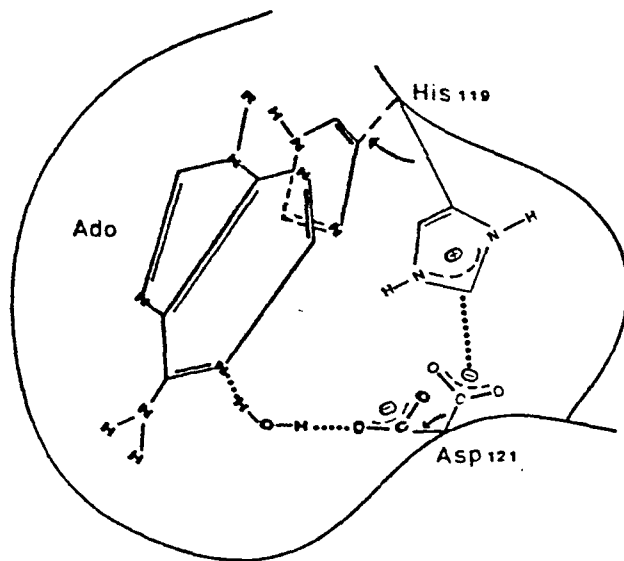


FIGURA-42

Esquema del canvi conformacional proposat induït, per l'adenina en la RNAasa A. La interacció entre l'Asp-121 i la His-119 (per pont d'hidrogen) es trencaria a l'ocupar l'adenosina (Ado) B2 R2. L'Asp-121 passaria a interaccionar, bé directament o mitjançant una molècula d'aigua, amb l'N1 de l'anell de purina. La His-119 es desplaçaria a una posició favorable per assolir un "stacking" amb l'anell heterocíclic en posició B2. (ARÚS et al., 1982).



## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

L'activació es detecta en les primeres hores de la reacció, però, a mida que passa el temps, van tenint lloc altres reaccions del marcador amb d'altres grups de l'enzim que van donant lloc a l'aparició de derivats molt menys actius en front de 2',3' Cp, però en petita quantitat, el que fa que l'activitat total de la barreja, continuï restant elevada.

Donat que el marcador en posició B3 R3 P2 (Derivat II) no impedeix la interacció d'una altra molècula en B2 R2 P1, hom podria esperar que l'adenina exercís un efecte d'activació en la hidròlisi del 2',3' Cp per el Derivat II, com així es va observar (ARUS, 1981 a).

Els fets esmentats vindrien a recolzar la hipòtesi de que el Cl6-RMP interacciona en primer lloc amb el seti principal fixador de purines (B2 R2 P1), provocant l'activació de l'hidròlisi del 2',3' Cp en la barreja de reacció. Una segona molècula de Cl6-RMP interaccionaria, simultàniament, en el sub-seti secundari B3 R3 P2, fixador de purines, que reacciona donant lloc al Derivat II.

Front d'RNA, a temps 0, s'observa que es manté una activitat bastant elevada, gairabé el 100%, quan en el medi hi ha una quantitat relativament petita de Cl6-RMP ( $32\mu\text{M}$  en cubeta), activitat que passa a ésser menor en augmentar la quantitat de marcador present ( $65\mu\text{M}$  en cubeta) i encara menor en emprar concentracions elevades ( $260\mu\text{M}$  en cubeta). Aquests fets venen a indicar que el marcador interacciona amb l'enzim (a B2 R2 P1 i a B3 R3 P2), i que degut a la seva gran concentració a la barreja de reacció (encara que l'enzim mostri més afinitat pel RNA que pel Cl6-RMP), el nucleòtid halogenat exerciria un empediment estèric a la interacció enzim-RNA, donat que es tracta d'un substrat d'alt pes molecular. D'ésser certa la hipòtesi abans esmentada de que el marcador interacciona inicialment en el sub-seti principal fixador de purines (B2 R2 P1), a baixes concentracions seria aquest el sub-seti principalment ocupat, i donada la major afinitat de l'enzim per l'RNA, el substrat desplaça el marcador i és hidrolitzat, a temps 0, amb una eficiència comparable a la de l'enzim natural. En anar augmentant la concentració de Cl6-RMP, aquest passa a interaccionar també en el B3 R3 P2 (i pot ésser en d'altres, com es veurà posteriorment), i aquest fet resulta en una més gran dificultat d'ésser desplaçat el nucleòtid i, en conseqüència, la barreja presenta una menor activitat.

## C DISCUSSIÓ FINAL ]

Essent, doncs, important el paper jugat pel sub-seti B2 R2 P1 en la fixació del marcador, els fets esmentats vindrien a indicar que el sub-seti B3 R3 P2 també juga un paper en el reconeixement de la base següent en la seqüència de l'RNA a la que interacciona en B2 R2 P1 (Figura 40).

A mida que passa el temps, el marcador va reaccionant amb l'enzim. L'activitat va disminuint apreciablement, fins a esser nul·la (entre 12 i 18 hores d'incubació), per formació de derivats monosubstituïts (en general amb una baixa activitat front de l'RNA) i derivats bi(multi)substituïts (amb una activitat nul·la). A les 48 hores, la barreja de reacció encara presenta un 33% d'enzim sense modificar, però no es detecta activitat front d'RNA. Aquest fet suggereix que la concentració de C16-RMP (entre 32 i 260 $\mu$ M) en la cubeta de la reacció enzimàtica és suficient per inhibir l'enzim.

### IV-3 REACCIÓ ENTRE LA RNAasa A i EL C16-RMP EN PRESENCIA D'AMP.

L'existència d'aquest sub-seti B3 R3 P2 també permet d'entendre millor perquè l'AMP no logra inhibir més que en un 50% la formació del Derivat II quan és afegit a la barreja de reacció RNAasa A - C16-RMP. El nucleòtid natural desplaçaria al C16-RMP del centre principal (B2 R2 P1), doncs presenta una constant d'associació més elevada (unes 4 vegades més gran) i es troba en una concentració 7 vegades més gran en la reacció. El nucleòtid marcador encara pot interaccionar en el sub-seti secundari, el B3 R3 P2, on, a més a més, es troba amb un nucleòfil (la Lys-1) amb el qual pot reaccionar. L'AMP també pot interaccionar en aquest sub-seti, però sembla presentar, en principi, una menor afinitat per ell (el 5'-AMP presenta un lloc fort d'interacció amb la RNAasa A i de tres -NOGUES, 1982- a quatre - SOLÀ, 1981- de febles). Per aquest motiu ambdós nucleòtids, l'halogenat i el natural, competeixen per B3 R3 P2, la qual cosa determina que el C16-RMP pugui interaccionar en aquest sub-seti i vagi reaccionant amb l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, restant el B3 R3 P2 ocupat. A la fi de les 48 hores d'incubació el marcador logra reaccionar aproximadament en un 50% del que hauria reaccionat en absència d'AMP.

#### IV-4 COMPARACIÓ ENTRE ELS DERIVATS F i II.

##### INFLUÈNCIA DEL GRUP FOSFAT EN LES CARACTERÍSTIQUES CINÈTIQUES.

El Derivat F és el que resulta de la reacció de 6-Clo-ropurina ribòsid amb l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la RNAasa A, essent, per tant, idèntic al derivat II sense fosfat, la comparació de les característiques cinètiques d'ambdós derivats ens permet estudiar el paper jugat pel grup fosfat.

D'acord amb les dades de la TAULA 23, front de 2',3' Cp, el Derivat II presenta una Km pràcticament igual, i una Kcat quelcom inferior al Derivat F. Aquestes dades indiquen que ambdós derivats presenten una afinitat bastant semblant pel substrat de baix pes molecular, mentre que l'eficiència catalítica decreix un 30% quan està present el grup fosfat. Així doncs, en front del substrat de baix pes molecular, la presència del grup fosfat no provoca unes grans variacions de les característiques cinètiques, la qual cosa no és d'estranyar, doncs el grup fosfat, en el cas del Derivat II, roman bastant allunyat del centre catalític de l'enzim (TAULA 25, entre uns 6 i 10 Å)

Front d'RNA, les variacions observades son molt acusades. Per al Derivat F s'observa una activació, mentre que per al Derivat II s'observa una forta inhibició (d'un 75%). Aquesta inhibició, que només pot ésser deguda a la presència del grup fosfat, solament pot explicarse per una repulsió de càrregues entre la negativa del fosfat marcador i les dels grups fosfat de l'RNA, i per impediment estèric en P2.

Donat que el grup fosfat del Derivat II, que roman allunyat del centre catalític, és capaç d'inhibir fortament la hidròlisi de l'RNA, aquest fet ve a recolzar l'existència i el paper jugat per d'altres sub-setis fixadors de nucleòtids en l'enzim. Les característiques dels Derivats F i II venen a recolzar l'existència d'un seti fixador de nucleòtids en l'extrem N-terminal de l'enzim (B3 R3 P2).

#### IV-5 REACCIÓ ENTRE LA RNAasa A i EL C16-RMP A pH 7,4

L'especificitat de la reacció de marcatge, RNAasa A - C16-RMP a pH 7,4, ha estat posada en evidència tant per les dades exposades a la introducció com per les dades de la reacció en presència d'AMP i de la reacció a pH's més bàsics. Però, recordant el fet de que, a més del Derivat II, es formen d'altres derivats monosubstituïts minoritaris ("X's", IV, V, VI, Figura 20) hom es pregunta:

- amb quin grup nucleòfil de l'enzim ha reaccionat el marcador en aquests altres derivats?
- han tingut lloc aquests marcats en d'altres sub-sè-tis fixadors de nucleòtids?
- son aquests derivats monosubstituïts minoritaris reflex d'altres marcatges per afinitat, menys afavorits pel fet de que el marcador no pugui encarar-se correctament amb un grup nucleòfil adequat, o se situï lluny d'ell?

Els grups nucleòfils de l'enzim que poden ésser candidats per a reaccionar amb el marcador van ésser estudiats per PARÉS (1977). En aquest estudi restava clar que, en les condicions de reacció (pH 7,4) els únics candidats eren els grups imidazol de les histidines i l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> i  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les lisines.

Els estudis dels derivats monosubstituïts, majoritari i minoritaris, per espectrofotometria directa i per diferència d'espectre, indiquen que tots els derivats obtinguts son derivats per reacció del marcador en una lisina. La RNAasa A mostra en la seva seqüència un  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 i 10  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de 10 lisines, la Lys-1, 7, 31, 37, 41, 61, 66, 91, 98 i 104.

L' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 es el grup marcat en el cas dels Derivats II i F.

## [ DISCUSSION FINAL ]

L' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, pels estudis de determinació de l'aminoàcid terminal, no sembla que hagi reaccionat amb el marcador en cap dels casos dels derivats monosubstituïts estudiats.

L' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-41 tampoc sembla que hagi reaccionat donant lloc a un derivat monosubstituït, doncs cap dels derivats perd totalment l'activitat front de 2',3' Cp. La Lys-41 podria ésser marcada en alguns dels derivats bi(multi)substituïts.

D'acord amb les dades de la bibliografia i de l'estructura tridimensional, l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-66 formaria part d'un sub-seti fixador de fosfat (IWAHASHI et al., 1981), pel que aquest  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> seria un possible grup marcat en el cas dels altres derivats monosubstituïts obtinguts.

D'acord també amb les dades de la bibliografia, un altre candidat és l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-7.

Queden també com a possibles  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> susceptibles de reaccionar amb el marcador els de les Lys-31, 37, 61, 91, 98 i 104. Cada grup marcat donaria lloc a un derivat diferent. S'ha de tenir també en compte que quan s'utilitza Cl<sub>6</sub>-RMP com a nucleòtid clorat marcador, aquest pot perdre el grup fosfat durant el procés de purificació, obtenint-se doncs derivats diferenciables cromatogràficament, però marcats en el mateix grup proteic (PARÉS, 1977). Aquest podria ésser el cas dels Derivats V i VI (de la Figura 20), doncs aquests derivats elueixen, en la cromatografia de bescanvi catiònic, a una força iònica superior a la del Derivat II i just abans que la RNAasa A, que en les condicions cromatogràfiques és la molècula eluïda més tard, ja que és la que poseeix una càrrega positiva més elevada. Donat que el Derivat II és la molècula d'enzim amb l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> modificat, i que aquest grup és el de menor pK (d'entre els NH<sub>2</sub> de la RNAasa A), la desaparició d'aquesta càrrega positiva és la que disminueix en menor quantitat la càrrega positiva total de la molècula. És per aquest fet que el Derivat II és, d'entre la sèrie de derivats monosubstituïts possibles, el que serà eluït a més alta força iònica. Aquest supost va fer pensar que, tant el Derivat V com el VI, eren derivats monosubstituïts que havien perdut el grup fosfat i podrien ésser derivats per reacció en els mateixos grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> que algun dels derivats "X", el Derivat II i

## C DISCUSSIÓ FINAL ]

Adhuc el IV. Aquesta suposició vindria recolzada pel fet que, en la reacció RNAasa A-6 Cloropurina ribosa (Figura 27), el Derivat F (per marcatge en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, o sia, el Derivat II sense fosfat) es l'eluit a més alta força iònica d'entre tots els derivats obtinguts. Aquest Derivat F es eluït just abans que l'enzim que roman sense reaccionar, indicant el fet abans esmentat de que al modificar l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, la càrrega positiva total de l'enzim es la més elevada d'entre els derivats monosubstituïts obtinguts.

Les característiques cinètiques del Derivat F comparades amb les del Derivat II (TAULA 23) van posar en evidència que el responsable de la disminució de l'eficiència catalítica, en el cas del Derivat II era el grup fosfat. Suposant que en el cas dels Derivats V i VI aquests fossin derivats que haguessin perdut el grup fosfat, caldria esperar que presentessin una activitat, si no més elevada front del 2',3' Cp que l'enzim natiu, si més elevada que els altres derivats monosubstituïts. En la TAULA 9 s'observa que presenten una activitat del 100% i 97% respectivament, el que indica que el marcador roman suficientment "allunyat" com per no impedir la hidròlisi del substrat de baix pes molecular amb una eficiència igual a la de l'enzim natural. Per contra, front d'RNA, aquests derivats mostren una molt baixa activitat (15% i 13%) la qual cosa sembla indicar que el marcador interfereix la interacció enzim-substrat d'alt pes molecular, però en menor grau que la resta de derivats (exceptuant el II) ja que tots presenten una activitat encara més baixa front de l'RNA.

Resten doncs 5 derivats monosubstituïts, els 4 "X" i el IV, i 8 grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>: els de les Lys-7, 31, 37, 61, 66, 91, 98 i 104.

Cal assenyalar en aquest punt que els 5 derivats monosubstituïts esmentats mostren una activitat front de 2',3' Cp bastant inferior a la de l'enzim natural i a la del Derivat II, i similar entre si (TAULA 9). Tots ells presenten una activitat molt baixa front d'RNA, i també inferior a la del Derivat II. Aquestes dades vindrien a indicar que en tots els casos el marcatge ha tingut lloc en un  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'una lisina que fa que el marcador se situï quelcom més a prop del seti catalític de l'enzim, exercint un impediment més elevat a la hidròlisi del 2',3' Cp i de l'RNA.

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

Tal com ja s'ha esmentat, el marcador (C16-RMP) presenta una distància entre l'àtom de fòsfor i el C(6) de la base purínica d'uns 10,5 Å (apartat I-3). Però la molècula en solució pot adoptar estructures espacials diferents a la de la forma cristal·lina i la distància entre el grup fosfat i el C(6) pot ésser inferior a 10,5 Å (com així es comprova en mesurar la distància entre el C(6) de l'adenina i l'oxigen O3'U del dinucleòsid monofosfat en solució UpA, que resulta ésser, per cristal·lografia de raigs X, d'uns 8 Å (SUSSMAN & SEEMAN, 1972)).

Davant d'aquestes dades es van determinar les distàncies al seti catalític de l'enzim dels diferents  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>, per tal de comprovar si les dades obtingudes estarien d'acord amb les dades tridimensionals. El seti catalític de l'enzim es va dividir en dues zones:

- 1- punt mig entre els imidazols de les His-12 i 119.
- 2- l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-41.

Per aquest fet es va dur a terme l'elaboració de la gràfica tridimensional de la RNAasa A (Figura 6 i 43).

En observar l'estructura tridimensional de la molècula de RNAasa A s'observa que l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-61 està situat en una posició completament contrària a l'esclletxa de la molècula que inclou el centre actiu. Així doncs, en principi caldria descartar aquest grup com un possible lloc de marcatge, donat que tots els derivats obtinguts presenten una activitat inferior a la de l'enzim natiu, i per tant el marcador ha d'estar situat en una zona pròxima al seti catalític.

Els  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les Lys-91 i 98 resten massa allunyats del seti catalític, en una zona externa, perllongació de l'esclletxa que inclou el centre actiu per l'extrem delimitat per les Lys-66 (PO), Val-124 i Lys-104. No sembla procedent mesurar la distància en línia recta entre aquests  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> i l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-41, doncs la mateixa molècula de RNAasa A ofereix un impediment estèric a l'accessibilitat del marcador (zona dels aminoàcids 85-86-87-88). De tota manera, encara que molt allunyats, i en principi "externs", aquests dos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> no poden ésser rebutjats completament (particularment el de la Lys-98), tal com es veurà posteriorment.

C DISCUSSIÓ FINAL ]

En un cas similar es troben els  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les Lys-31 i 37, essent externes, la 31 es troba bastant allunyada de la vall que inclou el centre actiu. La 37 estaria situada just en l'extrem contrari al que determina la Lys-66 i 104, i la Val-124, delimitant per l'altra costat la vall que inclou el centre actiu, pel que aquesta lisina tampoc pot ésser rebutjada.

Les distàncies de cada  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> al seti catalític venen indicades en la TAULA següent (TAULA 24).

TAULA 24 .-

DISTÀNCIES DELS NH <sub>2</sub> DE LES LISINES AL CENTRE CATALÍTIC DE LA RNAasa A		
-NH <sub>2</sub>	DISTÀNCIA AL PUNT MIG HIS-12 i 119	DISTÀNCIA A L' $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> DE LA LYS-41
Lys-1 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> )	18,5 Å	16,4 Å
Lys-1 ( $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> )	13,4 Å	12,8 Å
Lys-7 "	8,7 Å	6,0 Å
Lys-37 "	16,7 Å	11,2 Å
Lys-66 "	12,3 Å	16,0 Å
Lys-104 "	18,0 Å	22,5 Å
Lys-41 "	7,0 Å	-

Mides efectuades emprant les coordenades de la RNAasa A (CARLISLE, 1974) obtingudes a partir dels plànols de densitat electrònica de la cristal·lografia de raigs X de la molècula amb una resolució de 2,5 Å. Cal assenyalar que la conformació de la molècula en solució pot variar de la de la molècula en forma cristal·lina, particularment pel que respecta a grups més externs, com serien l' $\alpha$  i  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les Lys-37, 66 i 104.



[ DISCUSSIÓ FINAL ]

Les distàncies assenyalades en la TAULA 24, poden variar, tal com s'indica en el peu de la taula, i també poden variar degut a la interacció enzim-substrat.

S'estima doncs que el marcador (C16-RMP) es d'un tamany entre 8 i 10,5 Å, i com hipòtesi el considerem unit pel C(6) de la purina a l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 i a l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les lisines 7, 37, 66 i 104. Si es resten 8 a 10 Å a les distàncies de la TAULA 24, ens dóna la distància a la que podria situar-se el grup fosfat del centre catalític de l'enzim, en cas de que s'hagi produït la reacció en alguns d'aquests NH<sub>2</sub>. Aquestes distàncies venen expressades en la TAULA 25.

TAULA 25.-

POSSIBLES DISTANCIES MINIMES ENTRE EL FOSFAT DEL GRUP MARCADOR UNIT A L' $\alpha$  i  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> DE LA LYS-1 i A L' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> DE LES LISINES 7, 37, 66 i 104 i EL SETI CATALITIC DE L'ENZIM

GRUP	SETI CATALÍTIC	
	PUNT MIG His-12, His-119	$\epsilon$ -NH <sub>2</sub> Lys-41
Lys-1 $\alpha$ -NH <sub>2</sub>	entre 8 i 10,5 Å	entre 6 i 8,5 Å
Lys-1 $\epsilon$ -NH <sub>2</sub>	entre 3 i 5,5 Å	entre 2 i 5 Å
Lys-7 $\epsilon$ -NH <sub>2</sub>	0 Å	0 Å
Lys-37 $\epsilon$ -NH <sub>2</sub>	entre 6 i 8,5 Å	entre 0,5 i 3 Å
Lys-66 $\epsilon$ -NH <sub>2</sub>	entre 2 i 4,5 Å	entre 5,5 i 8 Å
Lys-104 $\epsilon$ -NH <sub>2</sub>	entre 7,5 i 10 Å	entre 12 i 14,5 Å

Les dades de la TAULA 25 indiquen:

- a) Que el fosfat del marcador unit a l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 (Derivat II i Derivat F) roman bastant allunyat del seti catalític (a una distància que permet introduir-hi encara un altre nucleòtid purínic). Aquesta distància està d'acord amb l'esmentat al principi d'aquest apartat així com amb les dades exposades. Cal observar que, estant a uns 8-10 Å de distància, el grup fosfat del Derivat II encara exerceix una influència en l'activitat, doncs, encara que presenta la mateixa afinitat pel substrat de baix pes molecular, la seva eficiència catalítica es menor.
- b) L' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 queda, en principi, descartat pel que respecta als Derivats F', E, X3, X4 i VI, doncs la determinació del seu N-terminal indica que cap NH<sub>2</sub> de la Lys-1 havia estat modificat. Aquests NH<sub>2</sub> de la Lys-1 quedarien com a candidats per als Derivats X1, X2, IV i V, donat que no s'ha determinat el seu N-terminal. En aquests casos el grup fosfat se situaria, com a mínim, entre 2 i 5,5 Å del seti actiu, distància més petita que pel cas del marcat en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, que podria explicar la menor activitat front del 2',3' Cp (TAULA 9) (exceptuant el V).
- c) En estar el marcador unit a l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-7 el seu grup fosfat estaria situat a sobre del seti catalític de l'enzim, encara que el seti fixador de pirimidines (B1 R1 P1) pugui quedar lliure per a que pugui interaccionar el 2',3' Cp, podent conservar el derivat en qüestió una certa activitat front d'aquest substrat.
- d) Si el marcador s'ha unit a l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-66, la distància mínima està entre 1 i 3 Å.
- e) I si s'ha unit en l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-104 entre 5,5 i 8 Å.

## [ DISCUSSION FINAL ]

En ambdós casos el grup fosfat podria situar-se més a prop que en cas del Derivat II, i determinar també una disminució més elevada d'activitat front del 2',3' Cp.

Ens podem preguntar si els derivats obtinguts, altres que el Derivat II, són resultat d'un marcalge per afinitat en un sub-seti diferent del B3 R3 P2. Per respondre a aquesta qüestió es pot tenir en compte, en primer lloc, les dades d'activitat de cada derivat front de l'RNA (TAULA 9):

Aquestes dades indiquen que:

- 1) En el cas del Derivat II, restant molt elevada l'activitat front del 2',3' Cp, front de l'RNA disminueix en gran mida. Aquest fet indica que en restar ocupat el B3 R3 P2 pel marcador, aquest exerceix un impediment (tant estèric com per repulsió de càrregues) a la interacció enzim-RNA, el que està d'acord amb les idees i resultats exposats, tant en l'apartat I com en el IV, de que l'enzim presenta més d'un sub-seti d'interacció amb el substrat d'alt pes molecular.
- 2) En el cas dels altres derivats monosubstituïts minoritaris, i exceptuant els Derivats V i VI per raons ja esmentades, tots presenten una activitat front d'RNA menor que el Derivat II, i donat que en principi, en no ésser derivats per reacció amb l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, no sembla que en aquests derivats resti ocupat el sub-seti B3 R3 P2. Un dels possibles podria ésser un sub-seti proper al PO (Lys-66) postulat pel grup de IRIE (SAWADA & IRIE, 1969).

#### IV-5.1 INTENT DE LOCALITZACIÓ D'ALTRES POSSIBLES SUB-SETIS

Per tractar de localitzar aquests altres possibles sub-setis s'ha posicionat un pentanucleòtid model (ApApApCpAp) en l'esqueleta que forma el centre actiu de l'enzim, emprant la gràfica tridimensional de la RNAasa A, portada a terme d'acord amb l'esmentat en l'apartat II-19 (Figura 43).

S'ha escollit un pentanucleòtid en base a, en primer lloc, les dades de l'interacció del pirofosfat amb la RNAasa A (RIDNLLINGTON & WOMACK, 1969) que assenyalaven un seti de forta interacció i dos a tres de febles. Les dades d'interacció de la RNAasa A amb el 5'-AMP (SOLA, 1981) que indiquen un seti de fixació primari i quatre de febles. En segon lloc, cal esmentar les dades de l'interacció de l'enzim amb el DNA que indiquen que la RNAasa A interacciona amb cinc a sis nucleòtids del DNA. En tercer lloc s'han posicionat diversos oligonucleòtids en la vall del centre actiu de l'enzim, emprant les representacions tridimensionals obtingudes per computadora, i s'ha observat que el millor model a emprar era un pentanucleòtid, la qual cosa està d'acord amb les dades esmentades abans.

En observar la gràfica tridimensional (a) de la Figura 43 (i les fotos de la mateixa figura) hom pot observar quins residus de l'enzim queden a prop de cada grup del pentanucleòtid model. Anant en la direcció 3' --> 5':

- El primer fosfat resta a prop de la Lys-104, que podria jugar el paper d'un residu que formés part d'un seti fixador de fosfat, que caldria anomenar P1'. Aquest possible paper jugat per la Lys-104, com a constituent d'un sub-seti fixador de fosfat, estaria d'acord amb el possible paper jugat per els aminoàcids bàsics en la interacció enzim-substrat, indicat per COOKE et al. (1963), HUMMEL & KALNITSKY (1964), LIBONATI (1965) i BROWN & BRADBURY (1976).

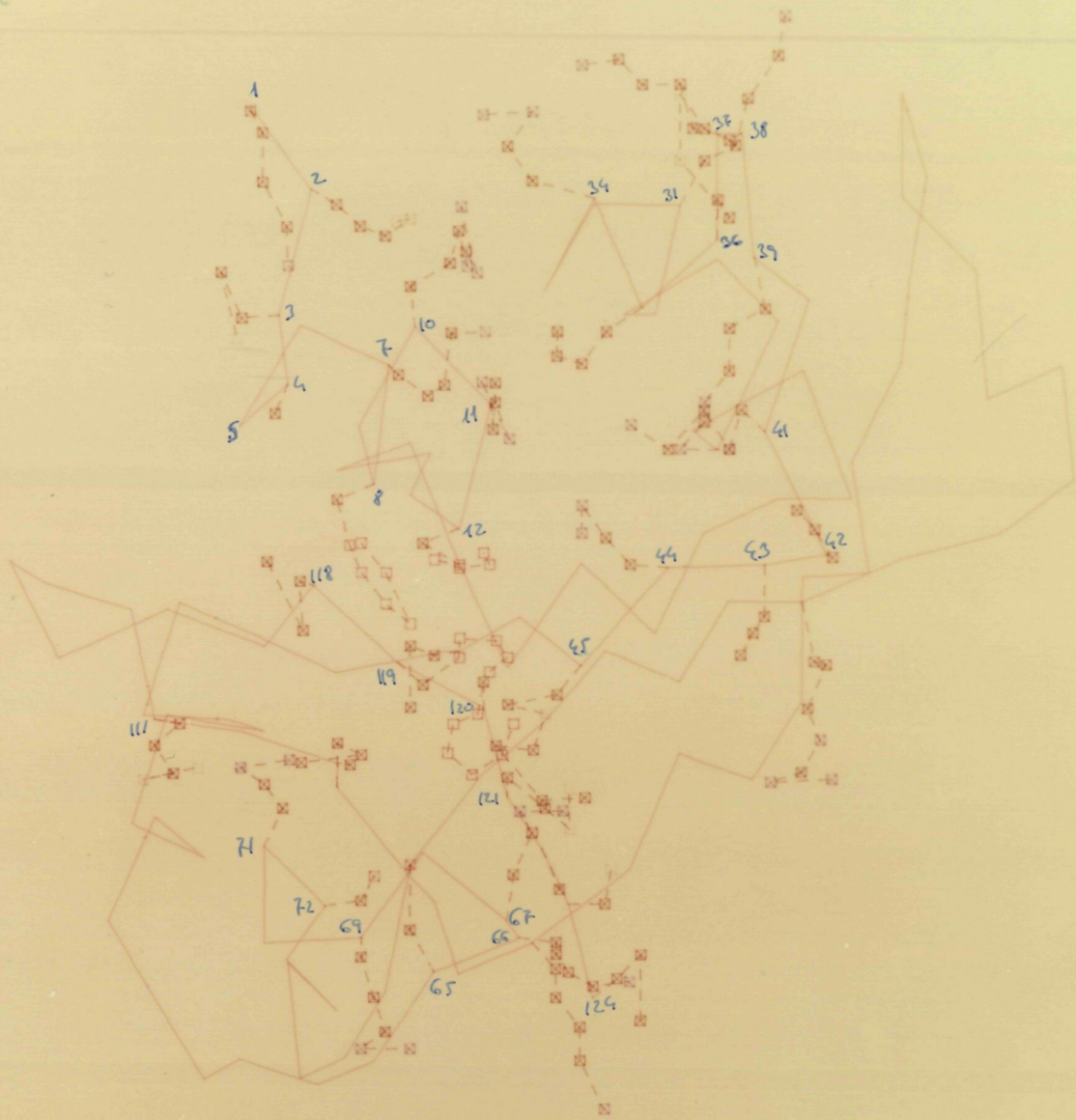
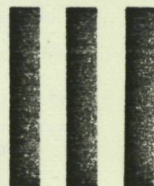
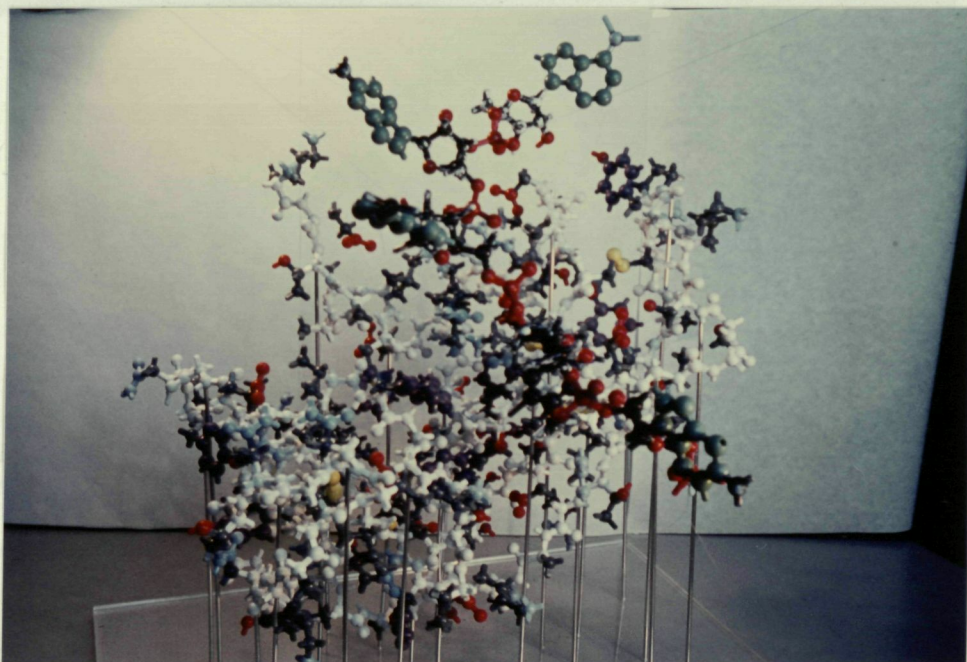
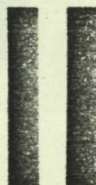
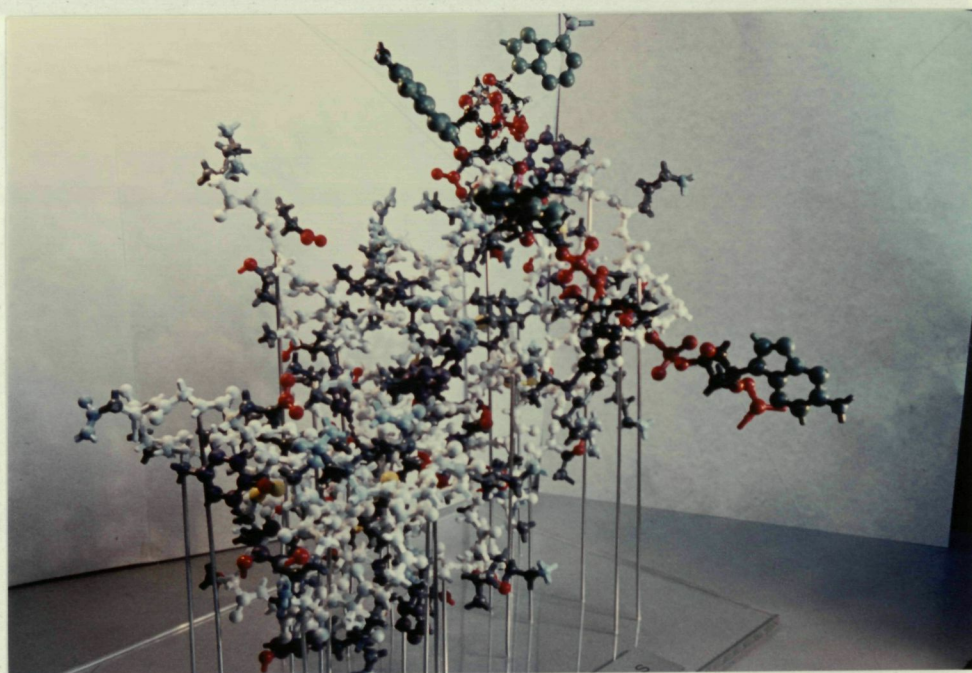
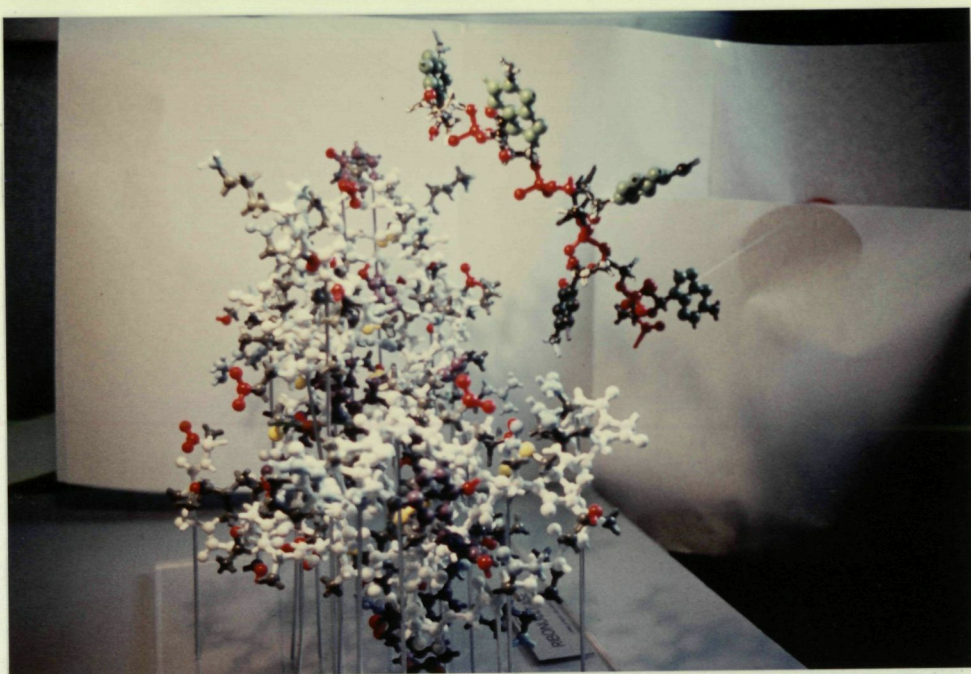
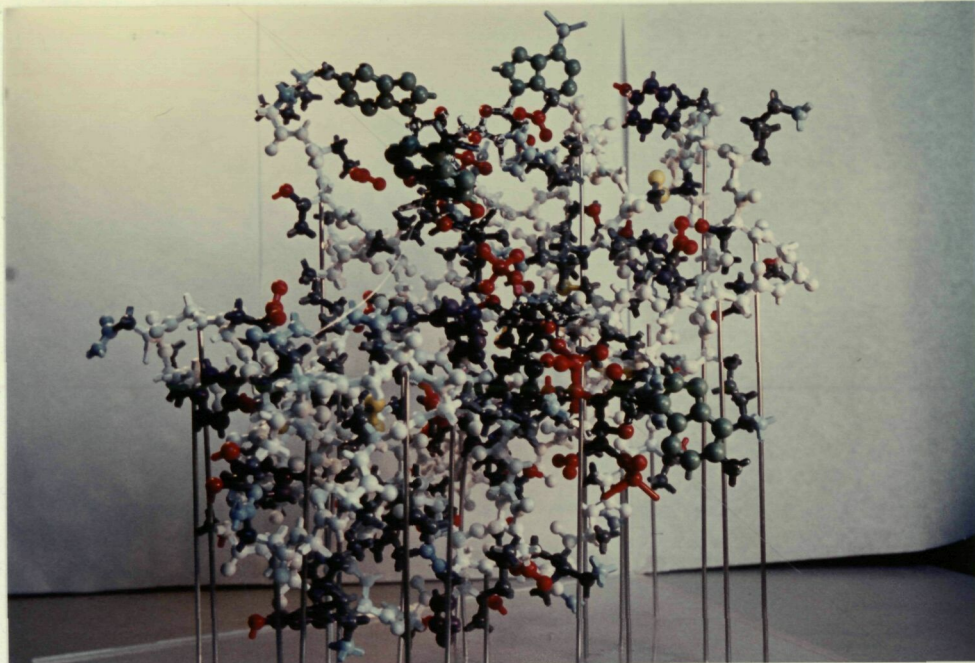


FIGURA 43

- a) Representació de la cadena principal de la RNAasa A en la que es sobreimposen 39 cadenes laterals (las que resten més a prop del pentanucleotid model que es fa interaccionar amb l'enzim - APAPAPCPAP). Aquestes cadenes laterals són les dels aminoacids: Lys-1, Glu-2, Thr-3, Ala-4, Lys-7, Phe-8, Arg-10, Gln-11, His-12, Lys-31, Asn-34, Leu-35, Thr-36, Lys-37, Asp-38, Arg-39, Lys-41, Pro-42, Val-43, Asn-44, Thr-45, Val-47, Cys-65, Lys-66, Asn-67, Gln-69, Asn-71, Cys-72, Ile-81, Arg-85, Lys-104, Val-108, Ala-109, Glu-111, Val-118, His-119, Phe-120, Asp-121, Ala-122, Ser-123, Val-124.





IV



V

FIGURA 43

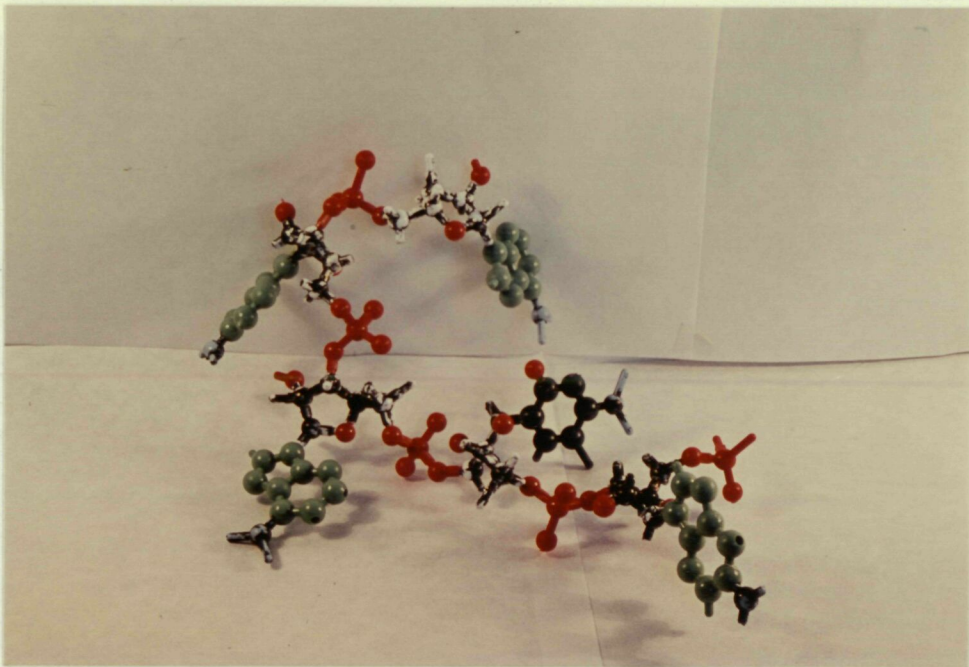
b) I, II, III, IV, V: sequencia de fotografies del model de la RNAasa S, en la que es mostra la fixacio d'un pentanucleotid model en la molecula d'enzim. L'estructura del pentanucleotid model es mostra en la fotografie VI.

VII, VIII, IX : detalls de la interaccio del pentanucleotid model amb la RNAasa S.

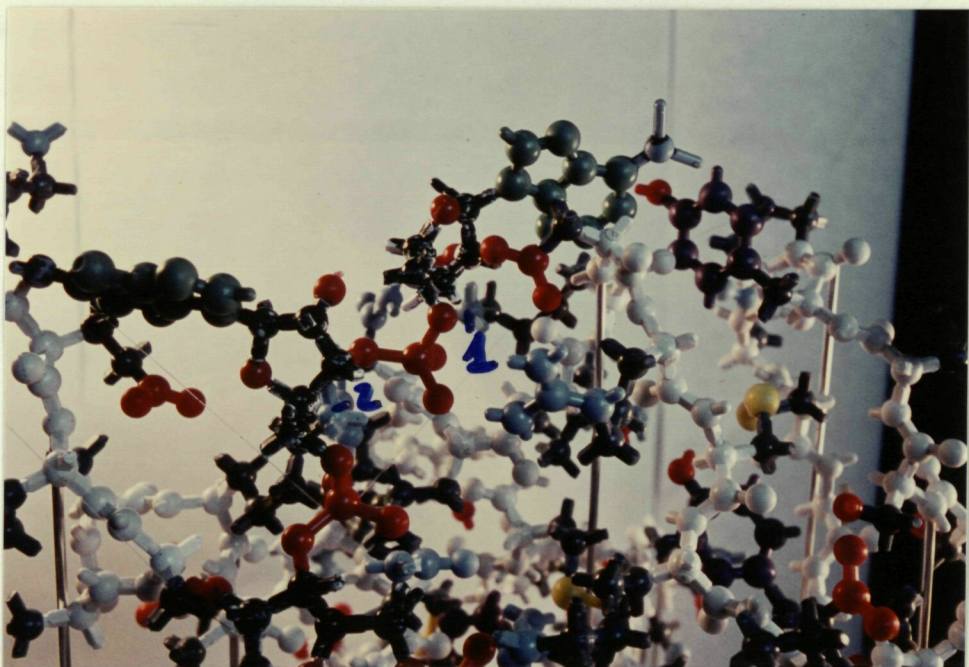
VII: zona de la Lys-37 i Lys-7

VIII: zona de la Lys-7, -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, Lys-41 i Lys-66.

IX: zona de la Lys-66 i Lys-104.



VI



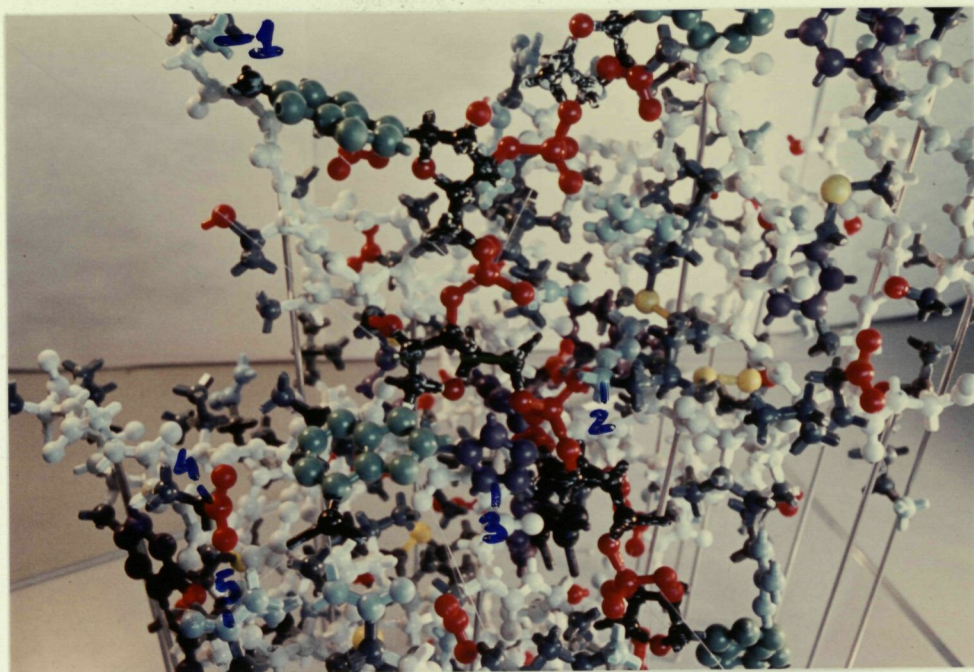
VII

1 Lys-37

2 Lys-7

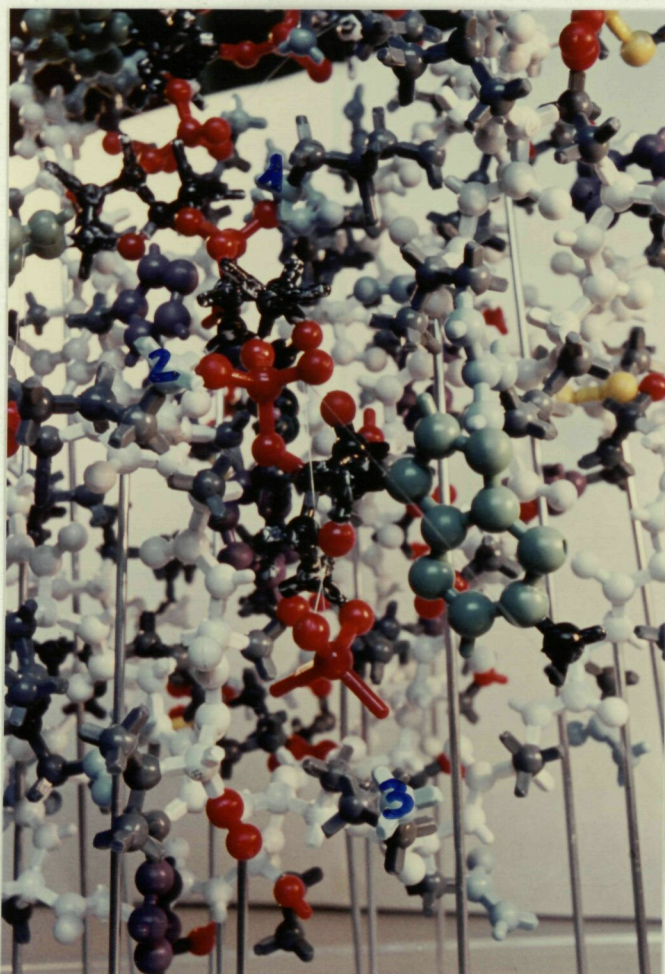
IX





VIII

1  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> Lys-1; 2 Lys-41; 3 His-119; 4 Glu-111  
5 Gln-69 i Asn-71



IX

1 Lys-41; 2 Lys-66; 3 Lys-104

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

- La primera ribosa resta a prop de la Val-124 i Arg-85. Un possible paper jugat per l'Arg-85 ja va ésser indicat per PATTHY & SMITH (1975) (apartat I-2.4.b.2).
- La primera adenina pot restar a prop d'Arg-85, però molt exposada al dissolvent (externa a l'esclètxa que inclou el centre actiu).
- El segon fosfat se situa junt a la Lys-66, residu ja postulat pels treballs d'IRIE (SAWADA & IRIE, 1969) i de WALTER & WOULD (1976), i constituent del subseti fixador de fosfat anomenat PO, restant a prop l'Ala-122 i Pro-42.
- La base pirimidínica, la citosina, se situa en el seti fixador de pirimidines B1, ben definit pels treballs de RICHARDS & WYCKOFF resumits en el treball publicat en 1971, i pel treball de CARLSON (1976), així com per WODAK (1977). En ells hom cita com a residus que formarien aquest seti: la Phe-120, la Ser-123, l'enllaç peptídic entre l'Asn44 i la Thr-45. Cal afegir que resten a prop la Val-47 i la Ile-81.
- La segona ribosa resta a prop de la His-12, Lys-41, Val-43, Asn-44 i de l'enllaç peptídic entre els residus Phe-120 i Asp-121.
- El fosfat número 3, entre la base pirimidínica i la segona base purínica, es el que se situaria en el seti principal fixador de fosfat, del seti catalític de l'enzim, anomenat P1. Aquest seti també està ben definit i formarien part d'ell la Lys-41, la His-12 i 119, l'enllaç peptídic entre la His-119 i la Phe-120 i resta a prop la Gln-11.

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

- La tercera ribosa resta a prop de l'Ala-4, Phe-8, Val-118 i l'enllaç peptídic entre la Val-118 i la His-119.

- La tercera base purínica se situa en el sub-seti fixador de purines anomenat B2 R2, també força ben precisat i format per:

La Gln-69 que se situa junt a l' $\text{NH}_2$  en posició C(6) de l'anell de l'adenina. El C(1) junt a la Asn-71. L' $\text{N}(7)$  junt a l'Asn-67 i Asp-121, restant a prop el Glu-111, Val-108, Val-118 i el pont di-sulfur 65-72.

- El quart fosfat se situa junt a la Lys-7, que formaria part del sub-seti fixador de fosfat postulat pel grup del Dr. CUCHILLO (PARÉS, 1980 b). Resten a prop Glu-2, Thr-3 i l'Ala-4. Aquest possible paper jugat per la Lys-7 ve recolzat per diverses dades indicades en la bibliografia. Com a més importants cal recordar els treballs de: COOKE et al. (1963), HIRS et al. (1965), KARTHA et al. (1967), ROCCHI et al. (1969), MARCHIORI et al. (1974), RIQUELME et al. (1975) i WALTER & WOLD (1976). (apartat I-2.4.b.2).

- La quarta ribosa resta a prop de la Lys-7, Arg-10, Gln-11 i Leu-35. Un possible paper de l'Arg-10 ha estat suggerit pels treballs de PATTHY & SMITH (1975) (apartat I-2.4.b.2) i postulat per ARÚS (1981).

- L' $\text{NH}_2$  en posició C(6) de la quarta adenina està junt a l' $\alpha$ - $\text{NH}_2$  de la Lys-1 i la resta de la base resta a prop de Glu-2, Thr-3, Arg-10, Asn-34, Arg-39 i Asp-38. Aquesta base purínica encaixa en l'esclotxa de la molècula enzimàtica formada per l'extrem N-terminal (residus Lys-1, Glu-2, Thr-3, Ala-4, Lys-7, Phe-8, Arg-10, Gln-11, Leu-35, Asp-38 i Arg-39). El possible paper jugat per la Lys-1 ja va ésser assenyalat pels treballs de EAKER et al. (1965), RIQUELME et al. (1975) i pels treballs del grup del Dr. CUCHILLO (PARÉS, 1977; PARÉS et al., 1980 a; ARÚS, 1981; ARÚS et al., 1981).

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

- El fosfat número 5 se situa junt a la Lys-37, que podria ésser un residu constitutiu d'un sub-seti secundari fixador de fosfat que podríem anomenar el P3. Aquest possible important paper jugat per la Lys-37 ja va ésser assenyalat pels estudis de COOKE et al. (1963).
- La cinquena ribosa se situaria a prop de l'Asn-34 i Asp-38.
- La cinquena i última base purínica podria situar-se a prop de la Tyr-92 (restant també molt exposada al dissolvent).

L'últim nucleòtid encaixaria en una escletxa que delimita la part oposada al PO de la vall que inclou el centre actiu. Aquesta escletxa estaria formada pels següents residus: Arg-10, Lys-31, Asn-34, Leu-35, Thr-36, Lys-37, Asp-38 i Arg-39.

Al principi d'aquest mateix apartat es resumien una serie de dades aportades per la bibliografia que també estarien d'acord amb l'existència de varis sub-setis.

D'entre les dades exposades cal resaltar:

- les dades cinètiques d'en NELSON & HUMMEL (1961) que els hi va permetre de postular l'existència de més setis d'interacció de l'enzim amb l'RNA que amb el 2',3' Cp. Els resultats d'en MYER & SCHELLMAN (1962) i d'en IRIE (1965), ampliat en treballs posteriors.
- Resulta especialment important el treball de RID-LINGTON & BUTLER (1969) (Figura 41), doncs troben un seti principal d'interacció del pirofosfat amb la RNAasa i de 3 a 4 de febles, que concorda amb el número de sub-setis fixadors de fosfat postulats (P1', PO, P1, P2 i P3).

## C DISCUSSION FINAL ]

- En els estudis portats a terme amb DNA (apartat IV-1):

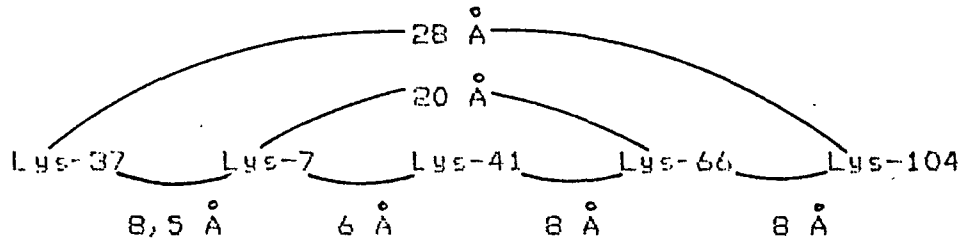
les dades obtingudes per FELSENFELD et al. (1963), SEKINE et al. (1969), WALZ (1971), JENSEN & VON HIPPEL (1976) i LACOMBE et al. (1974 a i b) venen a indicar que la RNAasa A interacciona amb el DNA d'una manera similar que amb l'RNA, i aquesta interacció inclou entre 4 i 5,5 deoxiribonucleòtids. Aquestes dades estan completament d'acord amb el nombre de nucleòtids que poden interaccionar amb l'enzim segons les dades estructurals.

En aquest punt es interesant observar que el pentanucleòtid model en interaccionar amb l'enzim, adopta una disposició espacial, especialment pel que respecte a la disposició dels grups fosfat i de les riboses, molt similar a la corba que descriuen 5 grups fosfat i riboses quan estan estructurades en forma de doble helix en el DNA. En el model B-DNA de doble helix proposat per WATSON & CRICK (1953), i emprant les coordenades donades per ARNOTT & HUKINS (1972), la distància entre un grup fosfat i el següent de la mateixa cadena es de 7,3 Å. 5 grups fosfat de la doble helix descriuen una corba de 150°. Entre el primer fosfat i el cinquè del pentanucleòtid model i han 25 Å de distància. Entre l'É-NH<sub>2</sub> de la Lys-37 i el de la Lys-104 hi ha 28 Å en el model Labquip de la RNAasa-S. Emprant les coordenades de la RNAasa A d'en CARLISLE, entre l'É-NH<sub>2</sub> de la Lys-37 i el de la 104 i han 33 Å. Però les dues, i sobretot la 104, estan exposades al solvent.

Aquest fet indicaria que la RNAasa A pot adaptar-se a una cadena de la doble helix i provocar la desestabilització del DNA esmentada (apartat IV-1).

Donat que els grups fosfat del pentanucleòtid resten a prop de 5É-NH<sub>2</sub> (Lys-37, 7, 41, 66 i 104) es va procedir a medir la distància entre cadascun d'aquests É-NH<sub>2</sub>. Aquestes distàncies, en Å, son les següents:

[ DISCUSSIÓ FINAL ]



-----  
Els  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les Lys-37, 66 i 104 estan molt exposades al solvent. Aquest fet implica que, en solució, les distàncies interatòmiques poden variar.  
-----

La distància entre cada grup fosfat del pentanucleòtid model és d'uns 7,6 Å (la mateixa distància que hi ha entre cada grup fosfat de la doble hèlix del DNA).

- La importància de l'extrem N-terminal de la molècula d'enzim va ésser demostrada pels estudis de MERRIFIELD & HODGES (1974) i LEVIT & BERGER (1976), en els estudis amb DNA (apartat IV-1), i també en els estudis per RMN dels S-pèptid II i F (apartat III-B. 1.c) en els que s'indicava que el marcador restava a prop del Glu-2, Thr-3 i Phe-8.
- Cal recordar la sèrie de dades aportades per SOLÀ (1981), GUASCH (1982) i NOGUÉS (1982) en les que s'indicava que l'enzim presenta, a més d'un sub-seti principal fixador de purines, entre 3 i 4 més de febles (dades que estan també d'acord amb la postulació de 2 sub-setis addicionals), aquí postulats (el P1' i P3) i les dades d'ARÚS et al. (1981 b i 1982) que suggereix un possible paper de la Lys-7 i la Arg-10 en el P2.

## C DISCUSSIÓ FINAL ]

- Finalment, cal fer esment del recent treball de MATTHEW & RICHARDS (1982). En ell apliquen a la RNAasa A i S el model, per efectes electrostàtics, de càrrega discreta d'accessibilitat del dissolvent de TANFORD & KIRWOOD (1957), modificat.

Determinen setis específics d'interacció d'anions, en la superfície proteica accessible al dissolvent, per la localització de zones d'alt potencial electrostàtic positiu.

Emprant el càlcul de la distribució de càrrega en la proteïna i la topografia coneguda de la superfície de la proteïna, desenvolupen un procediment per a la identificació de setis específics d'interacció iònica en la superfície proteica, basat en criteris electrostàtics. Utilitzant el sistema RNAasa com exemple, identifiquen particularment el centre catalític de la RNAasa com un seti general d'interacció aniònica. Això els hi permet evaluar el tractament teòric en el context de les dades de la bibliografia, corresponents a les afinitats pels protons de les histidines del centre catalític, així com pel que fa referència a les constants conegudes d'associació per a lligands aniònics.

Les representacions del potencial electrostàtic en la superfície proteica, a varies forces iòniques, mostra 2 setis amb un potencial positiu excepcional, a pH 6,0. El nombre de setis d'alt potencial, accessibles al dissolvent, s'incrementa fins, al menys, 5, a pH 4,0. Un dels 2 setis positius identificats a pH 6,0 és el corresponent al centre catalític, mentre que el segon està, aproximadament, a uns 8 Å, en línia recta, en la mateixa zona proteica. Aquest fet suggereix un paper en l'orientació o ancoratge d'un fragment d'RNA.

Identifiquen, doncs, a pH 4,0, 5 setis d'interacció aniònica en zones localitzades d'alt potencial positiu, externs a l'envoltant de Van der Waals de la proteïna. A continuació es donen les distàncies entre cada seti i tres grups titrables de l'estructura de la proteïna:

---

SETI	GRUPS TITRABLES
1	Lys-1 a 4 Å; Lys-37 a 6 Å; Tyr-92 a 6,6 Å.
2	Lys-7 a 4 Å; Arg 10 a 5,1 Å; Lys-41 a 6,9 Å.
3	His-12 a 5 Å; His-119 a 6,1 Å; Lys-41 a 8,6 Å.
4	Arg-85 a 4 Å; Lys-98 a 8,1 Å; Lys-66 a 10,8 Å.
5	Lys-104 a 4,1 Å; His-105 a 5,6 Å; Val-124 (COOH terminal) a 6,3 Å.

---

Es pot observar que cadascun d'aquests setis inclou els grups proteics constituents de setis fixadors de fosfat ja esmentats. Així, el seti número 5 inclou la Lys-104 (P1'), el 4 la Lys-66 (P0), el 3 la Lys-41, His-12 i 119 (P1), el 2 la Lys-7 (P2) i 1'1 la Lys-37 (P3).

---

La postulació dels sub-setis secundaris de fixació de fosfat P1' i P3 (Lys-104 i Lys-37 respectivament) i els ja acceptats P2 i P0 (Lys-7 i Lys-66) permet relacionar millor cadascun dels derivats monosubstituïts minoritaris (4 "X" i el IV) que restaven per explicar, amb aquests residus: Lys-7, 37, 66 i 104, esmentats. També es podria incloure, donat que faltaria un cinquè  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>, a la Lys-98, doncs aquesta està situada a continuació de la Lys-104, i l'anell de la purina de la primera adenina del pentanucleòtid model apunta vers la Lys-98 (Figura 43).



## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

Cal esmentar que, el fet de que cada derivat monosubstituit pogui relacionar-se amb un residu de lisina, no significa que aquest marcatge sigui el reflex de l'interacció del grup fosfat del marcador amb el grup  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lisina que posteriorment reaccionarà amb el marcador. De fet, en interaccionar el grup fosfat del marcador amb un grup  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'una lisina, el grup que reacciona, el C(6) de l'adenina, resta situat a l'extrem oposat de la molècula de marcador (aproximadament a uns 8 Å). El grup reactiu reaccionarà, aleshores, amb un  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> que resti a uns 8 Å de l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> per on s'ha fixat el fosfat. Donat que cada grup  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de l'esclatxa del centre actiu està situat a uns 8 Å de distància, significa que, en interaccionar el grup fosfat en un  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>, el grup reactiu pot reaccionar, o bé amb el grup  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> situat abans, o situat després, en la seqüència de 5 grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> assenyalats, que inclou l'esclatxa del centre actiu. Així doncs, el marcat d'un  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> específic seria el reflex de l'interacció del grup fosfat del marcador amb un  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'una lisina adjacent.

Amb les dades de que es disposa resulta molt difícil, sinó impossible, determinar si els possibles marcatges dels sub-setis fixadors de nucleòtids, pròxims als sub-setis fixadors de fosfat P1', P0 i P3 són reflex d'un marcat per afinitat.

D'ésser cert que l'enzim pot interaccionar amb 5 nucleòtids d'una molècula d'RNA, hom pot suposar que alguns dels sub-setis d'interacció jugarien un paper més important que d'altres, però la suma de tots ells determinaria un mecanisme cooperatiu que provocaria una alta eficiència en la interacció, i, en definitiva, una alta eficiència catalítica (cal recordar aquí les dades de RUSHIZKY 1961, citades a l'apartat I-2.7). Aquesta hipòtesi de l'existència de varis sub-setis d'interacció permet entendre millor el resultat de la reacció de marcatge en presència d'AMP (apuntat al principi d'aquest apartat), doncs l'AMP pot interaccionar principalment en el subseti B2 R2 P1, però més feblement a d'altres sub-setis. En canvi el marcador, el C16-RMP, poguent també interaccionar en els mateixos sub-setis, es quan interacciona en B3 R3 P2 on es troba amb un grup nucleofil susceptible de reaccionar i donar lloc a la formació del Derivat II.

## [ DISCUSSIÓ FINAL ]

Donat que el marcat és covalent, la presència del marcador impossibilita el que l'AMP pugui interaccionar en aquest sub-seti, i, a mida que passa el temps, més i més molècules d'enzim tenen aquest sub-seti ocupat (a més d'altres), el que determina que la reacció tingui lloc en més d'un 50%.

És molt possible, doncs, que alguns dels derivats aïllats estiguin marcats en lisines que formen part dels centres fixadors de fosfat, encara poc coneguts, com el P1', P3 y també el P0.

La determinació del lloc de marcat d'aquests derivats per tècniques de cromatografia líquida d'alta pressió s'està iniciant en el nostre laboratori. Les característiques cinètiques dels derivats més adequats permetran clarificar l'importància relativa de cada centre de fosfat en la fixació de l'RNA.

[ CONCLUSIONS ]

**-V-CONCLUSIONS**

## [ CONCLUSIONS ]

- 1) En la reacció RNAasa A - C16-RMP a pH 7,4 s'obté un derivat monosubstituit majoritari, anomenat Derivat II, i una sèrie de derivats monosubstituits minoritaris. Els quatre anomenats "X" són uns derivats monosubstituits per modificació d'un grup  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'una lisina que presenten una activitat d'un 50% front del substrat de baix pes molecular i entre un 3 i 6% front de l'RNA. La caracterització cinètica del Derivat X4 indica la presència del grup marcador quelcom més a prop del seti de fixació B1 R1 P1. L'hidròlisi d'aquest Derivat X4 amb subtilisina demostra que, en aquest derivat, el marcatge ha tingut lloc en un  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'una lisina de la S-proteïna.
  
- 2) La reacció RNAasa A - C16-RMP a pH 7,4 en presència d'un lligand normal, com l'AMP, posa en evidència que s'estableix una competència entre el nucleòtid halogenat i el natural, i que, per tant, el reactiu reacciona com un anàleg de substrat. Ambdós nucleòtids competeixen per B3 R3 P2, la qual cosa determina que el marcador pugui interaccionar en aquest seti i vagi reaccionant (en un 50% després de 48 hores) amb l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1.
  
- 3) La presència de C16-RMP afecta l'activitat de l'RNAasa A en solució. Front de 2',3' Cp l'enzim s'activa, mentre que front l'RNA es produeix una disminució d'activitat. L'activació esmentada s'explicaria per una actuació similar a l'activació produïda per l'adenina, el seu nucleòsid i el seu nucleòtid. La disminució d'activitat front de l'RNA seria deguda a l'interacció del marcador amb més d'un seti de fixació de purines de l'enzim, la qual cosa significaria un impediment estèric, i una repulsió de càrregues entre el fosfat del marcador i els grups fosfat de l'RNA.

## [ CONCLUSIONS ]

- 4) L'estudi de la reacció de marcatge de l'RNAasa A amb Cl<sub>6</sub>-RMP a diferents pH's indica que, augmentant el pH, no s'obté cap derivat majoritari diferent al Derivat II, ans aquest derivat i quatre derivats minoritaris que l'acompanyen (els anomenats "X"). Aquests fets confirmen l'especificitat de la reacció a pH 7,4.
  
- 5) La reacció de l'RNAasa A amb 6-Cloropurina ribosa, a pH 7,4, dona lloc a una sèrie de derivats monosubstituïts. El derivat que elueix just abans que l'enzim que roman sense modificar, anomenat F, és un derivat per reacció del nucleòsid halogenat amb l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys 1, o sia, el Derivat II sense fosfat. La comparació de les característiques cinètiques d'ambdós derivats indica que el grup fosfat es el responsable de les diferències cinètiques observades entre el Derivat II i l'enzim natural, particularment pel que fa referència a l'hidròlisi de l'RNA.
  
- 6) Els treballs duts a terme aquests darrers temps pel nostre grup, junt amb les dades exposades en aquest treball, han permès de postular l'existència d'un sub-seti secundari, fixador de fosfat, anomenat P2, que formaria part d'un sub-seti fixador de nucleòtids purínics anomenat B3 R3 P2.
  
- 7) L'elaboració de les gràfiques tridimensionals de la RNAasa A per computadora, junt amb la resta de resultats d'aquest treball i de les dades de la bibliografia, han permès la postulació de dos sub-setis fixadors de fosfat, anomenats P1' i P3, dels que formarien part la Lys-104 i la Lys-37, respectivament. La postulació d'aquests sub-setis addicionals permet, junt amb els tres sub-setis ja establerts, P0, P1 i P2, postular una teoria general sobre l'interacció RNAasaA - RNA:

## [ CONCLUSIONS ]

"L'RNAasa A presentaria un centre de fixació per l'RNA que consta de 5 regions positives. Els grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de lisines que pertanyen a aquestes zones positives s'alineen seqüencialment a una distància de 7,5 Å. La distància entre els grups fosfat correlatius de l'RNA també es d'uns 7 a 8 Å.

L'interacció electrostàtica inespecífica entre 5 grups fosfat de l'RNA i 5 regions positives de l'enzim seria l'etapa primària de reconeixement i determinaria el correcte aliniament de la molècula de substrat en el centre actiu, permetent la formació d'interaccions específiques i, finalment, l'hidròlisi de l'RNA".

[ BIBLIOGRAFIA ]

**-VI- BIBLIOGRAFIA**

[ BIBLIOGRAFIA ]

ALLEWELL, N. (1968) . Dades del laboratori del Dr. F. RICHARDS i Dr. H. WYCKOFF comunicats pel Dr. ALLEWELL en el Meeting of the British Biophysical Society de desembre de 1968. Part d'aquesta informació està resumida pel Dr. L.N. JOHNSON a FEBS Let. (1969) 2, 201.

ALLEWELL, N. (1969). Ph.D. Dissertation. Yale University.

ALLEWELL, N.; MITSUI, Y.; WYCKOFF, H. W. (1973). J.B.C. 248, 5291.

ALM, P. H. (1952). Acta Chem. Scand. 6, 826.

ALTONA, C.; VAN BOOM, J. H.; DE JAGER, J. & KOENERS, H. J. (1974). Nature 247, 558.

ANDERSON, D. G.; HAMMES, G. G.; WALZ, Jr. F. G. (1968). Biochem. 7, 1637.

ANFENSEN, C. B.; SELA, M. & TRITCH, H. (1956). Arch. Biochem. Biophys. 65, 156.

ANFENSEN, C. B.; SELA, M. & COOKE, J. P. (1962). J.B.C. 237, 1825.

ARNOTT, S. & HUKINS, S. W. L. (1972). B.B.R.C. 47, 1504.

ARÚS, C. (1977). Tesina. Univ. Aut. Barcelona.

ARÚS, C.; PAOLILLO, L.; LLORENS, R.; NAPOLITANO, R.; PARÉS, X. & CUCHILLO, C. M. (1981). B.B.A. 660, 117.

ARÚS, C. (1981). Tesi Doctoral. Univ. Aut. Barcelona.

ARÚS, C.; PAOLILLO, L.; LLORENS, R.; NAPOLITANO, R.; CUCHILLO, C. M. (1982). Biochem. 21, 4290.

ATKINS, G. L. & NIMMO, J. A. (1975). Biochem. J. 149, 775.

BAKER, B. R.; LEE, W. W.; TONG, E.; ROOS, L. O. (1961). J.A.C.S. 83, 3713.

BAKER, B. R. (1967). a "Design of active-site-directed irreversible enzyme inhibitors" J. Wiley. Cap. 8 pag. 122.



[ BIBLIOGRAFIA ]

- BARON, A.; SIERAKOWSKA, H. & SHUGAR, D. (1976). B.B.A. 438, 461.
- BARNARD, E. A. (1969). Ann. Rev. Biochem. 38, 677.
- BATT, C. W. & HOUCK, J. C. (1964). B.B.A. 89, 90.
- BEINTEMA, J. J.; SCHEFFER, A. J.; DIJK, H. V.; WELLING, G. W. & ZWIERS, H. (1973). Nat. New Biol. 241, 76.
- BEINTEMA, J. J.; GAASTRA, W.; SCHEFFER, A. J. & WELLING, G. W. (1976). Europ. J. Biochem. 63, 441.
- BERMAN, E.; WALTERS, D. E. & ALLERHAND, A. (1981). J.B.C. 256, 3853.
- BERNFELD, M. R. (1965) J.B.C. 240, 4753.
- BENZ, F. W. & ROBERTS, G. C. K. (1973). a "Phisico chemical properties of nucleic acids" J. Dolmesne Ed. Vol 3, Cap. 20, pag. 77. Academic Press.
- BENZ, F. W. & ROBERTS, G. C. K. (1975). J. Mol. Biol. 91, 345.
- BILLETER, M. A.; WEISSMAN, C. & WARNER, R. C. (1966) J. Mol. Biol. 17, 145.
- BIRKELAND, A. J. & CHRISTENSEN, T. G. (1975). J. Carbohydr. 2, 83.
- BLACKBURN, S. (1976). a "Enzyme structure and function" Ed. by M. Dekker, N.Y. Vol. 3 de Enzymology. pag. 327.
- BLACKBURN, G. M. (1977). Chem. Ind. 193.
- BLACKBURN, P.; WILSON, G. & MOORE, S. (1977). J.B.C. 252, 5904, a) .
- BLACKBURN, P. (1979). J.B.C. 254, 12487. b) .
- BLACKBURN, P. & GAVILANES, J. G. (1980). J.B.C. 255, 10959. c)
- BLACKBURN, P. & GAVILANES, J. G. (1982). J.B.C. 257, 316. d).
- BLOCH, F. (1946). Phys. Rev. 70, 460.

[ BIBLIOGRAFIA ]

BORKAKOTI, N.; MOSS, D. S. & PALMER, R. A. (1982). *Acta Cryst. B.* 38, 2210.

BOVEY, F. A. (1969). a "Nuclear magnetic resonance spectroscopy". Academic Press. N.Y.

BRADBURY, J. H.; HOWELL, J. R.; JOHNSON, R. N. & WARREN, B. (1978). *Europ. J. Biochem.* 84, 503.

BRAYER, G. D. & Mc PHERSON, A. (1982). *J.B.C.* 257, 3359.

BROCKLEHURST, K; CROOK, M. & WHARTON, W. (1963). *J.B.C.* 238, 2054.

BROW, L. R. & BRADBURY, J. H. (1975). *Europ. J. Biochem.* 54, 219.

BROW, L. R. & BRADBURY, J. H. (1976). *Europ. J. Biochem.* 68, 227.

BROWN, D. M. & TODD, A. R. (1953). *J. Chem. Soc.* 2040.

BURR, M. & KOSHLAND, D. E. (1964). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 52, 1017.

CAMPBELL, I. D.; DOBSON, C. M.; WILLIAMS, R. J. P. & XAVIER, A. V. (1973). *J. Magn. Reson.* 11, 172.

CARLISLE, C. H.; PALMER, R. A.; MAZUMDAR, S. K.; GDRINSKY, B. A. & YATES, D. G. R. (1974). *J. Mol. Biol.* 85, 1.

CARLSON, W. E. (1976). Ph. D. Thesis. Yale University.

CHINSKY, L. & TURPIN, P. Y. (1982). *Biopolymers* 21, 277.

COHEN, L. A. (1968). *Ann. Rev. Biochem.* 37, 695.

COHEN, L. A. (1970). "Chemical modification as a probe of structure and function" a *The Enzymes* 3th edition Vol. 1, 147.

COLOWICK, S. P. & WOMACK, F. C. (1969). *J.B.C.* 244, 774.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- COOK, J. P.; ANFINSEN, C. B. & SEIA, M. (1963). J.B.C. 238, 2034.
- CORNHISH-BOWDEN, A. & EISENTHAL, R. (1978). B.B.A. 523, 268.
- CRESTFIELD, A. M.; STEIN, W. H. & MOORE, S. (1962). ABB Suppl. 1, 217.
- CRESTFIELD, A. M., STEIN, W. H. & MOORE, S. (1963). J.B.C. 238, 2413.
- CROOK, E. M.; MATHIAS, A. P. & RABIN, B. R. (1960). Biochem. J. 74, 234.
- CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M. & ANFINSEN, C. B. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 638.
- CUCHILLO, C. M. (1974). Ph. D. Thesis. London University.
- DAVIES, D. B. & DANYLUK, S. S. (1974). Biochem. 13, 4417.
- DEAKYNE, C. A. & ALLEN, L. C. (1979). J. Am. Soc. 101, 3951.
- DEARING, A. (1982). Biochem. Soc. Transact. 10, 307.
- DEAVIN, A.; MATHIAS, A. P. & RABIN, B. R. (1966). Nature 211, 252. a).
- DEAVIN, A.; MATHIAS, A. P. & RABIN, B. R. (1966). Biochem. J. 101, 14c. b).
- DEAVIN, A.; FISCHER, R.; KEMP, C. M.; MATHIAS, A. P. & RABIN, B.R. (1968). Europ. J. Biochem. 7, 21.
- DUVE, S. K.; MARCKER, K. A.; CLARK, B. F. C. & CORY, S. (1969) Europ. J. Biochem. 8, 244. a).
- DUVE, S. K. & MARCKER, K. A. (1969). Europ. J. Biochem. 8, 256
- DUBOS, R. J. & THOMPSON, R. H. S. (1938). J.B.C. 124, 501.
- EADIE, G. S. (1942). J.B.C. 146, 85.
- EAKER, D. L.; KING, T. P. & GRAIG, L. C. (1965). Biochem. 4, 174. a).

C BIBLIOGRAFIA J

- EAKER, D. L.; KING, T. P. & GRAIG, L. C. (1965). *Biochem.* 4, 1479. b).
- EAKER, D. L.; KING, T. P. & GRAIG, L. C. (1965). *Biochem.* 4, 1486. c).
- EINSPAHR, H.; COOK, W. J. & BUGG, C. E. (1981). *Biochem.* 20, 5788
- EPTON, R. & THOMAS, T. H. (1971). a "An introduction to water-insoluble enzymes" Koch-light Lab. Ltd.; Colnbrook, Bucks, England.
- ERNST, R. R. & ANDERSON, W. A. (1966). *Rev. Scient. Instrum.* 37, 93.
- EYLAR, E. H. (1965). *J. Theor. Biol.* 10, 89.
- FANKUCHEN, I. (1941). *J. Gen. Physiol.* 24, 315.
- FELGUER, P. L. & WILSON, J. E. (1977). *Anal. Biochem.* 80, 601.
- FELSENFELD, G.; SANDEEN, G. & von HIPPEL, P. H. (1963). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50, 644.
- FILIPPI, B.; CHESSA, G. & BORIN, G. (1981). *J. Mol. Biol.* 147, 597.
- FINN, F. M.; DADD, J. & BOTHER-BY, A. A. (1972). *Biochem.* 11, 455.
- FOLLMAN, H.; WIEKER, H. J. & WITZEL, H. (1967). *Europ. J. Biochem.* 1, 243.
- FOLLAMN, H. & GREMELS, G. (1974). *Europ. J. Biol.* 47, 187.
- FRENCH, T. C. & HAMMES, G. G. (1965). *J.A.C.S.* 87, 4669.
- GALLEGO, E.; HERRANZ, J.; NIETO, J. L.; RICO, M. & SANTORO, J. (1982). (enviat a *Int. J. Peptide Protein Res.*, pendent de publicació).

[ BIBLIOGRAFIA ]

- GELPÍ, E.; PARÉS, X. & CUCHILLO, C. M. (1976). a "Advances in Mass spectrometry in Biochemistry and Medicine" Frijerio A. & Castagnoli, N.; Eds. Vol. 1, pag. 215. Spectrum Publications, N.Y.
- GIRDITI, A. W. & BRESLOW, E. (1970) J.B.C. 245, 3066.
- GLAZER, A. N. (1975). "The Chemical modification of Proteins by Group-specific and site-specific reagents" a The Proteins 2 edit., pag. 1.
- GLITZ, D. G. & DECKER, C. A. (1963). Biochem. 2, 1185.
- GOLDBERGER, R. & ANFINSEN, C. B. (1962). Biochem. 1, 401.
- GOLDFARB, A. R. (1970). B.B.A. 200, 1.
- GOLDFARB, A. R. (1974). Bioorg. Chem. 3, 249.
- GOLDFARB, A. R. & MARTIN, S. (1976). Bioorg. Chem. 5, 137. a).
- GOLDFARB, A. R. & MARTIN, S. (1976). Bioorg. Chem. 5, 147. b).
- GRAEDEL, T. E. & Mc GILL, R. (1982). Science 215, 4537.
- GRAY, W. R. & HARTLEY, B. S. (1963). Biochem. J. 89, 59p.
- GUASCH, A. (1982). Tesina. Univ. Aut. Barcelona.
- GUTTE, B. & MERRIFIELD, R. B. (1969). J.A.C.S. 91, 501.
- GUTTE, B. (1978). Europ. J. Biochem. 92, 403.
- GUTTE, B. (1979). Nature 281, 650.
- HAAR, W; MAURER, W & RUTERJANS, H. (1974). Europ. J. Biochem. 44, 201.
- HAFFNER, P.H. & WANG, J. H. (1973). Biochem. 12, 1608.
- HAMMES, G.G. & WALZ, F.G. (1969). J.A.C.S. 91, 7179
- HAMPTON, A & MAGUIRE, M.H. (1961). J.A.C.S. 83, 150.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- HARTREE, E.F. (1972). *Analyt. Biochem.* 48, 422.
- HAUGEN, T.H. & HEATH, E.C. (1979). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2689.
- HAVRON, A. & SPERLING, J. (1977). *Biochem.* 16, 5631.
- HENRIKSON, R.L.; STEIN, W.H.; CRESTFIELD, A.M. & MOORE, S. (1965). *J.B.C.* 240, 2921.
- HERMAN, S.J. & SCHERAGA, H.A. (1961). *J.A.C.S.* 83, 3283.
- HERRIES, D.G. (1960). *B.B.R.C.* 3, 666.
- HERRIES, D.G.; MATHIAS, A.P. & RABIN, B.R. (1962). *Biochem. J.*, 85, 127.
- HERSKOVITS, T.T. (1969). *Methods in Enzymology*, vol. 11., pag. 748.
- HIRS, C.H.W.; STEIN, W.H. & MOORE, S. (1951). *J. Ann. Chem. Soc.* 73, 1893.
- HIRS, C.H.W.; MOORE, S. & STEIN, W.H. (1953). *J.B.C.* 200, 193.
- HIRS, C.H.W.; MOORE, S. & STEIN, W.H. (1956). *J.B.C.* 219, 611.
- HIRS, C.H.W.; MOORE, S. & STEIN, W.H. (1960). *J.B.C.* 235, 633.
- HIRS, C.H.W. (1962). *Brookhaven Symposia in Biology* num. 15, 154.
- HIRS, C.H.W.; HALMANN, M. & KYCIA, J.H. (1965). *Arch. Biochem. Biophys.* 111, 209.
- HIRS, C.H.W. (1967). a "Methods in Enzymology" vol. 11, 59. Calswik, S.P. & Koplan, N.O., eds. Academic Press, N.Y.
- HIRSCHMANN, R; NUTT, R.F.; VEBER, D.F.; VITALI, R.A.; VARGA, S.L.; JACOB, T.A.; HOLLY, F.W. & DENKEWALTER, R.G. (1969). *J.A.C.S.* 91, 508.
- HOFSTEE, B.J.H. (1952). *Science* 116, 329.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- HUMMEL, J.P. & KALNITSKY, G. (1958). J.B.C. 234, 1517.
- HUMMEL, J.P. & DREYER, W.J. (1962). B.B.A. 63, 530.
- HUMMEL, J.P. & KALNITSKY, G. (1964). Ann. Rev. Biochem. 33, 15.
- HUMMEL, J.P. & ANDERSON, B.S. (1964). Arch. Biochem. Biophys. 112, 443.
- IHNAT, M. (1972). Biochem. 11, 3483.
- IJIMA, H; PATRZYC, H. & BELLO, J. (1977). B.B.A. 491, 305.
- IKEHARA, M.; VESUGI, S. & YOSHIDA, K. (1972). Biochem. 11, 830.
- IRIE, M. (1965). J. Biochem. 57, 355.
- IWAHASHI, K.; NAKAMURA, K.; MITSUI, Y.; OHGI, K. & IRIE, M. (1981). J. Biochem. 90, 1685.
- JENSEN, D.E. & von HIPPEL, P.H. (1976). J.B.C. 251, 7198.
- JONES, W. (1920). An. J. Physiol. 52, 203.
- KALMAN, S.M.; LINDERSTROM-LANG, K.; OTTESEN, M. & RICHARDS, F. M. (1955). B.B.A. 16, 297.
- KARTHA, G.; BELLO, J. & HARKERD, D. (1967). Nature, 213, 862.
- KENDREW, J.C.; WATSON, H.C.; STRANDBERG, B.E.; DICKERSON, R.E.; PHILLIPS, D.C. & SHORE, V.C. (1961). Nature, 190, 663.
- KLEE, N.A. & RICHARDS, F.M. (1957). J.B.C. 229, 489.
- KOSHLAND D.E. (1960). Advan. Enzymol. 22, 45.
- KOSHLAND, D.E.; KARKHANIS Y.D. & LATMAN, H.G. (1964). J.A.C.S. 86, 1448.
- KOTAKI, A.; HARADA, M. & YAGI K. (1968). J. Biochem. (Tokio) 64, 537.

C BIBLIOGRAFIA ]

- KUNITZ, M. (1940). J. Gen. Physiol. 24, 15.
- KUNITZ, M. (1946). J.B.C. 164, 563.
- LACOMBE, C.; CATTAN, D. & LAIGLE, A. (1974). Biochem. 56, 341, a).
- LACOMBE, C.; CATTAN, D. & LAIGLE, A. (1974). Biochem. 56, 649, b).
- LAEMMLI, U.K. (1970). Nature, 227, 680.
- LEE, C.H.; EVANS, F.E. & SARMA, R.H. (1975). FEBS Lett., 51, 73.
- LEGGET BAILEY, J. (1967). a "Techniques in protein chemistry" Ed. Elsevier North, Holland, cap. 2, pag. 41.
- LEMIEUX, R.V. & STEVENS, J.D. (1966). Canadian Journal of Chemistry, 44, 249.
- LESK, A. M. & HARDMAN, K. D. (1982). Science 216, 539.
- LEVIT, S. & BERGER, A. (1976). J.B.C. 251, 1333.
- LIBONATI, M.; SORRENTINO, S.; GALLI, R.; LA MONTAGNA, R. & DI DONATO, A. (1973). B.B.A. 402, 83.
- LINCWEAVER, H. & BURK, D. (1934). J.A.C.S. 56, 661.
- LOEB, G.I. & SAROFF, H.A. (1964). Biochem. 4, 1619.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; LEWIS, R.A. & RANDALL, R.J. (1965). J.B.C. 193, 265.
- MARCHIORI, F.; BORIN, G. & MORODER, L. (1974). Int. J. Peptides Protein. Res. 6, 419.
- MARFEY, P.S.; UZIEL, M. & LITTLE, J. (1965). J.B.C. 240, 3270.
- MARKHAM, R. & SMITH, J.D. (1952). Biochem. J. 52, 552.
- MARKLEY, J.L. (1975). Biochem. 14, 3546 i 3554 a) i b).



C BIBLIOGRAFIA 3

- MARSHALL, R.D. (1972). Annual Rev. Biochem. pag. 673.
- MARTIN, A.J. & PORTER, R.R. (1951). Biochem. J. 45, 215.
- MARZOTTO, A. (1979). Int. J. Biochem. 1, 506.
- MATTHEW, J.B. & RICHARDS, F.M. (1982). Biochem. 21, 4989.
- Mc DONALD, M.R. (1955). a "Methods in Enzymology" Colowick, S.P. Kaplan N.D. ed. vol. 2, 427. Academic Press, N.Y.
- MEADOWS, D.H.; JARDETZKY, D.; EPANA, R.; RUTERJANS, H. & SCHE-  
RAGA, H.A. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 60, 766. a).
- MEADOWS, D.H. & JARDETZKY, D. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci.  
U.S.A., 61, 406. b).
- MEADOWS, D.H.; ROBERTS, G.L.K. & JARDETZKY, D. (1969). J. Mol.  
Biol. 45, 491.
- MEANS, G.E. & FEENEY, R.E. (1971). a "Chemical Modification of  
Proteins" ed. Holden-Day Inc.
- MERRIFIELD, R.B. & HODGES, R.S. (1974). Proc. Int. Symp. on  
Macromolecules. Rio de Janeiro, Mano, E.B. ed. pag. 417. Else-  
vier.
- MICHAELIS, L. & MENTEN, M.L. (1913). Biochem. Z. 49, 333.
- MITSUMI, Y. & WYCKOFF, H.W. (1975). J. Mol. Biol. 94, 17.
- MITSUMI, Y.; URATA, Y.; TORII, K. & IRIE, M. (1978). B.B.A.  
535, 299.
- MODA, P.T. (1962). J.B.C. 237, 3210.
- MURDOCK, A.L.; GRIST, K.L. & HIRS, C.H.W. (1966). A.B.B. 114,  
375.
- MYER, Y.P. & SCHELLMAN, J.A. (1962). B.B.A. 55, 361.
- NELSON, C.A. & HUMMEL, J.P. (1961). J.B.C. 236, 3173.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- NELSON, F.A. & WEAVER, H.E. (1964). *Science*, 146, 223.
- NEUMANN, N.P.; MOORE, S. & STEIN, W.H. (1962). *Biochem. J.* 68.
- NEUMANN, N.P. (1969). a "Methods in Enzymology" vol. 13. pag. 393 (Colowik S.P.; Kaplan N.O. eds.) Academic Press, N.Y.
- NOGUÉS, M.V. (1978). Tesina. Univ. Aut. Barcelona.
- NOGUÉS, M.V. (1982). Tesi Doctoral. Univ. Aut. Barcelona.
- OPELLA, S.J. (1977). *Science*, 198, 158.
- OLSON, W. K. & FLORY, P. J. (1972). *Biopolymers* 11, 1 i 25.
- PARÉS, X. (1977). Tesi Doctoral. Univ. Aut. Barcelona.
- PARÉS, X.; ARÚS, C.; LLORENS, R. & CUCHILLO, C.M. (1978). *Biochem. J.* 175, 21.
- PARÉS, X.; LLORENS, R.; ARÚS, C. & CUCHILLO, C.M. (1980). *Europ. J. Biochem.* 105, 571. a).
- PARÉS, X.; PUIGDOMENECH, P. & CUCHILLO, C.M. (1980). *Int. J. Peptide Protein Res.* 16, 241. b)
- PATEL, D.J.; CANUEL, L.L. & BOVEY, F.A. (1975). *Biopolymers* 14, 987, a).
- PATEL, D.J.; CANUEL, L.L.; WOODWARD, C. & BOVEY, F.A. (1975). *Biopolymers* 14, 959. b).
- PATTHY, L. & SMITH, E.L. (1975). *J.B.C.* 250, 565.
- PAVLOVSKY, A.G.; BORISOVA, S.N.; BORISOV, W.W.; ANTONOV, I.V. & KAPERISKY, M.Y. (1978). *FEBS Lett.* 92, 256.
- PINCUS, M.; THI, L.L. & CARTY, R.P. (1975). *Biochem. J.* 14, 1653.
- PLUMMER, T.H. Jr.; HIRS, C.H.W. & TENCH, A.L. (1963). *J.B.C.* 238, 1396.
- PLUMMER, T.H. Jr. & HIRS, C.H.W. (1964). *J.B.C.* 239, 2530.

C BIBLIOGRAFIA J

- PLUMMER, T. H. Jr. & KOSINSKI, P. (1968). J.B.C. 243, 5961.
- PREISS, J. W. (1968). Biophys. J. 8, 199.
- PURCELL, E. M.; TORREY, H. C. & POUND, R. V. (1946). Phys. Rev. 69, 37.
- RABIN, B. R.; CUCHILLO, C. M.; DEAVIN, A.; KEMP, C. M. & MATHIAS, A. P. (1970). a "Metabolic Regulation and Enzyme action" (ed. Sols, A. & Grisolia, S.) pag. 203. Academic Press. London.
- RAJU, E. V. & DAVIDSON, N. (1969). Biopolymers 8, 743.
- RANDERATH, K. (1961). B.B.R.C. 6, 452.
- RANDERATH, K. & STRUCK, H. J. (1961). J. Chromato. 6, 365.
- RASPER, J. & KAUZMANN, W. (1962). J.A.C.S. 84, 1771.
- REDFIELD, R. R. & ANFINSEN, C. B. (1956). J.B.C. 221, 385.
- REDFIELD, A. G. (1978). a "Methods in Enzymology" Vol. 49, pag. 253.
- REYNOLDS, J. H. (1968). Biochem 7, 3131.
- RICARD, J.; MEUNIER, J. C. & BUC, I. (1974). Europ. J. Biochem. 49, 195.
- RICHARDS, F. M. & VITHAYATHIL, P. J. (1959). J.B.C. 234, 1459.
- RICHARDS, F. M. & WYCKOFF, (1971). a "The enzymes" ed. Boyer, P. D. ,Vol. 4, 3 ed., pag. 647. Academic Press. N.Y.
- RICHARDS, F. M. & WYCKOFF, H. V. (1973). Atlas of Molecular structures in Biology. Vol. 1. Ribonuclease-S. OUP.
- RIDLINGTON, I. & BUTLER, L. G. (1969). J.B.C. 244, 777.
- RIEHM, J. P. & SCHERAGA, H. A. (1966). Biochem. 15, 154.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- RIGUILLME, P.; BROWN, W. E. & MARCUS, F. (1975). *Int. J. Peptide Protein Res.* 7, 379.
- ROBSON, B. (1980). *Nature* 283, 622.
- ROCCHI, R.; MARCHIORI, F.; MORODER, L.; BORIN, G. & SCOFFONE, E. (1969). *J.A.C.S.* 91, 3927.
- ROSENBERG, J. M.; SEEMAN, N. C.; DAY, R. O. & RICH, A. (1976). *J. Mol. Biol.* 104, 145.
- RÜBSAMEN, H. KHANDLER, R. & WITZEL, H. (1974). *Hoppe Zeylers Z. Physiol. Chem.* 355, 687.
- RUDRUM, M. & SHAW, D. F. (1965). *J. Chem. Soc.* pag. 52.
- RUSHIZKY, G. W.; KNIGHT, C. A. & SOBER, H. A. (1961). *J.B.C.* 236, 2732.
- RUTERJANS, H. & WITZEL, H. (1969). *Europ. J. Biochem.* 9, 118
- SALKOWSKI, E. (1889). *Z. Physiol. Chem.* 13, 506.
- SAROFF, H. & CARROLL, T. H. (1962). *J.B.C.* 237, 3384.
- SAUNDERS, M. WISHNIA, A. & KIRKWOOD, J. G. (1957). *J.A.C.S.* 79, 3289.
- SAWADA, F. & IRIE, M. (1969). *J. Biochem. (Tokio)* 66, 415.
- SCATCHARD, G. (1949). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660.
- SCHECHTER, A. N.; SACHS, D. H.; HELLER, S. R.; SHRAGER, R. I. & COHEN, J. S. (1972). *J. Mol. Biol.* 71, 39.
- SCHMUKLER, M.; JEWETT, P. B. & LEVY, C. C. (1975). *J.B.C.* 250, 2206.
- SEKINE, H.; NAKANO, E. & SAKAGUCHI, K. (1969). *B.B.A.* 174, 202.
- SELA, M. & ANFINSEN, C. B. (1957). *B.B.A.* 24, 229.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- SHAW, E. (1970). a "The enzymes" 3ed. Vol. 1, 91.
- SHOELLMANN, G. & SHAW, E. (1963). Biochem. 2, 252.
- SIFRAKOWSKA, H. & SHUGAR, D. (1977). a "Nucleic Acid Research and Molecular Biology" Vol. 20.
- SILMAN, H. I. & KATCHALSKY, E. (1966). Ann. Rev. Biochem. 35, 873.
- SILVERMAN, D. N.; KOTELCHUCK, D.; TAYLOR, G. T. & SCHERAGA, H. A. (1972). A.B.B. 150, 757.
- SINGER, S. J. (1967). a "Advances in Protein Chemistry" 22, 1.
- SMYTH, D. G.; STEIN, W. H. & MOORE, S. (1963). J.B.C. 238, 227.
- SOLA, J. (1981). Tesina. Univ. Aut. Barcelona.
- SON, T. D. & CHACHATY, C. (1973). B.B.A. 335, 1.
- SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. & MOORE, S. (1960). J.B.C. 235, 648.
- SPERLING, J. & HAVRON, A. (1976). Biochem. 15, 1489.
- STEHELIN, D. & DURANTON, H. (1969). J. Chromatog. 43, 93.
- STEINHARDT, J. & REYNOLDS, J. A. (1969). a "Multiple Equilibria in Proteins" .Academic Press. N.Y.
- SUCK, D.; MANDR, P. C.; GERMAIN, G.; SCHWALBE, C. H.; WEIMAN, G. & SAENGER, W. (1973). Nat. New Biol. 246, 161.
- SUSSMAN, J. L. & SEEMAN, N. C. (1972) J. Mol. Biol. 66, 403.
- SZER, W. & SHUGAR, D. (1963). a "Biochemical Preparations" Ed. Brown U.K. Vol. 10. pag. 139. Wiley, N.Y.
- TABORSKY, G. (1959). J.B.C. 234, 2652.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- TANI ORD, C. & HAUENSTEIN, J. D. (1956). J.A.C.S. 78, 5287.
- TANFORD, C. & KIRKWOOD, J. G. (1957). J.A.C.S. 79, 5333.
- TAKAHASHI, K. (1968). J.B.C. 243, 6171.
- TAKEMURA, M; TAKAZI, M.; MIYAZAKI, M. & EGAMI, F. (1959). J. Biochem. (Tokio). 46, 1149.
- THOMAS, J. O. (1974). a "Companion to Biochemistry, Vol. 1, Cap. 2, pag. 87. Ed. Longman.
- TIGERSTROM, R. G. von & MARCHAK, J. M. (1976). B.B.A. 418, 184.
- TOAL, J. N.; RUSHIZKY, G. W.; PRATT, A. V. & SOBER, H. A. (1968). Analyt. Biochem. 23, 60.
- TS'O, P. O. P. (1969). Ann. N.Y. Acad. of Sci. 153, 785.
- TS'O, P. O. P. (1974). a "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry" Vol. 1. Academic Press. N.Y.
- TRIM, A. R. & PARKER, J. E. (1970). Biochem. J. 116, 589.
- UDENFRIEND, S.; STEIN, S.; BOHLEN, P.; DAIRMAN, W.; LEIMGRUBER, W. & WEIGELE, M. (1972). Science, 178, 871.
- UKITA, T.; WAKU, K.; IRIE, M. & HOSHINO, O. (1961). J. Biochem. (Tokio). 50, 405.
- USHER, D. A. & RICHARDSON, D. I. (1970). Nature 228, 663.
- UY, R. & WOLD, F. (1977). Science 198, 890.
- VALLE, G.; ZANOTTI, G.; FILIPPI, B. & DELPRA, A. (1977). Biopolymers 16, 1371.
- VALLEE, E. & RIORDAN, S. H. (1969). Ann. Rev. Biochem. 38, 773.
- VOET, D.; GRATZER, W. B.; COX, R. A. & DOTY, P. (1963). Biopolymers 1, 193.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- VON HIPPEL, P. H. & Mc GHEE, J. D. (1972). *Ann. Rev. Biochem.* 231.
- WALKER, A. J.; RALSTON, G. B. & DARVEY, I. G. (1975). *Biochem. J.* 147, 425.
- WALKER, A. K.; RALSTON, G. B. & DARVEY, I. G. (1976). *Biochem. J.* 153, 129.
- WALKER, E. J.; RALSTON, G. B. & DARVEY, I. G. (1978). *Biochem. J.* 173, 1, a).
- WALKER, E. J.; RALSTON, G. B. & DARVEY, I. G. (1978). *Biochem. J.* 173, 5, b).
- WALTER, B. & WOLD, F. (1976). *Biochem.* 15, 304.
- WALZ, F. G. Jr. (1971). *Biochem.* 10, 2156.
- WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. (1953). *Nature.* 171, 737.
- WEBER, K. & OSBORN, M. (1975). a "The proteins", vol. 1, cap. 3., pag. 179. Ed. Neurath, H. & Hill, R. L. 3a. ed. Academic Press, N. Y.
- WECHTER, W. J.; MIKOLSKI, A. J. & LASKOWSKI, M. Sr. (1968). *B. B. R. C.* 30, 318.
- WEIGELE, M.; DE BERNARDO, S. L.; TENGI, J. P. & LEIMGRUBER, W. (1972). *J. A. C. S.* 94, 4052.
- WELLING, G.; VAN DER BERG, A.; GAASTRA, W. & BEINTEMA, J. J. (1973). *Abstr. IXth. Int. Congress Biochem.*
- WELLING, G.; GROEN, G.; GABEL, D.; GAASTRA, W. & BEINTEMA, J. J. (1973). *FEBS. Lett.* 40, 134.
- WELLING, G.; LEIGENAAR-VAN DEN BERG, G.; VAN DIGK, B.; VAN DER BERG & BEINTEMA, J. J. (1975). *Biosystems* 6, 239.
- WELLNER, D.; SILMAN, H. I. & SELA, M. (1963). *J. B. C.* 238, 1324.

[ BIBLIOGRAFIA ]

- WHITE, M.D.; KEREN-ZUR, M. & LAPIDOT, Y. (1977). *Nucleic Acid Res.* 4, 843. a).
- WHITE, M.D.; BAUER, S. & LAPIDOT, Y. (1977). *Nucleic Acid Res.* 4, 3029. b).
- WIEKER, H.J. & WITZEL, H. (1967). *Europ. J. Biochem.* 1, 251.
- WIGLER, P.W. (1968). *Biochem. Prep.* 12, 107.
- WILCHEK, M. (1974). a "Methods in Enzymology", 34, 182.
- WITZEL, H. & BARNARD, E.A. (1962). *B.B.R.C.* 7, 289, a).
- WITZEL, H. & BARNARD, E.A. (1962). *B.B.R.C.* 7, 295, b).
- WLODAWER, A.; BOTT, R. & SJOLIN, L. (1982). *J.B.C.* 247, 1325.
- WODAK, S.Y.; LIU, M.Y. & WYCKOFF, H.W. (1977). *J. Mol. Biol.* 116, 855.
- WOFSEY, L.; METZGER, H. & SINGER, S.J. (1962) *Biochem.* 1, 1031.
- WUTHRICH, K. (1974). *Experientia* 30, 577.
- WUTHRICH, K. (1976). a "NMR in Biological Research: Peptides and Proteins", pag. 44, North Holland Pub. Comp. Amsterdam.
- WYCKOFF, H.W.; HARDMAN, K.D.; ALLEWELL, N.M.; INAGAMI, T.; JOHNSON, L.N. & RICHARDS, F.M. (1967). *J.B.C.* 242, 3984.
- WYCKOFF, H.W.; TSERNOGLOU, D.; HANSON, A.W.; KNOX, J.R.; LEE, B. & RICHARDS, F.M. (1970). *J.B.C.* 245, 305.
- YAMASAKI, N.; HAYASHI, K. & FUNATSU, M. (1968). *Agr. Biol. Chem. (Tokio)* 32, 64.
- YU, N.T. & JO, B.H. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 469, a.
- YU, N.T. & JO, B.H. (1973). *J. Am. Chem. Soc.* 95, 5033, b.
- ZABORSKY, O.R. & MILLIMAN, G.E. (1972). *B.B.A.* 271, 274.



[ APÉNDIX ]

-VII- APÉNDIX

## C APÈNDIX 3

Tal com s'ha esmentat als apartats II-19 i III-9, per confeccionar les gràfiques tridimensionals s'han emprat les coordenades ortogonals de la RNAasa A, gentilment cedides per el Dr. CARLISLE. Com a oligonucleòtid model s'ha emprat el APAPCPAPAP. La configuració del sistema emprat ha estat:

- Un sistema gràfic interactiu CALMA, amb un sistema operatiu C01.
- Com aparell de dibuixat de gràfiques un plotter GERBER - 6542.

A continuació es detallen els llistats de les representacions emprades per a cada tipus d'àtom:

```
\PRINT.DAT\
```

```
* INTRODUCE OVERLAY A IMPRIMIR Y (-MR) : 1  
* IMPRESION DE DATATYPES *
```

```
OVERLAY SELEC. : 1
```

```
DADATYPE £ 1
```

---

```
TOOL 1  
£1 SOLID LENGTH 0  
PT FIGURE NAME: CUB03  
ARE PT FIGURES UNSCALED? NO  
CONNECT PT DATA? NO  
FONT NAME:  
*
```

```
DATATYPE £ 2
```

---

```
TOOL 4  
£1 SOLID LENGTH 0  
PT FIGURE NAME: CUB03  
ARE PT FIGURES UNSCALED? NO  
CONNECT PT DATA? NO  
FONT NAME:  
*
```

```
DATATYPE £ 3
```

---

C APENDIX 3

TOOL 1  
£1 SOLID LENGTH 0  
PT FIGURE NAME: TETRA3  
ARE PT FIGURES UNSCALED? NO  
CONNECT PT DATA? NO  
FONT NAME:  
\*VOID DATATYPE.FAIL  
\*  
DATATYPE £ 5

---

TOOL 4  
£1 SOLID LENGTH 0  
PT FIGURE NAME: TETRA3  
ARE PT FIGURES UNSCALED? NO  
CONNECT PT DATA? NO  
FONT NAME:  
\*  
DATATYPE £ 6

---

TOOL 3  
£1 SOLID LENGTH 0  
PT FIGURE NAME: TETRA3  
ARE PT FIGURES UNSCALED? NO  
CONNECT PT DATA? NO  
FONT NAME:  
\*  
DATATYPE £ 7

---

TOOL 2  
£1 SOLID LENGTH 0  
PT FIGURE NAME: CUBO3  
ARE PT FIGURES UNSCALED? NO  
CONNECT PT DATA? NO  
FONT NAME:  
\*  
DATATYPE £ 8

---

TOOL 1  
£1 SOLID LENGTH 0  
PT FIGURE NAME: TETRA3  
ARE PT FIGURES UNSCALED? NO  
CONNECT PT DATA? NO  
FONT NAME:  
\*  
DATATYPE £ 9

---



C APÈNDIX 3

A continuació es detallen les MACRO dels operadors emprats:

\MACRO-PRMASK

IMPRIME LAS MACROS DEL OPERADOR DESEADO

- \* NUM. OPERADOR : 7
- \* ENTRA LA MASK ADECUADA Y (-MR) : =RIBO=

LISTADO MACROS OPERADOR £ 7

\*\*\*\*\*

= INDICE =

-----

£	NOMBRE
1	RIBO-PICK/M
2	RIBO-CAD. D/M
3	RIBO-CAD. 1/M
4	RIBO-CAD/M
5	RIBO-CAD. U/M
6	RIBO-V. DT/M
7	RIBO-ERR/M
8	RIBO-EST/M
9	RIBO-CPRAL/M
10	RIBO-CP. ESQ/M
11	RIBO-C. ESQ/M
12	RIBO-DT/M
13	RIBO-RAD. N/M
14	RIBO-RAD. D/M
15	RIBO-RAD. X/M
16	RIBO-RAD. C/M
17	RIBO-RAD. S/M
18	RIBO-RA/M
19	RIBORAD/M
20	RIBO-RA. C/M

=====

[ APENDIX ]

MACRO £ : 1. -- NOMBRE : RIBO-PICK/M

;D  
DQ7;M  
TYM;M;M  
\* CARBOND ? : ;D  
IRGT;M;P;I;O;D  
IRGE;MA;M

;K  
;P;D;S  
;N

DOS;M  
C;Z1;M  
;K  
DOTL;M  
;J  
TYM;M;M  
\* NO EXISTE \* ;M;D  
;N

;F

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 2. -- NOMBRE : RIBO-CAD. O/M

;K  
;D  
GRR;M  
7FLV;M1;M  
;N

GRN;M

;K  
IRGN;M1;M  
1-3DFS;MRIBO-TEMP;M  
;Z7;M  
7FLA;M3;M

[ APÉNDIX 3 ]

;F  
;N

7DFS;MRIBO-TEMP;M  
O;M  
;S

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 3. -- NOMBRE : RIBO-CAD. 1/M

;K  
;O  
5FLV;M4;M  
1-4DFL;MRIBO-TEMP;M  
O;M  
CP;M  
;R;Z2,;Z3,;Z4;M;D;D  
GRE;M  
;N

FLKSE;M;Z1;M  
;K  
;S  
;N  
2-4DFL;M  
RIBO-TEMP;M;Z5;M  
CPE;M  
;R;Z2,;Z3,;Z4;M;D;D  
5FLA;M3;M  
;F

\*

\*\*\*\*\*

C APÉNDIX 3

MACRO E : 4. -- NOMBRE : RIBO-CAD/M

```
;K
;D
DOD;M
DOA;M
;N
DCID;M
;K
;BRIBO-CAD. 0;M
;BRIBO-CAD. 1;M
DOU;M
DOA;M
DOA;M
DOA;M
;K
;F
;J
TYM;M;N
* FIN CADENAS *;M;D
;P;D;S
;N
;N
1DOT;M
TYM;M;M
* ERROR EN : Z1*;M;D
;P;D;S
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO E : 5. -- NOMBRE : RIBO-CAD. U/M

```
;D
GRE;M
9RGN;M1;M
DOD;M
GRE;M
IEI;M2;M7;M
Y
IEE;M2;M3;M
;Z9;M
```



C APENDIX 3

IEE; M2; M4; M  
; ZA; M  
IEE; M2; M5; M  
; ZB; M  
DOU; M  
DOA; M  
DOA; M  
; S

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 6 -- NOMBRE : RIBO-V.DT/M

; O  
DOD; M

; K  
GRE; M  
GDG; M32; M  
DOT; P; M; O  
DOU; M  
; N

; S

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 7. -- NOMBRE : RIBO-ERR/M

; K  
; O  
7FLV; M1; M  
8FLI; M  
; N

1RGN; M  
; Z7; M  
; K

C APENDIX 3

```
4RON;M;Z8;M
9GEL;M
;R; Z1; Z2; Z3;M
;R
; Z4; Z5; Z6;M
FLV;M Z9;M
FLS9;M200;M

;K
TYM;M;M
* TRAM : ; Z7; Z8;M,D
;N
```

```
7FLVI;M; Z7;M
8FLI;M
;F
;N
```

```
;P;D;S
```

```
*
```

```
*****
```

```
MACRO £ : 8. -- NOMBRE : RIBQ-EST/M
```

```
;K
;D
1QVC;M
1QVS;M
DOC;MESQUELET;M
1FLV;M1;M
;N
1RGS;M
DOC;M
C; Z1;M
DOC;M
N; Z1;M
DOC;M
BC; Z1;M
1FLI;M
FLKSE;M125;M
;K
```

C APÈNDIX 3

```

TYM;M;M
* FI ESTRUCTURA * ;M;D
;P;D;S
;N
;F

*

*****

MACRO £ : 9. -- NOMBRE : RIBO-CPRAL/M

;K
;D
TYM;M;M
* ENTRADA DE DADES DE LA CADENA PRINCIPAL ;M
  A PARTIR DE QUIN CARBO VOLLS ENTRAR DADES;M;M
  * NUMERO I (-MR) : ;D
1RGT;M;P;I;O;D
1QVS;M
DOS;M
C; Z1;M
;K
DOJ;M
;J
TYM;M;M
* NO EXISTEIX * ;M;D
;P;D;S
;N
;N
DOA;M
;K
1DGT;M
TYM;M;M
* ATOM ;Z1 ;M
-----;M
COORD. X Y (-MR) : ;D
2RGT;M;P;I;O;D
TYM;M;M
COORD. Y I (-MR) : ;D
3RGT;M;P;I;O;D
TYM;M;M
COORD. Z I (-MR) : ;D

```

C APÉNDIX 3

```
4RGT;M;P;1;0;D
PT;M
;R; Z2,; Z3,; Z4;M;D
1RP;M
C=;M;M;M
;K
TYM;M;M
* TIPUS DE RADICAL (1-19) Y (-MR) : ;D
5RGT;M;P;1;0;D
IBK;MYM
IBT;MRADICAL;M
; Z5;D
;N
;F
;N
TYM;M;M
* FI CADENA PRINCIPAL * ;M;D
;P;D;S
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO E : 10. -- NOMBRE : RIBO-CP.ESQ/M

```
;K
;D
16FLV;M1;M
15DFL;MESQUELET;M
Q;M
1-12DFL;MESQUELET;M;ZG;M
CP;M
;R; Z1,; Z2,; Z3;M
;R; Z4,; Z5,; Z6;M
;R; Z7,; Z8,; Z9;M
;R; ZA,; ZB,; ZC;M;D;D
GRE;M
16FLA;M12M
;N
FLKSL;M; ZF;M
```

C APENDIX 3

```
;K
1-12DFL;MESQUELET;M
; ZG;M
CPE;M
;R; Z1;; Z2;; Z3;M
;R; Z4;; Z5;; Z6;M
;R; Z7;; Z8;; Z9;M
;R; ZA;; ZB;; ZC;M;D;D
16FLA;M12;M
;F
;N
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 11. -- NOMBRE : RIBQ-C.ESQ/M

```
;K
;D
DFC;MESQUELET;M
112S;M
1QVS;M
DOD;M
16FLV;M1;M
;N
DOA;M
;K
GRN;M
1RGN;M1;M
1-3DFS;MESQUELE;M
; ZG;M
16FLA;M3;M
DOA;M
DUA;M
;F
;N
16FLD;M
16DFS;MESQUELET;M
Q;M
;P;D;S
```

\*

\*\*\*\*\*

C APENDIX 3

MACRO £ : 12. -- NOMBRE : RIBO-DT/M

```
;O
GDD;M1;M
DOA;M
GDD;M2;M
DOA;M
GDD;M3;M
DOA;M
;K
;F
;N
;P;D;S
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 13. -- NOMBRE : RIBO-RAD. N/M

```
;O
5PT;M
;R; Z6,; Z7,; Z8;M;D
;S
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 14. -- NOMBRE : RIBO-RAD. O/M

```
;O
6PT;M
;R; Z6,; Z7,; Z8;M;D
;S
```

\*

\*\*\*\*\*

C APENDIX J

MACRO E : 15. -- NOMBRE : RIBORAD. X/M

```
;Q  
7PT;M  
;R; Z6,; Z7,; Z8;M;D  
;S
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO E : 16. -- NOMBRE : RIBO-RAD. C/M

```
;Q  
8PT;M  
;R; Z6,; Z7,; Z8;M;D  
;S
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO E : 17. -- NOMBRE : RIBO-RAD. S/M

```
;Q  
9PT;M  
;R; Z6,; Z7,; Z8;M;D  
;S
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO E : 18. -- NOMBRE : RIBO-RA/M

```
;K  
;Q  
1QVS;M  
TYM;M;M  
* EN QUIN ATOM VOLLS COMENCAR? I (-MR) : ;D  
1RGT;M;P;I;Q;D
```

C APÈNDIX 3

```
DOS;MC; Z1;M
;K
;J
TYM;M;M
* NO EXISTEIX EL C; Z1 *;M;D
;P;D;S
;N
;N
```

```
1IBE;MRADICAL;M
2DFL;MRADICALS;M
; Z1;M
3DFL;MRAD. C;M
; Z1;M
4DOT;M
TYM;M;M
* ATOM ;Z4 RAD : ;Z2;M;M;M
;D
DOD;M
;BRIBO-RAD;M
DOU;M
DOA;M
DOA;M
DOA;M
DOA;M
;K
;F
;N
;P;D;S
```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 19. -- NOMBRE : RIBO-RAD/M

```
;K
;O
SRGT
;M; Z3;M
;N
```



C APÉNDIX 7

```

3RGT;M; Z5;M
5RPD;M
*;M=;M,M
3RPD;M
;M*;M=;M
3RGE;M/;M

```

```

;K
;S
;N

```

```

TYM;M;M
* COORD.      "" ; Z3      "";M;M;D
TYM;M;M
      COORD.  X  I  (-MR)  :  ;D
6RGT;M;P;I;O;D
TYM;M;M
      COORD.  Y  I  (-MR)  :  ;D
7RGT;M;P;I;O;D
TYM;M;M
      COORD.  Z  I  (-MR)  :  ;D
BRGT;M;P;I;O;D
;BRIBO-RAD. ; Z3;M
;F

```

\*

\*\*\*\*\*

MACRO £ : 20. -- NOMBRE : RIBO-RA. C/M

```

;K
;D
GRR;M
;N

```

```

GRN;M
;K
1RGN;M1;M
TYM;M;M
* COORDENADAS : ;Z1      ;Z2;M
      COORD  " Z " Y (-MR) : ;D
3RGT;M;P;I;O;D

```

C APÉNDIX J

```
IEE;M
2;M
5;M
; Z3;M
;F
;N
DOU;M
DOA;M
DOA;M
DOA;M
;K
16DOT;M
TYM;M;M
;M ***** A T O M ; ZG *****;M;D
DOD;M
;ERIBO-RA. C;M
;N
;P;D;S
```

\*

\*\*\*\*\*

```
* FIN LISTADO MACROS OPERADOR £ 7. **
* MASK : =RIBO=
```

=====

Aquesta Tesi ha estat escrita amb un sistema de tractament de textos, que consta de:

- Un micro-ordenador FACIT - DTC (Desk Top Computer) Sèrie 6500. (Suècia), de 128K, amb dos drives per a diskettes flexibles de 160KB.
- Un programa de tractament de textos anomenat: DTC WORD, Versio 1.1A NO 9287 00 08-01, S/N217001749/b.

[ APÈNDIX ]

- Una impressora FACIT 4526 (matricial de punts per impacte).
- El programa de tractament de dades DTC REGISTER, Versió 1.4 NO 9287 02 03-01 S/N217001775/0

.....



UNIVERSITY OF CALIFORNIA

20 July  
73

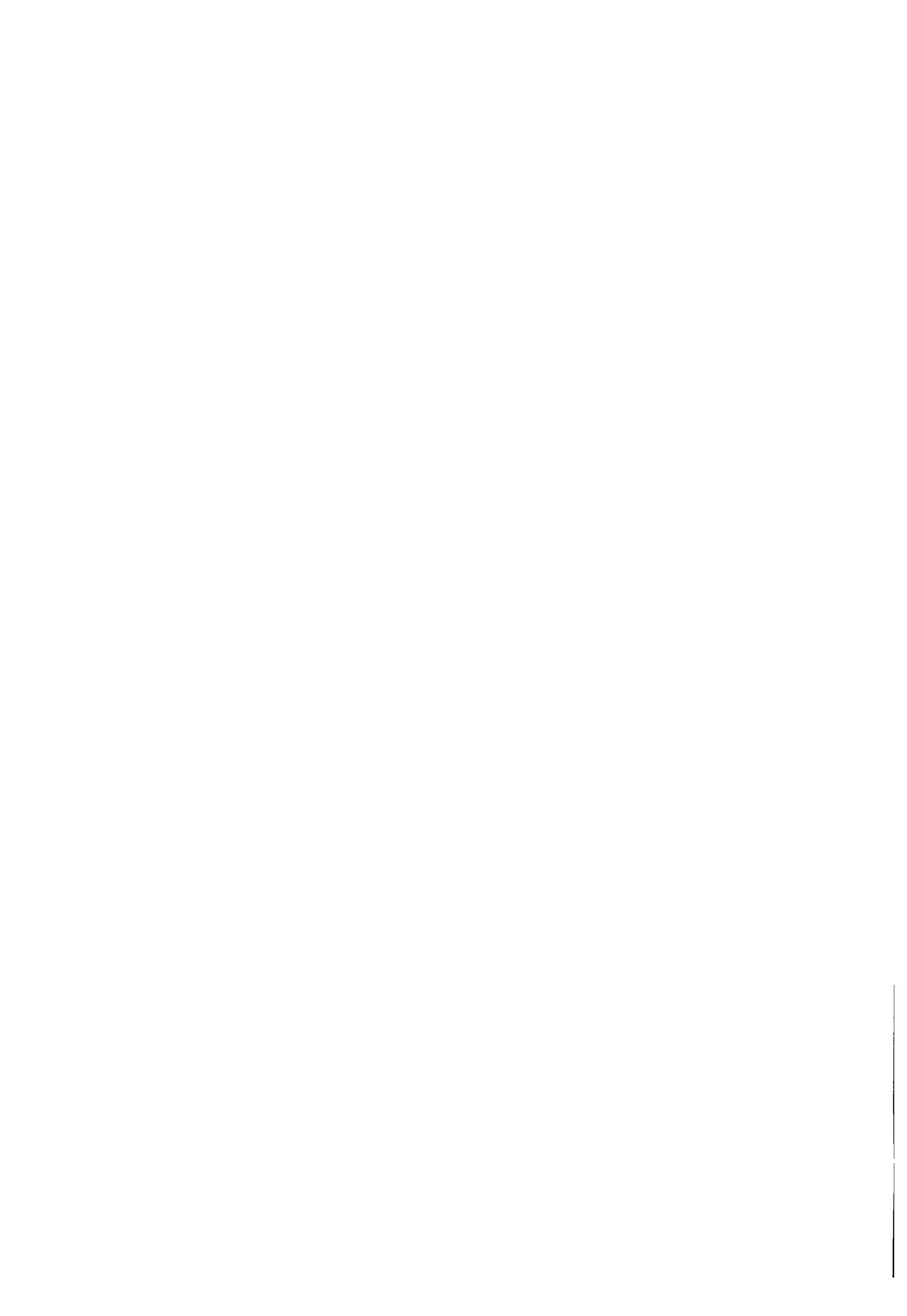
VOCALS

~~Handwritten signature~~

~~Handwritten signature~~

Claudio Audittio

Excellent "cum laude"









Universitat Autònoma de Barcelona

Servei de Biblioteques

Reg. 224482

Sig. TUAB/2708



