



**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**ESTUDIS SOBRE LA CONFORMACIÓ DEL SEGMENT
D'ACTIVACIÓ DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A PORCINA I
LA SEVA RELACIÓ AMB PROTEÏNES FIXADORS DE Ca^{2+} DE
LA FAMÍLIA EF-HAND.**



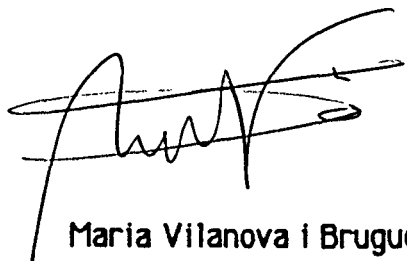
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**ESTUDIS SOBRE LA CONFORMACIÓ DEL SEGMENT
D'ACTIVACIÓ DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A PORCINA I
LA SEVA RELACIÓ AMB PROTEÏNES FIXADORES DE Ca^{2+} DE
LA FAMÍLIA EF-HAND.**



Tesi presentada per a adquirir el grau de Doctor en Ciències Químiques per MARIA VILANOVA i BRUGUES, llicenciada en Ciències Químiques.

Treball realitzat al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. FRANCESC X. AVILES i PUIGVERT.



Maria Vilanova i Brugués



Dr. F.X. Avilés i Puigvert

Bellaterra 7 de gener del 1987

Francesc X. Avilés i Puigvert, professor titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que els treballs experimentals destinats a la realització de la present Tesi: "Estudis sobre la conformació del segment d'activació de la procarboxipeptidasa A porcina i la seva relació amb les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand", presentada per Maria Vilanova i Brugués, han estat realitzats en aquest Departament sota la meva direcció des del mes d'abril del 1981 fins al desembre del 1986.

I perquè en quedi constància a efectes acadèmics, lliuro el present certificat.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. X. Avilés i Puigvert', written in a cursive style.

Dr. F.X. Avilés i Puigvert

Bellaterra, 7 de gener del 1987

AGRAÏMENTS

Vull deixar constància del meu agraïment a totes aquelles persones que d'una o altra forma m'han ajudat a fer possible la finalització del present treball.

En primer lloc, al Dr. F.X. Avilés i Puigvert, per la seva direcció al llarg de la realització del treball experimental aquí presentat així com per la correcció i discussió d'aquesta memòria.

També al Dr. Claudi M. Cuchillo i Foix per haver permès la realització d'aquesta Tesi en el Departament de Bioquímica de la seva direcció i per la seva col.laboració en la discussió de diferents temes tractats en aquesta memòria.

Als membres del grup de la procarboxipeptidasa A, que encara en formen part, Pep Vendrell i Paco Burgos, així com a aquells que ja l'han deixat un cop finalitzats els seus estudis, A. Muñoz, B. San Segundo, M.T. López i M.C. Martínez, per l'ajuda rebuda al llarg d'aquest temps i per l'amistat i el companyerisme que en tot moment s'ha viscut dins del grup. A tots els membres del Departament de Bioquímica que han contribuït a fer el treball de cada dia més fàcil i agradable.

Al Dr. Pedro Mateo i al Dr. Manuel Cortijo del Departament de Química Física de la Facultat de Ciències de la Universitat de Granada per facilitar la realització dels experiments de calorimetria d'escombrat diferencial i col.laborar en l'execució i discussió dels resultats. També agraiexo al Dr. M. Cortijo i a la Dra. Carmen Barón el seu ajut en l'aplicació dels tractaments matemàtics a les corbes resultants dels experiments de fixació de metalls al saA, seguides per fluorescència.

Al Dr. Esteve Padrós, del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona per facilitar l'equipament necessari i prestar la seva col.laboració i assessorament en la realització dels experiments d'espectroscòpia de diferència.

Al Dr. José Laynez, de l'Institut de Química Física Rocasolano del C.S.I.C., Madrid per facilitar la realització dels estudis de calorimetria de reacció així com per la col.laboració en l'execució i discussió dels resultats.

Al Dr. Colyn Crane-Robinson, del Laboratori de Biofísica, Portsmouth Polytechnic de Portsmouth, Anglaterra, per facilitar l'execució dels experiments de ressonància magnètica nuclear de protó (270 MHz).

Als Dr. L. Paolillo i E. Trivellone, del Departament de Química de la Universitat de Nàpols per facilitar la realització dels experiments de ressonància magnètica nuclear de protó (500 MHz).

He d'agrair també els ajuts econòmics rebuts de la "Federation of European Biochemical Societies" i de la CIRIT per l'estada a la Universitat de Nàpols. També el meu agraïment al Ministeri d'Educació i Ciència per la concessió d'una beca de Formació de Personal Investigador que ha permès la continuïtat d'aquests estudis.

Vull per últim i de forma especial agrair als meus pares i a l'Angel, als qui dedico aquesta Tesi, l'ajut, recolzament i ànim que m'han donat al llarg de tots aquests anys.

ÍNDEX

<u>INTRODUCCIÓ</u>	1
I 1.- Zimògens i proteòlisi limitada.....	2
I 2.- Funcionalitat dels fragments generats per proteòlisi limitada.....	7
I 3.- Carboxipeptidases i Procarboxipeptidases pancreàtiques..	15
I 4.- Procarboxipeptidases A i Carboxipeptidases A de pàncreas de porc.....	32
I 5.- El segment d'activació de la PCPA monomèrica de pàncreas de porc.....	36
I 6.- Proteïnes fixadores de Ca ²⁺ de la família EF-hand.....	39
I 7.- OBJECTIUS DE LA PRESENT TESI.....	45
 <u>MATERIALS I MÈTODES</u>	 47
M1.- Mètodes cromatogràfics.....	48
M1.1.- Cromatografia de bescanvi iònic.....	49
M1.1.1.- Obtenció i purificació de les PCPA i PCPB de pàncreas de porc.....	51
M1.1.2.- Obtenció del saA de la PCPA monomèrica de pàncreas de porc.....	54
M1.1.3.- Separació de les diferents formes del saA a pH elevat.....	56
M1.1.4.- Obtenció del saA a pH baix.....	58
M1.2.- Cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC)	59
M1.2.1.- Aplicació a l'obtenció del saA de la PCPA monomèrica.....	60
M2.- Mètodes electroforètics.....	63

M2.1.- Electroforesi discontinua en placa, en presència de SDS.....	63
M2.2.- Electroforesi discontinua en placa, en presència de SDS-urea.....	67
M2.3.- Electroforesi en placa , en medi bàsic, en presència d'urea 7M.....	69
M2.4.- Electroforesi en placa, en medi bàsic, sense agents desnaturalitzants.....	71
M2.5.- Electroforesi en gradient d'urea, en medi bàsic.....	72
M2.6.- Electroforesi preparativa.....	75
M3.- Mètodes enzimològics.....	80
M3.1- Determinació de l'activitat peptidàsica de PCPA, CPA, PCPB, CPB, QT i TG.....	80
M3.2.- Anàlisi d'activitat enzimàtica de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II, en variar la força iònica del medi.....	82
M3.2.1.- Al llarg del pH.....	82
M3.2.2.- En augmentar la temperatura.....	83
M3.2.3.- Per perdua de Zn^{2+}	84
M3.2.4.- Per acció de la tripsina (corba d'activació).....	84
M3.3.- Mesures d'activitat enzimàtica per a seguir la renaturalització de PCPA-II, CPA-II i saA, prèvia desnaturalització tèrmica.....	85
M3.4.- Variacions d'activitat enzimàtica de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II, en augmentar la concentració de Ca^{2+} del medi.....	88
M4.-Mètodes espectroscòpics.....	89
M4.1.-Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat.....	90

M4.1.1.- Identificació espectroscòpica i determinació quantitativa de PCPA-I, PCPA-II, CPA, PPE, PCPB, CPB i saA.....	90
M4.2.- Espectroscòpia de diferència i de quarta derivada a l'ultraviolat.....	92
M4.2.1.- Titració de tirosina del saA aïllat.....	97
M4.3.- Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear.....	98
M4.3.1.- Estudis de RMN del saA.....	101
M4.3.1.a.- En variar la força iònica.....	102
M4.3.1.b.- En variar el pH. Titració de ressonàncies de residus singulars.....	102
M4.3.1.c.- Bescanvi de protons -NH.....	103
M4.3.1.d.- Deuteració d'histidines.....	104
M4.3.1.e.- En augmentar la concentració d'urea.....	104
M4.3.1.f.- Iodació selectiva.....	104
M4.3.1.g.- Experiments de NOE.....	105
M4.3.2.- Comprovació de la puresa del saA aïllat. Estu- di per RMN de les diferents subformes molecu- lars que presenta.....	106
M4.4.- Espectroscòpia de fluorescència.....	107
M4.4.1.- Fixació de Ca ²⁺ i Tb ³⁺ al saA.....	108
M5.- Preparació de mostres per experiments de fixació de me- talls.....	113
M6.- Calorimetria.....	115
M6.1.- Calorimetria de reacció.....	115
M6.1.1.- Fixació de Ca ²⁺ i Tb ³⁺ al saA aïllat.....	119

M6.2.- Calorimetria d'escombrat diferencial (DSC).....	120
M6.2.1.- DSC de PCPA-II, CPA-II i saA.....	122
M7.- Tinció específica (Stains All) per proteïnes fixadores de Ca ²⁺	123
M8.- Predicció de l'estructura secundària de proteïnes.....	126

RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	129
----------------------------	-----

APARTAT A

ANÀLISI DE LA CONTRIBUCIÓ DEL saA EN LES PROPIETATS DE LES PCPAs PORCINES.

RA.1.-Estudis d'associació de PCPA-II, PCPB, PPE i dels seus fragments triptics per electroforesi en gradient d'urea...	131
RA.2.-Corbes d'activitat de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II al llarg del pH i en medis de diferent força iònica.....	143
RA.3.-Cinètica de pèrdua de Zn ²⁺ de la PCPA-I,PCPA-II i CPA- II, segons la força iònica del medi.....	146
RA.4.-Activació de la PCPA-II per acció de la tripsina, segons la força iònica del medi.....	148
RA.5.-Variació de l'activitat de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II en augmentar la temperatura, i modificant la força iònica del medi.....	150
RA.6.-Estudis de renaturalització de PCPA-II, CPA-II i del saA, després d'ésser sotmesos a temperatura elevada, variant les condicions del medi.....	153

RA.7.-Estudis de calorimetria d'escombrat diferencial de PCPA-II, CPA-II i saA.....	162
---	-----

APARTAT B

ESTUDI CONFORMACIONAL DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ AÏLLAT. ANÀLISI DE LES HOMOLOGIES QUE PRESENTA AMB LES PROTEÏNES FIXADORES DE Ca^{2+} DEL TIPUS EF-HAND.

RB.1.-Comparació dels diferents mètodes d'obtenció del saA a partir de PCPA-II.....	170
RB.2.-Milliores aconseguïdes en el procés de fraccionament de les diferents formes del saA aïllat de la PCPA-II.....	177
RB.3.-Estudi dels canvis conformacionals que poden presentar les diferents formes moleculars del saA.....	180
RB.4.-Titració de la tirosina del del saA aïllat mitjançant espectroscòpia de diferència i de quarta derivada a l'UV.....	184
RB.5.-Estudis de ressonància magnètica nuclear del saA aïllat.	187
RB.5.1.- Efecte de la força iònica i del pH.....	190
RB.5.2.- Titració d'histidines.....	191
RB.5.3.- Titració de la tirosina.....	193
RB.5.4.- Titració de RCS.....	193
RB.5.5.- Bescanvi de protons -NH.....	196
RB.5.6.- Deuteració d'histidines.....	198
RB.5.7.- Desnaturalització per urea.....	201
RB.5.8.- Iodació d'histidines i tirosina.....	206
RB.5.9.- Experiments de pertorbació NOE.....	208

RB.6.-Variació de l'activitat de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II en augmentar la concentració de Ca^{2+} del medi.....	211
RB.7.-Comparació de les estructures primària i secundària del saA amb les de proteïnes fixadores de Ca^{2+}	214
RB.8.-Fixació de Ca^{2+} i Tb^{3+} al saA seguida per espectroscòpia de fluorescència.....	230
RB.9.-Fixació de Ca^{2+} i Tb^{3+} al saA, seguida per calorimetria de reacció.....	237
RB.10.-Tinció específica per a proteïnes fixadores de Ca^{2+}	241
 DISCUSSIÓ GENERAL.....	 248
 CONCLUSIONS.....	 260
 BIBLIOGRAFIA.....	 266

ÍNDIX DE FIGURES

	Pàgina
Figura 1.- Comparació esquemàtica de quatre zimògens de serin-proteïnases.....	6
Figura 2.- Mecanisme de trencament d'un enllaç peptídic....	11
Figura 3.- Classificació dels enzims proteolítics coneguts fins al moment.....	12
Figura 4.- Esquema del sistema d'activació en cascada dels zimògens pancreàtics en ésser alliberats al duodè..	16
Figura 5.- Seqüència de la CPA bovina.....	19
Figura 6.- Fixació del substrat Gly-L-Tyr al centre actiu de la CPA.....	21
Figura 7.- Mecanisme catalític proposat per la CPA.....	24
Figura 8.- Mecanisme d'activació proposat per als complexos binari i ternari de la PCPA de pàncreas boví.....	29
Figura 9.- Seqüència d'aminoàcids de la preprocarboxipeptidasa A de rata.....	31
Figura 10.- Comparació de seqüències N-t de diferents PCPAs i PCPBs.....	35
Figura 11.- Seqüència del segment d'activació de la PCPA de pàncreas de porc.....	38
Figura 12.- Esquema d'un lloc de fixació de Ca^{2+} tipus EF-hand.....	40
Figura 13.- Seqüència d'aminoàcids més probable d'un EF-hand.....	41

Figura 14.- Cromatografia de les proteïnes de pàncreas porcí en DEAE-Sepharose equilibrada amb Tris/HCl 40 mM (pH 8.0).....	52
Figura 15.- Separació cromatogràfica de les formes monomèrica i complex binari de la PCPA de pàncreas porcí.....	53
Figura 16.- Separació cromatogràfica en DEAE-Sepharose de CPA i saA obtinguts a partir d'un digerit triptic de la PCPA de pàncreas porcí.....	55
Figura 17.- Esquema electroforètic d'una mostra heterogènia de saA.....	57
Figura 18.- Representació esquemàtica de la formació dels gels en gradient d'urea.....	73
Figura 19.- Esquema del muntatge efectuat per a la construcció i funcionament d'un gel d'electroforesi preparativa....	76
Figura 20.- Esquema dels passos a seguir en l'elaboració d'un gel d'electroforesi preparativa.....	78
Figura 21.- Espectres d'absorció a l'ultraviolat de PCPA-I, PCPA-II, CPA, PCPB, CPB, PPE i saA.....	91
Figura 22.- Espectres d'absorció i de quarta derivada del compost model: AcTyrOEt i AcTrpA a relació 4/1.....	95
Figura 23.- Esquema del calorímetre de reacció amb el muntatge de valoració.....	117
Figura 24.- Corba idealitzada de DSC per a la desnaturalització d'una proteïna.....	121
Figura 25.- Estructura del colorant Stains-all.....	123

Figura 26.- Comportament electroforètic en gels de poliacril- amida amb gradient d'urea (0-9M) de les procarboxipep- tidases i carboxipeptidases pancreàtiques.....	133
Figura 27.- Comportament electroforètic en gels de poliacril- amida amb gradient d'urea (0-9M) dels fragments tríptics de PCPA i PCPB.....	136
Figura 28.- Comportament electroforètic en gel de poliacril- amida amb gradient d'urea (0-9M) dels complexos PPE/ PE amb els fragments tríptics de la PCPA.....	140
Figura 29.- Comportament electroforètic en gels en gradient de poliacrilamida (7.5-15%) i gradient d'urea (0-9M) d'un complex a relació molar entre PCPB i PPE.....	142
Figura 30.- Corbes d'activitat específica de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II en funció del pH.....	144
Figura 31.- Cinètica de pèrdua de Zn^{2+} per acció de l'O-P sobre mostres de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II.....	147
Figura 32.- Procés d'activació tríptica de PCPA-II a diferents forces iòniques.....	149
Figura 33.- Corbes d'activitat específica de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II enfront de la temperatura.....	152
Figura 34.- Histograma representatiu de la capacitat de renatu- ralització del saA.....	156
Figura 35.- Cinètiques de desnaturalització i renaturalització de CPA a diferents temperatures.....	160
Figura 36.- Cinètiques de desnaturalització i renaturalització de PCPA a diferents temperatures.....	161

Figura 37.- Registre microcalorimètric de la capacitat calorífica diferencial de PCPA-II al llarg de la temperatura.....	163
Figura 38.- Registre microcalorimètric de la capacitat calorífica diferencial de CPA-II al llarg de la temperatura.....	164
Figura 39.- Registre microcalorimètric de la capacitat calorífica diferencial de saA al llarg de la temperatura.....	168
Figura 40.- Electroferograma d'un digerit triptic de PCPA-II.....	172
Figura 41.- Cromatografia líquida d'alta pressió per a l'obtenció de saA.....	174
Figura 42.- Cromatografia en DEAE-Sepharose (pH 9.0) per a la separació de les diferents formes del saA.....	178
Figura 43.- Comparació dels espectres de RMN de protó a 500 MHz de les diferents formes del saA.....	183
Figura 44.- Titració alcalina en l'UV del saA aïllat.....	185
Figura 45.- Espectres d'absorció i de quarta derivada del saA...	186
Figura 46.- Espectre de RMN de protó a 270 MHz del saA a pH 6.5.....	189
Figura 47.- Corbes de titració al llarg del pH de les ressonàncies dels probables protons C2 i C4 de les histidines del saA, així com de la ressonància anomenada IV.....	192
Figura 48.- Corbes de titració al llarg del pH de les ressonàncies dels protons C(3,5) i C(2,6) de l'única Tyr del saA.....	194
Figura 49.- Corbes de titració al llarg del pH de les ressonàncies dels protons dels grups metil desplaçades per corrents d'anell.....	195
Figura 50.- Cinètica de bescanvi de protons -NH del saA.....	197

Figura 51.- Bescanvi per deuteri dels protons C2 dels residus d'histidina del saA.....	199
Figura 52.- Efecte de l'addició d'urea sobre l'espectre de RMN del saA a pH 6.5 i 25°C.....	202
Figura 53.- Efectes de la desnaturalització per urea sobre l'espectre de RMN del saA.....	203
Figura 54.- Efecte de la iodació en l'espectre de RMN del saA..	207
Figura 55.- Espectres de diferència de NOE del saA a dos pHs diferents: 7.3 i 11.8.....	209
Figura 56.- Variació de l'activitat carboxipeptidàsica de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II en funció de la concentració de Ca ²⁺ del medi.....	212
Figura 57.- Comparació de les dues regions de la seqüència del saA que es proposa estan estructuralment relacionades amb les seqüències de les regions fixadores de Ca ²⁺	216
Figura 58.- Comparació dels perfils de probabilitat de formació d'hèlix- α i gir- β segons el mètode de Chou-Fasman per saA i una seqüència mitjana elaborada a partir del grup de proteïnes de la família EF-hand.....	219
Figura 59.- Comparació dels perfils de probabilitat de formació d'hèlix- α i gir- β segons el mètode de Garnier per saA i una seqüència mitjana elaborada a partir del grup de proteïnes de la família EF-hand.....	220
Figura 60.- Comparació dels perfils d'hidrofobicitat calculats segons els paràmetres de Sweet-Eisenberg i Kyte-Doolittle per saA i una seqüència mitjana de proteïnes fixadores de Ca ²⁺ de la família EF-hand.....	222

Figura 61.- Comparació del perfil d'hidrofilicitat calculat segons segons els paràmetres de Hopp-Woods per saA i una seqüència mitjana de proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand.....	223
Figura 62.- Model proposat per a l'evolució de les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand.....	227
Figura 63.- Corbes de titració amb Tb^{3+} del saA seguides per fluorescència.....	232
Figura 64.- Reversió de la fluorescència del complex Tb^{3+} /saA a relació molar 2/1, per diferents metalls.....	235
Figura 65.- Entalpia de reacció del Tb^{3+} amb saA en funció de la concentració total de metall adicionada.....	238
Figura 66.- Absorció a 640 nm. i espectres de diferència dels complexos d'Stains-all amb CAL, saA i BSA.....	242
Figura 67.- Espectres d'absorció dels complexos Stains-all amb CAL, saA i BSA en presència d'etilenglicol al 30%.....	244
Figura 68.- Efecte del Ca^{2+} sobre els espectres d'absorció dels complexos Stains-all amb CAL i saA.....	245
Figura 69.- Efecte del Tb^{3+} sobre els espectres d'absorció dels complexos Stains-all amb CAL i saA.....	246
Figura 70.- Localització d'introns en les unitats funcionals proposades com a fixadores de Ca^{2+} en CAL i saA.....	255

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.- Exemples de zimògens que es converteixen en proteïnes actives en resposta a diferents estímuls.....	3
Taula 2.- Comparació de la longitud de diferents segments d'activació respecte a la longitud del zimogen precursor.....	8
Taula 3.- Diferents condicions emprades en els assaigs de desnaturalització tèrmica i renaturalització posterior de PCPA i CPA.....	87
Taula 4.- Paràmetres de desnaturalització tèrmica obtinguts per microcalorimetria.....	165
Taula 5.- Coeficients de correlació (R) trobats per a les proteïnes indicades en la Taula emprant els paràmetres de Garnier per a la probabilitat de formació d'hèlix- α i gir- β segons el mètode de Pongor-Szalay.....	225
Taula 6.- Coeficients de correlació (R) trobats per a les proteïnes indicades en la Taula emprant els paràmetres de Chou-Fasman per a la probabilitat de formació d'hèlix- α i gir- β segons el mètode de Pongor-Szalay.....	226
Taula 7.- Coeficients de correlació (R) trobats per a les proteïnes indicades en la Taula emprant els paràmetres de Kyte-Doolittle, Sweet-Eisenberg i Hopp-Woods per a la predicció de regions d'hidrofobicitat i hidrofilicitat segons el mètode de Pongor-Szalay.....	228
Taula 8.- Paràmetres termodinàmics de la unió del Tb^{3+} al saA.....	239

ABREVIACIONS D'ÚS MÉS FREQUENT

- AC: Anhidrasa carbònica.
- AcTrpA: Amida del N-acetiltriptòfan.
- AcTyrOEt o ATEE: Ester etílic de la N-acetil tirosina.
- Bisacrilamida: N,N', metilendiacrilamida.
- Bis-Tris: Bis (2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil) metà.
- BPTI: Inhibidor de tripsina de pàncreas boví.
- CAL: Calmodulina.
- CM-Sepharose: Carboximetil-Sepharose.
- C_p: Capacitat calorífica.
- CPA: Carboxipeptidasa A.
- CPB: Carboxipeptidasa B.
- DEAE-Sepharose: Dietilaminoetil-Sepharose.
- DiFP: Diisopropilfluorofosfat.
- DSC: Calorimetria d'escombrat diferencial.
- DTT: Ditiotreitòl.
- EDTA: Acid etilenediaminotetraacètic.
- FID: "Free induction decay".
- HA: Hipuril-L-Arginina o Benzoilglicil-L-Arginina.
- HPA o Bz-Gly-L-Phe: Hipuril-L-Fenilalanina o
Benzoilglicil-L-Fenilalanina.
- HPLC: Cromatografia líquida d'alta pressió.
- ICaBP: Proteïna intestinal fixadora de Ca²⁺.
- IR: Infraroig.
- Liz: Lizozim.
- Mes: Acid 2(N-morfolino) etanosulfònic.

- M_r: Per molecular aparent.
- nm: Nanòmetres.
- NOE: "Nuclear Overhauser Enhancement".
- O-P: 1,10 fenantrolina.
- OVO: Ovoalbúmina.
- P: Tampó fosfat.
- PP: Tampó pirofosfat.
- PCPA: Procarboxipeptidasa A.
- PCPA-I: Procarboxipeptidasa A complex binari.
- PCPA-II: Procarboxipeptidasa A monomèrica.
- PCPB: Procarboxipeptidasa B.
- PE: Proteasa E.
- PFCa-EFH: Proteïnes fixadores de Ca²⁺ de la familia EF-hand.
- PPE: Proproteasa E.
- PMSF: Fluorur de para-toluèsulfonil.
- PVA: Parvalbúmina.
- P_α: Probabilitat de formació d'hèlix-α.
- P_β: Probabilitat de formació de plegament-β.
- P_γ: Probabilitat de formació de gir-β.
- QT: Quimotripsinogen.
- RMN: Ressonància magnètica nuclear.
- RCS: "Ring current shifts".
- saA: Segment d'activació de la procarboxipeptidasa A-II.
- saA I: Lloc I potencial fixador de Ca²⁺ en el saA.
- saA II: Lloc II potencial fixador de Ca²⁺ en el saA.

- Stains-all: Bromur de (1-etil-2-[3-(1-etil-nafto[1,2d] tiazol-2-ilidene)-2-metilpropil nafto [1,2d] tiazol.
- STI: Inhibidor de tripsina de soja.
- TEMED: N,N,N',N', tetrametiletilediamina.
- TFA: Acid trifluoroacètic.
- TG: Tripsinogen.
- TNC: Troponina.
- T_{tr} o T_m : Temperatura de transició o temperatura mitja.
- Tris: Tris-(hidroximetilaminometà).
- UV: Ultraviolat.
- VIS: Visible.
- λ : Longitud d'ona.
- δ : Desplaçament químic.
- ΔC_p : Variació de la capacitat calorífica.
- ΔG : Variació d'energia lliure.
- ΔH_{cal} : Variació d'entalpia calorífica.
- ΔH_{VH} : Variació d'entalpia de Van't Hoff.
- ΔH_{max} : Entalpia de saturació.
- ΔS : Variació d'entropia.

INTRODUCCIÓ

I 1.-ZIMÒGENS I PROTEÒLISI LIMITADA.

Molts enzims, hormones i altres proteïnes fisiològicament actives se sintetitzen en forma de precursors inactius, anomenats zimògens. Aquests zimògens es converteixen en les formes actives per trencament selectiu d'un o més enllaços peptídics per acció d'una proteasa; aquest procés es coneix com a proteòlisi limitada.

La proteòlisi limitada es pot considerar com l'últim pas en la síntesi de proteïnes biològicament actives i, en molts casos, com el primer pas de la degradació proteïca, a més és un important mecanisme de regulació metabòlica. Es tracta d'un procés d'elevada especificitat, ja que per produir-se el trencament de l'enllaç peptídic cal que aquest adopti dins del zimogen una estructura tridimensional que encaixi perfectament en el centre actiu de la proteasa activant (1). En general, la proteòlisi limitada es dirigeix a segments peptídics desestructurats que es troben en la superfície de la molècula, més que a dominis interns o zones plegades en hèlix- α o full- β (2).

La proteòlisi limitada es considera com un dels sistemes de modificació postraduccionals de proteïnes, però, a diferència de la major part dels altres, aquest és irreversible, ja que no existeixen mecanismes biològics senzills per reparar un enllaç peptídic trencat (3).

Aquest mecanisme de regulació intervé en un gran nombre de processos biològics tals com coagulació sanguínia, fibrinòlisi, sistema complement, producció d'hormones, desenvolupament, diferenciació i formació d'estructures supramoleculares (4). En la taula 1 es mostren diferents exemples de zimògens que poden ésser activats en resposta a diferents estímuls, siguin externs o fisiològics.

Taula 1.- Exemples de zimògens que es converteixen en proteïnes actives en resposta a diferents estímuls.

Resposta fisiològica normal	Resposta a estímuls externs	Resposta programada
Productes vasoactius	Digestió	Desenvolupament
Angiotensina	Pepsinogen	Prococonasa
Precalicroïna	Proquimosina	Procol.lagenasa
Quininogen	Tripsinogen	Proacrosina
Hormones	Quimotripsinogen	Fibrinòlisi
Proinsulina	Profosfolipasa	Plasminogen
Proglucagó	Procarboxipeptidases	Toxines
Hormona paratiroidal	Proelastasa	Promelittina
Enzims	Coagulació sanguínea	Autoensamblatge
Protiroxinas	Factors VII, IX, X	Procol.làgena
Profenoloxidas	Protrombina	Proteïnes de la càpsida dels fags.
Prorrenina	Factor XIII	
	Fibrinogen	
	Sistema complement	
	Factors C ₃ , C ₅	
	Precursor properdina	

L'activació de zimògens normalment té lloc per trencament proteolític d'un enllaç peptídic en la regió N-terminal de la proteïna a activar. El fet que sigui el fragment N-terminal el que es trenca s'explica pel propi procés de biosíntesi proteica, el qual progressa des del N cap al C-terminal. A mesura que la proteïna abandona el ribosoma pren la seva estructura tridimensional correcta i la seva capacitat funcional. Ara bé, la formació d'un segment inactivador, previa a la regió que conté el centre actiu, evita l'expressió prematura de la funció fisiològica de la proteïna, funció que, en determinats casos, podria ésser perillosa per a la pròpia cèl.lula si no s'expressa en el lloc i moment apropiats (4).

La conversió de zimògens en proteïnes actives es pot donar en un sol pas, o bé en una sèrie de passos consecutius o "cascades" que serveixen per amplificar un estímul petit a fi d'obtenir una resposta fisiològica gran (5). Normalment l'activació del primer zimogen de la cascada és produïda per un estímul determinat, extern o fisiològic, i un cop activat aquest, es produeix l'activació del següent i així successivament. Exemples d'aquest tipus de cascades són l'activació de proteases digestives (6), l'activació del sistema complement (7) i del sistema de coagulació sanguínia (8). A part del propi mecanisme de cascada, que ja constitueix per si mateix un important sistema de regulació metabòlica, cada un dels zimògens activats pot ésser regulat per un inhibidor específic, que té les característiques d'un pseudo-substrat. Aquesta inhibidor es combina de forma quasi irreversible amb el centre actiu de l'enzim i es converteix en una forma diferent per trencament d'un enllaç. Així, en cada pas, la durada de l'acció d'un zimogen activat pot ésser controlada per la concentració d'inhibidor, mentre que el grau d'amplificació del senyal ve donat pel nombre de passos entre el primer i l'últim zimògen activat (4). Exemples d'inhibidors de zimògens activats són l'inhibidor de tripsina de pàncreas boví (BPTI), que com el seu nom indica inhibeix la tripsina, enzim proteolític que participa en el procés de digestió de proteïnes de la ingesta (9) , l'antitrombina III i la α_2 -macroglobulina , inhibidors de diferents proteases del procés de coagulació sanguínia (8), l'inhibidor de carboxipeptidasa A en patata (10), l'inhibidor de tripsina en soja (11),....etc.

Hi ha encara un darrer pas de control en el sistema de cascades que es dona quan hi ha interacció entre elles, tal com és el cas de la interacció entre el sistema de coagulació sanguínia, el de fibrinòlisi i el de la calicreïna (4).

Ja que la proteòlisi limitada és un important mecanisme de regulació metabòlica, cal preguntar-se quin camí evolutiu ha seguit. En les cèl·lules primitives existien només proteïnes actives que després s'inactivaren per addició d'un fragment polipeptídic N-terminal, formant-se el zimogen, o bé aquests zimògens ja existien, i es formà l'enzim actiu mitjançant la seva activació?. Les evidències que es tenen fins al moment recolzen la primera de les hipòtesis presentades, ja que s'han trobat pocs proenzims en procariotes i en organismes eucariotes poc diferenciats (4). A part, quan s'ha intentat estudiar famílies de proteïnes que se sintetitzen en forma de zimògens, com és el cas de les ben conegudes serin-proteïnases (4,12) (veure Fig. 1), s'ha trobat que l'enzim actiu presenta una sèrie d'homologies seqüencials sobretot en els residus del centre actiu, els quals s'han conservat molt bé al llarg de l'evolució. En canvi, quan s'ha intentat veure la relació evolutiva entre diferents fragments N-t d'aquests enzims, s'ha trobat una important variabilitat de seqüència (4,12). Aquest fet recolza la hipòtesi que primer fou sintetitzat l'enzim actiu i que després per algun mecanisme evolutiu es va afegir el fragment N-t i es va formar el zimògen.

Respecte als inhibidors de les proteases, encara es coneix menys la seva evolució, però sembla que els de proteases evolutivament relacionades poden provenir, també, d'un antecessor comú. Aquesta relació s'ha pogut constatar entre la α_1 -antiquimotripsina i l'antitrombina III, inhibidors de proteases evolutivament relacionades. El paral·lelisme plantejat suggereix que l'especialització dels inhibidors ha tingut lloc simultàniament i en resposta a l'evolució de les corresponents proteases (12).

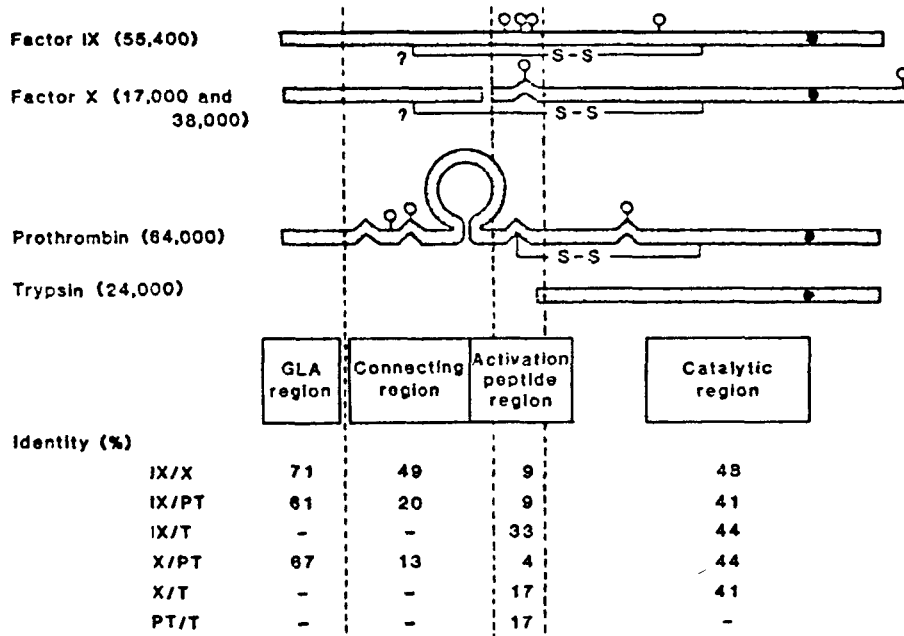


Figura 1.- Comparació esquemàtica de quatre zimògens de serin-proteïnases. Els ponts i les petites distorsions de la barra representativa de la longitud de la cadena polipeptídica s'inclouen per indicar els ajustos necessaris per fer coincidir les regions homòlogues. Els cercles buits indiquen llocs d'unió de carbohidrats mentre que els plens indiquen la localització de la serina del centre actiu. Les homologies entre les diferents regions presentades a la figura s'expressen en % d'identitat (obtingut de Katayama K. i col. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4994).

I 2.- FUNCIONALITAT DELS FRAGMENTS GENERATS PER PROTEÒLISI LIMITADA.

Quan un zimogen és activat, es produeixen, com a mínim, dos fragments polipeptídics. Un d'ells té una funcionalitat clara, aquella per la qual s'ha sintetitzat la molècula i que fins al moment de la seva activació no ha pogut expressar (pe. un enzim, una hormona..etc.). En la major part dels casos, tots els esforços experimentals han anat encaminats a l'estudi d'aquesta proteïna activa, mentre que el segment, generalment N-terminal alliberat en la seva activació, s'ha ignorat. No obstant, cada vegada més, sobretot en estudis recents, s'ha intentat aïllar aquests fragments i estudiar-los a fi de poder comprendre millor la seva possible funció secundària així com el mecanisme d'activació del zimogen en estudi.

La longitud , composició i seqüència dels fragments N-terminal alliberats són molt diferents d'un zimogen a l'altre. Concretament, i fixant-nos en els zimògens d'alguns enzims proteolítics, tals com els que es mostren en la Taula 2, podem veure que la longitud del fragment N-terminal pot variar des d'uns pocs aminoàcids, com és el tripsinogen que perd 6 aas. del N-t , fins al cas del plasminogen que perd 560 aminoàcids del seu N-t. En observar que hi ha determinats segments d'activació que presenten una longitud considerable, fins i tot més gran que la de la pròpia proteïna activa, sorgeix una qüestió. Es rentable per a una cèl.lula sintetitzar un fragment polipeptídic d'aquesta longitud que un cop alliberat serà degradat ja que ha perdut la seva única funció que és la d'actuar com a inhibidor?.

Taula 2.- Comparació de la longitud de diferents segments d'activació respecte a la longitud del zimogen precursor.

Zimogen	Pes molecular	Nombre de residus total	Nombre de residus del segment d'activació
Plasminogen	92.000	791	560
Protrombina	69.000	582	323
Factor X	55.000	465	155
Factor IX	53.000	450	191
Quimotripsinogen	25.000	245	15
Tripsinogen	23.000	229	6

Cal tenir en compte que per sintetitzar una cadena polipeptídica de, per exemple, 100 residus s'han d'activar 100 molècules d'aas. unint-les als seus t-RNA respectius. Per aquest procés cal l'aportació de 100 molècules d'ATP, i la utilització d'un total de 200 enllaços fosfat d'alta energia. Per a cada resta d'aminoàcid insertada cal desplaçar la cadena polipeptídica i el m-RNA al llarg del ribosoma una longitud equivalent a un codó; en cada una d'aquestes translocacions s'hidrolitza una molècula de GTP. Per tant, en total, per sintetitzar un pèptid de 100 residus calen 300 enllaços fosfat d'alta energia a més de 544,5 Kcal ja que la síntesi d'un enllaç peptídic consumeix 5,5 Kcal (13). Aquesta despesa energètica no es recupera mitjançant la degradació catabòlica de la proteïna. Per tant, des d'un punt de vista energètic no és rentable la síntesi d'un fragment d'activació gaire llarg, a menys que aquest pugui per si mateix tenir alguna altra funció.

Per això, a part d'estudiar el fragment N-terminal alliberat dels zimògens, perquè ajuda a comprendre el seu mecanisme d'activació, es busca una possible funcionalitat, fet que en cas d'ésser positiu justificaria plenament la seva biosíntesi.

Fins al moment, es coneixen alguns exemples de fragments d'activació de zimògens per als quals s'ha trobat una funció un cop alliberats de la proteïna activa. Concretament, l'activació del factor C_3 del sistema complement allibera un pèptid N-t anomenat C_{3a} o anafilotoxina que és fisiològicament actiu, i el responsable de determinades reaccions alèrgiques (14). Anàlogament, el factor C_5 del sistema complement i la protrombina del sistema de coagulació sanguínia alliberen pèptids N-t farmacològicament actius (14,15). El pèptid d'activació del tripsinògen pancreàtic, malgrat ésser molt petit, produeix una supressió de tipus hormonal de la secreció gàstrica (16). També és coneguda la inhibició de l'activitat de la pepsina i de la carboxipeptidasa A de pàncreas de porc pels seus respectius pèptids d'activació (17,18).

També, i per recolzar la hipòtesi d'una possible funcionalitat dels fragments N-t alliberats, cal tenir en compte que la proteòlisi limitada no tan sols treu una obstrucció del centre actiu sinó que pot induir un canvi conformacional que generi aquest centre o que el faci més funcional (sigui per modificació del centre catalític o del centre de fixació de substrats) (4,12). Si aquest canvi conformacional té lloc en la part de l'enzim actiu, també pot tenir lloc en el fragment N-t, adquirint aquest una conformació determinada que el faculti per dur a terme una funció particular, funció que no pot expressar-se quan es troba unit a l'enzim actiu. Concretament hi ha tres zimògens que participen en la cascada de coagulació sanguínia que poden il·lustrar el fet que l'eliminació del pèptid d'activació pot tenir conseqüències addicionals a part de generar un enzim actiu. Aquests zimògens són la protrombina i els factors X i IX. S'ha demostrat que la regió N-t d'aquests zimògens conté un aminoàcid no usual,

el γ -carboxiglutàmic, que sembla ésser efectiu per al segrestament d'ions Ca^{2+} (19,20). La formació d'aquest aminoàcid és un requisit per a l'activació de la protrombina pel factor X, essent aquesta activació accelerada per la presència d'ions Ca^{2+} , igual com l'activació del factor X pel factor IX actiu. (8).

Per últim, i tenint en compte que és molt probable que evolutivament apareguren primer els enzims actius i després els zimògens (4,12) i que dos mecanismes freqüents d'evolució són la duplicació gènica i la fusió de dos gens diferents per formar un híbrid, és possible que la inactivació d'un zimogen es faci per integració d'algun fragment polipeptídic que tingui alguna altra funció.

Fins al moment, s'ha parlat del fragment N-t dels zimògens, però, evidentment, la generació d'una proteïna activa sembla ésser el principal objectiu, o com a mínim el més conegut, de l'activació de zimògens.

Hi ha un grup molt important d'enzims (dels quals forma part el sistema enzimàtic estudiat en la present Tesi), els enzims proteolítics o proteases, que es generen a partir de zimògens. Precisament, en un principi, el terme zimogen s'aplicava tan sols als precursors inactius d'aquests enzims (sobretot als que es troben en l'aparell digestiu), els quals són responsables de la degradació proteica i de la pròpia proteòlisi limitada. Hi ha pocs camins pels quals el trencament d'un enllaç peptídic es pugui dur a terme en condicions fisiològiques. El mecanisme més comú és la polarització de l'enllaç peptídic per atac nucleòfil al carbó carbonílic (sigui directament o mitjançant un molècula d'aigua), assistit per la donació d'un protó al N de l'enllaç peptídic, tal com s'esquematitza a la figura 2. En els enzims proteolítics alguns aminoàcids fan de nucleòfils i d'altres actuen com a dadors de protons. Cada família de proteases té el

seu grup característic de residus disposats en el centre actiu amb la configuració idònia per dur a terme el trencament de l'enllaç peptídic. Configuració que fixa l'activitat enzimàtica, la qual ha servit per a la classificació de les proteases.

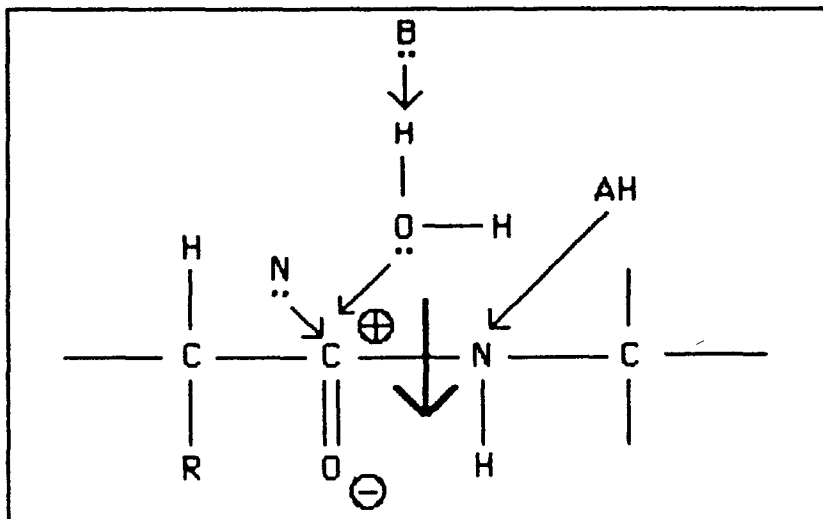


Figura 2.- Mecanisme de trencament d'un enllaç peptídic per polarització d'aquest mitjançant atac nucleòfil (N) al carboni carbonílic directament o mitjançant una molècula d'aigua (B), assistit per la donació d'un protó al N (AH).

Aquesta classificació va ésser feta per Grassmann i Dyckerhoff (21) l'any 1923, separant dos grans grups, les anomenades exopeptidases i les anomenades endopeptidases. Dins de cada grup hi ha una sèrie de subgrups que s'esquematitzen a la figura 3.

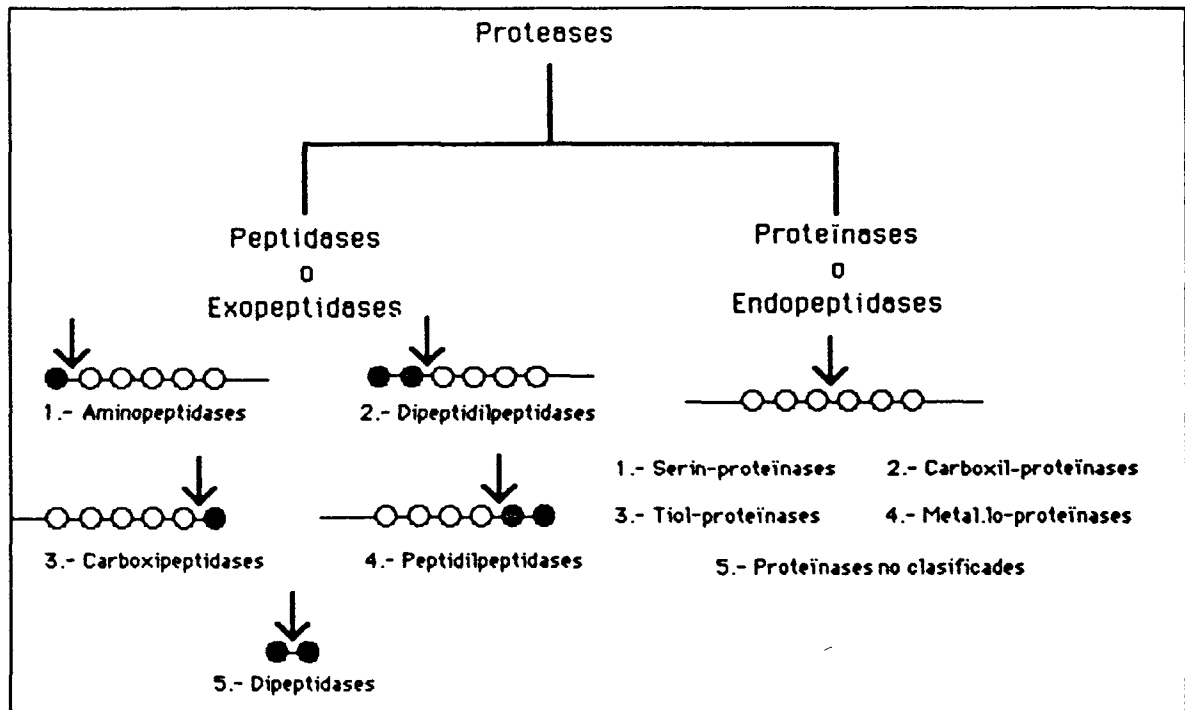


Figura 3.- Classificació dels enzims proteolítics coneguts fins al moment.

Les exopeptidases, també anomenades peptidases, hidrolitzen enllaços peptídics de l'extrem N o C-terminal de les proteïnes. La seva classificació es fa en funció del punt on es produeix l'hidròlisi i del nombre d'aminoàcids hidrolitzats en la proteïna substrat (22, 23), tal com es pot veure en la figura 3.

Dins d'aquest grup s'hi troben les anomenades aminopeptidases que hidrolitzen un residu del N-terminal de la proteïna o pèptid a digerir. Dins d'aquest subgrup trobem exemples tals com la leucín aminopeptidasa, una proteasa que conté Zn^{2+} i que es localitza en els teixits i fluids corporals de tots els organismes (24).

Les carboxipeptidases fan la mateixa funció hidrolítica que les anteriors però pel C-terminal de la proteïna a hidrolitzar. Dins d'aquest grup s'hi troben les carboxipeptidases A, B, C, Y de diferents espècies (41-56,25).

El grup de les dipeptidilpeptidases compren proteases que hidrolitzen proteïnes pel seu N-terminal però alliberant un dipèptid. Dins del grup de les peptidilpeptidases s'hi troben proteïnes de funció idèntica a l'anterior però treballant pel C-terminal de les proteïnes a hidrolitzar. Un exemple d'aquest tipus de proteases és la dipeptidil-carboxipeptidasa d'E. coli (26).

Per últim, dins de les exopeptidases s'hi troben les dipeptidases que hidrolitzen dipèptids alliberats per les dipeptidilpeptidases i per les peptidilpeptidases. Tenim exemples d'aquestes proteïnes en una gran varietat d'organismes (27).

Les endopeptidases s'anomenen també proteïnases. La seva classificació depèn del mecanisme catalític emprat per a la hidròlisi dels pèptids (23). Segons aquest mecanisme i tal com es pot veure en la Figura 3, es poden fer cinc subgrups.

La família de les serin-proteïnases conté, probablement, els enzims millor coneguts, tals com la tripsina, la quimotripsina i la elastasa (23). Es caracteritzen per tenir en el seu centre actiu un residu de serina especialment reactiu. Formen part d'aquest grup d'enzims proteïnes que participen en processos tan diversos com : digestió de proteïnes de la ingesta (tripsina, quimotripsina, elastasa etc.)(6), coagulació sanguínia i fibrinòlisi (factor XII, plasminogen, factor XI, factor IX...,etc.) (8) ,sistema complement (components C1r i C1s, etc.) (7), reproducció (acrosina) (28), sistema de defensa enfront d'antígens (proteïnases dels leucòcits

polimorfonuclears, catepsina G) (29) i proteïnases bacterianes (subtilisina) (30)...etc.

El grup de les tiol-proteïnases compèn un grup de proenzims que participen en la degradació proteica intracel.lular que es troben dins dels lisosomes i són activats per un activador tipus glutatíon que es troba en el citosol. La seva activitat catalítica depèn de l'acció concertada de dos residus del centre actiu que són la cisteïna i la histidina. Dins d'aquest grup s'hi troben les diferents catepsines B (31), H (32) i L (33), així com una proteïnasa dependent de Ca^{2+} , recentment descoberta en teixits de mamífers (34), la papaïna (plantes) (35) i moltes proteïnases bacterianes.

Dins del grup de les carboxil-proteïnases o proteïnases àcides s'hi troba la catepsina D (36) i les diferents formes de pepsina que participen en la degradació proteica de les proteïnes de la ingesta en l'estómac (37), la renina (38) i diferents proteïnes àcides d'organismes inferiors. Es caracteritzen per tenir un grup carboxil en el centre actiu, essencial perquè es manifesti la seva activitat.

Per últim, dins del grup de les metal.lo-proteïnases s'inclouen aquells enzims que per manifestar la seva activitat necessiten la presència d'un àtom de metall en el centre actiu. Dins d'aquest grup s'hi troba la termolisina (39), una proteasa bacteriana que conté un àtom de Zn^{2+} en el centre actiu. Així mateix s'hi troben proteïnases de mamífers tals com la col.lagenasa (40).

I 3.- CARBOXIPEPTIDASES I PROCARBOXIPEPTIDASES PANCREATIQUES.

Les carboxipeptidases pancreàtiques són exopeptidases que hidrolitzen pèptids o proteïnes pel seu C-terminal sempre que aquest presenti un grup carboxil lliure en configuració L. Se sintetitzen en forma de proenzims o procarboxipeptidases les quals són activades in vivo per l'acció d'endopeptidases digestives (sobretot per la tripsina) mitjançant proteòlisi limitada. El procés d'activació de les procarboxipeptidases de mamífers en el duodè forma part d'un sistema d'activació en cascada (4) que s'esquemmatitza en la Figura 4. En aquesta cascada el primer enzim activat és el tripsinogen per acció de l'enteroquinasa, un enzim de la paret intestinal, o bé per autoactivació. La tripsina catalitza després l'activació dels altres zimògens a la seva forma activa.

Les carboxipeptidases són metal·loenzims que contenen un àtom de Zn^{2+} en el centre actiu que és essencial per a la seva activitat.

Les carboxipeptidases més estudiades són les A i B, sintetitzades en pàncreas de mamífers i peixos (41-55), encara que es troben també en invertebrats (56-58) i fongs (59).

Ens centrarem en la carboxipeptidasa A (abreu. CPA) i la seva forma proenzimàtica ja que són el tema d'estudi de la present Tesi. La carboxipeptidasa B (abreu. CPB) i el seu zimogen es tractaran molt superficialment i a mena de comparació amb les formes A. L'especificitat entre una i altra forma és diferent. Mentre la CPA hidrolitza preferentment els residus C-terminals de cadena lateral aromàtica o alifàtica neutra, la CPB té preferència pels de cadena lateral de tipus bàsic (Lys, Arg).

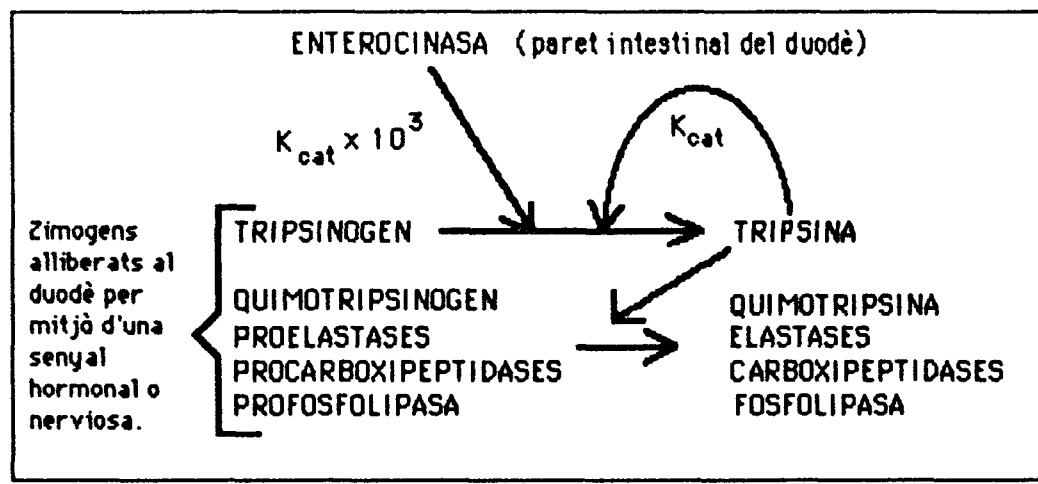


Figura 4.- Esquema del sistema d'activació en cascada dels zimògens pancreàtics en ésser alliberats al duodè.

Segons l'espècie, les procarboxipeptidases pancreàtiques es presenten en forma monomèrica o bé associades a altres subunitats. Així, la procarboxipeptidasa A (abrev. PCPA) de pàncreas de bou es presenta en dues formes, una d'elles en complex binari per associació a una subunitat de quimotripsinogen C i amb un coeficient de sedimentació de 5S (PCPA-5S) i l'altra en complex ternari per associació del complex binari anterior amb una altra subunitat anomenada III. El conjunt presenta un coeficient de sedimentació de 6S (PCPA-6S). Cal afegir que en pàncreas de bou la subunitat III no és activa ni activable enfront de cap biomolècula, encara que s'han trobat evidències de la seva analogia estructural i evolutiva amb les elastases i les proteases E pancreàtiques (41-45). Altres espècies que presenten també un complex ternari són l'ovella i la cabra (46).

En canvi, en pàncreas de porc la PCPA es presenta en forma monomèrica i com a complex binari per associació a una molècula de proproteasa E (47,48). La PCPA de cavall (46) es presenta només en forma monomèrica igualment com les aïllades de "dogfish" (49), "lungfish" (50) i de gos (51), mentre que l'aïllada de balena (52) forma un complex binari amb una molècula de quimotripsinogen C (50). Per últim, la PCPA de pàncreas humà sembla que es presenta només en forma monomèrica (53).

Per contraposició a la variabilitat presentada per les procarboxipeptidases A de les diferents espècies, la procarboxipeptidasa B (abrev. PCPB) es presenta en les estudiades només en forma monomèrica (54,55).

El fet que algunes de les PCPAs es presentin en forma monomèrica facilita el seu estudi i la comprensió del procés d'activació. Malgrat aquesta facilitat, el sistema més estudiat és el de pàncreas de bou per qüestions de tipus històric.

La CPA de pàncreas de bou va ésser trobada per primer cop per Waldschmidt-Leitz i Purr (60), mentre que el seu zimogen o procarboxipeptidasa A va ésser descrit per primera vegada per Keller i col. (61). A partir d'aquest fet, s'han portat a terme nombrosos estudis que han convertit aquesta CPA en un dels enzims millor coneguts.

La CPA bovina té un pes molecular de 34600, i presenta activitat enfront de substrats de tipus peptídic i ester. Es troben tres formes diferents de l'enzim, les quals han estat anomenades A_{α} , A_{β} i A_{γ} . Aquesta heterogeneïtat és deguda al procés d'activació del proenzim en el qual es va retallant l'extrem N-terminal de la CPA alliberada, donant lloc a formes cada vegada més curtes (PCPA \rightarrow CPA α \rightarrow CPA β \rightarrow CPA γ) per

aquest extrem. En la taula que a continuació es detalla s'indiquen els diferents mètodes d'obtenció de CPA (anomenats segons l'autor) amb les diferents formes abans descrites que s'aïllen en cada procés, els seus N-terminal i nombre d'aminoàcids (62):

<u>Preparació</u>	<u>Forma majoritària</u>	<u>N-terminal</u>	<u>Nº aas.</u>
Cox	α	Ala	307
Allan	β	Ser	305
Anson	γ	Asn	300

L'estructura primària de l'enzim va ésser determinada pels col·laboradors de Neurath (63). En la Figura 5 es presenta la seqüència d'aminoàcids així com els diferents punts de trencament del N-t que donen lloc a les formes α , β i γ .

Una altra font d'heterogeneïtat en la CPA és deguda a l'al·lèlomorforme en què és sintetitzada, ja que cada una de les formes anteriors, en les posicions 179, 228 i 305, pot presentar Ile, Ala i Val o bé Val, Glu i Leu, respectivament (63).

Un cop aïllada la CPA, Vallee i Neurath (64) van trobar que contenia un àtom de Zn^{2+} per molècula. La seva eliminació per diàlisi a pH baix o per agents quelants inactiva totalment l'enzim, inactivació que es reverteix per readdició del metall o per addició d'altres metalls divalents tals com Co^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+}etc. (65,66,67).

La cristallització de la CPA i la seva anàlisi per difracció de Raigs X, portada a terme pel grup de Lipscomb (68) confirmaren la seqüència d'aminoàcids i la unió de les Cys 138 i 167 per pont disulfur. A partir d'aquests estudis se sap que la proteïna presenta forma elipsoïdal amb unes dimensions de 50x42x38 Å.

	5	10	15	20
ALA-ARG-SER-THR-ASN-THR-PHE-ASN-TYR-ALA-THR-TYR-HIS-THR-LEU-ASP-GLU-ILE-TYR-ASP				
α	β	γ		
	25	30	35	40
PHE-MET-ASP-LEU-LEU-VAL-ALA-GLN-HIS-PRO-GLU-LEU-VAL-SER-LYS-LEU-GLN-ILE-GLY-ARG				
	45	50	55	60
SER-TYR-GLU-GLY-ARG-PRO-ILE-TYR-VAL-LEU-LYS-PHE-SER-THR-GLY-GLY-SER-ASN-ARG-PRO				
	65	70	75	80
ALA-ILE-TRP-ILE-ASP-LEU-GLY-ILE-HIS-SER-ARG-GLU-TRP-ILE-THR-GLN-ALA-THR-GLY-VAL				
	85	90	95	100
TRP-PHE-ALA-LYS-LYS-PHE-THR-GLU-ASN-TYR-GLY-GLN-ASN-PRO-SER-PHE-THR-ALA-ILE-LEU				
	105	110	115	120
ASP-SER-MET-ASP-ILE-PHE-LEU-GLU-ILE-VAL-THR-ASN-PRO-ASN-GLY-PHE-ALA-PHE-THR-HIS				
	125	130	135	140
SER-GLU-ASN-ARG-LEU-TRP-ARG-LYS-THR-ARG-SER-VAL-THR-SER-SER-SER-LEU-CYS-VAL-GLY				
	145	150	155	160
VAL-ASP-ALA-ASN-ARG-ASN-TRP-ASP-ALA-GLY-PHE-GLY-LYS-ALA-GLY-ALA-SER-SER-SER-PRO				
	165	170	175	180
CYS-SER-GLU-THR-TYR-HIS-GLY-LYS-TYR-ALA-ASN-SER-GLU-VAL-GLU-VAL-LYS-SER-ILE-VAL				
	185	190	195	200
ASP-PHE-VAL-LYS-ASN-HIS-GLY-ASN-PHE-LYS-ALA-PHE-LEU-SER-ILE-HIS-SER-TYR-SER-GLN				
	205	210	215	220
LEU-LEU-LEU-TYR-PRO-TYR-GLY-TYR-THR-THR-GLN-SER-ILE-PRO-ASP-LYS-THR-GLU-LEU-ASN				
	225	230	235	240
GLN-VAL-ALA-LYS-SER-ALA-VAL-ALA-ALA-LEU-LYS-SER-LEU-TYR-GLY-THR-SER-TYR-LYS-TYR				
	245	250	255	260
GLY-SER-ILE-ILE-THR-THR-ILE-TYR-GLN-ALA-SER-GLY-GLY-SER-ILE-ASP-TRP-SER-TYR-ASN				
	265	270	275	280
GLN-GLY-ILE-LYS-TYR-SER-PHE-THR-PHE-GLU-LEU-ARG-ASP-THR-GLY-ARG-TYR-GLY-PHE-LEU				
	285	290	295	300
LEU-PRO-ALA-SER-GLN-ILE-ILE-PRO-THR-ALA-GLN-GLU-THR-TRP-LEU-GLY-VAL-LEU-THR-ILE				
	305			
MET-GLU-HIS-THR-VAL-ASN-ASN				
-LEU-				

Figura 5.- Seqüència d'aminoàcids de la CPA de pàncreas boví amb indicació de les substitucions al·lelomorfiques. Les fletxes indiquen els llocs de trencament que originen les formes R_α , R_β i R_γ .

Al voltant d'una tercera part de la molècula es troba plegada en hèlix- α (37,5%), la qual es divideix en vuit segments curts alguns dels quals no presenten una hèlix- α típica. El nucli de la molècula està format per diferents plegaments en full β , amb cadenes peptídiques paral·leles i antiparal·leles. El plegament β constitueix el 14,6 % de la molècula i dóna al seu centre una estructura rígida. En la seqüència d'aminoàcids les zones plegades en α i β es van alternant. El 47,5% restant de la molècula es considera que es troba en cabdell estadístic. Aquestes parts desestructurades, des del punt de vista d'estructures secundàries, semblen sofrir canvis conformacionals en el moment de fixar el substrat. S'han trobat també evidències que la CPA bovina presenta tres dominis estructurals globulars que comprenen els residus 1-125, 126-189 i 190-307 (69,70).

Aquests primers estudis per difracció de Raigs X van ésser posteriorment revisats (71-74) i refinats fins a una resolució d'1.75 Å (75). A part, s'han estudiat també per difracció de Raigs X els complexos formats per pseudo-substrats tals com Gly-L-Tyr i Phe-Gly-Phe-Gly amb l'enzim i els complexos amb inhibidors (71, 74-76). A partir d'aquests treballs juntament amb estudis de modificació química de determinats residus (Tyr, His, Glu) seguits per mesures cinètiques, portats a terme principalment pels grups de Vallee i Neurath (77), s'han pogut identificar els residus de la CPA que intervenen en el mecanisme catalític, així com els que intervenen en la fixació del substrat, i proposar un mecanisme d'hidròlisi de l'enllaç peptídic per part de la CPA.

A la figura 6a es mostren els residus que participen en la fixació dels substrat curt Gly-L-Tyr. L'àtom de Zn^{2+} es troba coordinat amb tres residus de l'enzim que són la His-69 (N1 de l'imidazol), el Glu-72 (O

carboxílic) i la His-196 (N1 de l'imidazol). La quarta posició formant un tetraedre distorsionat està ocupada per una molècula d'aigua.

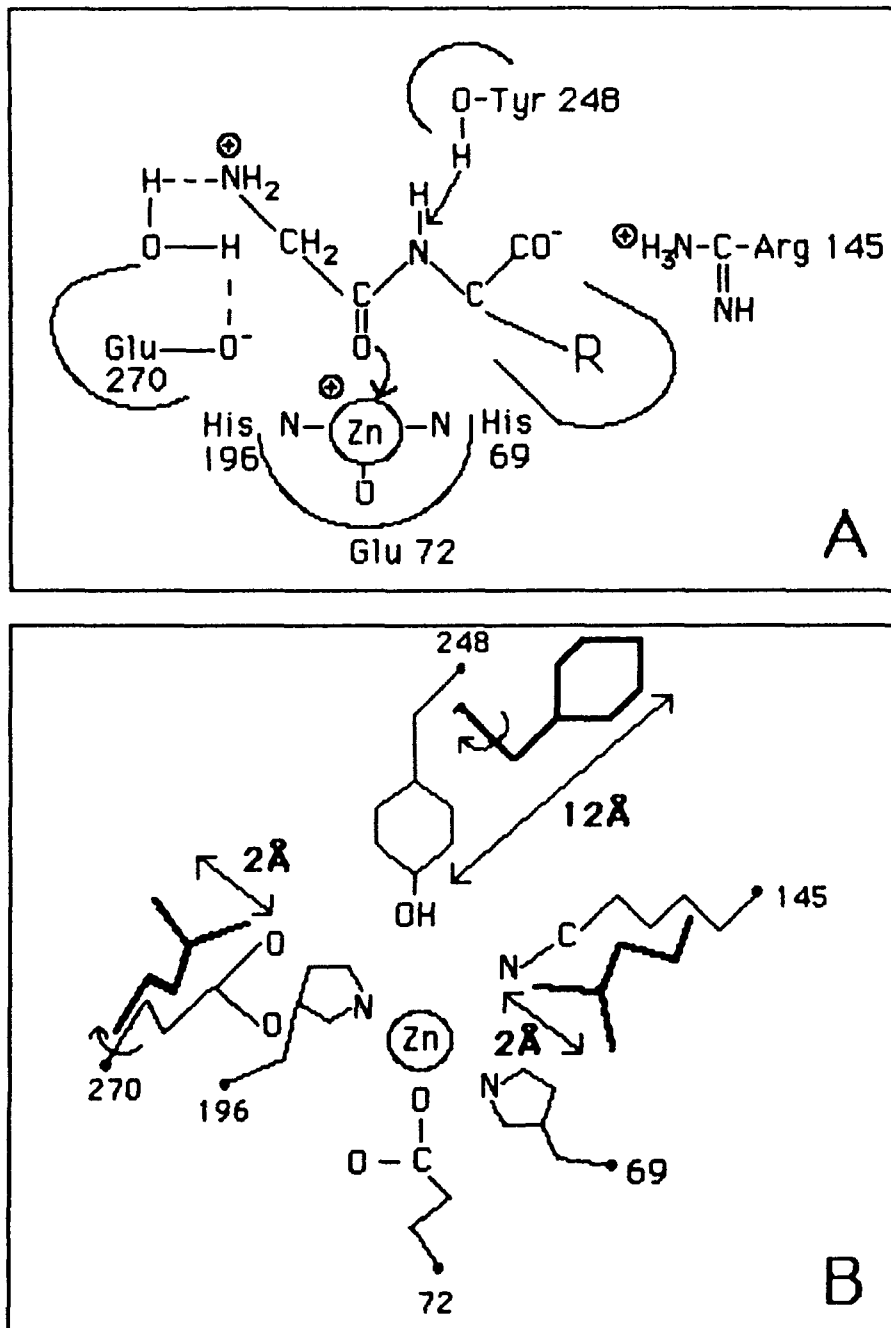


Figura 6.- A) Esquema de la fixació del substrat Gly-L-Tyr al centre actiu de la carboxipeptidasa A.

B) Esquema dels moviments dels residus implicats en la catàlisi i unió del substrat anterior.

El substrat es col·loca en la cavitat que conté l'àtom de Zn^{2+} . La cadena lateral aromàtica d'aquest (grup fenòlic) entra dins d'una butxaca hidrofòbica que és suficientment gran per acomodar la cadena lateral d'un triptòfan. La presència d'aquesta butxaca hidrofòbica pot explicar l'especificitat de la CPA per hidrolitzar preferentment aminoàcids de cadena lateral aromàtica o alifàtica neutra. El grup carboxil lliure del substrat interacciona amb l'arginina 145 formant un enllaç de tipus salí. L'oxigen carbonílic de l'enllaç peptídic a trencar reemplaça la molècula d'aigua que forma una de les posicions de coordinació de l'àtom de Zn^{2+} . Per últim, el Glu-270 s'uneix a través d'una molècula d'aigua al grup amino N-terminal lliure del substrat (només en el cas de dipèptids com a substrats).

Totes aquestes interaccions, en fixar el substrat, comporten una sèrie de moviments dels residus implicats que es mostren en la Figura 6b. El grup guanidini de l'Arg-145 es mou 2 Å a causa de la rotació de la cadena lateral al voltant de l'enllaç C_{β} ---- C_{γ} . A la vegada, el carboxilat del Glu-270 també es mou 2 Å per la rotació al voltant dels enllaços C_{α} ---- C_{β} i C_{β} ---- C_{γ} . El moviment més gran, però, l'experimenta la Tyr-248, la qual es mou 12 Å per rotació al voltant de l'enllaç C_{α} ---- C_{β} fins a posicionar l'OH fenòlic a prop del N de l'enllaç peptídic. A més, hi ha una sèrie de moviments coordinats de l'esquelet peptídic. Sembla ésser que la unió del carboxil lliure del substrat a l'Arg-145 és la causa que dispara tota la sèrie de moviments exposats. Tots aquests canvis conformacionals s'han considerat com un exemple de la teoria de Koshland de l'encaix induït (78).

Recopilant tota aquesta informació, Lipscomb i col. van postular un possible mecanisme de catàlisi en la qual es veuen implicats l'àtom de Zn^{2+} i els residus de Tyr-248 i Glu-270. La funció de l'àtom de Zn^{2+} és actuar com un àcid de Lewis i polaritzar el carbonil de l'enllaç peptídic, fent-lo susceptible al trencament. Mentre que el Glu-270 funciona com a nucleòfil atacant l'àtom d'oxigen carbonílic, bé directament o bé mitjançant una molècula d'aigua intermediària. Un cop efectuat aquest atac la Tyr-248, via un enllaç per pont d'hidrogen, dona un protó al N de l'enllaç peptídic a hidrolitzar. Aquest mecanisme s'especifica a la figura 7. En el cas A de l'esmentada figura, l'atac del Glu-270 es fa directament formant-se un anhidrid intermediari abans del trencament de l'enllaç peptídic. Mentre que en el cas B l'atac és mitjançat per una molècula d'aigua i no es forma l'esmentat intermediari.

Lipscomb i col. han postulat també els llocs de fixació d'un substrat llarg. En aquest cas, l'enllaç entre el Glu-270 i el grup amino de l'enllaç a trencar es fa directament sense la participació d'una molècula d'aigua. A part de les interaccions ja esmentades pel substrat curt, es produeixen interaccions de la cadena d'aas. a hidrolitzar amb l'arginina 71, la tirosina 198, la fenilalanina 279 i l'arginina 124, la qual cosa dona lloc a cinc possibles sublocs de fixació del substrat. S'ha trobat que la naturalesa de la cadena lateral d'almenys cinc residus comptats a partir del C-t del pèptid a hidrolitzar, té una gran influència en les constants catalítiques de la CPA.

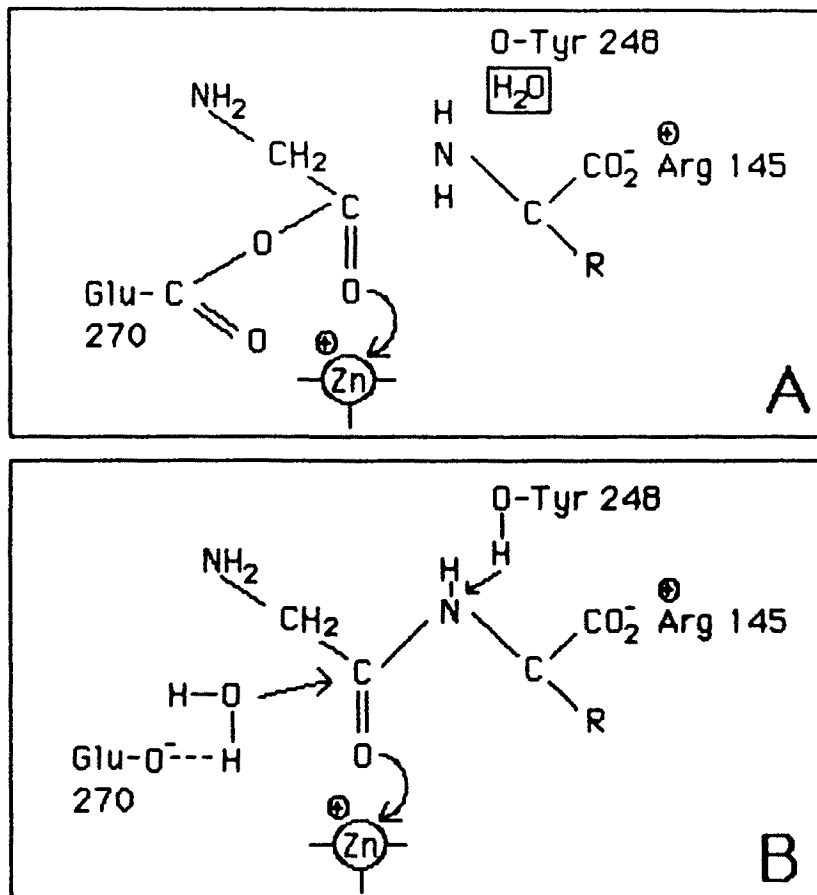


Figura 7.- Mecanisme catalític proposat per a la CPA.

A) Formació d'un intermediari de tipus anhídrid

B) Atac del Glu-270 mitjançat per una molècula

d'aigua, sense formació de l'anhídrid essentat.

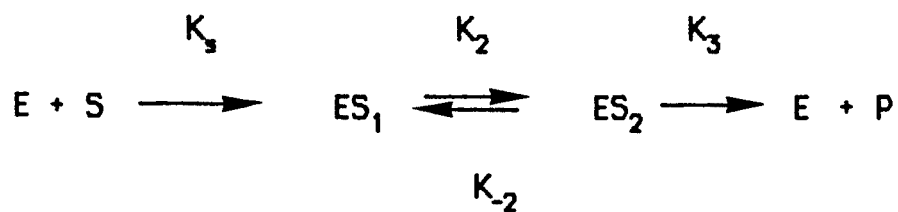
Sobre els mecanismes de catàlisi dels substrats tipus ester, els estudis fets no tenen una base estructural com els descrits fins ara per a substrats peptídics, però s'ha trobat que moltes modificacions químiques de la CPA, incloent substitucions del metall del centre actiu, afecten les dues activitats, peptidàsica i esteràsica, de la CPA, de forma diferent (79,80). Aquest fet sembla evidenciar diferents mecanismes d'hidròlisi per a una i altra activitats.

Malgrat els nombrosos estudis cinètics i cristal·logràfics realitzats que recolzen el mecanisme catalític exposat abans, recentment Gardell i col. (81) han demostrat que la tirosina 248 no té un paper tan crucial com el que se li ha assignat en el trencament de l'enllaç peptídic. Els esmentats autors han modificat el cDNA de la CPA de rata per mutagènesi dirigida, reemplaçant el codò que codifica per Tyr pel que codifica per Phe. Han expressat el cDNA modificat en llevat, via el sistema del factor- α , i han aïllat i caracteritzat enzimàticament la CPA modificada (CPA Phe-248) comparant-la amb el tipus salvatge (CPA Tyr-248).

Els resultats d'aquesta comparació han estat els següents: la constant catalítica (K_{cat}) per a la hidròlisi de diferents substrats de tipus peptídic o ester pràcticament no varia, mentre que la constant de Michaelis (K_m) per aquests mateixos substrats peptídics així com la constant d'inhibició (K_i) de l'inhibidor de patates de la CPA, s'incrementen 6 i 70 vegades, respectivament. Per tant, aquests resultats suggereixen que l'OH fenòlic de la Tyr-248 no participa directament com a dador de protons, però, en canvi, l'anell fenòlic pot participar com a fixador del substrat. Postulen els autors que el Glu-270 o bé una molècula d'aigua poden substituir el paper assignat a la Tyr-248 en base a un mecanisme similar al proposat per a la termolisina, una metalloendoproteasa evolutivament relacionada amb la CPA (82).

Cal tenir en compte que aquest fet no és, fins a cert punt, sorprenent, ja que el mecanisme catalític proposat per Lipscomb i col. es depenent del fet que l'estructura de la CPA cristallitzada sigui la mateixa que en dissolució. Mesures cinètiques efectuades recentment per Vallee i col. (80) amb una CPA modificada en la Tyr-248 indiquen que

ambdues estructures són diferents. S'ha proposat fins i tot que quan la CPA es troba en dissolució, l'àtom de Zn^{2+} està pentacoordinat (83). A part, per determinar correctament el mecanisme d'un enzim, cal esbrinar cada pas implicat tant en l'unió com en la catàlisi del substrat. Això requereix una descripció cinètica completa de tots els intermediaris formats, així com la seva identificació estructural. La visualització directa d'aquests intermediaris és molt difícil ja que, com és obvi, la seva formació i destrucció són molt ràpides sobretot quan es treballa amb un diguem-ne "bon substrat". Darrerament aquest problema s'ha intentat solventar mitjançant el desenvolupament d'un aparell de stopped-flow computeritzat que treballa a baixa temperatura i que incorpora un detector espectrofotomètric d'escombrat ràpid. Amb aquest aparell s'ha estudiat el mecanisme de la CPA (84) per mesura dels paràmetres cinètics i de l'espectre dels intermediaris catalítics. A $-20^{\circ}C$ sembla que s'observen dos intermediaris els quals s'ajusten a l'esquema cinètic:



i no hi ha cap evidència de formació d'un anhidrid intermediari (84).

Aquests estudis críocinètics i crioespectroscòpics semblen, no obstant, corroborar l'existència de dos mecanismes d'hidròlisi diferents per a substrats de tipus peptídic i tipus ester, ja que en un i altre cas els intermediaris detectats són diferents.

Fins al moment, s'ha intentat fer un recull dels trets més importants que es coneixen sobre la CPA. Malauradament, es coneixen moltes menys coses sobre el seu zimogen o PCPA i encara menys del fragment N-terminal alliberat en l'activació d'aquest últim.

Es interessant ressaltar que els zimògens de les CPAs presenten una activitat intrínseca residual que indica que el centre actiu de l'enzim ja està preformat en el zimogen (48,85). El centre catalític d'aquest sembla ésser funcional mentre que el centre de fixació de substrats sembla estar en una conformació incorrecta o bé estar bloquejat. Cal recordar que la proteòlisi limitada pot induir un canvi conformacional que faci que el centre de fixació de substrats sigui més funcional.

Igual com amb les CPAs, les PCPAs més estudiades són les de pàncreas de bou. Possiblement el punt més interessant d'estudi sigui el seu procés d'activació. Aquest procés en el cas de PCPA de pàncreas de bou, a causa de la seva naturalesa oligomèrica, és difícil d'estudiar. Ha calgut separar les subunitats a fi d'estudiar el procés d'activació de la subunitat PCPA aïllada i comparar-lo amb el de la forma oligomèrica a fi de veure el possible efecte de les subunitats acompanyants.

S'han intentat diferents mètodes per a la separació de les subunitats de la PCPA de pàncreas de bou. La separació s'ha aconseguit en medi alcalí fort (pH 10.5) (43), però les subunitats queden desnaturalitzades o parcialment degradades. També el tractament amb anhídrid succínic (86,87) aconsegueix la separació de les subunitats però queden totes les Lys modificades irreversiblement, la qual cosa dificulta l'estudi del procés d'activació. L'únic camí trobat fins al moment per a obtenir les tres subunitats de la PCPA de pàncreas de bou separades i en estat natiu és el tractament amb anhídrid 2,3-dimetilmaleic (88). De

les tres subunitats separades la I correspon a la PCPA, la II a una molècula de QTC i la III a una proteïna no activable per cap biomolècula, encara que s'han trobat evidències de la seva analogia estructural, funcional i evolutiva amb les elastases i la proteasa E pancreàtiques (41-45).

S'han fet estudis d'activació de la subunitat I aïllada i dels complexos oligomèrics. Mitjançant aquests estudis Brown i col. (89) van proposar un mecanisme d'activació del complex binari i del complex ternari que s'esquematitzen en la figura 8. Segons experiments realitzats per aquests autors en condicions no fisiològiques, la tripsina activa més ràpidament la subunitat II (QTC) que la I (PCPA), i es produeix al final del procés d'activació una dissociació del complex inicial. La subunitat III no sembla jugar un paper gaire important. Estudis posteriors de Puigserver i col. (90) semblen, en canvi, indicar que l'activació de la PCPA està sensiblement influida per la presència de les altres subunitats. De totes maneres, encara avui es dubta que es produeixi la dissociació del complex un cop activat, malgrat les raons funcionals que recolzen aquesta hipòtesi (46).

Encara que la tripsina sembla ésser la proteasa activant de la PCPA més acceptada, existeixen indicis que altres proteases tipus QT poden participar en el procés d'activació (91). Per tant, és possible que les pròpies subunitats del complex participin en aquest procés quedant així explicat el paper biològic que poden jugar. Aquest fet tal vegada és més evident en el sistema enzimàtic equivalent en porc, el qual es comentarà més endavant.

Tal com es pot veure, donada la complexitat del sistema enzimàtic de pàncreas de bou i tenint en compte que els nombrosos estudis del procés d'activació s'han fet en una gran varietat de condicions que no

permeten comparació, es fa molt difícil formular un mecanisme d'activació precís.

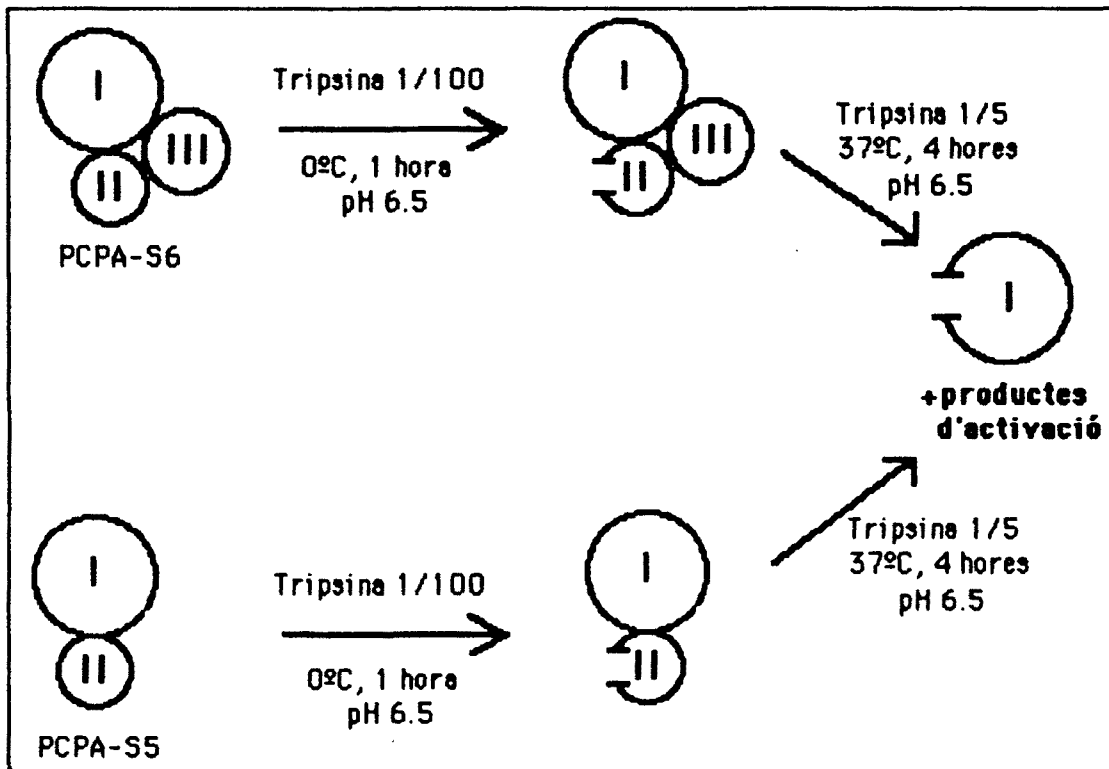


Figura 8.- Mecanisme d'activació proposat per als complexos binari i ternari de la PCPA de pàncreas de bou (44).

Altres estudis efectuats amb les procarboxipeptidases són de tipus cinètic ja que, com s'ha esmentat abans, presenten activitat residual. Uren i Neurath (85) han demostrat que la constant catalítica per

a substrats tipus ester es 20 vegades més petita que la de l'enzim actiu, mentre que la constant de Michaelis és de 100 a 300 vegades més gran. Per a substrats de tipus peptídic, la constant catalítica és de 100 a 400 vegades més petita mentre que la K_m pràcticament no varia. A més, la constant d'inhibició per al dipèptid glicil-L-tirosina és similar per al zimogen i per a l'enzim actiu. Tots aquests resultats indiquen que el centre actiu ja està preformat en el zimogen encara que la seva conformació i accessibilitat no és òptima. Els residus que participen en la catàlisi (Glu-270 i Tyr-248), així com l'àtom de Zn^{2+} en la CPA, són els mateixos en el proenzim. No obstant, els autors proposen que l'activació de la PCPA indueix un canvi conformacional que altera l'estructura del glutàmic 270, incrementant la reactivitat d'aquest nucleòfil.

Quan s'han fet comparacions de les constants d'estabilitat d'unió del metall a l'enzim actiu i al zimògen s'ha trobat que en aquest últim el metall està unit més fortament (92). A més, sembla ésser que el proenzim presenta 2 àtoms de Zn^{2+} per mol de proteïna. La funció de l'àtom de Zn^{2+} extra és, per al moment, desconeguda (66).

Per últim, i com és d'esperar, estudis cinètics amb substrats de diferent longitud han demostrat que quant més llargs són aquests més augmenta l'activitat de la CPA mentre que succeeix el contrari amb la PCPA, probablement perquè no s'adapten al centre actiu d'aquesta, presumiblement per l'impediment estèric del segment d'activació (93).

Pel que fa referència a estudis estructurals de la PCPA, fins al moment no es coneix que s'hagi pogut cristal·litzar i estudiar per difracció de raigs X la conformació de l'esmentat zimogen en cap de les espècies estudiades. En canvi, s'ha arribat a trobar l'estructura primària d'una PCPA, la provinent de pàncreas de rata (94) la seqüència de la qual es mostra en la Figura 9.

	5	10	15	20
MET-LYS-ARG-LEU-LEU-ILE-LEU-SER-LEU-LEU-LEU-GLU-ALA-VAL-CYS-GLY-ASN-GLU-ASN-PHE				
	25	30	35	40
VAL-GLY-HIS-GLN-VAL-LEU-ARG-ILE-SER-ALA-ALA-ASP-GLU-ALA-GLN-VAL-GLN-LYS-VAL-LYS				
	45	50	55	60
GLU-LEU-GLU-ASP-LEU-GLU-HIS-LEU-GLN-LEU-ASP-PHE-TRP-ARG-ASP-ALA-ALA-ARG-ALA-GLY				
	65	70	75	80
ILE-PRO-ILE-ASP-VAL-ARG-VAL-PRO-PHE-PRO-SER-ILE-GLN-SER-VAL-LYS-ALA-PHE-LEU-GLU				
	85	90	95	100
TYR-HIS-GLY-ILE-SER-TYR-GLU-ILE-MET-ILE-GLU-ASP-VAL-GLN-LEU-LEU-ASP-GLU-GLU				
	105	110	115	120
LYS-GLN-GLN-MET-SER-ALA-PHE-GLN-ALA-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ASP-SER-PHE-ASN-TYR-ALA				
	125	130	135	140
THR-TYR-HIS-THR-LEU-ASP-GLU-ILE-TYR-GLU-PHE-MET-ASP-LEU-LEU-VAL-ALA-GLU-HIS-PRO				
	145	150	155	160
GLN-LEU-VAL-SER-LYS-ILE-GLN-ILE-GLY-ASN-THR-PHE-GLU-GLY-ARG-PRO-ILE-HIS-VAL-LEU				
	165	170	175	180
LYS-PHE-SER-THR-GLY-GLY-THR-ASN-ARG-PRO-ALA-ILE-TRP-ILE-ASP-THR-GLY-ILE-HIS-SER				
	185	190	195	200
ARG-GLU-TRP-VAL-THR-GLN-ALA-SER-GLY-VAL-TRP-PHE-ALA-LYS-LYS-VAL-THR-LYS-ASP-TYR				
	205	210	215	220
GLY-GLN-ASP-PRO-THR-PHE-THR-ALA-VAL-LEU-ASP-ASN-MET-ASP-ILE-PHE-LEU-GLU-ILE-VAL				
	225	230	235	240
THR-ASN-PRO-ASP-GLY-PHE-ALA-TYR-THR-HIS-LYS-THR-ASN-ARG-MET-TRP-ARG-LYS-THR-ARG				
	245	250	255	260
SER-HIS-THR-GLN-GLY-SER-LEU-CYS-VAL-GLY-VAL-ASP-PRO-ASN-ARG-ASN-TRP-ASP-ALA-GLY				
	265	270	275	280
LEU-GLY-LYS-ALA-GLY-ALA-SER-SER-ASN-PRO-CYS-SER-GLU-THR-TYR-ARG-GLY-LYS-PHE-PRO				
	285	290	295	300
ASN-SER-GLU-VAL-GLU-VAL-LYS-SER-ILE-VAL-ASP-PHE-VAL-THR-SER-HIS-GLY-ASN-ILE-LYS				
	305	310	315	320
ALA-PHE-ILE-SER-ILE-HIS-SER-TYR-SER-GLN-LEU-LEU-LEU-TYR-PRO-TYR-GLY-TYR-THR-SER				
	325	330	335	340
GLU-PRO-ALA-PRO-ASP-GLN-ALA-GLU-LEU-ASP-GLN-LEU-ALA-LYS-SER-ALA-VAL-THR-ALA-LEU				
	345	350	355	360
THR-SER-LEU-HIS-GLY-THR-GLU-PHE-LYS-TYR-GLY-SER-ILE-ILE-ASP-THR-ILE-TYR-GLN-ALA				
	365	370	375	380
SER-GLY-SER-THR-ILE-ASP-TRP-THR-TYR-SER-GLN-GLY-ILE-LYS-TYR-SER-PHE-THR-PHE-GLU				
	385	390	395	400
LEU-ARG-ASP-THR-GLY-LEU-ARG-GLY-PHE-LEU-LEU-PRO-ALA-SER-GLN-ILE-ILE-PRO-THR-ALA				
	405	510	415	
GLU-GLU-THR-TRP-LEU-ALA-LEU-LEU-THR-ILE-MET-ASP-HIS-THR-VAL-LYS-HIS-PRO-TYR				

Figura 9.- Seqüència d'aminòcids de la pre-PCPA de pàncreas de rata (94). La zona emmarcada indica la seqüència corresponent al segment d'activació.

I 4.- PROCARBOXIPEPTIDASES A I CARBOXIPEPTIDASES A DE PÀNCREAS DE PORC.

Aquests enzims i proenzims han constituït el material bàsic d'aquesta Tesi i, per tant, els coneixements que es tenen sobre ells mereixen la nostra atenció. La procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc es pot obtenir a partir de suc pancreàtic (45) o bé a partir de l'extracte aquós de pols cetònic de pàncreas dessecats i desengreixats seguint el mètode de Folk i Schirmer (95), modificat per Martínez i col. (48) i darrerament millorat pel nostre grup (96) (veure apartat M1.1.1). En una primera caracterització d'aquests enzims s'han trobat les següents propietats químiques i físiques:

1.- Es presenta en dues formes: en forma monomèrica o procarboxipeptidasa A II (abreu. PCPA-II) i en forma de complex binari per associació a una subunitat que és el precursor d'un enzim que té activitat relacionada amb l'elastasa, subunitat identificada com a proproteasa E (47,48,97) (abreu. PPE). Aquest complex binari l'anomenem procarboxipeptidasa A -I (abreu. PCPA-I).

2.- La PCPA I i PCPA-II presenten coeficients d'absorció a 280 nm de 19.9 ± 0.3 i 16.3 ± 0.3 , respectivament. Els volums específics parcials són $\bar{v}^{\circ} = 0.707 \pm 0.016 \text{ cm}^3/\text{g}$ i $0.714 \pm 0.015 \text{ cm}^3/\text{g}$. I els coeficients de sedimentació i difusió $s_{20w}^{\circ} = 4.90 \pm 0.155$ i $s_{20w}^{\circ} = 3.75 \pm 0.15 \text{ S}$, $D_{20w}^{\circ} = (58 \pm 0.1) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ i $(6.95 \pm 0.15) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, fent referència sempre el primer valor al complex binari i el segon al monòmer (98). A partir d'aquestes dades es van calcular pesos moleculars de 71000 ± 4000 per la PCPA-I i de 46000 ± 3000 per la PCPA-II, valors que coincideixen amb els trobats per electroforesi en SDS (47,48).

3.- Ambdós proenzims són glicoproteïnes, sense grups tiol lliures, contenen 2 àtom-gram de Zn^{2+} per mol de proenzim (99) i no coneix fins al moment la funció del segon àtom de Zn^{2+} .

El fet que el sistema enzimàtic de pàncreas de porc es presenti en dues formes, una en complex binari i una monomèrica, facilita l'estudi del procés d'activació. En el nostre grup s'han dut a terme estudis d'aquesta naturalesa (48,100) comparant el procés d'activació de la forma monomèrica amb el de la forma binaria. A la vegada, i donat que ha estat possible separar les dues subunitats del complex binari mitjançant una cromatografia de bescanvi iònic en presència d'urea 7M (100), s'ha reformat el complex binari PCPA-I o el complex artificial PCPA-II/PPE i s'ha estudiat seguidament el mecanisme d'activació triptica d'aquests complexos (100).

A partir d'aquests estudis s'ha trobat que l'activació inicial de la PCPA-II (monòmer) per acció de la tripsina és molt més ràpida que en el cas de la forma dimèrica (sigui natural o reassociada). No obstant, al cap d'1-2, hores l'activitat del complex binari es fa més elevada que la de la forma monomèrica. Aquest fet indica que la subunitat PPE alenteix el procés d'activació en els seus primers estadis, encara que un cop iniciada l'activació aquesta es veu ajudada per la seva presència.

Un altre punt a tenir en compte, i que es dedueix de les observacions experimentals abans esmentades, és el fet que el complex binari natural i el reconstituït, així com l'híbrid format per la PCPA-II i la PPE aïllada, donen exactament el mateix "pattern" d'activació. Això fa pensar que la subunitat PCPA del complex binari pot presentar identitat estructural amb la forma monomèrica. Ja es tenien indicis d'aquest fet en el treball de Martínez i col. (48) quan es va analitzar per electroforesi en SDS el pattern de trencament de les dues formes enzimàtiques, monòmer i

dímer, per BrCN, pattern que va ésser pràcticament idèntic amb excepció de dues bandes atribuïdes a la PPE. Posteriorment aquest fet s'ha confirmat en analitzar per cromatografia líquida d'alta resolució el mapa peptídic que prové d'una digestió triptica de la forma monomèrica i la subunitat PCPA aïllada del complex binari (101). Ambdós perfils cromatogràfics són pràcticament idèntics, eluint-se en les mateixes posicions aquells pics que contenen Tyr, His i Trp. Aquest resultat fa pensar que la seqüència d'ambdós enzims si no és idèntica serà molt similar.

Quan s'activa la PCPA monomèrica amb tripsina, seguint una proteòlisi limitada, s'obté l'enzim actiu amb un pes molecular de 34800 i un fragment N-terminal de pes molecular entre 11 i 12000 (48,95). A més, quan s'ha analitzat per electroforesi en medi no dissociant l'activació d'aquests proenzims, s'ha trobat que es generen dues formes diferents de CPA (96) anomenades A_1 i A_2 per Folk i Schirmer (95). Aquests darrers autors han trobat també una tercera forma de CPA en pàncreas de porc que anomenen A_3 , que apareix en preparacions en les quals s'ha produït autòlisi en el material biològic de partida., presumiblement per acció de proteases tipus quimotripsina. Aquesta tercera forma, A_3 , també ha estat trobada pel nostre grup, ja que en el procés de purificació (96) el pic cromatogràfic amb activitat CPA és una barreja de les tres formes esmentades. Totes elles tenen quasi la mateixa activitat catalítica encara que diferent N-terminal la qual cosa ha fet pensar que són equivalents a les formes α (A_1), β (A_2) i γ (A_3) descrites per a la PCPA bovina (62).

Fins al moment, només ha estat publicada la seqüència d'uns quants aminoàcids del N-terminal de la CPA de pàncreas de porc (102). En canvi es té més informació sobre la seqüència N-terminal de la PCPA de pàncreas de porc ja que s'ha arribat a seqüenciar tot el segment d'activació, tal com es comentarà en el següent apartat. En la Figura 10 es comparen les seqüències N-terminal d'aquesta última amb la seqüència N-terminal de la PCPA de pàncreas de rata (94) així com amb la de la PCPB de pàncreas de porc (101) i lungfish (55).

	1	10	20	30
(r-A)	NENFYØHQVLRISA	AD	EAQVQKVEELEDLEHL	-QLDFW
(p-A)	KEDFYØHQVLRISV	DDEA	QVQKVKEL	DLAFL-QL
(p-B)	SSSØEHFEØEKVF	HVNVED	ENDIQ---	ELAELAHXXQIDFW
(l-B)	EPTPRSFNØDKV	FRV		
	1	10	20	30

Figura 10.- Comparació de les seqüències N-t de la PCPA i PCPB porcines, (p-A) i (p-B), respectivament, amb la PCPA de rata (r-A) i PCPB de "lungfish" (l-B). X= residu desconegut.

Cap forma de CPA ni PCPA porcines ha estat, fins al moment, estudiada per difracció de Raigs X. Les dades conformacionals detallades són, per tant, mínimes, però comparant les dades cinètiques que es tenen per CPA i PCPA porcines amb les corresponents bovines es pot deduir que el mecanisme catalític ha d'ésser el mateix.

I 5.- EL SEGMENT D'ACTIVACIÓ DE LA PCPA MONOMERICA DE PÀNCREAS DE PORC.

En el nostre laboratori s'ha aconseguit d'obtenir el segment d'activació de la PCPA monomèrica (abreu. saA) alliberant-lo d'aquesta per proteòlisi limitada amb tripsina i separant-lo mitjançant una cromatografia de bescanvi iònic en presència d'urea 7M (18). Es tracta del primer segment d'activació aïllat d'una PCPA. El pes molecular d'aquest segment es troba entre 11500 i 12000, segons electroforesi en presència de SDS i anàlisi d'aminoàcids, el que correspon a uns 100-103 residus (18). Aquest pes molecular es correspon bé amb el pes molecular de la regió d'activació de la PCPA de rata, recentment seqüenciada (94)(PM 10865-corresponent a 94 residus) (veure Fig. 9), així com amb el d'un segment aïllat de PCPB de pàncreas de "lungfish" (55). En canvi, no es correspon amb el pes molecular assignat a un fragment d'activació aïllat de la PCPA trimèrica de pàncreas de bou, el qual sembla ésser de 6800 (87).

L'anàlisi d'aminoàcids ha revelat que es tracta d'un pèptid amb un elevat contingut d'aminoàcids àcids i hidrofòbics, que no conté cap residu de Cys i el seu N-terminal és Lys.

En una primera caracterització d'aquest segment d'activació s'ha trobat que és un potent inhibidor competitiu de l'enzim actiu, amb una constant d'inhibició d'1,9 nM. Així mateix, inhibeix la CPA de pàncreas de bou amb una constant d'inhibició de 4.5 nM, però no la CPB de pàncreas de porc (18). Aquesta elevada especificitat per les formes A no la presenta cap altre inhibidor natural estudiat fins al moment, com el de patata (10) o el d'*Ascaris lumbricoides* (103). Aquest fet el fa molt interessant per dur

a terme estudis estructurals semblants als realitzats amb altres inhibidors, sobretot si fos possible de cristal·litzar el complex CPA-saA o la forma natural PCPA.

Quan la PCPA és activada per la tripsina, en els primers estadis de la digestió es genera una espècie de CPA i una altra de segment d'activació. L'acció posterior de la tripsina només pot escurçar lleugerament la longitud d'aquest segment d'activació però no el trenca en pèptids petits (104). Això va fer pensar per primera vegada que el segment d'activació aïllat de la PCPA podia constituir un domini estructural que adopta una conformació plegada i per tant no atacable per la tripsina (18).

A causa d'aquest fet, s'ha començat a caracteritzar estructuralment aquest segment mitjançant estudis de diroisme circular i ressonància magnètica nuclear (105). Els estudis de DC han revelat un contingut d'hèlix- α del 57-65% amb poca estructura β , només d'un 8-11%. Per altra banda, estudis de RMN de protó (270 MHz) indiquen que el saA adopta una estructura plegada amb característiques pròpies de proteïnes globulars. Així, per exemple, en l'espectre apareixen una sèrie de ressonàncies pròpies de grups alquil de residus apolars desplaçades a camps alts pel fet de trobar-se propers a anells aromàtics (RCS), les quals desapareixen en augmentar la temperatura, indicant un clar desplegament de la proteïna. De totes maneres, la desaparició d'aquestes ressonàncies no s'aconsegueix fins a arribar a 90°C, la qual cosa indica que es tracta d'una proteïna amb una conformació altament termoestable.

Molt recentment en el nostre laboratori s'ha aconseguit determinar la seqüència d'aminoàcids completa del segment estudiat (106) la qual es mostra en la Figura 11 on es compara aquesta seqüència amb la de rata (94). Com es pot observar el grau d'homologia entre els dos

I 6.- PROTEINES FIXADORES DE Ca^{2+} DE LA FAMÍLIA EF-HAND.

La família EF-hand conté tota una sèrie de proteïnes que fixen Ca^{2+} específicament a través d'una estructura coneguda com a tipus "EF-hand". Un EF-hand es pot descriure com una seqüència lineal de 29-35 residus on les regions N i C-terminals plegades en hèlix- α flanquegen un pont de 12 residus on es fixa un àtom de Ca^{2+} (107,108), tal com es presenta a la figura 12.

Fins al moment es coneixen 6 tipus principals de proteïnes que contenen la seqüència anomenada EF-hand, aquestes són: les parvalbúmines (abreu. PVA), les troponines C (abrev TNC), les calmodulines (abrev CAL), la cadena lleugera de la miosina, les proteïnes intestinals fixadores de Ca^{2+} (abreu. ICaBP) i les S-100 (107,109). De totes aquestes famílies, només les troponines C, les calmodulines i la cadena lleugera de la miosina tenen una funció clara i coneguda. Les altres se sap que fixen Ca^{2+} , però no es coneix quina funció poden tenir.

Totes aquestes proteïnes, a part de presentar una estructura primària homòloga amb un contingut elevat d'aminoàcids àcids i hidrofòbics, presenten una estructura secundària amb un elevat contingut d'hèlix- α , molt ben conservada sobretot en la regió fixadora de Ca^{2+} . Així s'ha trobat que la regió en hèlix- α C-terminal s'inicia en el pont fixador de Ca^{2+} . Les dues regions plegades en hèlix- α estan separades per un gir- β (β -turn), el qual té la probabilitat més elevada de localitzar-se en els quatre primers residus del "loop" (108,109).

Els primers estudis estructurals profunds de proteïnes EF-hand van ésser realitzats en cristalls de la parvalbúmina de carpa (pl 4.25)

(110). Es va trobar que aquesta proteïna conté 6 hèlix- α , anomenades de la A a la F, unides per ponts no helicoïdals. L'hèlix E, l'hèlix F i el pont EF entre ambdues ocupen en l'espai una posició anàloga a la d'una mà dreta amb el dit índex i polze estirats i perpendiculars entre si, estant situat l'índex en el pla del paper i el polze sortint cap a fora (veure Fig. 12). El "loop" fixador de Ca^{2+} se situa en la zona d'unió dels dits, és a dir, entre les dues hèlix- α . Aquest domini estructural és el que ha donat nom a tota aquesta família de proteïnes fixadores de Ca^{2+} .

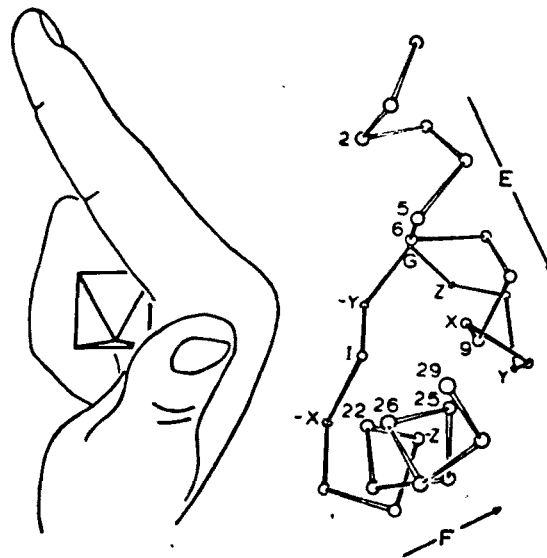


Figura 12.- Esquema d'un lloc de fixació de Ca^{2+} tipus EF-hand. S'indiquen els vèrtexs de l'octàedre per les lletres X, Y, Z, -Y, -X, -Z, les quals representen posicions ocupades per oxigen capaç d'unir el Ca^{2+} . G i I són les posicions corresponents a Gly i Ile de la seqüència, altament conservades.

A partir de dades cristal·logràfiques de les proteïnes d'aquesta família que han pogut ésser estudiades per difracció de Raigs X s'ha trobat que l'àtom de Ca^{2+} està hexacoordinat, ocupant els residus fixadors de Ca^{2+} els vèrtexs d'un octaedre. Aquests vèrtexs que s'han simbolitzat amb les lletres X, Y, Z, -Y, -X i -Z, estan ocupats quasi sempre per àtoms d'oxigen de la cadena lateral d'algun residu o bé de l'esquelet polipeptídic. També és possible que alguns punts de coordinació siguin ocupats pel residu Gly i per una molècula d'aigua (111).

Quan s'han comparat les seqüències de diferents proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand s'ha trobat que els vèrtexs esmentats estan ocupats preferentment per uns determinats aminoàcids igualment com que posicions concretes de les regions en hèlix- α . En la figura 13 s'esquematitza la seqüència tipus d'aquesta regió fixadora de Ca^{2+} amb els residus més probables en les diferents posicions (109).

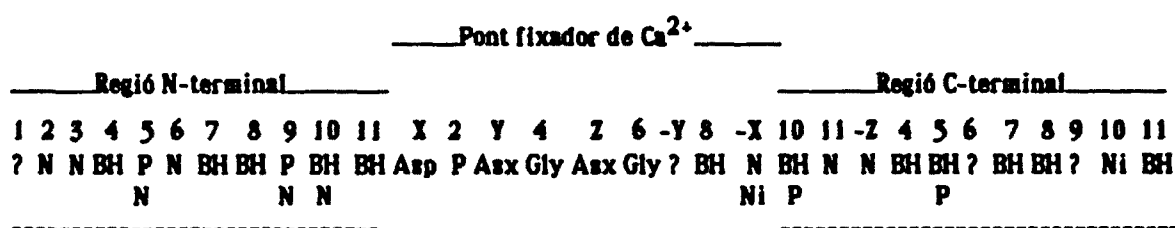


Figura 13.- Seqüència d'aminoàcids més probable d'un EF-hand, segons (109). N= residu carregat negativament, BH= residu hidrofòbic voluminos, P= residu carregat positivament, Ni= residu no iònic, ?= residu molt poc conservat, Asx= Asp o Asn.

La regió fixadora de Ca^{2+} i concretament la seqüència Asp-P-Asx-Gly-Asx-Gly on P representa un aminoàcid carregat positivament, és la millor conservada encara que hi ha excepcions. Per exemple, en les S-100 la posició X del pont està ocupada per un Glu, i precisament aquest aminoàcid és difícil de trobar en un β -turn. Un altre residu altament conservat en aquestes proteïnes es la Gly en les posicions 4 i 6 del pont, però les S-100a i b i les ICaBP són una excepció notable ja que la posició 6 està ocupada per una Lys i una Pro, respectivament. Les posicions 8 i 10 del pont semblen estar ocupades en tots els casos per un aminoàcid hidrofòbic i la posició -Z per un Glu, encara que també es presenten excepcions (109).

Aquestes seqüències homòlogues tipus EF hand es repeteixen en nombre variable, des de 2 (ICaBP) fins a 4 (CAL), al llarg de la seqüència d'aquestes proteïnes segons la família de què es tracti, fixant-se tants àtoms de Ca^{2+} com dominis hi hagi. Per això, s'ha postulat que aquestes proteïnes s'han originat per duplicació gènica (108,109).

Totes aquestes proteïnes presenten una sèrie de característiques que les fan fàcilment identificables:

1.- Un cop han fixat el metall tenen una major resistència a la degradació trípica així com una termoestabilitat substancialment més elevada que en absència del metall (112-115).

2.- El Ca^{2+} pot ésser substituït per altres metalls, entre els quals destaquen els lantànids. Concretament, és molt útil la substitució per Tb^{3+} ja que aquest metall presenta propietats fluorescents que es veuen incrementades en unir-se a la proteïna, permetent així seguir la fixació del metall per espectrocòpia de fluorescència (116-118) o bé per ressonància magnètica nuclear (119,120).

3.- Alguns autors han demostrat que en unir el Ca^{2+} o altres metalls aquestes proteïnes canvien la seva mobilitat electroforètica així com el temps de retenció quan la proteïna es passa a través d'una columna d'HPLC de fase reversa (121-124).

4.- En unir el Ca^{2+} presenten una major capacitat d'interacció amb reïnes hidrofòbiques, propietat que s'ha emprat en determinats casos per a la purificació d'aquests enzims (125,126).

5.- Aquestes proteïnes formen complexos específics amb determinats colorants (Stains-all), complexos que presenten bandes d'absorció al visible a longituds d'ona diferents dels complexos formats per altres proteïnes que no pertanyen a aquesta família. Aquesta propietat ha estat emprada per identificar proteïnes EF-hand (127,128).

S'ha descrit que la fixació del metall provoca una sèrie de canvis conformacionals en les proteïnes EF-hand que comporten una exposició de residus hidrofòbics a l'exterior. Aquests canvis conformacionals es manifesten en una variació de l'estructura secundària, observant-se per dicroïsmo circular generalment un increment en el contingut d'hèlix- α (108,122), i també en una variació de l'estructura terciària ja que els espectres de ressonància magnètica nuclear d'aquestes proteïnes veuen les seves ressonàncies canviades en fixar el metall (108,129,130).

L'exposició de residus a l'exterior en fixar el metall pot ésser la responsable d'algunes de les propietats esmentades abans, així com de la possibilitat d'interacció d'aquestes proteïnes amb altres subunitats o receptors que posin en marxa algun mecanisme biològic determinat. Això és el que es postula en el cas de la calmodulina, de la troponina C i de la cadena lleugera de la miosina, úniques proteïnes d'aquesta família per a les quals es coneix una funció (107,108).

Per tota la sèrie de característiques diferencials que presenten les proteïnes EF-hand la seva identificació i la fixació del metall es pot seguir per una gran diversitat de tècniques : ressonància magnètica nuclear, fluorescència, espectroscòpia normal i de diferència, calorimetria de reacció i diferencial d'escombrat, dicroisme circular.....etc. Aquest és, per tant, un camp ampli i desconegut en el qual s'està treballant molt, sobretot des que es té coneixement que en determinats casos de transformació maligna de cèl.lules de diferents teixits aquesta transformació va acompanyada d'un increment en els nivells de proteïnes fixadores de Ca^{2+} tipus EF-hand, és a dir, un augment de la síntesi proteica d'aquestes proteïnes (131).

El nostre interès en les proteïnes fixadores de Ca^{2+} tipus EF-hand es basa en les evidències que hem trobat en aquesta Tesi sobre l'existència de relacions estructurals entre aquestes proteïnes i el segment d'activació aïllat de la PCPA de pàncreas de porc, evidències que s'exposen i discuteixen en els apartats corresponents de Resultats i Discussió.

I 7.- OBJECTIUS DE LA PRESENT TESI.

Al llarg de tot aquest treball el principal objectiu ha consistit en la caracterització estructural del segment d'activació aïllat de la PCPA monomèrica de pàncreas de porc. Aquesta caracterització ja havia estat iniciada al nostre laboratori i havia donat com a resultat tot allò expressat en l'apartat 15 d'aquesta Introducció. L'estudi de l'estructura secundària i terciària d'aquesta proteïna es va plantejar des de dos aspectes: el seu estudi com a proteïna aïllada i el seu estudi unit a l'enzim actiu, formant el proenzim. L'objectiu d'aquesta duplicitat d'estudi consistia a poder conèixer si l'estructura del saA és la mateixa dins el proenzim que quan es troba aïllat.

De la caracterització estructural prèvia i dels estudis que s'han realitzat s'ha deduït una possible relació del saA amb una família de proteïnes fixadores de Ca^{2+} , la família EF-hand. D'aquest fet ha sorgit el segon gran objectiu d'aquesta Tesi que ha consistit a demostrar una possible funció o activitat secundària per al segment d'activació a més de la seva funció primària d'actuar com un inhibidor específic de la CPA. Aquesta funció secundària que es preten demostrar podria estar relacionada amb les funcions de les proteïnes fixadores de Ca^{2+} , de la família EF-hand. En cas de demostrar-se una funció d'aquest tipus s'obriria un camp molt ampli d'estudi i donaria nova llum sobre els mecanismes d'inhibició de zimògens, en general, i en concret sobre els zimògens de les procarboxipeptidases pancreàtiques. A més, quedaria plenament justificada la biosíntesi d'un fragment d'activació tan llarg l'única funció coneguda del qual, fins al moment, és la d'inhibir la CPA. Donat que demostrar aquesta relació funcional és un projecte de llarg abast podem dir, per ésser

més exactes, que hem començat per caracteritzar la relació estructural i evolutiva del saA amb les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand, caracterització que justifica posteriors estudis funcionals.

MATERIALS I MÈTODES

M1.-MÈTODES CROMATOGRÀFICS.

Les tècniques cromatogràfiques es basen en el fenomen de coeficient de partició o interacció diferencial dels components d'una barreja entre dues fases immiscibles. El concepte de coeficient de partició o distribució descriu la forma en què un determinat compost es distribueix, per si sol entre aquestes fases. El valor del coeficient de partició per cada compost i per cada parella de fases immiscibles és constant, a una mateixa temperatura concreta, i es defineix com el quocient entre la concentració del compost en la fase A i la seva concentració en la fase B.

Les fases entre les quals es distribueix el compost poden ésser sòlid/líquid, líquid/líquid i líquid/gas. En tots els sistemes cromatogràfics, aquestes fases s'anomenen de la següent manera: una fase estacionària, immòbil - la qual pot ésser sòlida, líquida o una barreja de sòlid-líquid - i una fase mòbil - que pot ésser líquida o gasosa - i que flueix a través de la fase estacionària. L'elecció de la fase estacionària i de la fase mòbil per a una determinada separació dependrà dels compostos a separar i dels seus coeficients de partició entre les diferents fases. Així es poden fer les següents combinacions de fases, determinant cada una d'elles un tipus de tècnica cromatogràfica:

(1) Equilibri d'adsorció entre una fase sòlida estacionària i una fase líquida mòbil (cromatografia d'adsorció).

(2) Equilibri de partició entre una fase líquida (o semilíquida) estacionària i una fase líquida mòbil (cromatografia líquid-líquid, per exemple HPLC o en capa prima, i distribució en contracorrent)

(3) Equilibri de partició entre una fase líquida estacionària i una fase gasosa mòbil (cromatografia gas-líquid).

(4) Equilibri de bescanvi iònic entre una fase estacionària formada per una reïna bescanviadora de ions i una fase mòbil líquida formada per electròlits (cromatografia de bescanvi iònic).

(5) Equilibri entre una fase líquida a dins i a fora d'una estructura porosa (cromatografia de gel filtració).

(6) Equilibri entre una macromolècula i una molècula petita amb la qual estableix una unió específica o molt preferencial (cromatografia d'afinitat).

En aquesta Tesi s'ha treballat particularment amb els tipus 4) i 2).

M1.1.- Cromatografia de bescanvi iònic.

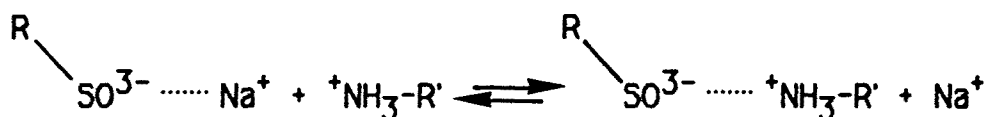
El fonament bàsic d'aquesta tècnica consisteix en l'atracció mútua de partícules de càrrega elèctrica oposada entre una reïna estacionària carregada i una fase mòbil amb electròlits. La major part dels materials biològics, i concretament les proteïnes, tenen grups ionitzables que, depenent del pH del medi i del seu punt isoelèctric, els hi conferiran una càrrega neta positiva o negativa. La major part de cromatografies de bescanvi iònic es duen a terme empaquetant una reïna bescanviadora d'ions en una columna cromatogràfica. Aquestes reïnes consten d'un suport inert que pot ésser de diferents tipus (polímer d'acrilamida, de sucres,..etc.) al qual s'ha afegit un braç carregat positiva o negativament, segons es tracti de bescanviadors d'anions o de cations, respectivament. Aquest braç positiu o negatiu porta un contraió de signe oposat que és el que serà desplaçat per les macromolècules a separar.

El mecanisme real de bescanvi iònic es creu que es compon de cinc passos diferents:

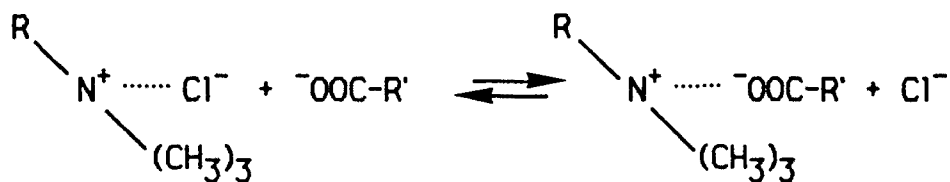
1) Difusió del ió en la superfície de la reïna. Això té lloc ràpidament en dissolucions homogènies.

2) Difusió del ió a través de la reïna cap al lloc de bescanvi. Aquest procés és depenent del grau d'entrecreuant ("crosslinking") de la reïna i de la concentració de la dissolució. Es creu que aquest procés controla tota la reacció de bescanvi.

3) Bescanvi d'ions en el lloc de bescanvi. Es creu que aquest procés té lloc instantàniament i és un procés d'equilibri. Així, per un bescanviador catiònic podem escriure:



I per un d'aniónic:



Quant més carregada sigui la molècula que s'ha de bescanviar, més fortament s'unirà a la reïna i serà més difícil desplaçar-la per altres ions.

4) Difusió del ió bescanviat a través de la superfície de la reïna.

5) Desabsorció per l'eluent i difusió del ió bescanviat en la solució externa.

A la pràctica tot aquest procés consisteix a tenir una reïna bescanviadora d'anions o de cations segons vulguem separar una barreja de macromolècules carregades negativa o positivament, equilibrada amb un tampó (que proporcionarà el contraió de la reïna) el pH del qual ha de permetre que reïna i macromolècula tinguin càrrega oposada. Si això es compleix, en introduir la barreja de macromolècules, aquestes interaccionaran amb la reïna amb major o menor grau segons sigui la seva

càrrega. En augmentar la concentració en l'eluent del contraió inicial de la columna es produirà una elució progressiva de la barreja, permetent la seva separació i donant lloc al que es coneix com a perfil cromatogràfic.

M1.1.1.- Obtenció i purificació de les PCPA i PCPB de pàncreas de porc.

L'obtenció de les proteïnes de partida es va dur a terme segons el mètode posat a punt al nostre laboratori (96), que en esquema consisteix en el següent:

1) Obtenció de pols de pàncreas, mitjançant un tractament de desengreixament i dessecació del material biològic de partida.

2) Extracte aquós de l'anterior pols de pàncreas, extracte que es precipita amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 43%(p/v) i se centrifuga.

3) Redissolució del precipitat centrifugat anterior en Tris/HCl 40 mM (pH 8.0) i introducció d'aquest, prèvia diàlisi enfront del mateix tampó, en una columna de bescanvi iònic, DEAE-Sepharose (Pharmacia) a pH 8.0. Seguidament elució amb un gradient salí i localització en el perfil d'elució, mitjançant mesures d'activitat peptidàsica, la fracció corresponent a procarboxipeptidasa A i B (Fig 14). Precipitació d'aquests proenzims en aquesta fracció amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, centrifugació i resuspensió del precipitat en Tris/Acètic 40 mM (pH 5.7).

4) Introducció de la dissolució anterior, prèvia diàlisi enfront del mateix tampó, en una altra columna de bescanvi, DEAE-Sepharose (Pharmacia) equilibrada a pH 5.7, elució amb un gradient salí i obtenció d'un perfil d'elució en el qual se separen les dues formes de procarboxipeptidasa A, la monomèrica i la dimèrica (Fig.15).

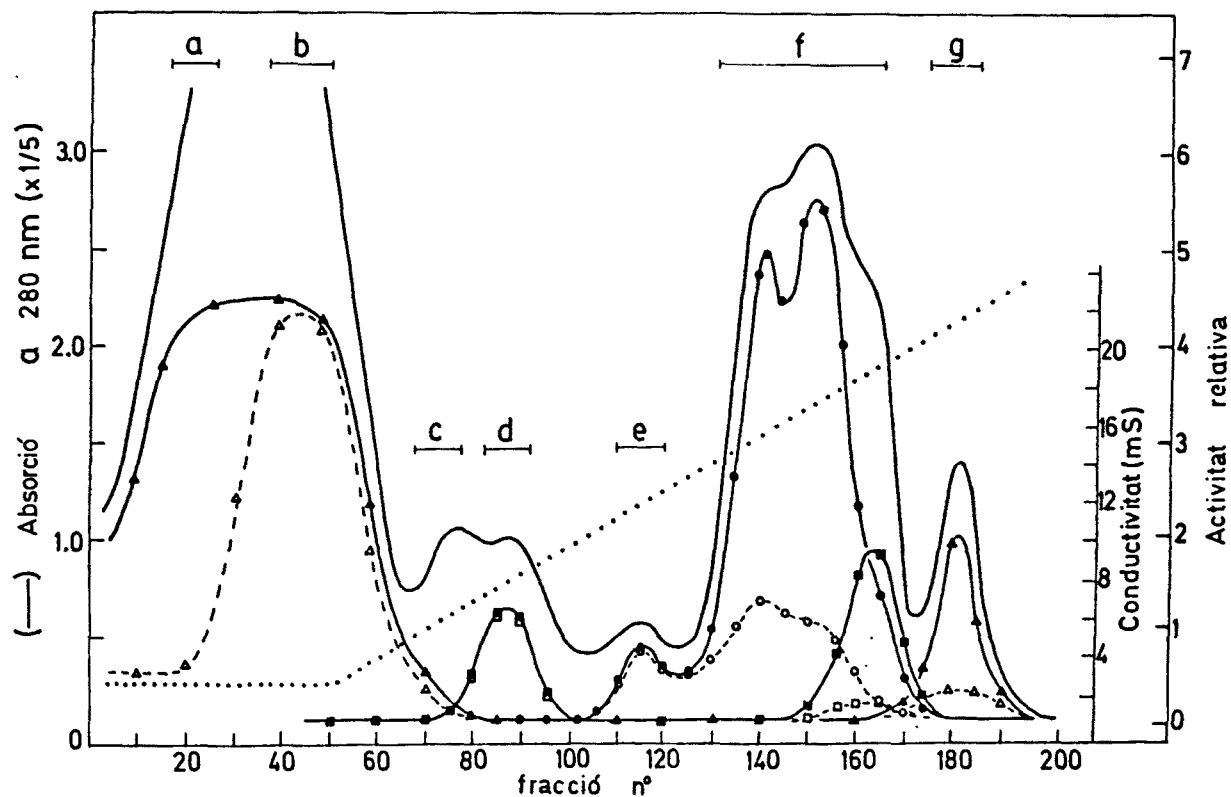


Figura 14.- Cromatografia de les proteïnes de pàncreas porcí en DEAE-Sephrose equilibrada amb Tris/HCl 40 mM (pH 8.0); (····) gradient salí lineal (0 - 0.45M NaCl); (—) absorció a 280 nm; (Δ -...- Δ) (Δ — Δ) activitats lliure i total per a quimotripsinògens enfront de N-Acetil-L-etilester; (o---o) (●—●) activitats lliure i total per a procarboxipeptidases A enfront de Benzoilglicil-L-Fenilalanina ; (\square -...- \square) (\blacksquare — \blacksquare) activitats lliure i total per a procarboxipeptidasa B enfront de Benzoilglicil-L-Arginina.

Per a l'obtenció de la procarboxipeptidasa B s'efectuà també una cromatografia de bescanvi iònic d'una fracció de la primera cromatografia en DEAE a pH 8.0 que és més rica en activitat procarboxipeptidasa B. En aquest cas, la columna s'equilibrà amb piperazina 40 mM també a pH 5.7, i es va obtenir un pic de procarboxipeptidasa B pura, completament neta de qualsevol forma de procarboxipeptidasa A, fet que no s'aconsegueix amb la columna equilibrada amb Tris/ Acètic 40 mM al mateix pH.

Les diferents fraccions de procarboxipeptidases A i B, un cop pures, van ésser precipitades amb sulfat amònic al 43% (p/v) i guardades en aquest estat a 4°C fins al moment del seu ús.

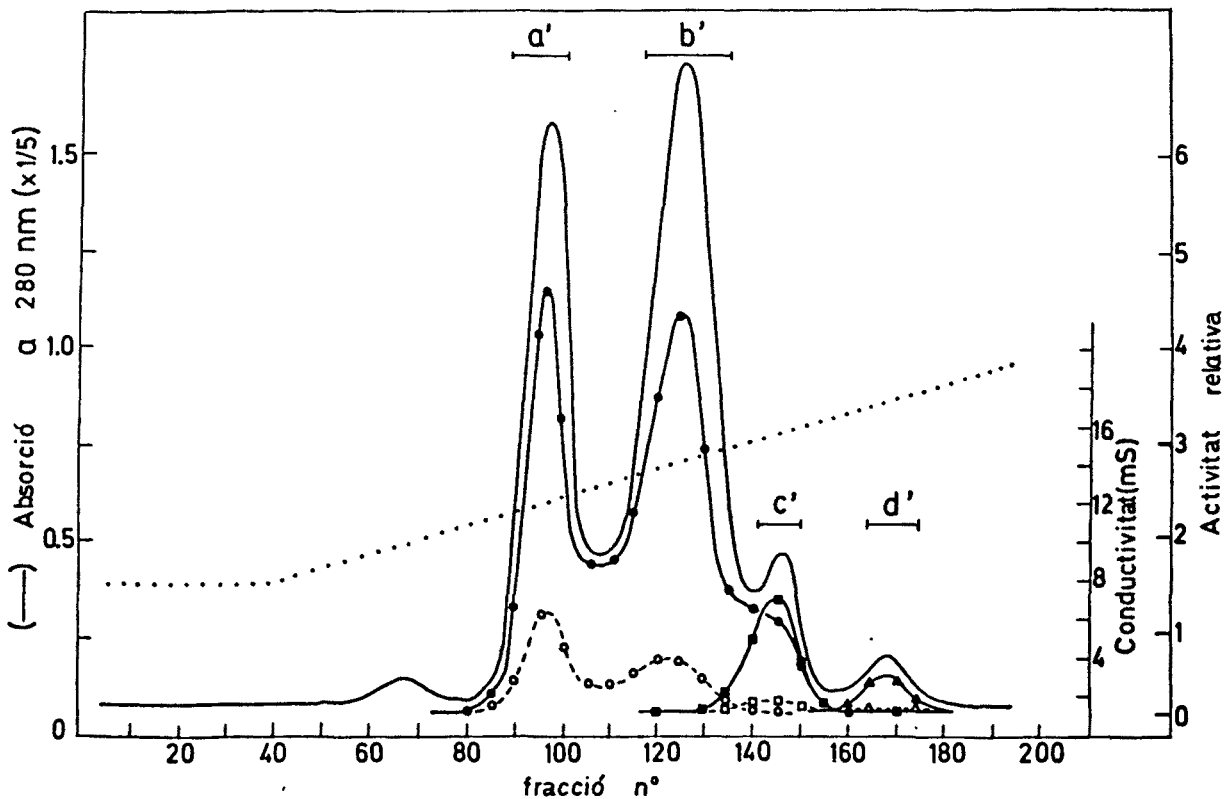


Figura 15.- Separació de les formes monomèrica i complex binari de la PCPA de pàncreas porcí per cromatografia en DEAE-Sepharose equilibrada amb Tris/Acetat 40 mM (pH 5.7). Símbols idèntics als de la Figura 14.

M1.1.2.- Obtenció del saA de la PCPA monomèrica de pàncreas de porc.

El segment d'activació de la PCPA monomèrica es va obtenir segons el mètode posat a punt al nostre laboratori (18), que bàsicament consisteix en una digestió triptica controlada del proenzim precursor (PCPA) seguida d'una cromatografia de bescanvi iònic en condicions dissociants (urea 7M). La digestió en tampó H_2NaPO_4 20 mM, Zn^{2+} 10^{-6} M (pH 5.8) es fa a una relació PCPA/Tripsina de 40/1 (p/p), durant 5 min. i a 25 °C. Acabat aquest temps s'afegeix al digerit una barreja d'inhibidors de la tripsina : PMSF fins a una concentració final de 2 mM, DiFP fins a una concentració final de 5mM i STI a una relació 10/1 (p/p) respecte a tripsina. Així mateix s'hi afegeix urea sòlida fins a una concentració final de 7M.

Aquest digerit inhibit s'aplica dins una columna de bescanvi iònic (DEAE-Seharose (Pharmacia)) equilibrada amb H_2NaPO_4 40 mM, urea 7M a (pH 5.8), i es procedeix a l'elució amb un gradient de NaCl de 0 a 0.07M. En el perfil d'elució cromatogràfic (Fig 16) s'observen tres pics corresponents a dues carboxipeptidases A (formes α i β) i al segment d'activació, que tal com s'observà posteriorment per anàlisi electroforètica és complex (Fig 17).

Aquest procediment permet d'obtenir el segment d'activació de la procarboxipeptidasa A monomèrica en estat pur, és a dir sense contaminants, però heterogeni i amb un rendiment molt baix (aprox del 15%). Per això al llarg del treball efectuat en aquesta Tesi es va intentar trobar mètodes d'obtenció alternatius i/o de subfraccionament.

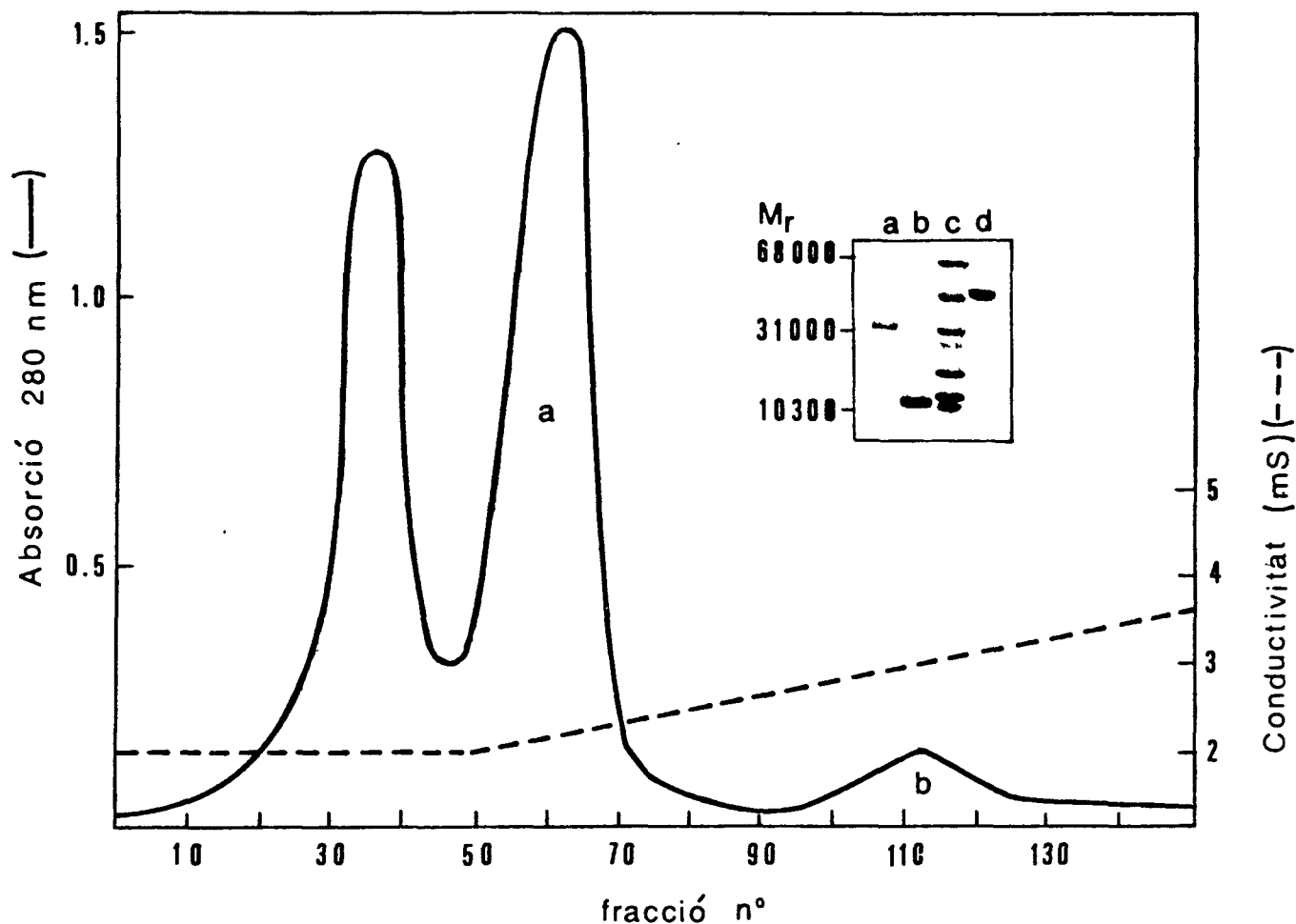


Figura 16.- Separació cromatogràfica en DEAE-Sepharose de CPA i del saR obtinguts a partir d'un digerit triptic de la PCPA monomèrica. L'elució es va fer mitjançant un gradient lineal entre 0 i 50 mM NaCl en el tampó d'equilibrat de la columna (H_2NaPO_4 , 50 mM, urea 7M (pH 5.8)). En la part superior es presenta l'anàlisi electroforètica en SDS-poliacrilamida de les fraccions del cromatograma anterior (a) CPA, (b) saR, (c) patró de pes molecular, (d) PCPA original.

M1.1.3.- Separació de les diferents formes del saA a pH elevat.

El segment d'activació de la PCPA monomèrica obtingut pel mètode descrit en l'apartat anterior (M1.1.2), en ésser analitzat per electroforesi presenta una multiplicitat de bandes, tal com es pòt observar en la Fig 17, on es presenten anàlisis electroforètiques de mostres d'aquest. Els mètodes electroforètics emprats han estat els descrits en els apartats M2.2 i M2.3 els quals presenten una major capacitat de resolució comparats amb el de Laemmli (apartat M2.1) amb el qual es va realitzar l'electroforesi presentada a la figura 16. Emprant aquests mètodes el nombre de bandes que s'ha arribat a veure per al saA s'esquematitza en la mateixa figura, on s'indica la identificació de cada una d'elles.

Es va intentar separar algunes d'aquestes bandes fent servir cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-Sepharose. Després de diversos intents a diferents pHs i condicions iòniques es va trobar que la millor condició per aconseguir una separació de bandes del segment d'activació consisteix a equilibrar la reïna amb $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 0.07M (pH 9.0). Habitualment, per separar una barreja d'espècies A, B, C, D i E (veure Fig. 17 per nomenclatura) de saA, contenint uns 2-5 mg. de proteïna, provinent d'un procés d'obtenció per bescanvi iònic (apartat M1.1.2), es va aplicar aquesta fracció a una columna de DEAE-sepharose (20 cm, 10 ml reïna) equilibrada amb el tampó esmentat. Seguidament es procedí a l'elució mitjançant un gradient de 0.07 M NaCl(50 ml) a 0.4 M NaCl(50 ml.), a un flux d'1 ml./min, i recol.lectant fraccions a raó d'una per minut.

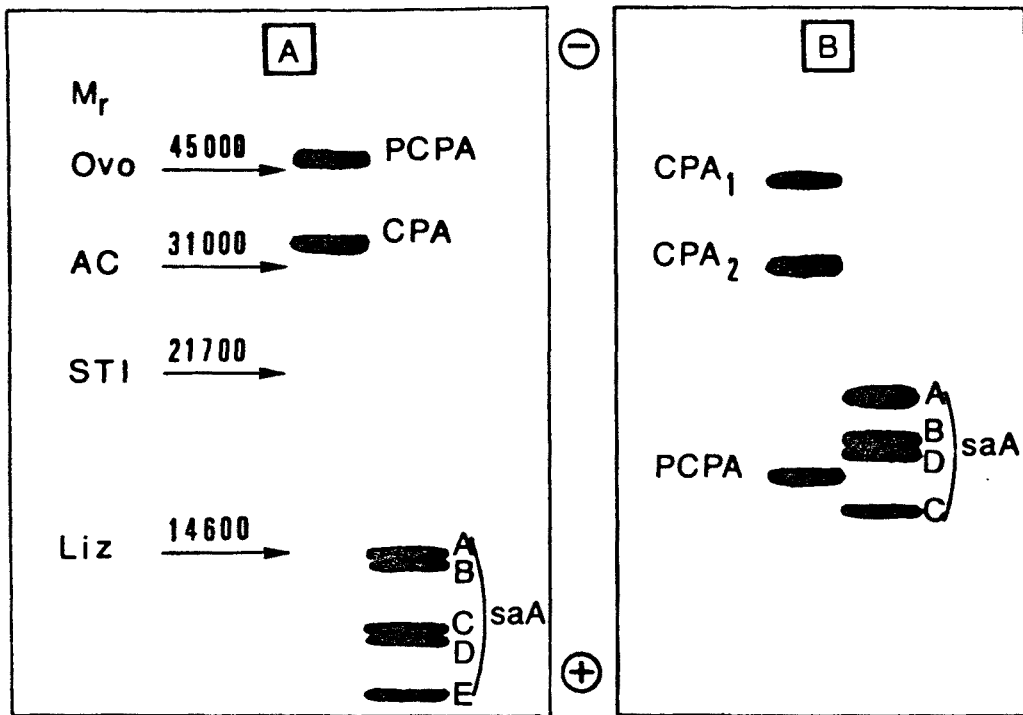


Figura 17.- Esquema electroforètic d'una mostra heterogènia de saA, obtinguda segons s'explica a l'apartat M1.1.2 i de les proteïnes relacionades PCPA i CPA. L'anàlisi es va realitzar:(A) en presència de SDS 0.1%, urea 7M, mètode de Hashimoto i col. (apartat M2.2) (B) en presència d'urea 7M, mètode de Creighton (apartat M2.3) . A,B,C,D i E fan referència a la nomenclatura emprada per identificar les diferents bandes del saA.

M1.1.4.- Obtenció del saA a pH baix.

També es van portar a terme cromatografies de bescanvi iònic amb una reïna bescanviadora de cations CM-Sepharose (Pharmacia) equilibrada a pH baix, com a mètode alternatiu per a l'obtenció del segment d'activació. El fet de triar una reïna catiónica en lloc d'una d'aniónica, com la DEAE-Sepharose, es basava en el desig de treballar a pH àcid, ja que s'esperava que en aquestes condicions el saA estigués dissociat de la CPA present, i que a més les diferents formes de saA presentessin diferent càrrega. Concretament es va escollir un pH de 3.5. A aquest pH les nostres proteïnes es troben carregades positivament ja que haurem annulat totes les càrregues dels carboxils mentre que els grups amino es trobaran protonats

Dins del marge de pHs àcids suaus es va triar per treballar un pH de 3.5 d'entre tots els provats (3.0, 3.5, 4.0, 4.5) ja que segons el mètode de "Test-tube for selecting starting pH" del catàleg de Pharmacia, a pH 3.5, es donava la màxima unió de les nostres proteïnes a la reïna emprada. Aquest pH va ésser mantingut mitjançant un tampó formiat amònic 20 mM. Es va utilitzar una columna de dimensions 25 cm. de llarg i 0.8 cm. de diàmetre, amb un volum de reïna de 10 ml, equilibrada amb l'esmentat tampó.

Per obtenir saA es va aplicar a la columna un digerit tríptic de PCPA-II, en aquest cas fet amb tampó formiat amònic 20mM (pH 5.8), mantenint-se les altres condicions de digestió (apartat M1.1.2) amb l'excepció que la inhibició es va fer baixant el pH a 3.5, per addició d'àcid fòrmic. A aquest pH la tripsina ja no és activa. Prèviament s'havia comprovat electroforèticament que el fet de canviar de tampó de digestió no afectava l'aparició del segment d'activació.

Així mateix, es va comprovar abans d'entrar la mostra a la columna que la conductivitat d'aquesta fos sempre inferior a 2 mS, per assegurar la unió de la proteïna. Seguidament es rentà la columna amb 50 ml. de tampó d'elució i es connectà un gradient lineal salí, sifonant dos gots de precipitat que contenien 30 ml de formiat amònic 20 mM (pH 3.5) (mS=0.9) i 30 ml. de formiat amònic 0.1M (pH 3.5)(mS=4.7), respectivament. El flux fou de 2.5 ml/h. i la velocitat de col.lecció d'un tub cada 15 min.

En una altra sèrie d'experiments es repetí tot el procés anterior afegint urea 9M al tampó d'equilibrat de la columna , igualment com a la mostra i al gradient d'elució.

M1.2.-Cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC).

La cromatografia líquida d'alta pressió o cromatografia líquida d'alta eficàcia és una tècnica que en els últims anys ha tingut un gran increment i acceptació en tots els laboratoris, no tan sols per la separació de molècules orgàniques petites i ions inorgànics, sinó també per la separació de macromolècules biològiques, i entre elles les proteïnes.

S'han desenvolupat tota una sèrie d'instruments comercials (cromatògrafs líquids d'alta pressió) i de reïnes cromatogràfiques de partícula molt petita (3-10µm) i homogènia que permeten la separació dels components de barreges sota una elevada pressió, condició quasi sempre necessària per fer avançar la fase mòbil a través d'una reïna de partícules tan petites. Les columnes cromatogràfiques emprades en aquesta tècnica consisteixen en un tub estret d'acer omplert amb la fase estacionària. La fase líquida mòbil es bombeja sota pressió a través de la columna.

Aquest tipus de cromatografia té l'avantatge, respecte a la tradicional, d'oferir una major capacitat de resolució, permetre reduir dràsticament el temps de separació i oferir una gran repetitivitat en els processos. Les quantitats de mostra amb les quals es pot treballar són a més molt petites, ja que els volums morts del sistema són pràcticament nuls i els detectors emprats són molt sensibles.

Les variants de les tècniques cromatogràfiques tradicionals com són partició líquid-líquid, bescanvi iònic i gel filtració també poden ésser emprades sense cap problema en aquest tipus de cromatografia.

M1.2.1.-Aplicació a l'obtenció del saA de la PCPA monomèrica.

L'obtenció del saA per cromatografia líquida d'alta pressió es va dur a terme en un aparell Waters equipat amb un controlador de gradients automàtic M-680, amb dues bombes M-6000A, amb dos detectors, un de longitud d'ona fixa model 441 i un de longitud d'ona variable model 450, i amb un registrador Data Module M 730. L'aparell permet treballar amb gradients lineals i no lineals.

Abans de començar qualsevol procés cromatogràfic els solvents van ésser filtrats i desgasats al buit de trompa d'aigua i sota agitació. Els solvents orgànics i aquosos es van filtrar a través d'un filtre Durapore de 0.22 μ (Millipore). L'aigua emprada per preparar les dissolucions aquoses era de qualitat Milli Q i havia estat passada per un cartutx de fase reversa Norgànic de la casa Millipore, a fi d'eliminar contaminacions orgàniques.

Per realitzar les separacions de saA es va treballar amb una

columna C-3 Ultrapore (Beckman) de 5 μ , de fase reversa que conté com a fase estacionària partícules de sílica que porten unit un braç de 3 àtoms de C (-CH₂-CH₂-CH₃) . La cromatografia de fase que es realitza en aquesta columna fonamentalment és un tipus de cromatografia de partició reversa líquid-líquid.

Per a la separació dels components d'un digerit de PCPA-II es va provar una sèrie de gradients, resultant com a més efectius i amb millor rendiment els següents:

1) Bomba A: aigua-àcid trifluoroacètic al 0.1 %.

Bomba B: Acetonitril-àcid trifluoroacètic al 0.1 %.

Condicions del gradient:

	Temps (min)	Flux (ml/m.)	%Solvent A	%Solvent B	Tipus de (*) gradient
	Inicial	1	100	0	lineal
	25	1	50	50	2
(**)	26	1	0	100	6
	33	1	0	100	6
(***)	37	1	100	0	6

2) Bomba A: aigua-àcid trifluoroacètic al 0.05%

Bomba B: Acetonitril 80%-àcid trifluoroacètic al 0.045%.

Condicions del gradient:

	Temps (min)	Flux (ml/m.)	%Solvent A	%Solvent B	Tipus de (*) gradient
	Inicial	1	98	2	lineal
	5	1	98	2	6
	35	1	49	51	5
(**)	38	1	0	100	6
	45	1	0	100	6
(***)	49	1	98	2	6

(*) gradients còncaus segons controlador M-680 Waters.

(**) rentat columna.

(***) retorn a condicions inicials.

La quantitat de mostra injectada fou de 2 mg. de PCPA digerida per aplicació, havent-se fet el digerit en les condicions esmentades en l'apartat M1.1.2 amb l'excepció que la inhibició de la tripsina es va aconseguir baixant el pH per addició d'àcid trifluoroacètic fins a una concentració final del 0.1%.

M2.-MÈTODES ELECTROFORÈTICS.

Es conegut que la majoria de molècules biològiques tenen grups ionitzables i que, per tant, existeixen en dissolució com a partícules carregades, cations o anions. També és conegut que molècules amb una càrrega similar poden tenir una relació càrrega/massa diferent a causa del seu pes molecular. Aquests dos aspectes combinats expliquen una migració diferencial de les molècules biològiques en dissolució quan estan sotmeses a un camp elèctric. Aquest és el fonament de l'electroforesi. Els cations es mouran cap al càtode mentre que els anions ho faran cap a l'ànode, a una velocitat que dependrà del balanç entre la força impulsora del camp elèctric sobre la partícula carregada i les forces retardadores del medi que l'envolta, que són principalment de tipus electrostàtic i friccional.

Les forces retardadores s'aconsegueixen fent córrer les partícules a separar en un suport inert, el més homogeni possible i que permeti d'explotar al màxim les diferències en la seva relació càrrega/massa. Hi ha molts tipus de suports, tals com làmina de paper o d'acetat de cel.lulosa, capes primes de silica o alúmina, gels de midó, agar o poliacrilamida.

En els mètodes electroforètics emprats en aquesta Tesi els suports han estat sempre de gel de poliacrilamida, variant les condicions en què s'ha dut a terme l'electroforesi.

M2.1.- Electroforesi discontinua en placa, en presència de SDS.

Les proteïnes en presència del detergent dodecil sulfat sòdic (SDS) adquireixen una càrrega negativa uniforme per unitat de massa, de manera

que en desplaçar-se en un camp elèctric, dins d'un suport inert de poliacrilamida que actua com a filtre, s'aconsegueix la seva separació en funció del pes o massa molecular.

En aquesta Tesi s'ha fet servir el mètode de Laemmli (132) modificat, utilitzant-se un gel separador de mida de porus uniforme o bé creant-hi un gradient lineal d'acrilamida, decreixent, des de la part inferior a la superior. Aquest gradient permet de millorar la resolució en alguns tipus d'anàlisi.

Per a la preparació del gel es partí de les següents dissolucions:

Dissolució A: acrilamida 30.4%

bisacrilamida 0.8%

Dissolució B: SDS 0.4%

Tris 18.2%.

Ajustat a pH 8.8 amb HCl.

Dissolució C: SDS 0.4%

Tris 6.0%

Ajustat a pH 6.8 amb HCl.

Dissolució D: Persulfat amònic al 10%, preparat en el moment del seu ús.

La dissolució A va ésser tractada amb carbó actiu durant una hora i desionitzada amb reïna de bescanvi iònic (Bio-Rad AG501X(D)).

El gel separador (inferior) de mida de porus uniforme es va obtenir barrejant les següents dissolucions, per preparar un gel de poliacrilamida del 15%:

15 ml. de dissol. A

7.5 ml. de dissol. B

3.5 ml. de glicerol

4 ml. d'aigua

25 μ l. de TEMED

125 μ l. de dissol. D

Per a la formació del gel separador en gradient entre el 12% i el 17% de poliacrilamida es partí de les dissolucions següents amb les quals es va preparar un gradient per sifonació, que s'introduí entre les plaques de vidre:

Dissolució al 12%

Dissolució al 17%

7.2 ml. de dissol. A

10.2 ml. de dissol. A

4.5 ml. de dissol. B

4.5 ml. de dissol. B

6.3 ml. d'aigua

1.2 ml. d'aigua

2.1 ml. de glicerol

9 μ l. de TEMED

9 μ l. de TEMED

58 μ l. de dissol. D

58 μ l. de dissol. D

El temps d'entrada de les dissolucions entre les plaques cal que oscil·li entre 10 i 15 min. quan la temperatura ambient es troba al voltant dels 20°C, ja que si el temps d'entrada és més gran, és a dir, si el flux s'alenteix, es pot produir la polimerització del gel abans que acabi l'entrada de les dissolucions que el formen.

Un cop finalitzada l'entrada de les dissolucions gelificants s'afegeix al damunt de la barreja una fina capa de n-butanol per obtenir una superfície de polimerització recta, sense menisc.

Acabada la gelificació s'elimina el n-butanol per rentats succesius amb aigua destil.lada i es procedeix a preparar a sobre del gel obtingut el gel concentrador barrejant les següents dissolucions:

1.89 ml. de dissol. A

3.15 ml. de dissol. C

7.6 ml. d'aigua

14µl. de TEMED

140µl. de dissol. D

Aquesta dissolució es diposita al cim del gel separador i seguidament, abans que polimeritzi, s'introdueix una "pinta" d'acetat de cel.lulosa que permet la formació de les "butxaques" corresponents per l'aplicació de la mostra, de dimensions 5x15x25 mm. Un cop produïda la gelificació del sistema es deixa reposar a ésser possible 24h. a fi que la polimerització sigui completa.

Com a tampó d'elució s'utilitza Tris 25 mM, glicina 0.2M, SDS 0.1% (pH 8.4), el qual es col.loca en les dues cubetes de metacrilat pontejades per la placa d'electroforesi i a les quals es connectaran els elèctrodes que units a la font d'alimentació generaran el camp elèctric.

Habitualment l'electroforesi es va dur a terme a voltatge constant, de 100V durant el recorregut d'un marcador (blau de bromfenol) del gel concentrador i a 250V durant el recorregut del gel separador, fins que el marcador arribava al final del gel.

Les mostres a analitzar han d'ésser convenientment preparades, el seu contingut en sals ha d'ésser baix i cal diluir-les al 50% amb el tampó anomenat d'aplicació que té la següent composició:

10% de glicerol

5% de β -mercaptoetanol

3% de SDS

60 mM Tris/HCl (pH 6.8)

Un cop feta la dilució les mostres s'incuben a 100°C durant 1 min.

En finalitzar l'electroforesi la tinció del gel s'efectua, si no s'indica el contrari, submergint el gel en la dissolució següent, durant un període de dues hores a temperatura ambient i amb agitació suau:

etanol 25%

àcid acètic 10%

Coomassie Blue 0.1%

La destinció es du a terme amb una dissolució aquosa d'etanol al 20% i àcid acètic al 8%, amb agitació suau i freqüents canvis fins a aconseguir un fons del gel transparent.

M2.2.- Electroforesi discontinua en placa, en presència de SDS-urea.

Aquest tipus d'electroforesi permet resoldre bé proteïnes o bé pèptids de baix pes molecular, la qual cosa és molt important a fi de poder estudiar la puresa i heterogeneïtat del segment d'activació de la PCPA.

Es va adoptar el mètode de Hashimoto et al. (133), que utilitza una electroforesi en placa, discontinua com la de l'apartat anterior però que conté urea 7M a més de SDS al 0.1%. Es va comprovar que per als pèptids que nosaltres volíem estudiar la dissolució gelificant més convenient a preparar era:

acrilamida 6.25 gr.(12.5%)

bisacrilamida 0.4gr (0.8%)

urea 21.1gr. (7M)

sacarosa 5gr. (10%)

A aquesta barreja s'hi afegeix 40 ml d'aigua destil·lada i desionitzada, deixant-la en agitació en un bany a 40-45°C fins que s'ha dissolt. Un cop aconseguida la dissolució s'hi afegeix reïna de bescanvi iònic (Bio-Rad AG501X(D) i es deixa en agitació suau durant 30 min. En acabar s'elimina la reïna per filtració i s'hi afegeix:

Tris 2.7 gr. (0.45M)

SDS 0.05 gr.(0.1%)

ajustant el pH a 9.0 amb HCl i enrasant a 50 ml. amb aigua desionitzada. Finalment la dissolució es filtra a través d'un filtre Sartorius de 0.45µ de porus i es desgasa al buit de trompa d'aigua.

La polimerització de 35 ml. de la dissolució anterior s'aconsegueix afegint-hi a la mateixa 7µl. de TEMED i 50µl de persulfat al 10%, addició que es porta a terme moments abans d'abocar la dissolució gelificant entre les plaques de vidre que contindran el gel. El gel així format serà el gel separador sobre el qual un cop polimeritzat, es prepararà un gel "concentrador" de la següent composició:

acrilamida 0.75 gr. (5%)

bisacrilamida 0.0195 gr.(0.13%)

Tris 0.12 gr. (66.7 mM)

SDS 0.015 gr.(0.1%)

Tots aquests components es dissolen en aigua destil·lada i desionitzada i s'enrasen a 15 ml. La polimerització s'inicia afegint 14µl. de TEMED i 140µl. de persulfat al 10%. Aquesta dissolució s'aboca immediatament sobre el gel separador ja format.

El tampó d'elució electroforètica és idèntic a l'emprat en la tècnica de Laemmli (132) (apartat M2.1), el pH del qual s'ajusta per addició de Tris o Glicina segons calgui.

Les mostres s'apliquen diluïdes al 50% amb el següent tampó d'aplicació:

sacarosa al 10%

β -mercaptoetanol 3%

SDS 5%

Tris 62.5 mM, ajustat a pH 6.8 amb HCl.

L'electroforesi es fa córrer a voltatge constant de 60V durant el recorregut del gel concentrador i a 140V durant el recorregut del gel separador, fins que finalitza, que sol ésser al cap de 14 hores. Com a marcador de l'avanç de mostres habitualment s'utilitza blau de bromfenol.

Cal remarcar que per dur a terme aquest tipus d'electroforesi calen reactius d'elevada puresa, així com una preparació "fresca" de totes les dissolucions a emprar. S'ha observat també que la resolució del gel millora si es deixa polimeritzar unes 24 hores o més abans d'utilitzar-lo.

M2.3.- Electroforesi en placa, en medi bàsic, en presència d'urea 7M.

En aquesta Tesi s'ha emprat una adaptació monodimensional del mètode bidimensional de Creighton (134) per dur a terme una electroforesi en la qual les mostres se separen en funció de la seva càrrega i mida. La presència d'urea 7M permet d'obtenir una millor resolució i observar els possibles components quaternaris d'una proteïna ja que actua com un poderós agent desagregant, dissociant i desnaturalitzant. Segons sigui el grau de resistència de les diferents proteïnes a analitzar a la desnaturalització per urea, aquestes poden estar més o menys

estructurades, és a dir, completament desplegadas, totalment plegades o bé en situacions intermèdies. Aquest fet farà variar el volum real de la molècula i per tant variarà la seva mobilitat electroforètica.

Segons el mètode de Creighton (134), cal triar la concentració d'acrilamida més adient per separar les nostres proteïnes problema i un cop fet això, la concentració de bisacrilamida ha d'ésser sempre un 0.0067% de la de l'acrilamida. Es va provar tota una sèrie de concentracions d'acrilamida i es va trobar que la millor per a resoldre PCPA, CPA i saA era del 9.5%. També es comprovà que per obtenir una bona polimerització la concentració de bisacrilamida havia d'ésser 100 vegades superior a la determinada per Creighton. Tenint en compte això esmentat en l'anterior paràgraf la composició del gel quedà, per tant:

acrilamida 9.5%

bisacrilamida 0.064%

urea 7M

Tris 45 mM

àcid bòric 25 mM

EDTA 0.78 mM, ajustant el pH amb HCl fins a 8.6.

Es prepara primer la barreja d'acrilamida, bisacrilamida i urea, la qual cal tractar amb carbó actiu durant 1 hora, filtrar i desionitzar per agitació en "batch" amb reïna de bescanvi iònic (Bio-Rad AG501X(D)). S'afegeixen després els altres components i s'ajusta el pH.

Per polimeritzar 50 ml. de la dissolució anterior calen 42 µl. de TEMED i 210 µl. de persulfat amònic al 10%.

Un cop segellades les plaques s'introdueix la dissolució gelificant entre elles fins al seu límit superior. Després s'introdueix la "pinta" per la formació de les "butxaques", ja que aquest tipus

d'electroforesi no requereix gel concentrador.

Com a tampó d'elució es va emprar Tris 45 mM, àcid bòric 25 mM i EDTA 0.78 mM (pH 8.6). L'aplicació de mostres es pot fer en diferents tampons de baixa força iònica que continguin urea 7M.

Habitualment l'electroforesi es va fer córrer a 4°C (cal aplicar les mostres un cop el gel es troba equilibrat a la temperatura adient) i a voltatge constant de 80 V. durant tota una nit (15 hores). Alternativament es va fer córrer el gel a 250 V. durant 5 hores també a 4°C. En tots dos casos es va mantenir l'electroforesi fins que el colorant indicador de l'avanç de les mostres (blau de bromfenol) arribava al final del gel. Per a la tinció i destinció del gel es va seguir el mateix mètode que en l'apartat M2.1.

M2.4.- Electroforesi en placa, en medi bàsic, sense agents desnaturalitzants.

Quan es pretenia d'analitzar proteïnes sense que la seva estructura quaternària o interaccions recíproques quedessin afectades, s'utilitzà un medi electroforètic no dissociant. Concretament el tipus d'electroforesi emprada és idèntica a la de l'apartat anterior (M2.3), fent servir el mètode de Creighton (134), però eliminant la urea de la dissolució formadora del gel i ajustant convenientment les concentracions d'acrilamida i bisacrilamida.

Les condicions de recorregut, el tampó d'elució, la tinció i destinció del gel són , també, idèntiques a les de l'apartat anterior. L'aplicació de mostres es fa també amb un tampó qualsevol, de baixa força iònica al qual s'afegeix glicerol al 10%.

M2.5.- Electroforesi en gradient d'urea, en medi bàsic.

En alguns casos es va voler analitzar el comportament diferencial de les proteïnes objecte del nostre estudi al llarg de diferents concentracions d'urea, mitjançant una electroforesi bidimensional. Aquesta tècnica es basa a fer un tipus de gel seguint una modificació del mètode de Creighton (134) , combinant els apartats M2.3 i M2.4, però construint un gradient d'urea (0-9M) perpendicular a la direcció de migració de la mostra.

Per aconseguir això es prepara un gradient per sifonació de les dues dissolucions següents:

Dissolució A(15 ml)

Dissolució B(15 ml)

acrilamida al 13%

acrilamida al 13%

bisacrilamida 0.087%

bisacrilamida 0.087%

urea 9 M

Tris 45 mM

Tris 45 mM

àcid bòric 25 mM

àcid bòric 25 mM

EDTA 0.78 mM

EDTA 0.78 mM

La construcció del gradient lineal perpendicular a la direcció de migració s'aconsegueix girant les plaques d'electroforesi, un cop muntades amb els separadors, 90º respecte a la seva posició normal per a l'aplicació de mostra. En aquesta posició s'introdueix el gradient tal com s'indica en l'esquema de la Fig. 18.2, previ segellat dels extrems de les plaques amb separadors d'acetat de cel.lulosa en dos costats i polimerització d'una franja d'aproximadament 5 cm. de gel d'urea 9M en el tercer (Fig 18.1).

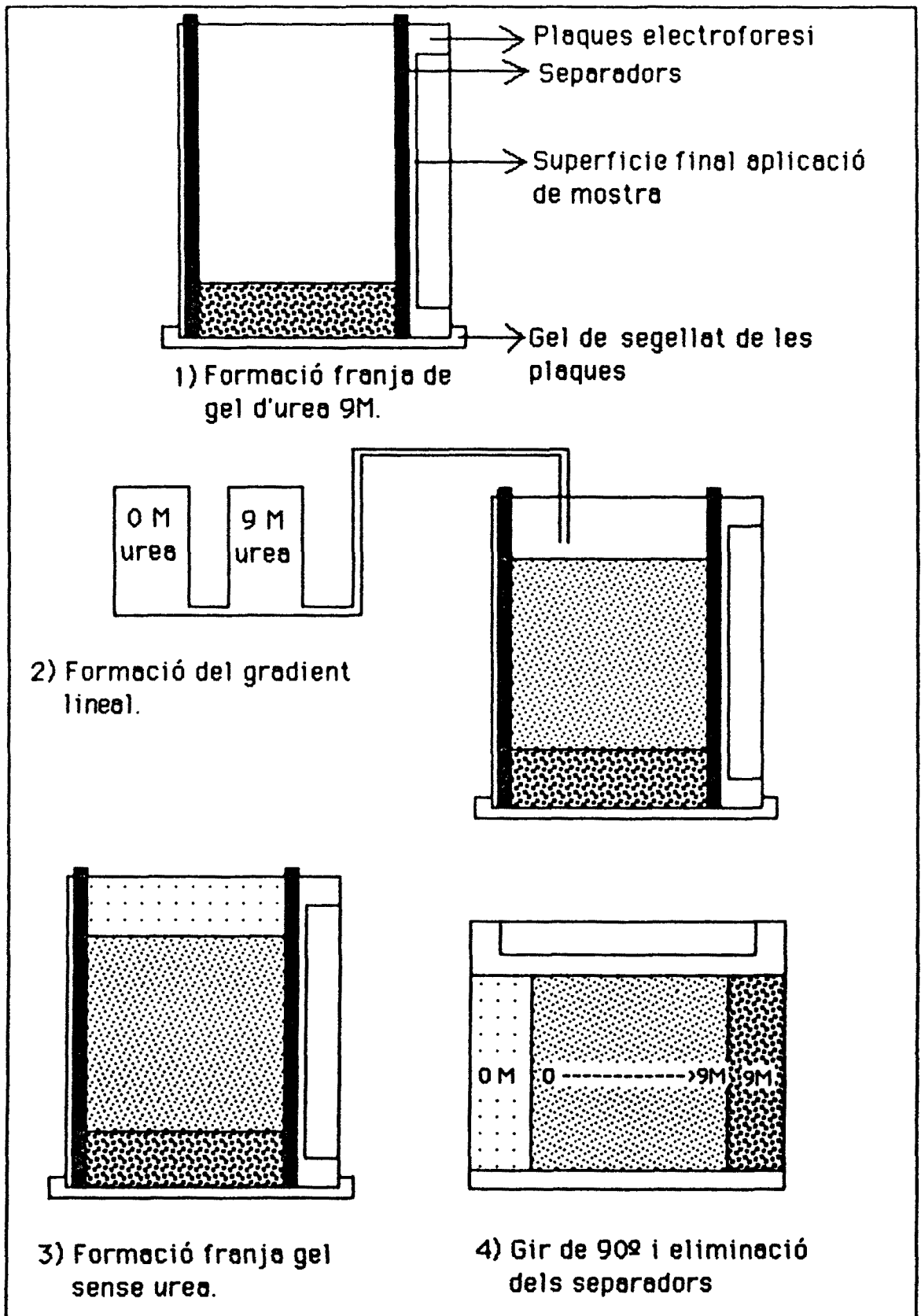


Figura 18.- Representació esquemàtica de la formació dels gels en gradient d'urea. Veure el text per més detalls.

Un cop format i polimeritzat el gradient s'acaba d'omplir l'espai entre les plaques amb una franja de gel sense urea (Fig 18.3). Polimeritzada aquesta franja, es torna el gel a la seva posició normal i s'extreuen els separadors (Fig 18.4), quedant una única butxaca per a l'aplicació de mostra tot al llarg del gradient d'urea.

A cada gel s'aplica una única mostra proteica que a mesura que avança es va trobant d'esquerra a dreta (Fig 18.4) amb una concentració creixent d'urea, de tal manera que en un extrem es trobarà mostra nativa i en l'altre desnaturalitzada (en el cas que la urea 9M sigui suficient per desnaturalitzar-la). Fent servir aquesta metodologia es pot observar el punt mig de la desnaturalització per urea que presenta la mostra aplicada o bé veure a quina concentració d'urea se separen els protòmers d'una mostra que sigui oligomèrica. Aquests són els objectius principals que s'han buscat en emprar aquesta tècnica en aquest treball, és a dir, fer estudis de desnaturalització i de dissociació de les diferents formes de la procarboxipeptidasa A, procarboxipeptidasa B i dels seus fragments triptics.

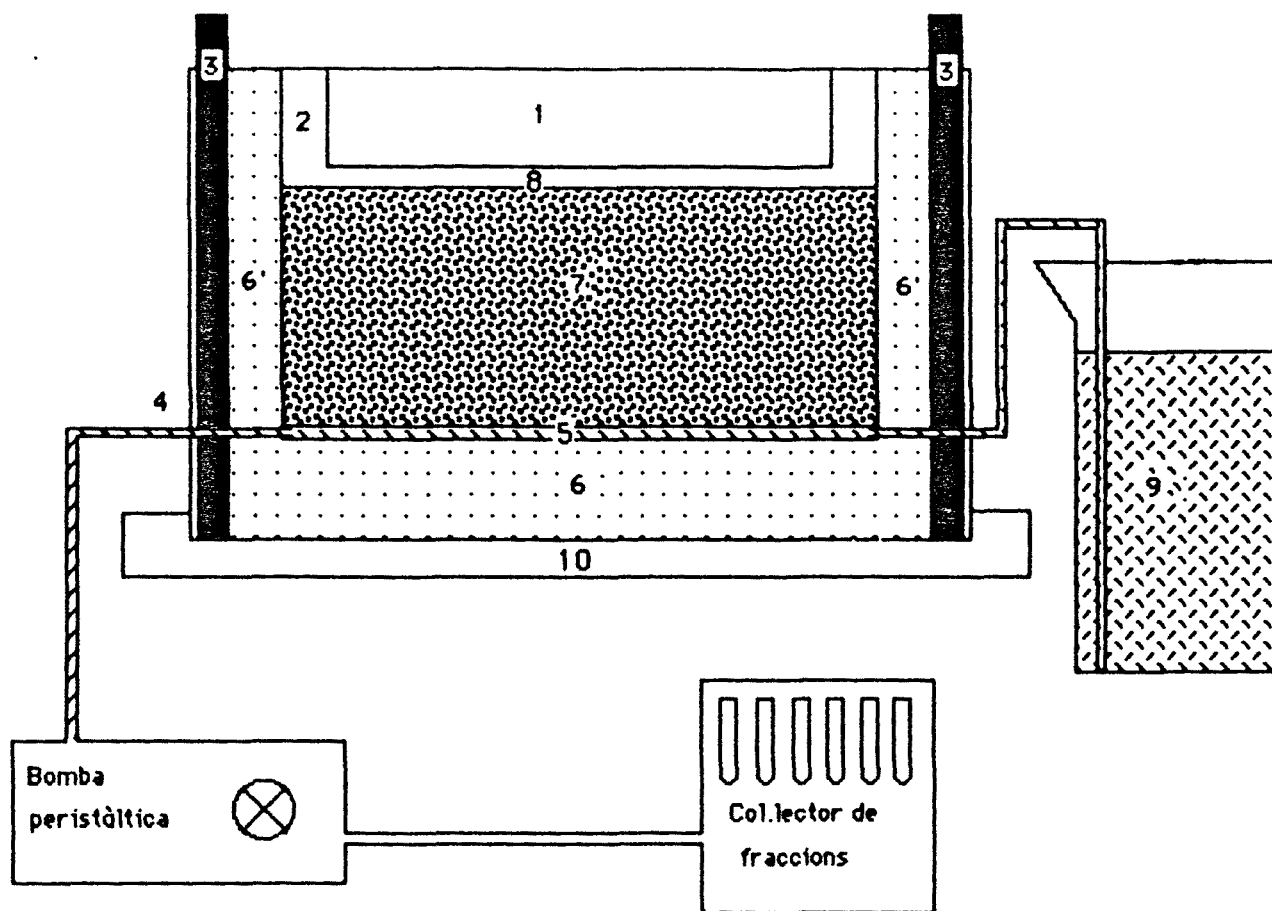
Les condicions de recorregut dels gels, tampó d'elució, tinció i destinció del gels són iguals a les esmentades en l'apartat M2.3, amb l'excepció que l'electroforesi es va dur a terme a temperatura ambient (20°C). Les mostres s'aplicaren sempre amb un tampó de baixa força iònica, normalment Tris/HCl 40 mM (pH 8.6) i amb urea 7M.

M2.6.- Electroforesi preparativa.

A fi d'obviar alguns problemes d'obtenció de saA es va desenvolupar un mètode preparatiu d'ell mitjançant electroforesi en placa, semblant al mètode utilitzat a nivell analític. Com a sistema separador es va escollir un gel gruixut preparat segons el mètode de Creighton (134), esmentat en l'apartat M2.3. El gel es construeix entre dues plaques de vidre, emprant separadors de 0.4 ó 0.5 cm. de gruix, atravesats lateralment per un tub de tefló de 0.05 cm de diàmetre. Aquests tubs es posicionaran aproximadament a 10 cm. del punt d'aplicació de mostra, i constituiran els punts d'entrada i sortida d'un canal pel qual circularà tampó de la mateixa composició que l'emprat en la polimerització de l'acrilamida. En la Fig 19 s'esquematitza el muntatge efectuat.

La contrucció de l'esmentat canal (nº5 en l'esquema de la Fig 19) presenta una sèrie de dificultats que, en part, s'han pogut superar. La principal dificultat consisteix en el col.lapse del canal per una caiguda del gel que es troba pel cim del mateix (nº7 en l'esquema de la Fig 19). Per evitar aquest fet, abans de fer el muntatge de les plaques, s'hi ha adherit un full de plàstic les superfícies del qual presenten una caràcter hidrofílic (la posada en contacte amb el vidre) i l'altra hidrofòbic; aquesta és la que queda en contacte amb l'acrilamida un cop polimeritzada. Els fulls de plàstic són prou llargs perquè quedin subjectes pels separadors i les pinces.

Així mateix, perquè el canal sigui estanc i es pugui mantenir en ell un flux elevat, cal fer un tancat inferior i lateral, polimeritzant acrilamida, seguint l'esquema de la Fig. 20 i l'explicació següent:



- 1.- Placa de vidre posterior.
- 2.- Placa de vidre anterior.
- 3.- Separadors de plàstic de 0.8 cm. de gruix.
- 4.- Tubs de tefló de 0.05 cm de diàmetre que atravesen els separadors.
- 5.- Canal entre gels per on s'elueix la mostra.
- 6 i 6'.- Gels de tancat inferior i lateral.
- 7.- Gel separador.
- 8.- Superfície d'aplicació de mostra.
- 9.- Reservori tampó d'elució.
- 10.- Recipient per a fer el gel de tancat inicial.

Figura 19.- Esquema del muntatge efectuat per a la construcció i funcionament d'un gel d'electroforesi preparativa (veure text).

S'introdueix, primerament, dissolució d'acrilamida de la mateixa composició o d'un % més elevat que la del gel separador fins arribar just per sota del tub de tefló (nº 6 a la Fig. 19 i nº 1 a la Fig 20). Es deixa polimeritzar posant una fina capa d'isopropanol al cim de la dissolució a fi d'aconseguir una superfície de polimerització recta i per tant una base del canal uniforme.

Un cop polimeritzat es giren les plaques 90º i s'afegeix lateralment la mateixa dissolució d'acrilamida (nº 6' a la Fig. 19 i nº 2 a la Fig 20) fins arribar just a l'entrada del tub de tefló. Aquest gel lateral de segellat ha de tenir com a mínim 1 cm. de gruix, ja que sinó, en circular també pel canal, la força del líquid hi provoca esclatxes en la zona d'unió al tub de tefló. També en aquest cas es deixa polimeritzar l'acrilamida posant una fina pel·lícula d'isopropanol. En acabar es giren les plaques 180º i es procedeix idènticament per l'altre costat (nº 6' a la Fig. 19 i nº 3 a la Fig. 24).

Finalitzat el tancat inferior i lateral, es tornen les plaques a la seva posició inicial i s'omplen els tubs de tefló i la superfície de gel de tancat inferior (nº6 a la Fig. 19) d'una dissolució formada urea 7M i sacarosa al 50% fins que quedin de 0.3 a 0.5 cm. d'aquesta dissolució pel cim del gel esmentat. A causa de l'elevada densitat d'aquesta dissolució es podrà evitar la unió entre els gels 6 i 7 de la Fig. 19, i es formarà el canal. Seguidament es procedeix a omplir i gelificar el gel separador (nº 7 a la Fig. 19). Una vegada polimeritzat el gel separador el canal es neteja amb el tampó d'elució, queda així llest per començar l'electroforesi.

La composició del gel separador i del tampó d'elució de les cubetes és la mateixa que la descrita en l'apartat M2.3, eliminant l'EDTA. El tampó d'elució que es fa circular pel canal és Tris/HCl 45 mM, Àcid bòric 25 mM, urea 7M (pH 8.6).

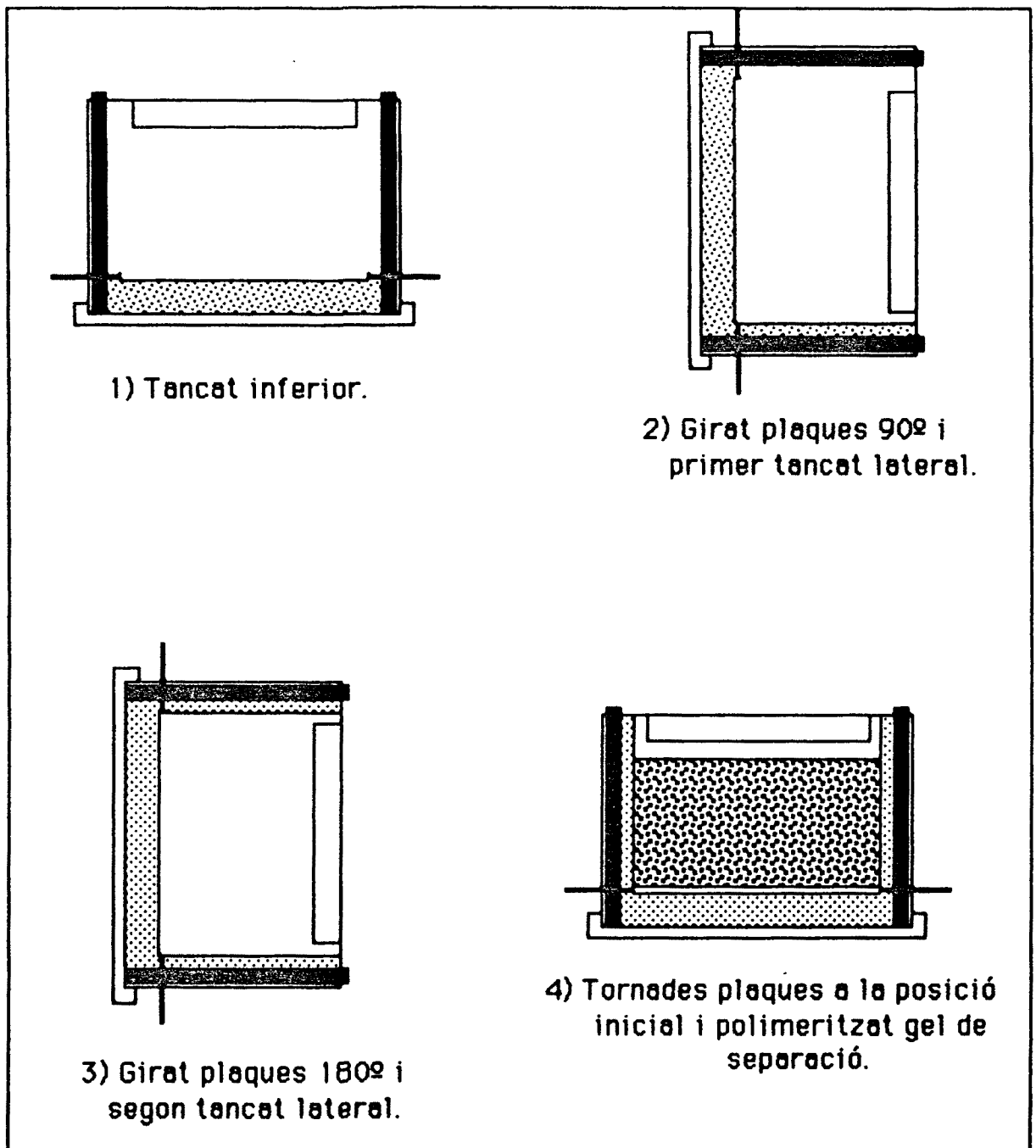


Figura 20.- Esquema dels passos a seguir en l'elaboració d'un gel d'electroforesi preparativa (veure text per a més detalls)

Prèviament a l'aplicació de mostra és convenient dur a terme una preelectroforesi, a fi d'eliminar possibles radicals que podrien malmetre les proteïnes separades.

A fi que la recuperació de mostres sigui elevada és molt important trobar un compromís entre el flux de la bomba peristàltica i el voltatge aplicat. Fent servir un colorant, concretament el blau de bromfenol, el qual pot ésser seguit al llarg de l'electroforesi i durant la seva elució pel canal, es va comprovar que la recuperació màxima s'obtenia fent l'electroforesi a 80V i recol·lectant mostra a un flux de 30 ml/h.

Habitualment la mostra aplicada fou un digerit triptic de la PCPA fet en les condicions estàndard (apartat M1.1.2), digerit al qual s'afegí urea 7M.

M3. MÈTODES ENZIMOLÒGICS.

La detecció, quantificació i anàlisi quantitativa de l'activitat enzimàtica de les espècies amb activitat peptidàsica estudiades, han estat mètodes habitualment emprats en aquesta Tesi. L'activitat biològica no tan sols permet d'identificar i caracteritzar un enzim sinó també proporcionar informació valuosa sobre la seva estructura i la relació estructura-funció. L'anàlisi de la inhibició de l'activitat enzimàtica per diverses condicions ambientals, cofactors o interaccions proteïna-proteïna ha proporcionat també una informació complementària com és el cas dels complexos CPA-saA.

M3.1.- Determinació de l'activitat peptidàsica de PCPA, CPA, PCPB, CPB, QT i TG.

Els diferents mètodes per a la determinació d'activitats enzimàtiques per espectroscòpia a l'ultraviolat emprats en aquesta Tesi es basen en el canvi d'absorció que presenten certs substrats en ésser hidrolitzats per l'enzim corresponent. La velocitat d'aparició o desaparició del cromòfor, en aquest cas el substrat, permet mesurar la velocitat de la reacció enzimàtica.

Per detectar la presència de zimògens es portaren a terme dues mesures d'activitat enzimàtica paral·leles. En primer lloc, es mesurà l'activitat que presentava la dissolució enzimàtica enfront del seu substrat, anomenada activitat lliure (o intrínseca). També, es mesurà l'activitat d'aquesta mateixa dissolució prèviament incubada amb tripsina porcina, la qual cosa va permetre d'obtenir l'anomenada activitat total (o

potencial). D'aquesta manera, si la relació activitat total/activitat lliure és la unitat, tenim la certesa que no hi ha zimògen present, mentre si la relació anterior és major que 1, tenim constància de la presència de zimògens.

Per a la determinació de l'activitat peptidàsica de mostres de PCPA i CPA, s'utilitzà el mètode de Folk i Schimer (95). Aquestes proteïnes presenten activitat peptidàsica, que provoca la hidròlisi del substrat, hipuril-L-fenilalanina (HPA), hidròlisi que va acompanyada d'un augment d'absorció a 254 nm. En la majoria dels casos l'HPA s'emprà a una concentració d'1 mM, dissolt en tampó Tris/HCl 25 mM, NaCl 0.5M (pH 7.5).

Per a la determinació de l'activitat peptidàsica de PCPB i CPB s'emprà el mètode de Folk i col. (135), semblant a l'anterior però fent servir com a substrat hipuril-L-arginina (HA). La hidròlisi d'aquest substrat provoca un augment d'absorció a 254 nm. També en aquest cas el substrat es preparà habitualment a una concentració d'1 mM en tampó Tris/HCl 25 mM, NaCl 0.1M (pH 7.65).

Per a la determinació de l'activitat quimotripsina A de les mostres estudiades contenint QT i TG s'utilitzà el mètode de Schuwert i Takenaka, (136) modificat d'acord amb el National Formulary, edició XII. El substrat emprat va ésser N-acetil-L-tirosina etil ester (ATEE), el qual en presència de quimotripsina sofreix una hidròlisi per l'enllaç ester que provoca una disminució d'absorció a 237 nm. L'ATEE s'emprà a una concentració de 9.4×10^{-4} mM, dissolt en tampó Tris/HCl 25 mM (pH 8.0).

Totes les mesures d'activitat es van dur a terme a 25°C, si no s'indica el contrari.

En els casos en què ha estat necessari s'ha calculat l'activitat específica de procarboxipeptidases i carboxipeptidases de la següent manera:

$$\Delta A_{254 \text{ nm}}/\text{min}$$

$$\text{Activitat específica} = \frac{\text{-----}}{0.36 \times \text{mg. d'enzim/ml. de dissolució final}}$$

definint-se l'activitat específica com el nombre d'unitats enzimàtiques per mil·lígram de proteïna i expressant-se en mols de substrat transformats per minut i per mil·lígram de proteïna, segons l'anterior càlcul.

M3.2.-Anàlisi de l'activitat enzimàtica de PCPA-I, PCPA-II i CPA en variar la força iònica del medi.

Es partí de mostres de PCPA-I, PCPA-II i CPA precipitades amb sulfat amònic al 43%, les quals es van centrifugar a 7000 rpm durant 30 min a 4°C, i el sediment es va redissoldre segons s'indica en cada un dels apartats següents, en funció del tipus d'estudi que es volia portar a terme.

M3.2.1.-Al llarg del pH.

Es tractà de mesurar l'activitat enzimàtica específica de PCPA-I, PCPA-II, i CPA tal com s'indica en l'apartat M3.1, però variant el pH del medi des de 3 fins a 10, repetint l'experiment a dues forces iòniques. Amb aquesta finalitat, les mostres esmentades es van redissoldre en una dissolució contenint els següents tampòns: Tris 1 mM, MES 1 mM i Acetat sòdic 1 mM ajustats a pH 7.5 amb HCl. La concentració de proteïna s'ajustà a 2 mg/ml, dialitzant-la tota la nit a 4 °C enfront del mateix tampò. Finalitzada la diàlisi se separaren 15 al·lòquotes que es diluïren a la meitat per addició d'un volum de tampò Tris 50 mM, MES 50mM, Acetat sòdic 50

mM, NaCl 1M, Zn^{2+} 2×10^{-6} M, ajustat als següents pHs: 3.0, 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.25, 6.5, 6.75, 7.0, 7.25, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 i 10.0. D'aquesta manera s'aconseguí posar la mostra a cada un dels pHs als quals es volia mesurar l'activitat enzimàtica, quedant una concentració proteïca d'1 mg/ml i a la concentració de 25 mM en cada un dels tampons esmentats.

Les alíquotes així preparades es deixaren 2 hores a 4°C i en acabar aquest temps es mesurà l'activitat enzimàtica enfront d'HPA dissolt en tampó Tris 25 mM, MES 25 mM, Acetat Sòdic 25 mM, NaCl 0.5M, ajustat a cada un dels pHs a mesurar.

Es repetí tot l'experiment per als dos proenzims i l'enzim actiu en presència de NaCl 0.05 M, és a dir, a una força iònica 10 vegades més petita en aquesta sal.

M3.2.2- En augmentar la temperatura.

La PCPA-I, PCPA-II i CPA es van redissoldre en tampó Tris/HCl 25 mM, NaCl 0.5 M, Zn^{2+} 10^{-6} M (pH 7.5), s'ajustà la concentració a 1 mg/ml, i es dialitzaren tota la nit enfront del mateix tampó. En acabar la diàlisi se separaren alíquotes de 20 µl que s'incubaren dins de les cubetes de l'espectrofotòmetre a cada una de les següents temperatures 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 i 80°C durant 15 minuts. En acabar el temps d'incubació s'afegí dins de les cubetes 1,5 ml de substrat, HPA, dissolt en condicions estandard (apartat M3.1) i equilibrat a la temperatura corresponent, i es mesuraren les activitats enzimàtiques.

L'experiment es repetí a una concentració de NaCl de 0.05M, és a dir a una força iònica 10 vegades més petita en aquesta sal.

M3.2.3- Per pèrdua de Zn^{2+}

Les mostres de PCPA-I, PCPA-II i CPA es van redissoldre en Tris/HCl 25 mM, NaCl 0.5M (pH 7.5) i es van dialitzar tota la nit enfront del mateix tampó, ajustant la concentració a 1 mg/ml. En acabar la diàlisi es mesurà l'activitat enzimàtica enfront d'HPA (apartat M3.1) a temps 0, 5, 10, 20 min., 1h, 2h, i 6h. després d'haver afegit orto-fenantrolina 0.5 mM (agent quelant de Zn^{2+}). El substrat es dissolgué en el tampó estandard i s'hi afegí orto-fenantrolina 0.5 mM.

Es repetí l'experiment amb les tres proteïnes a dues forces iòniques més, posant en el medi NaCl 0.05 M i NaCl 3M.

M3.2.4.- Per acció de la tripsina (corba d'activació).

En aquest cas es partí de mostres de PCPA-II i CPA dissoltes en Tris/HCl 25 mM, Zn^{2+} 10^{-6} M (pH 7.5) i dialitzades tota la nit enfront d'aquest tampó.

Se separaren diferents alíquotes de PCPA-II que s'activaren amb tripsina a una relació 5/1 (PCPA/tripsina, p/p) durant 2 hores, a 25°C, i en presència de concentracions creixents de NaCl des de 0M fins a 2M. Finalitzada la incubació es mesurà l'activitat peptidàsica específica segons M3.1. Així mateix, es mesurà l'activitat específica d'alíquotes de CPA sola i de CPA més saA, a relació molar CPA/saA de 1/1, que contenien les mateixes concentracions de sal que el digerit descrit abans.

Les mesures d'activitat es van fer sempre enfront d'HPA dissolt en Tris/HCl 25 mM, Zn^{2+} 10^{-6} M i a la concentració de NaCl adient a cada punt.

M3.3.- Mesures d'activitat enzimàtica per a seguir estudis de renaturalització de PCPA-II, CPA-II i saA, prèvia desnaturalització tèrmica.

Es va portar a terme una sèrie d'experiments de desnaturalització tèrmica i renaturalització de mostres de PCPA-II, CPA i de saA aïllat seguits per mesures d'activitat enfront d'HPA (apartat M3.1) a fi d'observar si el procés de desnaturalització és reversible i per tant comprovar si són aplicables tota una sèrie d'aproximacions i de tractaments matemàtics a les corbes de DSC (apartat M6.2).

Podem dividir les proves en dos grups:

I) Procés de desnaturalització del saA i renaturalització d'aquest, per comprovació de la seva capacitat inhibidora de l'activitat de la CPA (18), mesurada enzimàticament.

II) Procés de desnaturalització de PCPA-II i CPA i renaturalització per comprovació de la seva activitat enzimàtica.

GRUP I

Dins d'aquest grup es va portar a terme el següent experiment:

Es va partir de saA aïllat de la PCPA el qual es va dividir en vuit alíquotes les quals es van dissoldre en els següents tampons:

A) NaH_2PO_4 5 mM, DTT 0.1 mM (pH 7.5).

B) NaH_2PO_4 5 mM, urea 2M (pH 7.5).

C) NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0.05M, DTT 0.1 mM (pH 7.5).

D) NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0.05M, urea 2M (pH 7.5).

- A') Pirofosfat sòdic 5 mM, DTT 0.1 mM (pH 9.0).
- B') Pirofosfat sòdic 5 mM, urea 2M (pH 9.0).
- C') Pirofosfat sòdic 20 mM, NaCl 0.05M, DTT 0.1 mM (pH 9.0).
- D') Pirofosfat sòdic 20 mM, NaCl 0.05M, urea 2M (pH 9.0).

Cada alíquota de saA en les diferents condicions anteriors es va escalfar en un bany termostàtic des de 25°C fins a 85°C per pujada gradual de la temperatura a raó de 2.25°C/min. Es va deixar cada mostra un minut a 85°C, i es va retirar una alíquota d'ella, deixant la resta a aquesta temperatura durant 30 min. En acabar l'escalfament (1 min. o 30 min.) cada alíquota es va renaturalitzar per refredament immediat a 4°C en bany de gel. Transcorreguda 1 hora, i després de deixar temperar la mostra, es va procedir a la mesura de la inactivació enzimàtica de la CPA pel saA renaturalitzat. Per això, es va fer una barreja saA/CPA a relació molar, i es va mesurar seguidament l'activitat CPA seguint el protocol descrit en l'apartat M3.1. Cal recordar que el segment d'activació en estat natiu és un potent inhibidor de la CPA (18), per tant una mesura de la seva renaturalització serà la capacitat de manifestar aquesta funció. La CPA es trobava dissolta en Tris/HCl 25 mM, Zn^{2+} 10^{-6} M (pH 7.5) a una concentració de 0.5 mg/ml. En aquest mateix tampó també es va dissoldre l'HPA.

En aquest experiment es va emprar com a control l'activitat presentada per una barreja a relació molar CPA/saA, de la qual el saA no havia sofert cap escalfament, és a dir, es trobava en estat natiu.

Els resultats s'han expressat en % d'activitat que presenta cada una de les alíquotes CPA/saA respecte a l'activitat de la CPA sola, és a dir, s'ha representat l'activitat CPA romanent després de formar-se el complex CPA-saA.

GRUP II

Dins del grup II es van dur a terme els experiments de desnaturalització i renaturalització puntual en una gran varietat de condicions, les quals es resumeixen en la Taula 3.

Tampons	Fosfat	Pirofosfat
pH	7.5 / 7.0 / 6.5	9.0
Concentració tampó	1mM / 5mM / 20 mM	1mM / 5mM / 20mM
Concentració NaCl afegit	0M / 50 mM / 0.5M	0M / 50 mM / 0.5M
Altres modificants	DTT 0.1mM/0.5mM/1mM urea 2M / 3M	DTT 0.1mM/0.5mM/1mM urea 2M / 3M
Temperatura de pertorbació	Diverses, de 50–85°C	Diverses, de 50–85°C
Temps de pertorbació tèrmica	1 min / 30 min	1 min / 30 min
Temperatura de renaturalització	4°C o ambient	4°C o ambient

Taula 3.- Diferents condicions emprades en els assaigs de desnaturalització tèrmica i renaturalització posterior de PCPA i CPA.

Les mostres de PCPA-II i CPA-II es van dissoldre i tractar tal com s'indica a l'apartat M3.2 en cada un dels tampons triats de la taula anterior. Un cop dissoltes van sofrir diferents tractaments de desnaturalització tèrmica (també indicats en la taula 3) i en acabar es mesurà l'activitat remanent de PCPA i CPA de la mostra renaturalitzada enfront d'HPA dissolt en Tris/HCl 25 mM, Zn^{2+} $10^{-6}M$ (pH 7.5), tal com s'indica a l'apartat M3.1.

M3.4.- Variacions d'activitat enzimàtica de PCPA I, PCPA-II i CPA, en augmentar la concentració de Ca^{2+} del medi.

Es partí de mostres de PCPA-I, PCPA-II i CPA, precipitades amb sulfat amònic al 43% que foren dissoltes en Tris/HCl 25 mM, NaCl 0.5 M, Zn^{2+} 10^{-6} M (pH 7.5) i tractades tal com s'indica a l'apartat M3.2. La concentració de proteïna s'ajustà, finalitzada la diàlisi, a 0.5 mg/ml i es prengueren 10 alíquotes a les quals s'afeguí Ca^{2+} de manera que la concentració final de metall fos 0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 0.5 i 1M.

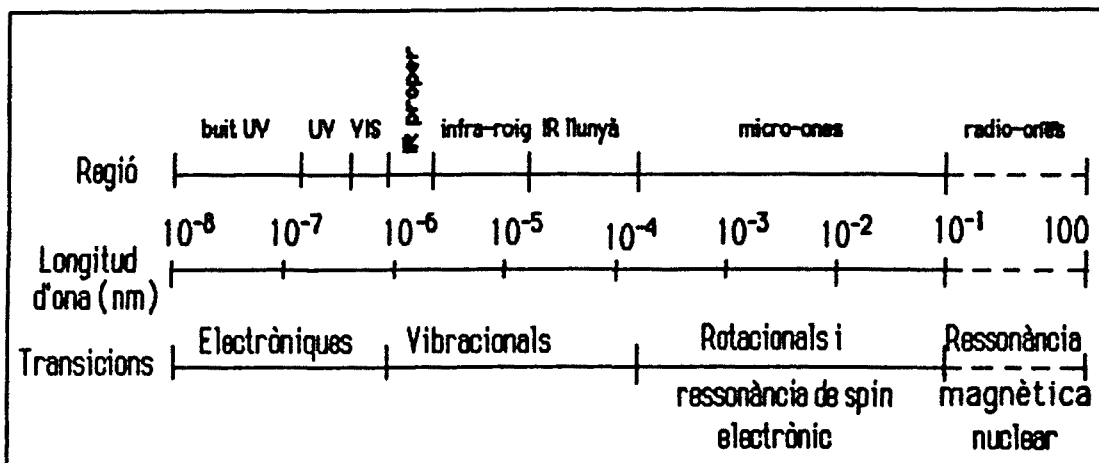
Les alíquotes així preparades es deixaren reposar una hora a 4°C i passat aquest temps es mesuraren activitats enzimàtiques tal com s'indica a l'apartat M3.1. L'HPA emprat en cada mesura d'activitat contenia una concentració de metall divalent equivalent al de la mostra a analitzar.

M4.- MÈTODES ESPECTROSCÒPICS.

Les tècniques espectroscòpiques s'han emprat durant dècades per a estudiar l'estructura i les reaccions dels diferents compostos, entre els quals es troben les macromolècules biològiques. Aquestes tècniques tenen, generalment, l'avantatge de no ésser destructives per als compostos estudiats i permeten, en determinats casos, treballar amb molt poca quantitat de mostra o fins i tot amb sistemes no purs.

Les tècniques espectroscòpiques es basen en l'estudi dels efectes que sofreixen diferents tipus de radiacions electromagnètiques (variacions d'intensitat, longitud d'ona, emissió de nova radiació,...etc.) en interaccionar amb el compost químic a estudiar. Les variacions observades en les radiacions són conseqüència de l'absorció o emissió d'energia per part de la substància interaccionant, energia que és utilitzada per provocar transicions energètiques de l'estat fonamental a diferents estats excitats.

Les partícules moleculars o atòmiques interaccionen amb un ampli marge de radiacions, donant lloc als diferents tipus d'espectroscòpia que s'assenyalen a la següent figura.



De tots aquests tipus d'espectroscòpia en aquesta Tesi es va treballar amb els que a continuació es descriuen.

M4.1.- Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat.

En aquest tipus d'espectroscòpia així com a la de visible, els canvis energètics tenen lloc entre nivells electrònics acompanyats de canvis entre nivells rotacionals i vibracionals. En aquesta Tesi s'ha fet servir l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat per a determinacions d'activitat enzimàtica, per a la identificació qualitativa de proteïnes i la seva anàlisi estructural i per a la determinació quantitativa d'aquestes.

Es va emprar en les diferents mesures, a menys que s'indiqui el contrari, un espectrefotòmetre de doble feix Cary 219, equipat amb termostatització de cubetes per circulació d'aigua procedent d'un bany termostàtic, amb un sistema que permet canvi automàtic de cubetes i de longitud d'ona i amb un compensador d'absorció base.

M4.1.1.- Identificació espectroscòpica i determinació quantitativa de PCPA-I, PCPA-II, CPA, PPE, PCPB, CPB i saA.

La PCPA monomèrica presenta un espectre d'absorció a l'ultraviolat amb un màxim d'absorció a 278.5 nm i un colze suau a 290 nm, originat pel seu contingut en residus de tirosina i triptòfan i pel baix contingut relatiu en aquest últim residu. La CPA, la CPB i la PCPB porcines presenten també espectres semblants. En canvi el complex binari de la PCPA i la PPE (PCPA-I) presenta el màxim d'absorció desplaçat a 282 nm a causa de la major proporció relativa de triptòfans aportats per la PPE.

Cal esmentar també que el saA presenta unes característiques espectrals intermedies, sobresortint, a més, l'existència de bandes intenses a la regió de 250-265 nm pel seu alt contingut en residus de fenilalanina. Els espectres esmentats es mostren a la Fig 21 i permeten la seva identificació qualitativa, per exemple en un perfil cromatogràfic del procés d'obtenció (apartats M1.1.1 i M1.1.2).

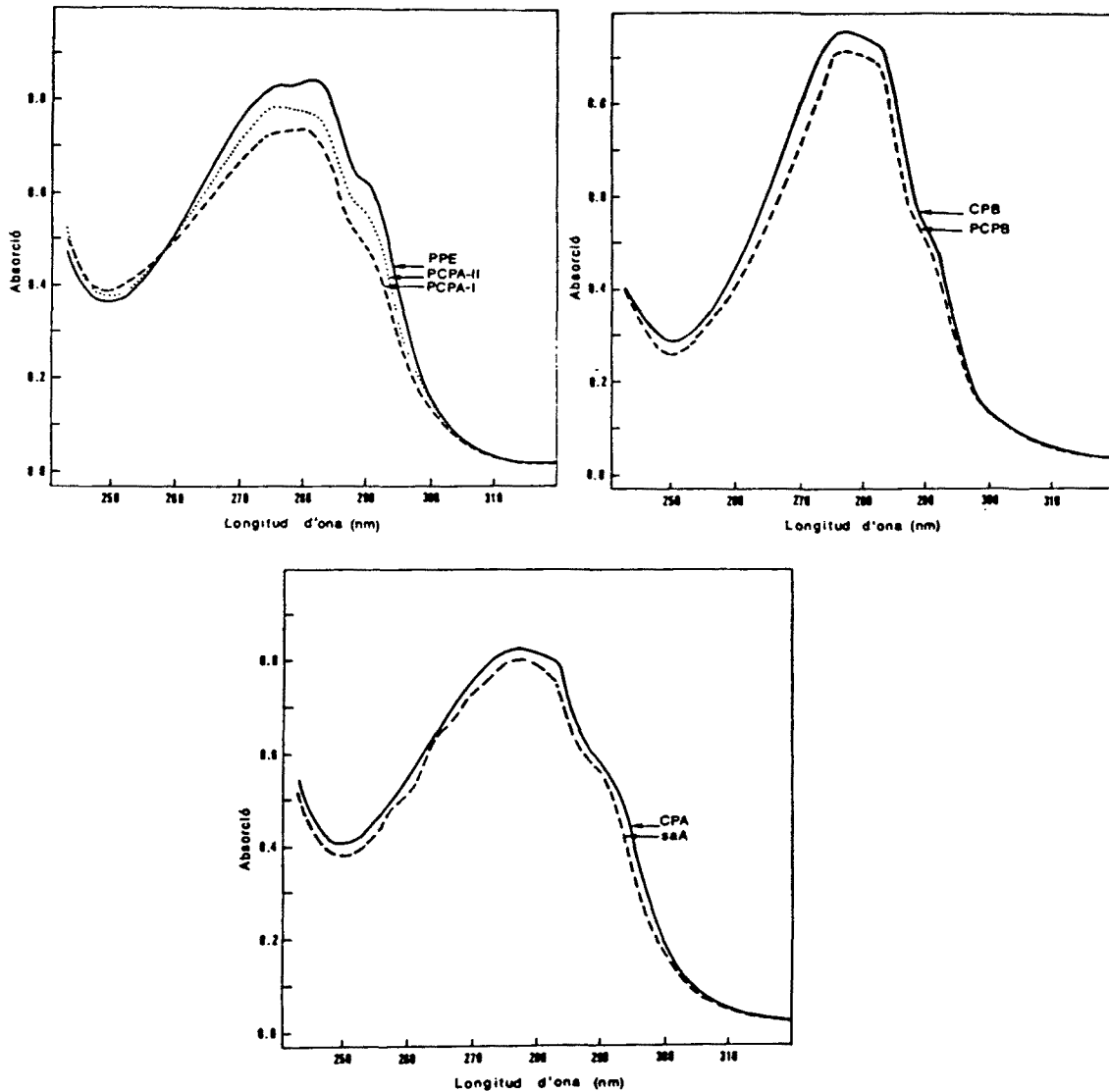


Figura 21.- Espectres d'absorció a l'ultraviolat de PCPA-I, PCPA-II, CPA, PCPB, CPB, PPE i saA.

També, a partir dels coeficients d'extinció a 280 nm (1 cm. de pas òptic) per una dissolució proteica a l'1% de PCPA-II, PCPA-I, CPA-II, PPE, PCPB, CPB i segment d'activació, que són 16.3, 19.9, 19.7, 24.5, 16, 21, i 14,3, respectivament (18,54,98,100), es pot calcular mitjançant mesures de densitat òptica la concentració de les diferents dissolucions proteiques esmentades quan es troben en estat pur.

M4.2.- Espectroscòpia de diferència i de quarta derivada a l'ultraviolat.

L'objecte principal dels experiments d'espectroscòpia de diferència portats a terme en aquesta Tesi va consistir a adquirir informació sobre la conformació proteica mitjançant l'estudi de les propietats espectrals de determinats residus dins de l'estructura tridimensional. El fonament de la tècnica consisteix, en general, a mesurar l'absorció d'una dissolució proteica o compost model, al llarg d'una regió espectral, enfront d'una dissolució de referència d'identica concentració però a diferent pH, força iònica, temperatura, composició del solvent,... etc. (137,138).

A grans trets, es troben dues respostes espectrals en aquest tipus d'espectroscòpia quan s'aplica a l'estudi físico-químic de proteïnes, que són:

a) aquelles en les quals els canvis espectrals són conseqüència de canvis en la conformació o estat d'agregació de la proteïna. Aquests canvis poden ésser induïts per variacions en la força iònica, pH, temperatura, concentració iònica,.. etc.

b) aquelles en les quals s'introdueix un canvi en les condicions del medi: temperatura, pressió, composició del solvent, pH,.....etc., sense modificar la conformació proteica ni l'estat d'agregació.

L'estudi efectuat en aquesta Tesi sobre les variacions dels canvis espectrals del segment d'activació en augmentar el pH del medi s'inclouen dins del primer grup. Quan s'efectua aquest augment de pH en una dissolució proteica els cromòfers en l'ultraviolat que es veuen més afectats són els residus de Tyr, ja que el seu grup fenòlic s'ionitza. Així, el pic típic causat per l'anell fenòlic no ionitzat, que a pH neutre o lleugerament alcalí es troba situat entre 274-275 o 275-278 nm depenent de si l'OH forma un pont d'hidrogen extern o intern, respectivament, (139,140) es desplaça cap a 295 nm, banda típica de l'ió fenolat.

En l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de proteïnes, sigui en les variants normal o de diferència, és habitual observar que les bandes dels diferents cromòfers són molt amples i solapades. Això és degut a la multiplicitat de nivells electrònics assolits i a la proximitat en l'espectre de les bandes d'absorció dels residus que absorbeixen a l'ultraviolat, Phe, Tyr i Trp. En els últims anys i per paliar aquest fet, s'ha desenvolupat l'espectroscòpia de derivades, tècnica que permet de millorar sensiblement la resolució dels espectres. Concretament, s'ha trobat que l'espectroscòpia de quarta derivada presenta els següents avantatges (141):

-tots els pics de l'espectre de quarta derivada corresponen a bandes d'absorció que tenen els màxims pràcticament a la mateixa longitud d'ona, i per tant no diferenciables en l'espectre normal,

-la quarta derivada pot revelar la presència de bandes constituents que no són evidents (o fins i tot no apareixen) en l'espectre original,

-els espectres de derivades d'ordre múltiple de quatre tenen l'avantatge sobre les altres, que presenten els màxims a la mateixa posició que els màxims de la banda original. Això fa més clara la correlació entre les bandes de la derivada i les de l'espectre normal,

-les bandes estretes són altament seleccionades en la quarta derivada, perquè la intensitat d'una corba de quarta derivada depèn en forma inversament proporcional de la quarta potència de l'amplada a mitja alçària de la banda original. Amb això, s'elimina la interferència de bandes d'absorció amples.

Aquesta tècnica s'ha emprat per l'estudi de la conformació de proteïnes a fi de conèixer quins residus aromàtics es troben en l'interior de la proteïna i quins en la seva superfície, és a dir, exposats al solvent (142). Permet, a més, de seguir canvis conformacionals d'una proteïna en variar les condicions del medi (pH, temperatura.. etc.) (142).

Per sistematitzar aquest tipus d'anàlisi Padrós i col. (143) han fet servir compostos model de Tyr , Trp i Phe en diferents solvents, a fi de reproduir les diferents condicions ambientals en què es poden trobar aquests residus en les proteïnes. Per comparació de les proteïnes estudiades amb aquests models, podem arribar a conèixer, en alguns casos, la situació dels diferents residus en la proteïna.

A partir dels estudis esmentats (143) , prenem com a model pel nostre cas una barreja de l'ester etílic de la N-Acetil-L-Tirosina (AcTyrOEt) i de l'amida del N-acetiltriptòfan (AcTrpA) a relació molar 4/1 en aigua destil.lada, ja que és el model, d'entre els estudiats, que més s'assembla a la nostra proteïna, el segment d'activació de la PCPA-II. L'espectre normal d'absorció i el de quarta derivada d'aquest model, es presenten a la figura 22. A partir dels estudis fets amb aquest model per

Padrós i col. i tenint en compte la posició de λ_1 (Fig 22) es poden considerar dos casos segons l'entorn sigui aquós o no:

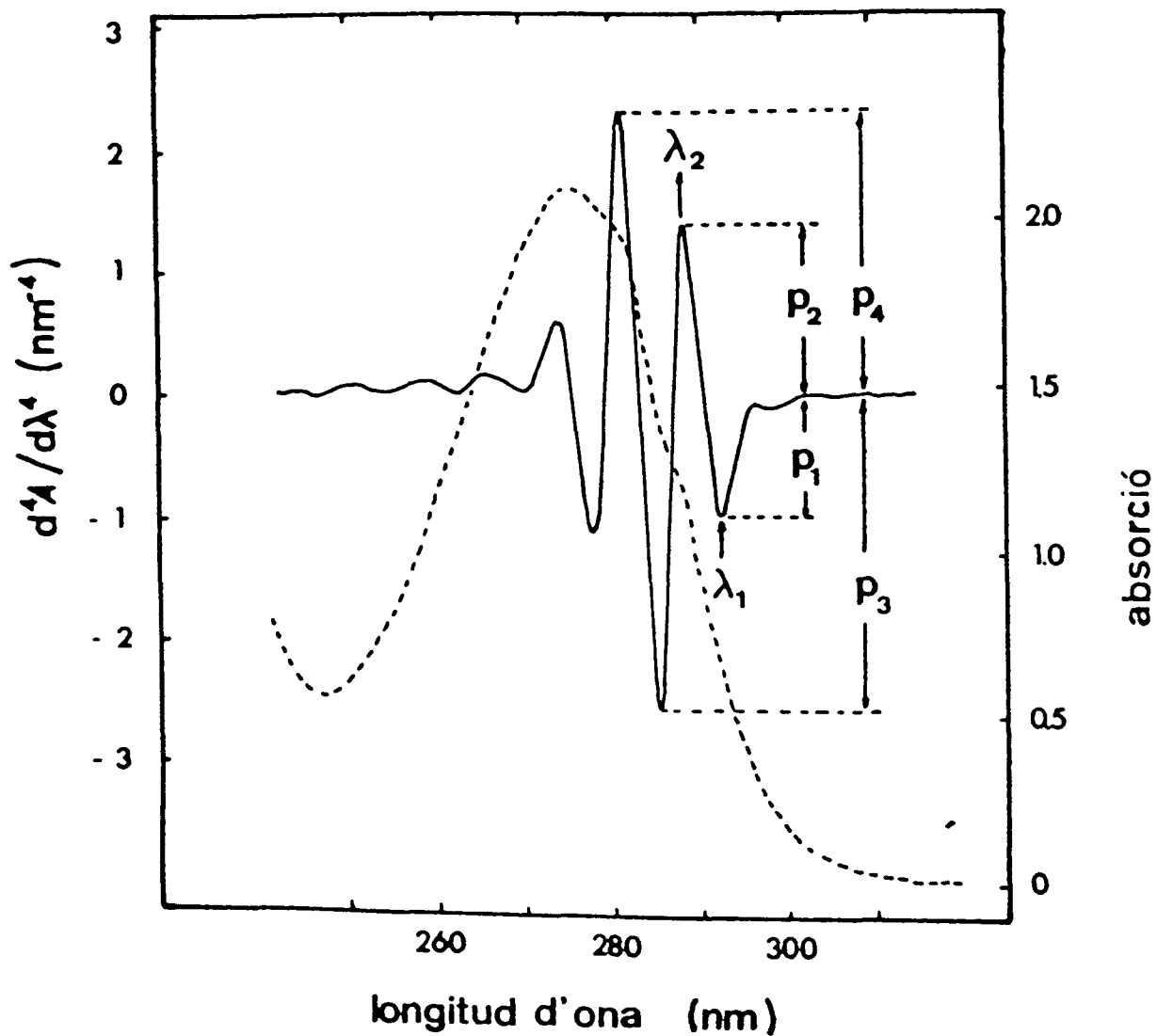


Figura 22.- Espectres d'absorció (----) i de quarta derivada (—) del compost model: barreja d'AcTyrOEt i AcTrpA a relació 4/1 (AcTyrOEt/AcTrpA), en aigua. $R = (p_1 + p_2 / p_3 + p_4)$.

- λ_1 igual o superior a 292 nm.

Aquesta és una posició característica del triptòfan, indicant poca influència de tirosina. Si el mínim se situa exactament a 292 nm. implica que tots els triptòfans es troben en un entorn aquós.

Si λ_1 se situa a 293 nm. o a valors més elevats, el triptòfan es troba en un medi hidrofòbic.

- λ_1 inferior a 292 nm.

La dissolució d'AcTrpA que presenta λ_1 amb una longitud d'ona més baixa és precisament en un medi aquós ($\lambda_1 = 292$ nm. en H_2O), mentre que per l'AcTyrOEt, el valor de λ_1 ($\lambda_1 = 286,5$ nm en H_2O) augmenta en disminuir el caràcter aquós del dissolvent. Per tant, si en l'espectre de quarta derivada es troben valors de λ_1 inferiors a 292 nm. però superiors a 286,5 nm. serà indicatiu de l'existència de tirosines en un entorn hidrofòbic.

En aquesta Tesi, els canvis espectrals del segment d'activació en augmentar el pH es van seguir, a més de per espectroscòpia de diferència, per espectroscòpia de quarta derivada. Es van mesurar els paràmetres següents, λ_1 , λ_2 i el valor R que correspon al quocient $(p_1+p_2)/(p_3+p_4)$ (veure fig 22). El valor de λ_1 , segons l'exposat abans, permet conèixer la posició del Trp al llarg de la titració, λ_2 correspon a l'espatlla de l'espectre d'absorció original i s'atribueix a l'anell fenòlic de la Tyr (142) i R dona una idea de l'alçada dels pics, alçada que varia al llarg del pH per desaparició de Tyr cap a tirosinat i possiblement per canvis en l'entorn del triptòfan.

M4.2.1.- Titració de la Tirosina del saA aïllat.

Els experiments es van fer en un espectrofotòmetre Perkin-Elmer model 320 de doble feix que té incorporat un micro-ordinador que permet d'obtenir espectres 1^a, 2^a, 3^a i 4^a derivades. Aquest aparell permet emmagatzemar un espectre en memòria i sumar-lo o restar-lo automàticament de l'espectre d'absorció de la mostra que s'estigui analitzant. Els portacubetes de la mostra i de la referència estan connectats independentment a un controlador de temperatura (Coleman, model 570-0702) que funciona per efecte Peltier i permet el control tèrmic amb una exactitud de dècima de grau.

Es partí de saA aïllat de la PCPA-II, dissolt a una concentració d'1 mg./ml. en NaCl 0.1M i ajustat a pH 8.0 amb KOH. Es prepararen 2 ml. d'aquesta dissolució que es filtraren per un filtre Millipore de 0.45 μ de mida de porus. Seguidament s'enregistrà el seu espectre normal i de quarta derivada fent servir com a referència NaCl 0.1M (pH 8.0).

Es fixaren els següents paràmetres de l'aparell:

Temps de resposta: 1 seg. Pas òptic: 1 nm.
Velocitat d'escombrat: 30 nm/min. Velocitat de paper: 5 nm./cm.
Temperatura : 25°C Interval de derivació: 1 nm.
Interval de longitud d'ona analitzat: 340 nm fins 240 nm.

A fi de començar la titració del segment per espectroscòpia de diferència es col·locà en la cubeta de referència dissolució de saA idèntica a la de la mostra i s'enregistrà l'espectre, el qual va correspondre a la línia base de la titració. Seguidament s'augmentà progressivament el pH de la cubeta de mostra per addicions successives d'alíquotes de KOH (5 μ l) de normalitats creixents (0.5 a 5N) segons s'augmentava el pH, i es va

aquest mesurar amb un pHmetre Radiometer PHM 84 que té incorporat un elèctrode combinat del tipus GK 2320C. Per cada valor de pH s'enregistrà l'espectre fins que noves addicions d'alcali ja no produïen cap canvi d'absorció. A la cubeta de referència s'hi afegí en cada pas un volum de tampó (NaCl 0.1M pH 8.0) igual al de KOH afegit a la mostra, a fi d'evitar diferències degudes a la dilució. A més, en cap cas la dilució total produïda per les succesives addicions fou superior al 5%.

Per cada valor de pH, a part de l'espectre de diferència, s'enregistrà el de quarta derivada, posant en la cubeta de referència tampó NaCl 0.1M (pH 8.0).

En acabar la titració es retornà la mostra al pH inicial, s'observà si es recuperava la línia base i es descartaren aquells experiments en què aquesta condició no es complia.

Els resultats s'han expressat representant els valors d'absorció a 295 nm dels espectres de diferència en funció del pH i ajustant la corba obtinguda a corbes teòriques de tipus sigmoïdal fent servir un programa d'anàlisi de regressions no lineals. Així mateix, s'ha representat els valors de R , λ_1 i λ_2 , dels espectres de quarta derivada, en funció del pH.

M4.3.- Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear.

Aquest tipus d'espectroscòpia es basa també en l'absorció d'una quantitat discreta d'energia per part dels nuclis dels àtoms que componen el material biològic a estudiar, però presenta unes característiques que la diferencien dels altres tipus d'espectroscòpia. L'observació d'una ressonància nuclear depèn de l'absorció d'una radiació de radiofreqüència

per un nucli amb un moment angular de "spin" diferent de 0 i amb un moment magnètic orientat en un camp magnètic extern. Les orientacions d'aquest moment magnètic nuclear varien en absorbir energia i es poden considerar com a nivells energètics entre els quals es produeixen les transicions.

Un espectròmetre de RMN consta dels mateixos elements que un espectròmetre d'absorció a l'ultraviolat, una font de radiació, un detector i un sistema de lectura. Una característica fonamental és que la diferència d'energia entre l'estat fonamental i els excitats en el nucli es crea aplicant un camp magnètic alt i extremadament uniforme. Cal ressaltar que les diferències entre els nivells energètics estan en funció directa del camp magnètic aplicat. Per tant, quant més gran sigui aquest, més grans seran les diferències entre els nivells energètics, i permetrà d'obtenir una resolució més gran en l'espectre enregistrat.

L'aplicació de l'espectroscòpia de RMN a problemes biològics o bioquímics és una de les activitats científiques que més ha crescut en els darrers anys. Les millores en la instrumentació han fet possible l'expansió d'aquesta àrea d'estudi fins a límits insospitats, només cal esmentar les recents tècniques de RMN bidimensional (144) comparables, quant a quantitat i qualitat d'informació estructural a la que pot proporcionar la difracció de raigs X.

L'aplicació de les tècniques de RMN va començar amb l'estudi d'aminoàcids i proteïnes, però, posteriorment, es va ampliar a l'estudi de nucleòtids i àcids nucleics, fosfolípids i membranes i actualment a l'estudi de sistemes vius (145,146,147).

En el cas de l'estudi de proteïnes aquesta tècnica s'aplica a diferents aspectes que inclouen conformació molecular en dissolució, dinàmica de la conformació proteïca, la hidratació de les

molècules proteiques, desnaturalització proteica, efectes allostèrics, aspectes estructurals i cinètics de la interacció entre enzims i substrats o inhibidors, interaccions intermoleculares entre proteïnes diferents, entre proteïnes i àcids nucleics o entre proteïnes i lípids, etc. (148).

Les proteïnes presenten una sèrie de nuclis que poden ésser estudiats, tals com H, C, N, O, S etc. No obstant, a la pràctica, el més estudiat és el nucli d'hidrògen, pel seu potent senyal, per la seva abundància natural, i per la ubiqüitat al llarg de totes les seqüències proteiques. Actualment, però, a causa de la millora instrumental i de la preparació de proteïnes enriquides en certs isòtops, per exemple ^2D , ^{13}C , ^{15}N , aquests nuclis també poden ésser estudiats (148,149).

Tots els espectres de RMN obtinguts en aquesta Tesi són de protó. Donat que cada protó genera una o diverses ressonàncies, l'espectre que s'obté d'una proteïna és molt complex ja que conté mils de ressonàncies difícils de separar, per gran que sigui el camp magnètic aplicat i encara que es treballi amb tractaments matemàtics dels senyals que permeten obtenir millors resolucions (148). Per això, encara que la informació obtinguda és exhaustiva, generalment només se'n fa servir una petita part, que normalment es limita a l'estudi de residus particulars, des del punt de vista de l'aparició d'algunes de les seves ressonàncies en parts de l'espectre relativament "netes". Aquests residus són els aromàtics com Tyr, His, Phe i Trp i altres residus que veuen desplaçades les seves ressonàncies a regions netes per tenir com a veí dins de l'estructura tridimensional de la proteïna algun anell aromàtic, com els coneguts "ring current shifts" soferts per les ressonàncies dels residus apolars(148).

M4.3.1.-Estudis de RMN del saA aïllat.

Tots els espectres de RMN esmentats en aquest apartat es van dur a terme amb un espectròmetre Bruker WH 270, equipat amb detecció de quadratura i amb un accessori que permet controlar la temperatura. Aquest espectròmetre té un magneto superconductor capaç de produir un camp magnètic de 6.4 Teslas, equivalents a una freqüència de ressonància de 270 MHz. per protó. Els espectres obtinguts en el domini temporal van ésser tractats i convertits al domini de freqüències per Transformada de Fourier. Es van fer servir els següents paràmetres: pols de 90° durant 12 µs., precedit d'un pols de desacoplament a la freqüència a què apareix el pic de l'aigua, de 0.3 µs., a fi de reduir el pic d'aquesta, amb una separació de 0.1 seg entre ambdues operacions. S'agafà un temps de mostreig de 0.6 seg. per acumular el senyal espectral en el domini del temps (FID). Es va acumular aquest senyal durant 2000 escombrats successius a fi d'incrementar la sensibilitat. Les millores de la resolució es van aconseguir tractant els senyals (FID) per diferència de convolució (150).

En la majoria dels experiments els desplaçaments químics es van referir a la freqüència de ressonància dels protons del DSS (àcid 2,2 dimetil-2-silapentà-1-sulfònic), observada en experiments paral·lels.

Les mostres de saA analitzades van ésser prèviament obtingudes segons M1.1.2, liofilitzades i guardades a -20°C. Algunes de les preparacions contenien contaminants orgànics, probablement del procés d'obtenció, detectats per l'aparició de ressonàncies molt agudes a la zona de camps alts de l'espectre. Aquests contaminants es van eliminar per precipitació isoelèctrica del segment d'activació a pH 4.7. Aquest mètode també es va emprar en determinats casos per eliminar aigua i

substituir-la per $^2\text{H}_2\text{O}$. Totes les mostres es van redissoldre en $^2\text{H}_2\text{O}$ 99.8% o en el tampó adient, preparat amb $^2\text{H}_2\text{O}$ 99.8%, es van enregistrar els espectres a 25°C, si no s'indica el contrari.

Abans de dur a terme qualsevol espectre, el segment d'activació dissolt en $^2\text{H}_2\text{O}$ a una concentració de 3-5 mg./ml. s'ajustà a pH 8.5 i es deixà a temperatura ambient durant 15 min. Aquest procediment aconseguí d'eliminar la major part de les ressonàncies dels protons -NH. que compliquen l'anàlisi espectral. Posteriorment, la mostra s'equilibrà al pH desitjat amb NaOH o ^2HCl , o per addició del tampó corresponent deuterat.

Amb la mostra així preparada es van portar a terme els estudis que a continuació es descriuen.

M4.3.1.a.- En variar la força iònica del medi.

Es va estudiar la conformació del saA aïllat de la PCPA i es van enregistrar espectres de RMN a diferents forces iòniques. S'augmentà progressivament la força iònica del medi per addició de NaCl des de 20 mM fins a 1 M.

M4.3.1.b.- En variar el pH del medi. Titracions de ressonàncies de residus singulars.

Es van estudiar les propietats estructurals del saA aïllat mitjançant RMN variant el pH des de 5.7 fins a 13.0 per addició de NaOH. Per sota de pH 5.7 i fins a pH 3.0 aquest estudi no va ésser possible a

causa de l'agregació macroscòpica de la proteïna. Per sota de pH 3.0 es van fer alguns espectres que indicaren una pèrdua considerable de conformació.

Els valors de pH de les mostres estudiades es van mesurar dins dels mateixos tubs de RMN amb un pHmetre equipat amb un elèctrode de 3 mm. de diàmetre. Es va prendre com a valors finals de pH els que donaven les lectures directes del pHmetre sense fer correccions per la presència de $^2\text{H}_2\text{O}$.

En aquest experiment, a part d'estudiar la conformació global del segment d'activació, se seguiren les titracions de determinats residus singulars de la proteïna tals com Tyr i His, representant els valors dels desplaçaments químics dels protons C-2,6 i C-3,5 de la Tyr i els del protons C-2 i C-4 de les His enfront del pH. En aquests experiments de titració, els desplaçaments químics es van referir al senyal del clorur de tetrametilamoni (1mM) afegit a la mostra, i posteriorment van ésser referits al senyal del DSS per addició de 3.17 ppm.

Els resultats experimentals de les corbes de titració es van ajustar a corbes teòriques de tipus sigmoïdal fent servir un programa d'anàlisi de regressió no lineal.

M4.3.1.c.- Bescanvi de protons -NH.

L'estudi de la cinètica de bescanvi de protons -NH (de l'esquelet, d'histidines i de triptòfan) es va portar a terme dissolent el segment d'activació en 5 mM fosfat potàssic (pH 6.7), bé amb sal (1M NaCl) o bé sense, i es va enregistrar una sèrie d'espectres a diferents temps : 10 50, 80, 160, 340 i 550 min. des del moment de la dissolució.

M4.3.1.d.- Deuteració d'histidines.

L'estudi del bescanvi dels protons C2 de les tres histidines del segment d'activació per àtoms de deuteri es va dur a terme en tres condicions diferents:

- 1) 20 mM fosfat potàssic (pH 8.5) i a 25°C de temperatura.
- 2) 20 mM fosfat potàssic (pH 6.5) i a 40°C de temperatura.
- 3) 20 mM fosfat potàssic (pH 7.3) i a 50°C de temperatura.

i es van enregistrar els espectres de RMN a diferents temps des de la dissolució del segment d'activació en el tampó corresponent.

Per comparar les diferents velocitats de deuteració de les tres histidines es va representar semilogàrítmicament la disminució de les àrees de cada ressonància d'histidina enfront del temps.

M4.3.1.e.- En augmentar la concentració d'urea.

L'efecte de la urea sobre el segment d'activació es va observar enregistrant espectres de RMN de dissolucions d'aquest que contenien concentracions creixents d'urea.

Sobre el segment d'activació inicialment dissolt a 5 mg./ml en tampó fosfat potàssic a pH 6.5, s'hi addicionà urea sòlida deuterada (Sigma) de manera que la concentració d'aquesta creixés gradualment des de 0 M fins a 8 M. El pH de la mostra es comprovà després de cada addició.

M4.3.1.f.- Iodació selectiva.

Una altra modificació química del segment d'activació

realitzada i seguida per RMN fou una iodació feta per addició d'alíquotes de 0.05M I₂ / 0.25M IK / ²H₂O a una dissolució de la proteïna en 10 mM tetraborat sòdic (pH 9.0). Les relacions molars I₂/SA s'incrementaren des de 0 fins a 8, i es van enregistrar els espectres de RMN després d'una hora d'haver fet la corresponent addició i d'haver deixat la mostra a 25°C.

M4.3.1.g.- Experiments de NOE (Nuclear Overhauser Enhancement).

El Nuclear Overhauser Enhancement és una tècnica particular dins de la RMN que dona informació de la proximitat de dos nuclis amb acoplament dipolar. En aquests tipus d'experiments es tractà d'observar relacions espacials entre els residus aromàtics (His, Tyr i Trp), que presenten ressonàncies a les zones de camps baixos, i els RCS o ressonàncies de metils desplaçades per corrents d'anell, que apareixen a camps alts.

Tècnicament, els espectres de NOE es van obtenir tal com s'explica a la referència (151), que bàsicament consisteix a enregistrar vuit FID irradiant la ressonància triada (aromàtic o RCS) i després restar-li uns altres vuit FID enregistrats fixant la irradiació en un punt del camp (alt o baix) on no hi hagi cap ressonància de la proteïna estudiada. El cicle es repeteix moltes vegades fins arribar a tenir un senyal prou intens sobre el soroll de fons. Van ésser necessaris de 100.000 a 400.000 escombrats a fi d'observar un efecte clar.

M4.3.2.- Comprovació de la puresa del saA aïllat. Estudi per RMN de les diferents subformes moleculars que presenta.

Tal com s'indica a l'apartat M1.1.3, el segment d'activació de la PCPA monomèrica presenta una multiplicitat de bandes en ésser analitzat per electroforesi. Algunes d'elles es van poder fraccionar (apartat M1.1.3) o bé es van obtenir en estat pur en alguna de les preparacions. Aquestes formes es van analitzar per RMN de protó a fi de xequer possibles canvis diferencials en la seva conformació. Concretament, es van obtenir en estat pur les bandes B i D, les quals es van comparar entre si i amb una mostra que contenia una barreja de bandes A, B, C, D i E (per nomenclatura veure fig 17, apartat M1.1.3).

Els espectres de RMN de les diferents mostres es van portar a terme amb un espectròmetre Bruker 2000 que treballa amb acumulació de doble precisió en la Transformada de Fourier i equipat amb un accessori que permet de controlar la temperatura. Aquest espectròmetre té un magneto superconductor capaç de produir un camp magnètic de 11.8 Teslas equivalent a una freqüència de ressonància de 500 MHz per protó. Per a la realització dels espectres es van fixar els següents paràmetres: nombre d'escombrats entre 1000 i 2000, pols de 45° durant 5 seg, fent servir un temps de mostreig de 2,7 seg. El senyal de l'aigua s'eliminà per irradiació contínua de les ressonàncies dels protons d'aquesta durant el temps d'acumulació.

Les diferents mostres del segment d'activació analitzades van ésser liofilitzades i mantingudes a -20°C fins al moment de la seva dissolució. Totes les mostres van ésser dissoltes en $^2\text{H}_2\text{O}$ 100%, ajustant el pH per addició d'alíquotes de NaOH o HCl . Els valors de pH es van

mesurar amb un pHmetre Radiometer equipat amb un elèctrode de 3 mm de diàmetre. Els protons bescanviabls van ésser eliminats incrementant el pH de la mostra a 8.5-9.0 i mantenint-la en aquestes condicions durant 15 min a temperatura ambient. En acabar aquest temps, el pH s'ajustà a 6.5 el que fou el pH al qual s'enregistraren tots els espectres. Així mateix aquests es van fer a 25°C.

Els desplaçaments químics dels diferents pics de l'espectre van ésser referits a la ressonància dels protons de l'aigua que no s'acabava d'eliminar completament en ésser irradiada ($\delta\text{H}(\text{H}_2\text{O}) = 4.70 \text{ ppm}$).

M4.4.- Espectroscòpia de fluorescència.

Tal com s'ha esmentat a la introducció de les tècniques espectroscòpiques, determinades molècules orgàniques mitjançant absorció d'energia sofreixen una elevació dels electrons de les capes externes a nivells electrònics superiors, podent ocupar dins d'ells diferents nivells vibracionals. Ara bé, un cop es troben en aquests nivells superiors poden succeir dos fenòmens, en el primer d'ells tota l'energia d'excitació es perd per col·lisions entre les diferents partícules (per exemple per generació de calor), i en el segon d'ells la partícula perd una part de l'energia d'excitació en forma de calor fins arribar a situar-se en el nivell vibracional fonamental del primer estat excitat electrònic i des d'aquest nivell retorna al nivell electrònic fonamental emetent radiació, evidentment de freqüència inferior (o λ menor) que la d'absorció. Les característiques d'aquest fenomen depenen de l'estructura de la molècula orgànica. Amb ell s'obté informació estructural aprofitada per la tècnica d'espectroscòpia de fluorescència.

Aquesta tècnica té múltiples aplicacions a bioquímica de les quals es poden esmentar: l'anàlisi qualitativa de mostres per identificació dels seus espectres, l'anàlisi quantitativa fent servir estàndards interns, assaigs enzimàtics i anàlisi cinètica posterior, estudis sobre l'estructura de proteïnes, sobre la interacció de lligands amb macromolècules,.....etc. (152).

L'espectroscòpia de fluorescència presenta l'avantatge de permetre de treballar amb quantitats de mostra molt petites per la seva elevada sensibilitat, però cal tenir en compte que no tots els compostos orgànics són fluorescents. Les proteïnes estudiades en el nostre cas, però, presenten una fluorescència intrínseca deguda a Trp i Tyr que és molt útil per al seu estudi. A part de la fluorescència intrínseca es poden fer interaccionar les proteïnes amb determinats marcadors fluorescents, la fluorescència dels quals canvia a causa de la interacció, donant així informació sobre l'estructura proteica o bé sobre algun altre paràmetre particular.

M4.3.1.- Fixació de Ca^{2+} i Tb^{3+} al saA.

En el nostre cas, un marcador fluorescent utilitzat ha estat el Tb^{3+} . Aquest metall presenta en ésser excitat una sèrie de màxims de fluorescència (concretament a 620, 585, 545, 512 i 488) en el seu espectre d'emissió a causa de diferents tipus de transicions electròniques (153). A part, s'ha descrit que determinats tipus de proteïnes, concretament les anomenades "proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand", veuen afectada la seva fluorescència intrínseca per interacció amb el Tb^{3+} , essent, a la vegada, la fluorescència pròpia del metall afectada per aquesta interacció (116,118).

Aquest fet descrit permet de seguir la fixació del metall a la proteïna fent una titració amb dissolucions de Tb^{3+} i enregistrant les mesures de fluorescència relativa en els màxims de les bandes presentades tant per la proteïna com del propi metall, en ésser excitats a les longituds d'ona adjacents.

Totes les mesures de fluorescència es van obtenir en un espectrofluorímetre Perkin-Elmer 650-40, connectat a una estació de dades Perkin-Elmer 3600, la qual permet de controlar els diferents paràmetres de l'aparell de fluorescència així com registrar els espectres que es realitzen. L'aparell està termostatitzat per connexió de la torre de la cubeta a un bany termostàtic. Els paràmetres de l'aparell s'han fixat per treballar amb una reixeta d'excitació i d'emissió de 5, amb un "gain" alt, en "mode" R i amb resposta elevada.

La titració es va efectuar sobre 1 ml. de dissolució de saA a una concentració entre 0.08 i 0.1 mg./ml. ($8 \times 10^{-6}M - 10 \times 10^{-6}M$), dissolució que havia estat tractada prèviament per extreure-li el Ca^{2+} tal com s'indica a l'apartat M5. El saA es va dissoldre en tampó Bis-Tris 10 mM (pH 6.4), i es va procedir a la titració bé en aquest tampó sol, bé en el tampó més KCl 0.1M, o bé en el tampó més Cl_2Ca 1 mM. Les addicions de Cl_3Tb es van fer amb una xeringa Hamilton de 5 μ l. de volum total, a partir de dissolucions stock concentrades, de manera que s'evités al màxim la dilució de la mostra (la dilució no va ésser mai superior al 5%). Les relacions molars Tb^{3+} /segment d'activació a les quals es va mesurar la fluorescència foren: 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.50, 2.75, 3.0, 3.25, 3.50, 3.75 i 4.0. Així mateix, es va fer una titració amb Tb^{3+} fins a una relació molar Tb^{3+} /saA de 2.0 i després es va intentar revertir l'efecte per addició de concentracions creixents de Ca^{2+} , Mg^{2+} i Cd^{2+} (relacions

molars metall/saA des de 0 fins a 14000), a fi de veure possibles desplaçaments del Tb^{3+} per altres metalls, cas que es dona en les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand (108,118).

Les longituds d'ona d'excitació i emissió emprades foren les següents:

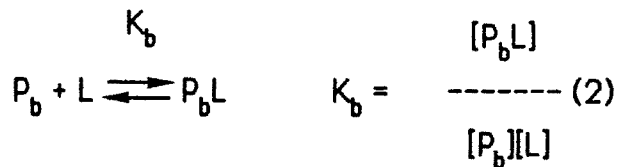
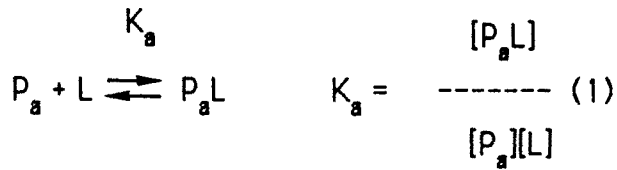
-Longitud d'ona d'excitació 235 nm., i mesura l'emissió a 545 nm (fluorescència del metall) i a 340 nm. (fluorescència intrínseca de la proteïna).

-Longitud d'ona d'excitació 265 nm., i mesura l'emissió a 488 nm (fluorescència del metall) i a 340 nm. (fluorescència intrínseca de la proteïna).

-Longitud d'ona d'excitació 280 nm., i mesura l'emissió a 488 nm (fluorescència del metall) i a 340 nm. (fluorescència intrínseca de la proteïna).

De la mateixa manera que s'ha descrit la titració amb Tb^{3+} , s'ha efectuat una titració amb Ca^{2+} excitant a les mateixes longituds d'ona descrites però enregistrant la fluorescència només a 340 nm., que és el pic corresponent a la fluorescència intrínseca de la proteïna.

Amb la finalitat de calcular la constant d'associació, quan l'anàlisi dels valors de la intensitat de fluorescència en funció de la relació molar metall/proteïna ha donat, per representació directa, una corba tipus hiperbòlic, aquesta s'ha intentat d'ajustar a un tractament matemàtic tipus Adair-Klotz (118, 154). Per això s'han suposat dos llocs, a i b, de fixació de metall diferents i independents:



de manera que la intensitat de fluorescència, F , a cada punt, serà funció de la fracció de saturació (α_a i α_b) de cada lloc, és a dir:

$$F = F_a \alpha_a + F_b \alpha_b = F_a \frac{[P_aL]}{[P_a] + [P_aL]} + F_b \frac{[P_bL]}{[P_b] + [P_bL]} \quad (3)$$

on F_a i F_b són la fluorescència màxima dels llocs a i b quan es troben totalment saturats. Substituint (1) i (2) en (3) i tenint en compte que $F_{\max} = F_a + F_b$ podem escriure:

$$F = F_a \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} + (F_{\max} - F_a) \frac{K_b [L]}{1 + K_b [L]}$$

$$F = F_a \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} - \frac{K_b [L]}{1 + K_a [L]} + F_{\max} \frac{K_b [L]}{1 + K_b [L]}$$

$$\frac{F}{F_{\max}} = \frac{F_a}{F_{\max}} \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} - \frac{K_b [L]}{1 + K_a [L]} + \frac{K_b [L]}{1 + K_b [L]}$$

$$F' = F_a \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} - \frac{K_b [L]}{1 + K_a [L]} + \frac{K_b [L]}{1 + K_b [L]}$$

essent $[L]$ la concentració de lligand lliure i sabent que $[L] = [L]_{\text{total}} - \nu[P]_{\text{total}}$, on ν és la fracció de saturació total $\nu = \alpha_a + \alpha_b$, es pot fer un ajust de K_a , K_b i F_a per mínims quadrats no lineals seguint un mètode de Newton-Gauss (155) a partir dels valors de F i $[L]_{\text{total}}$ a cada punt.

M5.- PREPARACIÓ DE MOSTRES PER EXPERIMENTS DE FIXACIÓ DE METALLS.

Es conegut que quan es treballa en la fixació de metalls a proteïnes cal tota una sèrie de precaucions especials per evitar contaminacions d'aquests, així com tractaments especials de les mostres proteiques que els portin units a fi de poder-los eliminar i treballar, quan calgui, amb apoproteïnes (156,157).

En aquesta Tesi, sempre que es va estudiar la fixació de metalls, tant per experiments de fluorescència (apartat M4.4) com per calorimetria (apartat M6), es van tenir en compte les següents precaucions:

Quant al material a emprar:

1.- Sempre que fou possible es va treballar amb material de plàstic ja que el seu ús és aconsellat sobre el vidre (157).

2.- Tot el material de plàstic i/o vidre va ésser rentat amb el detergent quelant EXTRAN MAD1 alcalí (Merck), i es va deixar tota una nit submergit en una dissolució del 5 al 10% d'aquest. Al dia següent es va rentar exhaustivament amb aigua destil.lada i desionitzada i es va guardar sempre protegit de la pols ambiental.

3.- L'aigua emprada per a la neteja del material i per a la preparació dels tampons va ésser sempre destil.lada i passada a través d'una columna de reïna bescanviadora d'ions AG501X(D) (Bio Rad Lab.) a un flux de 5 ml./min.

4.- Tots el tampons van ésser preparats amb l' aigua esmentada i després es van passar per una columna de Chellex 100 (Bio Rad Lab.) prèviament equilibrada amb el mateix tampó (cal equilibrar el pH de la columna amb un tampó de força iònica més elevada del que s'hi vol passar i

després baixar la força iònica fins a un valor constant i igual al del tampó d'entrada, abans de començar a recollir tampó per a treballar).

Quant al tractament de les mostres:

1.- Van ésser dissoltes o dialitzades en el tampó adient preparat tal com s'ha explicat abans i passades a través d'una minicolumna (montada en una pipeta Pasteur) de Chellex 100 equilibrat tal com s'indica abans.

2.- Es va procurar sempre que el nombre de manipulacions de la mostra així tractada fos el mínim abans de començar l'experiment. Així, si es requeria determinar la concentració d'aquesta, se'n va prendre una alíquota per aquesta determinació la qual, posteriorment, es va descartar.

M6.-CALORIMETRIA.

Fins fa realment poc temps, les tècniques calorimètriques no s'han emprat ampliament en l'estudi de sistemes biològics, per la carència d'instruments comercials suficientment sensibles per mesurar les petites quantitats de calor que acompanyen seves les transicions. No obstant, en els últims deu anys s'han fet gran quantitat d'estudis en sistemes biològics fent servir aquesta tècnica, la qual permet d'obtenir, entre altres, les següents informacions: canvis d'entalpia, d'entropia i d'energia lliure de reaccions catalitzades per enzims, corbes d'unió de lligands a macromolècules que permeten el càlcul dels valors de la constant d'associació així com del nombre de llocs de fixació i dels paràmetres termodinàmics del sistema. Així mateix, es poden conèixer els paràmetres termodinàmics de canvis conformacionals soferts per les molècules biològiques a partir dels quals és possible d'arribar a trobar el nombre de dominis estructurals del sistema estudiat (158).

Els sistemes biològics estudiats poden ésser tant proteïnes i àcids nucleics com estructures supramoleculares tals com membranes, nucleosomes i cromatina (158).

Hi ha diferents tipus de calorímetres, isotèrmics de reacció discontinua, isotèrmics de flux, i d'escombrat diferencial (158), dels quals en aquest treball s'han emprat el primer i l'últim esmentats, tal com es descriu en els apartats següents.

M6.1.- Calorimetria de reacció.

Aquest tipus de calorimetria permet de seguir la unió d'un lligand a una macromolècula per mesura del calor absorbit o alliberat en la unió.

El microcalorímetre de reacció discontinua emprat en aquest treball és un LKB 10700 que basa el seu funcionament en el principi del calorímetre bessó, el qual consisteix en dues cel·les d'idèntica construcció de dimensions 4x3x1 cm., situades l'una a prop de l'altra i mantingudes a la mateixa temperatura, ja que estan immerses en un bloc d'alumini i a la vegada aquest bloc està situat dins d'una cambra d'aire termostatitzat. Cada una de les cel·les presenta una paret intermitja que forma dos compartiments connectats per la part superior. Aquests compartiments permeten d'introduir els reactius evitant que es barregin abans d'arribar a l'equilibri tèrmic. Una vegada aconseguit aquest equilibri el bloc calorimètric gira permetent la barreja del contingut dels dos compartiments de cada cel·la.

El calor desenvolupat en una reacció, que es produeix en la cel·la anomenada de reacció, provoca un canvi de temperatura entre aquesta cel·la i la de referència (que només conté un dels reactius i el tampó en què té lloc la reacció) la qual cosa fa que es produeixi una diferència de potencial entre les piles connectades a cada una d'elles. Aquesta diferència s'amplifica amb un microvoltímetre (Keithley) i es registre en un registre potenciomètric. El registre que s'obté és una corba voltatge-temps.

El calorímetre aquí descrit és l'instrument idoni per a l'estudi de reaccions biològiques, però presenta l'inconvenient de que per cada addició d'alíquotes de qualsevol producte de reacció dins de les cel·les cal esperar un mínim de dues hores per al nou equilibrat del calorímetre abans de poder fer la nova mesura. Per això, Woledge (159) i Fulling (160) modificaren el calorímetre acoplant un sistema de xeringes mogudes per un motor sincrònic. Per addicions successives dels reactius de les xeringes a les cel·les calorimètriques aquests autors trobaren corbes de valoració amb un gran estalvi de temps i de productes reaccionants.

La firma LKB ha dissenyat una unitat de valoració com la descrita per Fulling que s'ha acoplat al calorímetre emprat en aquest treball. Dues xeringues Hamilton de 0.5 ml. acoplades a la part exterior del calorímetre estan connectades directament a les cel·les calorimètriques per tubs capilars de tefló (1.7 mm. i 0.2 mm. de diàmetre exterior i interior, respectivament.) (veure Fig 23).

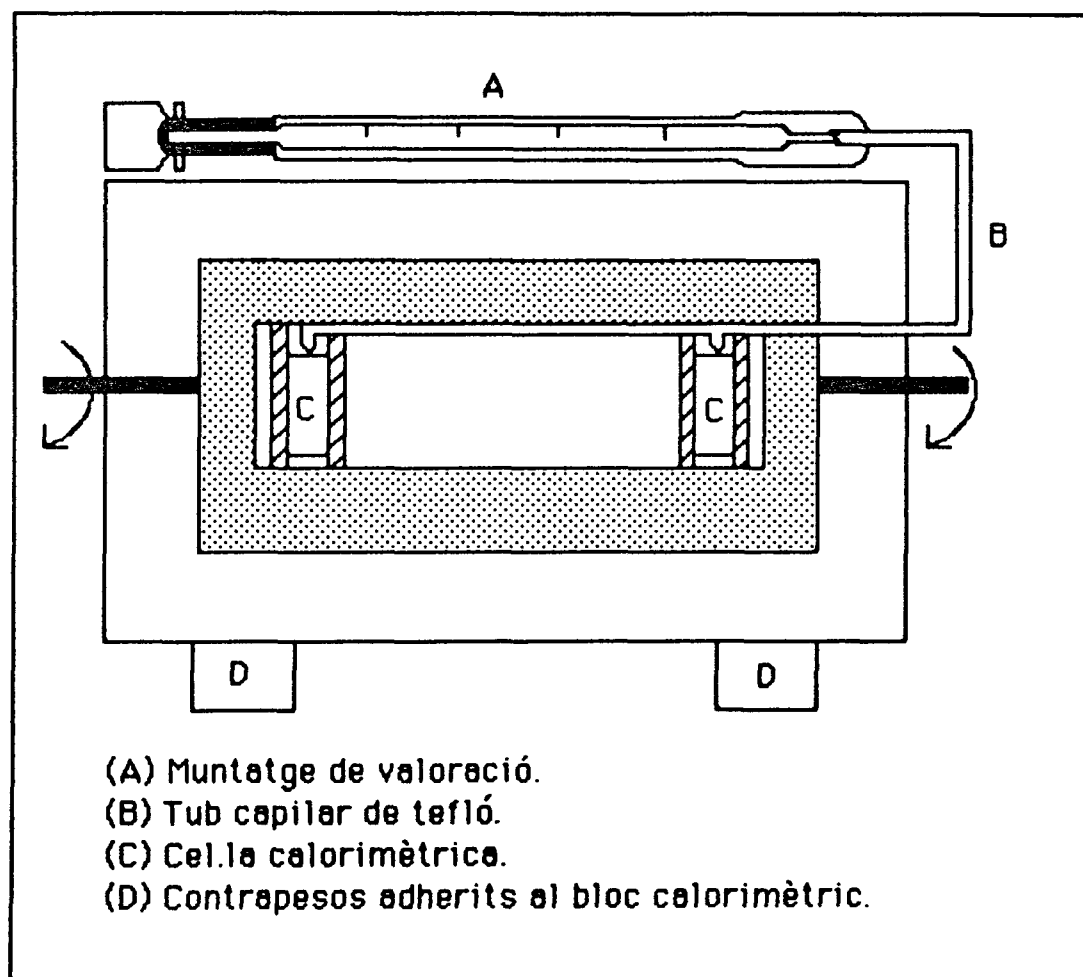


Figura 23.- Esquema del calorímetre de reacció amb el muntatge de valoració.

Durant el període d'equilibri tèrmic el bloc calorimètric gira, un cicle normal de barreja, amb l'objecte d'eliminar possibles efectes tèrmics a causa de l'adsorció dels productes de reacció a les parets del calorímetre. D'aquest anomenat "mixing", s'obté un registre l'area del qual cal sostreure dels registres dels diferents punts de la corba d'unió.

La injecció de dissolucions a les cel.les de reacció i referència es produeix al mateix temps i s'injecta el mateix volum.

El senyal voltatge-temps que s'obté és integrat per mitjà d'un microordinador Commodore 64 al qual s'ha acoblat una interfase. L'ordinador pot ésser programat per regular el temps d'integració i el nombre d'experiments.

Per a conèixer la proporcionalitat entre les àrees sota les corbes i el calor és necessari calibrar l'aparell prèviament, és a dir, enviar un corrent elèctric conegut a través d'una resistència situada dins de les cel.les durant un temps determinat i mesurar les àrees del registre obtingut amb aquest corrent. De la fórmula $Q=I^2Rt$ s'obté el calor que correspon a la superfície. El quocient entre $Q/\text{àrea}$ es denomina constant de calibrat i es representa per ϵ . A partir d'aquesta dada, quan es dugui a terme un experiment qualsevol només cal conèixer les arees sota els pics i multiplicar-les per aquesta constant a fi de trobar la calor de reacció corresponent.

Per obtenir una corba d'unió d'un lligand a una macromolècula a partir de les arees registrades cal multiplicar aquestes per la constant de calibrat, addicionar-les i representar l'entalpia (calor per mol de reactant a les cel.les) enfront de la concentració de lligand. Quan s'arriba a una saturació, la representació gràfica arriba a un "plateau" a partir del qual es

dedueix en primera aproximació l'entalpia de saturació. Per a millorar aquest valor es procedeix segons el mètode descrit per Wädso i Laynez (161), consistent a representar els inversos de les entalpies enfront dels inversos de la concentració de lligand lliure. La representació correspon a la fórmula:

$$1/\Delta H = 1/\Delta H_{\max} + (1/[L])(1/K_a\Delta H)$$

on [L] és la concentració de lligand lliure i K_a es la constant d'associació.

Tal com es pot veure l'equació escrita és l'equació d'una recta. Del seu tall amb l'eix d'ordenades es troba l'entalpia màxima i del pendent la constant d'associació. Aquesta representació cal iterar-la fins que l'error en les successives iteracions de l'entalpia màxima sigui inferior al 5%. En aquest punt es té l'entalpia màxima i la constant d'associació. Posteriorment, per comprovar els valors així obtinguts es tracta d'ajustar-los a la corba experimental. Per això només cal calcular noves entalpies amb les dades de K_a , de ΔH_{\max} i de lligand lliure. Es representa la corba i es compara amb l'experimental.

M6.1.1.- Fixació de Ca^{2+} i Tb^{3+} al saA aïllat.

Aquesta fixació es va seguir per calorimetria de reacció, i es va construir una corba de fixació tal com s'especifica en l'anterior apartat.

Les mostres de saA van ésser tractades tal com s'especifica en l'apartat M5. Es va treballar amb una dissolució de saA en tampó Bis-Tris 10 mM (pH 6.4) a una concentració de $4.59 \times 10^{-5} M$, en un volum de 5 ml. Les addicions es van fer a partir d'una dissolució mare de Cl_3Tb preparada en el mateix tampó en el qual es trobava el segment i exactament al mateix pH.

Es van fer addicions de metall i es van enregistrar les corbes voltatge-temps a diferents relacions metall/segment d'activació.

El tractament de les dades experimentals es va fer tal com s'indica en l'apartat anterior M6.1.

M6.2.- Calorimetria d'escombrat diferencial (DSC).

La calorimetria d'escombrat diferencial és un mètode per mesurar la capacitat calorífica d'un sistema en funció de la temperatura, resultant ésser una tècnica fonamental per a l'estudi de l'estructura i propietats fisico-químiques de les proteïnes mitjançant l'anàlisi de la seva desnaturalització tèrmica (162-165).

Aquest tipus de calorimetria té la capacitat potencial per a resoldre les transicions estructurals que sofreix un determinat compost químic quan és sotmès a una variació sistemàtica de temperatura. Suposem un sistema format per una dissolució proteica al qual se li proporciona un flux de calor. Aquest calor absorbit per la proteïna produirà, primer, un increment del moviment vibracional i rotacional de les molècules. Una mesura d'aquest calor es la capacitat calorífica C_p que es defineix com la quantitat de calor necessària per elevar la temperatura de la molècula 1°C . Els calorímetres determinen C_p en funció de la temperatura. Valors de C_p petits són característics d'estructures natives mentre que valors grans són característics d'estructures obertes o desnaturalitzades. A mesura que la temperatura va augmentant el sistema sofreix una transició (absorbint o cedint calor) a causa d'un canvi conformacional que normalment és una desnaturalització. L'entalpia d'aquesta transició (ΔH_{cal}) es determina directament per mesura de l'àrea a sota del pic que apareix en representar



C_p en funció de la temperatura (veure Fig 24). El canvi d'entropia de la transició ve donat pel quocient entre $\Delta H_{cal}/T_{tr}$ essent T_{tr} la temperatura de la transició.

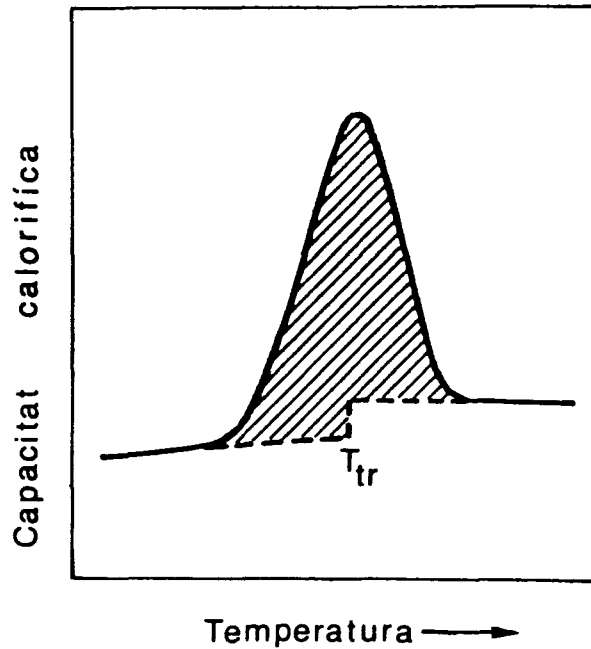


Figura 24.- Corba idealitzada de DSC per a la desnaturalització d'una proteïna.

La capacitat calorífica de la proteïna es registra en funció de la temperatura. Com es pot observar la capacitat calorífica de la proteïna nativa és inferior a la de la proteïna desnaturalitzada. Així mateix, es pot observar que la capacitat calorífica de la proteïna desnaturalitzada és menys dependent de la temperatura que la de la proteïna nativa. L'entalpia calorimètrica de la transició de desnaturalització es mesura integrant l'àrea sobrejada, prenent la línia de punts com a línia base. T_{tr} = temperatura de transició.

Si el procés de desnaturalització es comporta com un equilibri entre forma nativa i desnaturalitzada es pot determinar la constant d'equilibri de la transició a cada temperatura, i a partir de la variació d'aquesta constant d'equilibri a diferents temperatures es pot trobar un valor de la l'entalpia de la transició. Aquesta entalpia teòrica calculada s'anomena entalpia de Van't Hoff (ΔH_{VH}).

A partir dels dos valors d'entalpia ΔH_{cal} i ΔH_{VH} es pot obtenir informació sobre el nombre de dominis de la proteïna estudiada a partir del quocient entre ambdós $\Delta H_{cal} / \Delta H_{VH}$, sempre que $\Delta H_{cal} \geq \Delta H_{VH}$. Si $\Delta H_{cal} < \Delta H_{VH}$ la relació anterior dona el nombre de molècules que s'associen per formar una unitat cooperativa (165).

M6.2.1.- DSC de PCPA-II, CPA-II i saA.

Tots aquests experiments es van dur a terme en el calorímetre d'escombrat diferencial model DASM-1M a una velocitat d'escombrat de 2°K/min. L'escalfament es va fer des de 30°C fins a 100°C. Les mostres estudiades foren l'enzim actiu (CPA), el proenzim monomèric (PCPA-II) i el segment d'activació aïllat de la PCPA-II (saA). Tant l'enzim com el proenzim van sofrir prèviament un tractament tal com s'indica en l'apartat M3.2 i foren dissolts igualment com el segment d'activació liofilitzat en dos tampons diferents, fosfat sòdic (pH 7.5) i pirofosfat sòdic (pH 9.0), variant a més la força iònica del medi bé augmentant la concentració del tampó o bé per addició de NaCl.

M7.- TINCIÓ ESPECÍFICA (STAINS-ALL) PER A PROTEÏNES FIXADORES DE Ca^{2+} .

"Stains-all" és un colorant catiónic el qual s'ha demostrat que tenyeix diferents macromolècules. Es produeixen canvis en el seu espectre d'absorció com a resultat dels diferents complexos colorant-macromolècula que es formen (166). L'estructura d'aquest es presenta en la Fig. 25. Cada banda espectral del colorant depèn de les condicions en què es trobi i del tipus de complex que formi amb la macromolècula estudiada, el qual a la vegada és funció de la conformació d'aquesta.

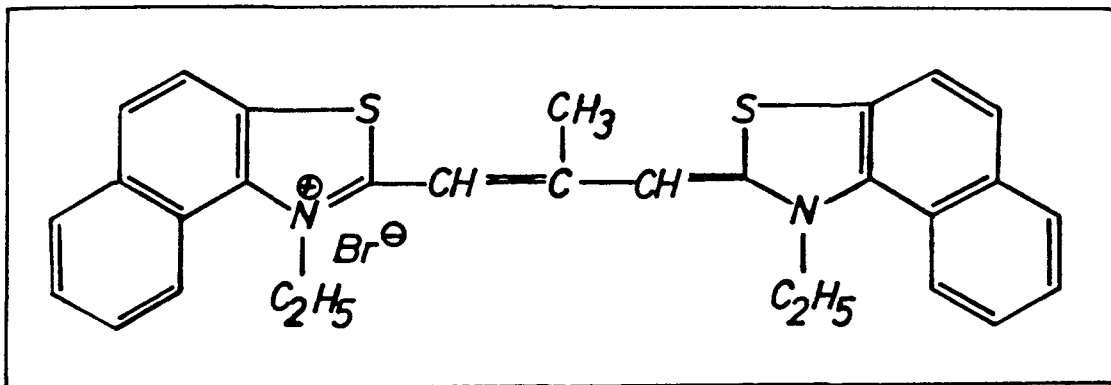


Figura 25.- Estructura del colorant Stains-all.

Se sap que aquest colorant tenyeix de color diferent tant fosfoproteïnes com sialoglicoproteïnes, les quals prenen color blau a diferència de la majoria d'altres proteïnes que es tenyeixen de rosa o vermell (127). Darrerament, però, s'ha trobat que certes proteïnes fixadores de Ca^{2+} , concretament les que pertanyen a la família de les

"EF-hand" (abreu. PFCa-EFH), presenten també una tinció específica de color blau (127). Aquest fet és molt interessant a fi de poder identificar com a membre potencial de l'esmentada família de proteïnes una, de la qual s'estigui estudiant la seva funció.

La tinció amb Stains-all es pot dur a terme per dos camins: tinció d'un gel de poliacrilamida o bé en dissolució. El segon camí és el que es va emprar en aquesta Tesi seguint els procediments de Campbell i col. (127) i de Caday i Steiner (128). Per això es va preparar una dissolució de Tris 10 mM, formamida al 0.1% i Stains-all al 0.001% a pH 8.8 i sobre aquesta dissolució es van afegir quantitats creixents de proteïna des de 0.5 fins a 12 µgr. a un volum final de dissolució d'1 ml. Es van incubar les diferents mostres durant 30 min., a temperatura ambient i a les fosques, i en acabar es va mesurar la seva absorció a 640 nm i es va enregistrar l'espectre des de 700 fins a 400nm, fent servir com a blanc la mateixa dissolució sense proteïna. Quan es produeix la unió colorant- proteïna EFhand, el pic d'absorció del colorant monomèric, que sol estar situat a 575 nm., es desplaça cap a 630-640 nm, apareixent la típica coloració blava.

Les proteïnes amb les quals es va dur a terme aquesta tinció van ésser, a part del saA, la calmodulina (abreu. CAL) la qual es va prendre com a model d'una típica proteïna EFhand i l'albúmina de sèrum boví (abreu. BSA) emprada com a patró d'una proteïna que no pertany a la família esmentada.

Se sap que aquest colorant té tendència a agregar-se segons les condicions de força iònica del medi, apareixent llavors una banda d'absorció al voltant de 650 nm (128).

Aquest fet fa difícil distingir entre efectes derivats d'aparició de bandes per formació de complexos colorant-proteïna o efectes deguts a l'estat d'agregació del colorant. El problema es pot pal·liar fent servir

etilenglicol al 30% en el dissolvent en què es dissol el colorant, aconseguint d'aquesta manera dissolucions d'aquest perfectament estables durant el període d'estudi (128).

Així, es va preparar una dissolució de Stains-all 20 μM en etilenglicol al 30%, Tris 10 mM (pH8.8) i a alíquotes d'1 ml d'aquesta dissolució s'hi afegiren concentracions creixents de proteïna des de 0.4 μM fins a 20 μM i s'enregistrà el seu espectre al cap d'una hora d'incubació a temperatura ambient i a les fosques. Els espectres es van efectuar en un espectrofotòmetre Hitachi 220S fent servir com a blanc tampó sol sense colorant ni proteïna.

Sobre les proteïnes abans esmentades també es va comprovar l'efecte que determinats metalls divalents, tals com el Ca^{2+} i Tb^{3+} tenen sobre els complexos Stains-all/proteïna. Està descrit que les bandes d'absorció degudes a la formació del complex colorant-proteïna EF hand són sensibles a la presència dels esmentats cations. Així, es va enregistrar els espectres dels complexos colorant-proteïna afegint en el medi concentracions creixents d'aquests metalls des de 0 fins a 10 mM.