

Identificació de proteases mitjançant proteòmica basada en activitat

Memòria presentada per **Eduard Sabidó Aguadé** per optar
al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Centre de realització de la tesi doctoral
Departament de Química Orgànica
Universitat de Barcelona

Programa de doctorat
Biotecnologia — Bienni 2004–2006

Departament responsable del programa de doctorat
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

Directors

Ernest Giralt i Lledó

Teresa Tarragó i Clua

Tutor

Antonio Cortés i Tejedor

Aquesta memòria no hagués estat possible sense els meus directors de tesi, els meus pares, la meva parella, el meu tutor, els companys de laboratori i els meus amics.

A tots ells, una forta abraçada i el meu agraïment més sincer.

Índex

Índex de figures	xiv
Índex de taules	xv
Abreviacions	xvii
1 Introducció	1
1.1 Proteòmica basada en activitat	2
1.1.1 Desenvolupament de grups reactius	2
1.1.2 Regió espaiadora: especificitat en les sondes basades en activitat	6
1.1.3 Etiquetes per al revelat i la purificació	8
1.2 Proteïnes implicades en la biosíntesi i la inactivació dels neu- ropèptids	10
1.2.1 Els neuropèptids	10
1.2.2 Biosíntesi dels neuropèptids	11
1.2.3 Inactivació proteolítica dels neuropèptids	21
1.2.4 Interès farmacològic de les proteïnes implicades en la biosíntesi i inactivació de neuropèptids	23
2 Objectius	27
3 Resultats i discussió	29
3.1 Posada a punt de la metodologia	29
3.1.1 Introducció	29
3.1.2 Sondes de tipus aldehyd	30
3.1.3 Sondes de tipus fosfonat	50
3.1.4 Retorn a les sondes de tipus aldehyd	72
3.2 Exploració del proteoma per a la identificació de noves proteases	84
3.2.1 Introducció	84
3.2.2 Noves sondes de tipus fosfonat	85
3.2.3 Anàlisi del proteoma	99
4 Discussió general	121

5	Conclusions	123
6	Annex	125
6.1	Introducció	125
6.2	Clonació dels gens <i>es1</i> i <i>LOC382044</i>	128
6.3	Expressió del gen <i>es1</i>	131
6.4	Assajos d'activitat del precursor de la carboxilesterasa N de fetge de ratolí	132
7	Metodologia	139
7.1	Síntesi i caracterització de compostos	139
7.1.1	Consideracions generals	139
7.1.2	Síntesi d'aldehids	141
7.1.3	Síntesi de fosfonats	149
7.1.4	Síntesi de substrats	166
7.1.5	Síntesi d'etiquetes de revelat	168
7.2	Assajos d'activitat, inhibició i detecció de hrPOP	169
7.2.1	Assajos d'inhibició amb inhibidors lliures i inhibidors immobilitzats en suport sòlid	169
7.2.2	Immobilització d'inhibidors en suport sòlid	169
7.2.3	Aïllament de hrPOP per immobilització en partícules magnètiques i resina PEGA amb inhibidor ancorat	170
7.2.4	Assajos de marcatge directe de la proteïna prolil oligopeptidasa amb l'inhibidor biotinitat	171
7.2.5	Assajos de marcatge de la proteïna prolil oligopeptidasa i aïllament del complex proteïna – inhibidor biotinitat amb estreptavidina immobilitzada	171
7.3	Anàlisi del proteoma per marcatge directe i gels de fluorescència	172
7.3.1	Homogenització de teixits	172
7.3.2	Assajos d'inhibició amb gels fluorescents	172
7.3.3	Marcatge del proteoma per a l'anàlisi per electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida	172
7.3.4	Escissió de bandes del gel i digestió trípica per a l'anàlisi per espectrometria de masses	173
7.4	Anàlisi del proteoma per espectrometria de masses	174
7.4.1	Experiments de 2D LC-MS/MS (MudPIT)	174
7.4.2	Experiments de LC-MS/MS	177
7.5	Clonació, expressió i purificació de la proteïna hrPOP i del precursor N de la carboxilesterasa de fetge de ratolí	178
7.5.1	Clonació del gen <i>es1</i> que codifica el precursor N de la carboxilesterasa de fetge de ratolí	178
7.5.2	Clonació del gen que codifica la proteïna prolil oligopeptidasa humana	179

7.5.3	Expressió de la proteïna hrPOP i del precursor N de la carboxilesterasa de fetge de ratolí	180
7.5.4	Purificació de la proteïna hrPOP i del precursor N de la carboxilesterasa de fetge de ratolí	181
7.6	Assajos d'activitat	182
7.6.1	Assaig per a la detecció de l'activitat esterasa	182
7.6.2	Assaig per a la detecció de l'activitat proteasa	182
7.7	Tècniques bàsiques de bioquímica i biologia molecular	183
7.7.1	Gels desnaturalitzants de poliacrilamida	183
7.7.2	Transferència de Western	184
7.7.3	Gels d'agarosa per a l'anàlisi d'ADN	185
7.7.4	Solucions tampó	185
7.7.5	Medis de cultiu	186

Índex de figures

1.1	Funcionament i estructura general d'una sonda basada en activitat	3
1.2	Mecanisme d'inactivació enzimàtica per part de fluorofosfonats	4
1.3	Mecanisme d'inactivació enzimàtica per part d'epòxids i de α -bromobenzilfosfonats	4
1.4	Mecanisme d'inactivació enzimàtica per part d'aciloximetilcetones, 2-desoxi-2-fluoro glicòsids i vinilsulfones	5
1.5	Mecanisme d'inactivació enzimàtica per part d'hidroximats i hidroxietilens fotoreactius	5
1.6	Esquema de les variacions en posició P1 i P2 de les sondes de tipus hidroximat	7
1.7	Esquema de les variacions en posició P1 de les sondes de tipus epòxid	7
1.8	Estratègies d'unió d'etiquetes de revelat a les sondes basades en activitat	10
1.9	Proteïnes precursors de neuropèptids i hormones peptídiques	14
1.10	Estructura general de les proteïnes convertasa de prohormones	17
1.11	Esquema del processament de neuropèptids	18
1.12	Estructura de raig X de la proteïna prolil oligopeptidasa de porc	22
1.13	Inhibidors de la proteïna prolil oligopeptidasa	23
3.1	Mecanisme d'inhibició dels compostos aldehids	31
3.2	Disseny de les sondes de tipus aldehyd	33
3.3	Estructura dels inhibidors de tipus aldehyd	34
3.4	Esquema general de la síntesi de pèptids en fase sòlida	35
3.5	Esquema de la reacció de conversió de Fmoc-Pro-OH a Fmoc-Pro-H	36
3.6	Esquema de formació de dicetopiperazines	37
3.7	Cromatogrames de HPLC de la síntesi de sondes aldehyd i estructura de les resines utilitzades en síntesi en fase sòlida	40
3.8	Assajos d'inhibició i càlcul de la IC_{50} dels compostos 1-4	41

3.9	Valoració de l'anticòs vers la proteïna prolil oligopeptidasa i detecció de la proteïna endògena en extracte de cervell	42
3.10	Assajos d'inhibició amb partícules magnètiques	43
3.11	Assajos d'inhibició amb resina PEGA	45
3.12	Estructura i càlcul de la IC ₅₀ del nou inhibidor biotinilat	46
3.13	Marcatge de la proteïna prolil oligopeptidasa amb inhibidors de tipus aldehyd biotinilats i detecció del complex proteïna – inhibidor amb estreptavidina i l'anticòs α -POP	48
3.14	Mecanisme proposat de la inhibició de les serina proteases per part dels fosfonats de difenil	51
3.15	Estructura bàsica d'un fosfonat de diaril (o de dialquil) de tipus peptídic	51
3.16	Esquema de la síntesi de Aha-Pro-Pro ^P (OPh) ₂	53
3.17	Esquema de la síntesi i degradació del trímer de 1-pirrolina	53
3.18	Esquema de la síntesi de Aha-Pro-Pro ^P (OEt) ₂ per transesterificació de Aha-Pro-Pro ^P (OPh) ₂	54
3.19	Esquema de l'assaig d'inhibició per competició amb el fluorofosfonat de rodamina (FP-rodamina) per a l'avaluació de les sondes de tipus 1-aminoalcanofosfonat	56
3.20	Assaig d'inhibició per competició amb el fluorur de rodamina per a l'avaluació de les sondes de tipus fosfonats anàlegs de prolina	57
3.21	Esquema de l'etiquetat del proteoma mitjançant el fluorofosfonat de rodamina	58
3.22	Etiquetat funcional del proteoma amb el fluorofosfonat de rodamina	60
3.23	Etiquetat funcional del proteoma amb l'1-aminoalcanofosfonat de dietil anàleg de prolina	62
3.24	Etiquetat funcional del proteoma amb l'1-aminoalcanofosfonat de dietil anàleg de prolina	63
3.25	Seqüència de la proteïna prolil oligopeptidasa amb els pèptids identificats per espectrometria de masses marcats en vermell	64
3.26	Etiquetat funcional de hrPOP pura amb els 1-aminoalcanofosfonats de dietil anàlegs de prolina i leucina	65
3.27	Tècnica multidimensional d'identificació de proteïnes (MudPIT)	68
3.28	Identificació de la proteïna prolil oligopeptidasa per MudPIT a partir d'extractes de cervell de ratolí i elaboració de la base de dades	69
3.29	Funcionament del mètode de validació estadística emprat en l'anàlisi dels resultats d'espectrometria de masses	71
3.30	Esquema de l'assaig d'inhibició per competició amb el fluorur de rodamina per a l'avaluació de les sondes de tipus aldehyd	75
3.31	Optimització de la concentració de sonda aldehyd	76

3.32	Optimització de les condicions per a la detecció de POP amb les sondes aldehyd	78
3.33	Detecció de la proteïna prolil oligopeptidasa en extractes de cervell de ratolí amb hrPOP	79
3.34	Detecció de proteïna prolil oligopeptidasa en extractes de cervell de ratolí	80
3.35	Determinació del límit de detecció de POP amb la sonda aldehyd Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H	81
3.36	Assaig d'immobilització del complex proteïna – inhibidor amb la sonda Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H	83
3.37	Alineament múltiple de la seqüència de tall (\downarrow) de diversos fragments derivats de la proteïna cromogranina B en diverses espècies de mamífer	85
3.38	Estructura de les noves sondes de tipus fosfonat	86
3.39	Esquema de la síntesi de Aha-Ala-Leu ^P (OPh) ₂	88
3.40	Esquema de la síntesi de Aha-Ala-Leu ^P (OEt) ₂ per transesterificació de Aha-Ala-Leu ^P (OPh) ₂	88
3.41	Esquema de la síntesi de Aha-Arg(diCbz)-Leu ^P (OPh) ₂	90
3.42	Esquema de la síntesi de Aha-Arg-Leu ^P (OPh) ₂	91
3.43	Esquema de la síntesi assistida per polímer de Aha-Arg-Leu ^P (OPh) ₂	91
3.44	Esquema de la síntesi de Aha-Arg-Leu ^P (OEt) ₂ per transesterificació de Aha-Arg(Pbf)-Leu ^P (OPh) ₂	92
3.45	Esquema de la síntesi de Aha-Glu-Leu ^P (OPh) ₂	93
3.46	Esquema de la síntesi assistida per polímer de Aha-Glu-Leu ^P (OPh) ₂	93
3.47	Esquema de la síntesi de Aha-Glu-Leu ^P (OEt) ₂ per transesterificació de Aha-Glu(tBu)-Leu ^P (OPh) ₂	94
3.48	Esquema de síntesi de la <i>N</i> -(<i>tert</i> -butoxicarbonil)-3-acetaldehidindola a partir del 3-cianometilindole	94
3.49	Esquema de síntesi de Aha-Asp-Trp ^P (OPh) ₂	95
3.50	Esquema de la síntesi de l'1-aminometilfosfonat de difenil	96
3.51	Esquema de la síntesi assistida per polímer de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc) ^P (OPh) ₂	98
3.52	Esquema de la síntesi de Aha-Asp-Trp ^P (OPh) ₂ i Aha-Asp-Trp ^P (OEt) ₂ per transesterificació de Aha-Asp(tBu)-Trp ^P (OPh) ₂	98
3.53	Assajos per a la incorporació de tritó X-100 en el protocol d'homogenització de teixits	101
3.54	Etiquetat funcional del proteoma de cervell de ratolí amb la sonda Aha-Ala-Leu ^P (OPh) ₂ i Aha-Ala-Leu ^P (OEt) ₂	104
3.55	Etiquetat funcional del proteoma de glàndula pituïtària de ratolí amb la sonda Aha-Ala-Leu ^P (OPh) ₂ i Aha-Ala-Leu ^P (OEt) ₂	105

3.56	Etiquetat funcional del proteoma de cervell de ratolí amb la sonda Aha-Arg-Leu ^P (OPh) ₂ i Aha-Arg-Leu ^P (OEt) ₂	106
3.57	Etiquetat funcional del proteoma de glàndula pituïtària de ratolí amb la sonda Aha-Arg-Leu ^P (OPh) ₂ i Aha-Arg-Leu ^P (OEt) ₂	107
3.58	Etiquetat funcional del proteoma de cervell de ratolí amb la sonda Aha-Glu-Leu ^P (OPh) ₂ i Aha-Glu-Leu ^P (OEt) ₂	108
3.59	Etiquetat funcional del proteoma de glàndula pituïtària de ratolí amb la sonda Aha-Glu-Leu ^P (OPh) ₂ i Aha-Glu-Leu ^P (OEt) ₂	109
3.60	Etiquetat funcional del proteoma de cervell de ratolí amb la sonda Aha-Asp-Trp ^P (OPh) ₂ i Aha-Asp-Trp ^P (OEt) ₂	110
3.61	Etiquetat funcional del proteoma de glàndula pituïtària de ratolí amb la sonda Aha-Asp-Trp ^P (OPh) ₂ i Aha-Asp-Trp ^P (OEt) ₂	111
6.1	Alineament de les seqüències proteïques codificades pels gens <i>LOC384022</i> i <i>es1</i>	126
6.2	Substrats de tipus amida processats per carboxilesterases . . .	127
6.3	Mecanisme d'acció de les proteïnes carboxilesterases	128
6.4	Esquema de les estratègies de clonació emprades a partir d'ADN complementari i un clon comercial	129
6.5	Alineament múltiple global per a la comparació de determinats fragments de les seqüències clonades amb les seqüències consens dels gens <i>es1</i> i <i>LOC382044</i>	130
6.6	Obtenció del precursor N de la carboxilesterasa de fetge (gen <i>es1</i>) en diferents condicions d'expressió	133
6.7	Assaig per a la determinació de l'activitat esterasa del precursor de la carboxilesterasa N de fetge de ratolí	135
6.8	Assajos per a la determinació de l'activitat proteasa	137

Índex de taules

1.1	Funcions regulades per neuropèptids del sistema nerviós i del sistema endocrí	12
1.2	Llista d'alguns dels neuropèptids de mamífer agrupats per famílies	13
1.3	Classificació de les proteïnes precursors segons la seqüència del punt de tall	15
1.4	Expressió i localització subcel·lular de les convertases de prohormones	17
1.5	Seqüències de tall atípiques de proneuropèptids i prohormones	20
3.1	Exemples d'aminoàcids per als quals s'ha sintetitzat el derivat fosfonat com a inhibidor de diverses proteïnes serina proteasa	52
3.2	Algunes seqüències atípiques derivades de la identificació i caracterització de nous neuropèptids.	87
3.3	Condicions assajades per a la desprotecció del grup ftalamido	96
3.4	Condicions assajades per al procés d'alquilació del compost (difenilmetileneamino)metilfosfonat de difenil	97
3.5	Proteïnes detectades específicament en gels de fluorescència mitjançant l'ús sondes de tipus fosfonat	112
3.6	Proteïnes identificades per escissió de les bandes d'interès dels gels de fluorescència	113
3.7	Proteïnes identificades per escissió de les bandes d'interès dels gels de fluorescència (Continuació)	114
3.8	Proteïnes identificades per espectrometria de masses MudPIT	116
3.9	Proteïnes identificades per espectrometria de masses MudPIT (Continuació – 1a part)	117
3.10	Proteïnes identificades per espectrometria de masses MudPIT (Continuació – 2a part)	118
6.1	Mètodes, condicions i resultats de l'expressió del gen <i>es1</i> en cèl·lules d' <i>E. coli</i> BL21 (DE3) i Origami 2 (DE3)	134

Abreviacions

2D LC-MS/MS	Cromatografia líquida bidimensional acoblada a espectrometria de masses en tàndem
2D PAGE	Electroforesi bidimensional en gel de poliacrilamida
2DE-MS	Electroforesi 2D PAGE acoblada a espectrometria de masses
ACE	Enzim que processa l'angiotensina
ACH	Àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic
ACTH	Hormona adrenocorticotròpica
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNc	Àcid desoxiribonucleic complementari
AF	Neuropèptid AF
AGRP	Proteïna relacionada amb el gen Agouti
Aha	Residu d'àcid 5-hexinoic
Ahx	Residu d'àcid ϵ -aminohexanoic
Ala	Residu de L-alanina
AMC	7-amino-4-metilcumarina
AQUA	Tècnica de proteòmica per a la quantificació absoluta de proteïnes
Arg	Residu de L-arginina
ARN	Àcid ribonucleic missatger
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
Asn	Residu de L-asparagina
Asp	Residu d'àcid L-aspàrtic
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Bpa	Residu de 4-benzoil-L-fenilalanina
BSA	Albúmina de serum boví
CART	Neuropèptids regulats per cocaïna i amfetamines
Cbz	Benziloxicarbonil, Carboxibenzil
CCK	Colecistoquinina
CE	Electroforesi capilar
CGRP	Pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina
CID	Dissociació induïda per colisió
CP	Carboxipeptidasa
CRH	Hormona alliberadora de corticotropina
CRMP	Proteïna <i>Collapsin response mediator</i>

Cter	Extrem carboxí·lic terminal
Cys	Residu de L-cisteïna
d	Duplet
DCM	Diclorometà
DCU	<i>N,N'</i> -Diciclohexilurea
DIBAL	Hidrur de diisobutilalumini
DIEA	Etildiisopropilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfòxid
DO	Densitat òptica
DPP IV	Dipeptidil peptidasa IV
DTT	Ditiotreitòl, (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2,3-(1,4-Bis-sulfanil)butanodiòl
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
ECE	Enzims que processen l'Endotelina
EDC	Hidroclorur de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDT	1,2-etanditiol
EDTA	Àcid 2-[2-(Bis(carboximetil)amino)etil-(carboximetil)amino]acètic
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
Eq	Equivalents
ESI	Ionitzador per electroesprai
f	Funcionalització
FF	Neuropèptid FF
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
Fmoc-Peg-OH	Àcid Fmoc-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoic
FPLC	Cromatografia líquida de proteïnes
FP-Rh	Fluorofosfonat de rodamina
FP-rodamina	Fluorofosfonat de rodamina
FTMS	Espectrometria de masses amb transformada de Fourier
g	Força centrífuga relativa
G3PDH	Proteïna Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa
GHRH	Hormona alliberadora de l'hormona del creixement
Gln	Residu de L-glutamina
GLP-1	Pèptid-1 similar al glucagó
Glu	Residu d'àcid L-glutàmic
Gly	Residu de glicina
HATU	Hexafluorofosfonat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1- <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
His	Residu de L-histidina
HMDA	Hexametilendiamina
HOAt	1-Hidroxí-7-azabenzotriazola
HOBt	1-Hidroxibenzotriazola
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució

HRP	Peroxidasa de rave
hrPOP	Proteïna prolil oligopeptidasa humana recombinant
IAPP	Amilina
IBCF	Cloroformiat d'isobutil
IC50	Concentració d'inhibidor que inhibeix el 50 % de l'activitat enzimàtica
ICAT	Identificació proteòmica amb etiquetes d'afinitat marcades amb isòtops
Ile	Residu de L-isoleucina
IPI	Index internacional de proteïnes
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactosa
MOPS	Àcid 2-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfònic
ITMS	Espectrometria de masses de trampa iònica
iTRAQ	Etiquetat isobàric per a la quantificació absoluta i relativa
KHMDS	Bis(trimetilsilil)amida de potassi
λ	Longitud d'ona
λ_{em}	Longitud d'ona d'emisió
λ_{ex}	Longitud d'ona d'excitació
LB	Medi Luria-Lennox
LC	Cromatografia líquida
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem
Leu	Residu de L-leucina
LHMDS	Bis(trimetilsilil)amida de liti
LHRH	Hormona alliberadora de l'hormona luteinizant
LTQ-FT	Quadrupol de trampa iònica lineal amb transformada de Fourier
m	Multiplet
m/z	Relació massa/càrrega
MALDI	Ionintzador làser assistit per matriu
MCH	Hormona concentradora de melanina
ME	(Met)encefalina
MES	Àcid 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfònic
Met	Residu de L-metionina
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem
MSH	Hormona alliberadora de l'hormona estimuladora de melanòcits
MudPIT	Tècnica multidimensional d'identificació de proteïnes
MW	Pes molecular
NARC-1	Proteïna <i>Neural apoptosis-regulated convertase 1</i>
n-BuLi	n-Butilliti
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
NKA	Neuroquinina α
NMF	<i>N</i> -Metilmorfolina

NPY	Neuropèptid Tirosina
N _{ter}	Extrem amino terminal
Orn	Residu de L-ornitina
p/v	Relació pes/volum
PACAP	Pèptid activador de l'adenilat ciclase de pituïtària
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametilcromà-6-sulfonil
PBS	Tampó fosfat salí
PBST	Tampó fosfat salí amb Tween
PC	Convertasa de prohormones
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEGA	Resina de poliacrilamida i polietilenglicol
Phe	Residu de L-fenilalanina
Pht	Ftalil
pI	Punt isoelèctric
pNA	<i>p</i> -Nitroanilida
POMC	Proopiomelanocortina
POP	Proteïna prolil oligopeptidasa
PPE/ADAM-10	Enzim processador del precursor proTNF
ppm	Part per milió
Pro	Residu de L-prolina
PyAOP	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidin) fosfoni
PyBOP	Hexafluorofosfat de (7-azabenzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi)-tris(pirrolidin) fosfoni
q	Quadruplet
Q	Quadrupol
R	Rendiment
RMN	Ressonància magnètica nuclear
RP	Fase reversa
RT	Temps de retenció
s	Singlet
SCX	Intercanvi catiònic fort
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida
Ser	Residu de L-serina
SF	Neuropèptid SF
SILAC	Etiquetat isotòpic estable de cultius cel·lulars amb aminoàcids
SKI-1/S1P	Proteïna <i>Site-1 Protease</i>
SOM	Somatostatina
SP-B	Proteïna surfactant B
t	Triplet
TAE	Tampó Tris-Acetata amb EDTA
TBTU	Tetrafluoroborona de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilaminometil]- <i>N</i> -metilmetanamini
tBu	<i>tert</i> -butil

TFA	Àcid trifluoroacètic
THF	Tetrahidrofurà, Oxaciclopentà
Thr	Residu de L-treonina
TIS	Triisopropilsilà
TLC	Cromatografia de capa fina
TM	Tampó de mostra per a electroforesi
TNF	Factor de necrosi tumoral
TOF	Analitzador de ions per temps de vol
TRH	Hormona alliberadora de tirotropina
TriN ₃	Etiqueta de revelat trifuncional
Trp	Residu de L-triptofan
Tyr	Residu de L-tirosina
UV	Llum ultraviolada
v/v	Relació volum/volum
Val	Residu de L-valina
VIH	Virus de la immunodeficiència humana
VIP	Polipèptid instestinal vasoactiu
Z	Benziloxycarbonil, Carboxibenzil
ZPP	Z-Pro-Pro-H

Capítol 1

Introducció

Des de la publicació del genoma de nombrosos organismes eucariotes i procariotes [1, 2], la comunitat científica disposa d'una immensa quantitat d'informació del material genètic i, alhora, de nombrosos productes gènics que requereixen una assignació de la seva funció. Davant d'aquesta situació, la recerca biomèdica ha entrat en una nova etapa en la qual l'esforç experimental es trasllada de la identificació de nous gens a la determinació de les funcions fisiològiques i cel·lulars dels productes gènics.

Existeixen diversos projectes i consorsis que pretenen identificar els elements funcionals del genoma i determinar-ne la seva funció fisiològica [3, 4]. En un esforç per accelerar aquesta identificació funcional i consolidar la riquesa de les noves dades genètiques s'han desenvolupat diverses tècniques per l'estudi col·lectiu de gens i proteïnes que s'engloben dins del camp de la genòmica i la proteòmica.

Inicialment, els estudis de genòmica van permetre l'agrupament funcional de gens basant-se en l'anàlisi del transcriptoma [5] i van representar una primera aproximació en la caracterització funcional dels productes gènics. Tanmateix, s'ha comprovat que els nivells d'ARNm sovint no es correlacionen amb l'abundància de proteïnes [6, 7] i, per tant, l'estudi del transcriptoma no sempre és adequat per a l'elucidació funcional del proteoma. Per aquest motiu, s'han desenvolupat diverses tècniques de proteòmica, que tenen com a objecte d'estudi les proteïnes i, conseqüentment, generen dades més properes i més estretament relacionades amb la funció cel·lular [8]. Existeixen diverses estratègies per a la identificació de proteïnes com la 2DE-MS [9], la CE-MS [10] o la LC-MS [11], així com diverses estratègies que permeten l'anàlisi quantitativa del proteoma com l'ICAT [12], el SILAC [13], l'AQUA [14] o l'iTRAQ [15]. Tot i això, les limitacions observades en algunes d'aquestes estratègies [16, 17], juntament amb la constatació que la variació de l'activitat proteïca no sempre implica alteracions en el nivell d'expressió (p.

e. modificacions posttraduccionals), limiten la utilització d'aquestes tècniques en els assajos de caracterització funcional del proteoma.

D'aquesta manera, tenint en compte que és l'activitat de les proteïnes, més que no pas el nivell d'expressió dels gens, allò que determina el seu paper funcional, els esforços en el camp de la proteòmica s'han centrat en la caracterització de perfils proteïcs per tècniques basades en l'activitat de les proteïnes. En aquest sentit, s'han desenvolupat un conjunt d'estratègies químiques per a l'estudi de l'activitat de les proteïnes en proteomes complexos, que s'engloben dins de l'anomenada proteòmica basada en activitat [18, 19, 20, 21, 22, 23, 24].

1.1 Proteòmica basada en activitat

La proteòmica basada en activitat és una estratègia química basada en la utilització de sondes que s'uneixen covalentment al centre actiu dels enzims per a l'estudi i caracterització de la seva activitat [25, 26, 27, 28], el descobriment de noves dianes terapèutiques [29, 30, 31] i la cerca de nous inhibidors [32].

Actualment, s'han desenvolupat estratègies de proteòmica basada en activitat per a més d'una dotzena de classes enzimàtiques i s'han desenvolupat sondes que permeten l'estudi de proteïnes serina hidrolasa [33, 34], cisteïna proteasa [35, 36], treonina proteasa [37], metal·loproteasa [38], oxidoreductasa [39, 40], fosfatasa i proteïnes de tipus glicosidasa [41].

Les sondes utilitzades en proteòmica basada en activitat es dissenyen a partir de substrats naturals [42], inhibidors [33] o, simplement, a partir de grups electròfils [43], i es caracteritzen per unir-se al centre actiu de les proteïnes enzimàtiques basant-se en el seu mecanisme d'acció. El reconeixement de les proteïnes en funció de la seva activitat permet utilitzar aquestes sondes per a la caracterització funcional del proteoma i l'estudi de subconjunts de proteïnes enzimàtiques.

Les sondes que s'utilitzen en la proteòmica basada en activitat consisteixen fonamentalment en tres elements funcionals [44, 45]: el grup reactiu, que s'uneix de forma covalent a l'enzim; una regió espaciadora, que pot modular la reactivitat i especificitat del grup reactiu; i una etiqueta per a la identificació o purificació dels enzims modificats (veure figura 1.1).

1.1.1 Desenvolupament de grups reactius

La majoria de sondes basades en activitat utilitzen grups electròfils com a grups reactius vers el centre actiu, sovint inspirant-se en inhibidors covalents

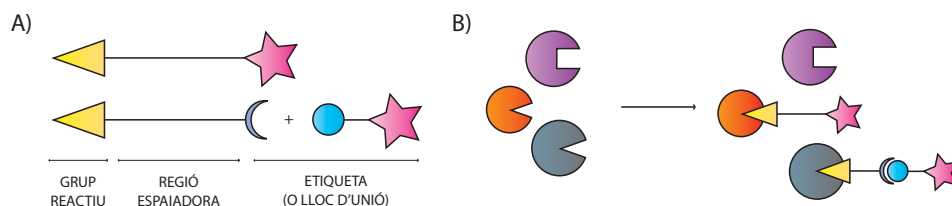


Figura 1.1: Funcionament i estructura general d'una sonda basada en activitat. A) Estructura d'una sonda basada en activitat, formada fonamentalment per un grup reactiu, una regió espaciadora, i una etiqueta o un lloc per a la unió d'etiquetes, que permeti la detecció i identificació de les proteïnes d'interès. B) Esquema de l'exploració d'un proteoma mitjançant sondes basades en activitat.

descrits prèviament. A tall d'exemple, les sondes descrites per a l'estudi de les proteïnes serina hidrolasa es basen en l'inhibidor diisopropil fluorofosfat i presenten un grup fluorofosfonat com a grup reactiu (veure figura 1.2) [33, 34]. En canvi, la sonda DCG-04, descrita per a l'estudi de proteïnes cisteïna proteasa, presenta un grup epòxid com a grup reactiu i el seu disseny es basa en el producte natural E-64, un inhibidor d'ampli espectre d'aquestes proteïnes (veure figura 1.3) [35, 36]. Més enllà d'aquests dos casos, s'han descrit sondes basades en activitat amb grups reactius molt variats que inclouen aciloximetil cetones [46, 47] i fluorometil cetones [48] per a proteïnes cisteïna proteasa, vinil sulfones per a les proteïnes treonina proteasa del proteasoma [37], 2-desoxi-2-fluorogalactòsids per a la caracterització de proteïnes glicosidasa [41, 49] i α -bromobenzilfosfonats per a proteïnes tirosina fosfatasa [50] (veure figures 1.3 i 1.4). Per aquells enzims en els quals no es forma un enllaç covalent entre el centre actiu i el substrat, s'han desenvolupat sondes de tipus hidroximat [51] i sondes de tipus hidroxiletilè [52] per al marcatge de proteïnes metal·loproteasa i proteïnes aspàrtic proteasa, respectivament. Aquestes sondes es caracteritzen perquè contenen un residu derivat de la benzofenona que, un cop posicionat al centre actiu, permet establir un enllaç covalent entre la sonda i l'enzim mitjançant la irradiació amb llum ultraviolada (veure figura 1.5). Finalment, per a la caracterització funcional de famílies enzimàtiques per a les quals no es coneixen grups reactius específics s'han emprat estratègies no dirigides amb grups reactius generalistes com els ésters de sulfonats [53, 39] i les α -cloracetamides [43].

La dificultat en la selecció del grup reactiu rau en l'habilitat de seleccionar un grup que sigui reactiu vers una determinada família o classe enzimàtica i inert vers les altres espècies reactives presents a la mostra (veure figura 1.1, apartat B). Com s'ha comentat, els grups reactius de la majoria de sondes han estat dissenyats en funció d'inhibidors mecànics d'aquestes famílies enzimàtiques, fet que facilita en gran mesura el disseny de sondes específiques

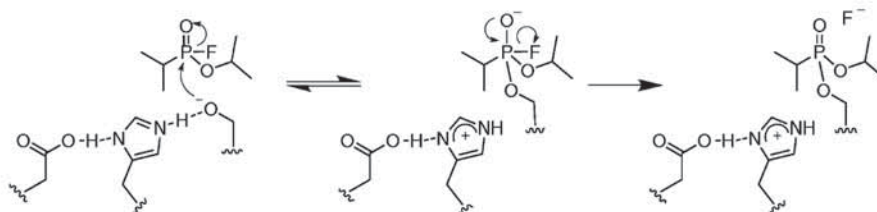


Figura 1.2: Mecanisme d'inactivació de proteïnes serina proteasa per part de sondes amb un grup reactiu de tipus fluorofosfonat. Esquema modificat de Evans, MJ i Cravatt, BF [24].

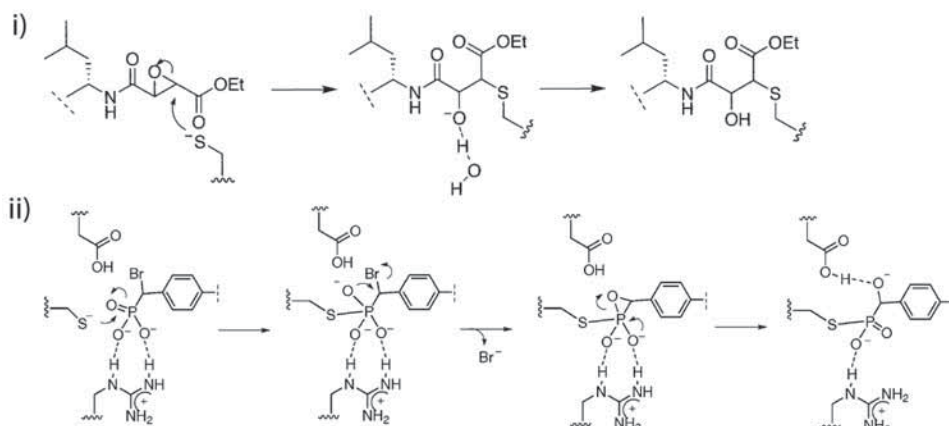


Figura 1.3: Mecanisme d'inactivació de proteïnes cisteïna proteasa per part de sondes amb un grup reactiu de tipus epòxid (i) i mecanisme proposat d'inactivació de proteïnes tirosina fosfatasa per part de sondes de tipus α -bromobenzilfosfonat (ii). Esquema modificat de Evans, MJ i Cravatt, BF [24].

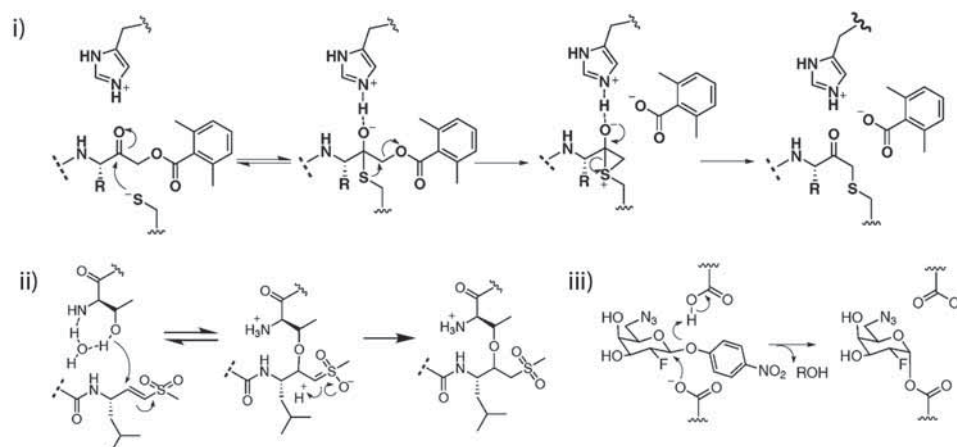


Figura 1.4: Mecanisme d'inactivació de proteïnes cisteïna proteasa per part de sondes amb un grup reactiu de tipus aciloximetilcetona (i), mecanisme d'inactivació de les proteïnes del proteasoma per part de sondes de tipus vinilsulfona (ii), i mecanisme d'inactivació de les proteïnes glicosidasa per part de sondes de tipus 2-desoxi-2-fluoro glicòsid (iii). Esquema modificat de Evans, MJ i Cravatt, BF [24].

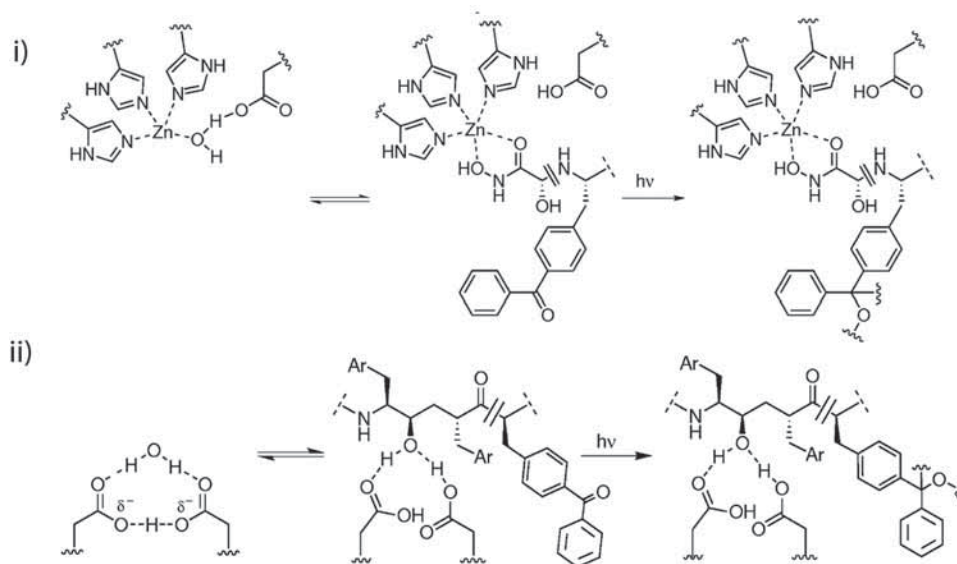


Figura 1.5: Mecanisme d'inactivació de proteïnes metal·loproteasa per part de sondes amb un grup hidroximat fotoreactiu (i) i de proteïnes aspàrtic proteasa per part de sondes basades en hidroxietilens i amb un grup fotoreactiu (ii). Esquema modificat de Evans, MJ i Cravatt, BF [24].

per a una determinada família enzimàtica. Tanmateix, a vegades aquesta estratègia no és suficient per acotar l'especificitat d'una sonda i llavors cal recórrer al disseny de la regió espaciadora.

1.1.2 Regió espaciadora: especificitat en les sondes basades en activitat

La regió espaciadora de la sonda connecta el grup reactiu de la sonda amb l'etiqueta utilitzada per a la seva identificació o purificació. La separació del grup reactiu i l'etiqueta és fonamental per evitar l'aparició d'impediments estèrics que bloquegin l'accés del grup reactiu al centre actiu o impedeixin l'accessibilitat a l'etiqueta en processos de purificació. Normalment, aquesta funció es veu acomplerta amb la incorporació de cadenes de tipus alquil o polietilenglicol que minimitzen les restriccions espacials i permeten que la sonda reaccionin amb un ampli ventall d'enzims mecanísticament similars.

Tanmateix, la regió espaciadora també esdevé un element clau a l'hora d'incorporar elements d'especificitat per tal que les sondes reaccionin selectivament amb un determinat tipus enzimàtic. D'aquesta manera, es poden incorporar seqüències peptídiques per dotar a la sonda d'un elevat grau de selectivitat vers a una proteïna diana determinada.

En aquest sentit, cal destacar el desenvolupament de sondes vinilsulfona amb regions espaciadores de tipus polileucina per a la caracterització de les proteïnes treonina proteasa del proteasoma [37]. Altres exemples, inclouen el desenvolupament de sondes hidroximat amb una regió espaciadora de tipus dipeptidil que permet la introducció de variacions en les posicions P1 i P2 (veure figura 1.6) per a l'estudi específic de les metal·loproteases [51], o el desenvolupament de sondes epòxid o vinilsulfones per a l'estudi de les proteïnes cisteïna proteasa.

En el cas de les proteïnes cisteïna proteasa, la inclusió de residus aminoacídics en la regió espaciadora ha permès millorar la selectivitat d'aquestes sondes. Així, la utilització d'una Tyr en posició P2 en combinació amb la resta d'aminoàcids naturals en posició P1 (veure figura 1.7), ha permès l'etiquetat i l'estudi específic de diversos tipus de proteïnes cisteïna proteasa com les catepsines, caspases, calpaïnes, hidrolases i bleomicines [35, 36]. De forma similar, Schaschke *et al.* han aconseguit desenvolupar sondes amb grups epòxids específiques per a la proteïna catepsina B amb la incorporació de seqüències peptídiques de tipus Gly-Gly-Leu en la regió espaciadora [57]. I de la mateixa manera, l'ús de sondes de tipus peptidil diazometà—descriu com a inhibidor per a proteïnes cisteïna proteasa [58]—ha permès la detecció específica de catepsina B, L i S en ronyó, fetge i melsa de rossegador, en un dels estudis pioners en la caracterització del proteoma amb sondes basades en activitat [59].

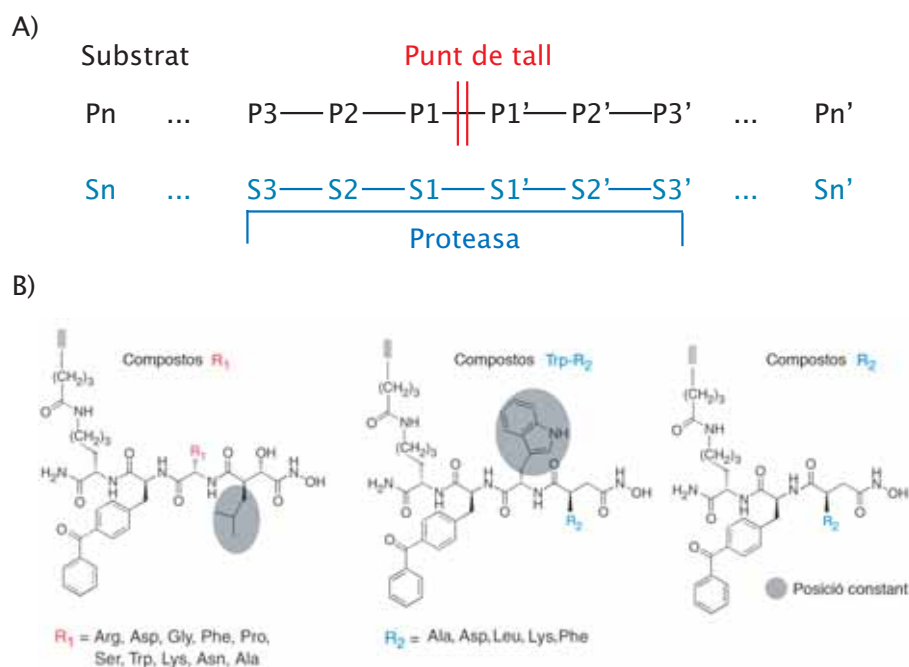


Figura 1.6: A) Esquema de la nomenclatura dels residus aminoacídics implicats en una reacció enzimàtica de tipus proteolític. Segons aquest model, descrit per Schechter i Berger [54, 55], els residus aminoacídics de substrat s'anomenen P1, P2, P3, etc. a partir del punt de tall i en direcció a l'extrem N_{ter} . Mentre que els residus localitzats en direcció C_{ter} s'anomenen P1', P2', P3', etc. B) Esquema de les variacions en les posicions P1 i P2 de la regió espaciadora de les sondes de tipus hidroximat desenvolupades per Sieber *et al.* Esquema modificat de Sieber *et al.* [56].

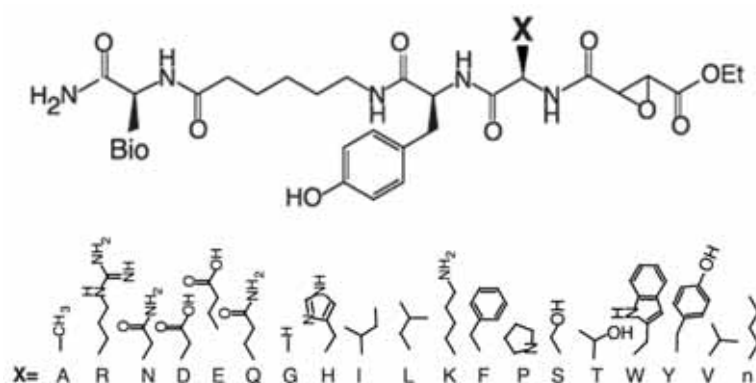


Figura 1.7: Esquema de les variacions en les posició P1 de la regió espaciadora de les sondes de tipus epòxid desenvolupades per Greenbaum *et al.* Esquema modificat de Greenbaum *et al.* [35].

Altres exemples inclouen la síntesi en fase sòlida de sondes aciloximetil cetones amb diferents combinacions peptídiques i la incorporació d'ubiquitina en sondes vinilsulfona. En el primer cas, les sondes descrites han estat utilitzades per al reconeixement de caspases, legumaïnes, gingipaines o catepsines [46, 47], mentre que les sondes vinilsulfona amb ubiquitina s'han dissenyat per restringir-ne la reactivitat i poder-les utilitzar de forma específica per a la detecció de proteïnes treonina hidrolasa i cisteïna proteasa del proteasoma [60, 61].

1.1.3 Etiquetes per al revelat i la purificació

A part del grup reactiu i del grup espaciador, la presència d'una etiqueta que permeti la visualització o purificació de la sonda i, en última instància, de la proteïna a la qual s'uneix, és de fet allò que distingeix una sonda basada en activitat d'un inhibidor covalent basat en el mecanisme d'acció de les proteïnes enzimàtiques.

En els últims anys, hi ha hagut un augment considerable del nombre de mètodes d'etiquetatge utilitzats en proteòmica basada en activitat. Aquesta proliferació en les etiquetes de revelat i purificació ha permès el desenvolupament d'aplicacions que comprenen des de la visualització i caracterització funcional dels proteomes, a la purificació o selecció de determinats tipus enzimàtics en diverses línies cel·lulars i teixits. Segons la classificació de les etiquetes de sondes basades en activitat que fa Sadaghiani *et al.* [62], es poden distingir diversos tipus d'etiquetes que inclouen les etiquetes basades en isòtops, les etiquetes fluorescents i les etiquetes d'afinitat.

En el cas de les etiquetes basades en isòtops existeixen nombrosos exemples de sondes basades en activitat que inclouen radioisòtops com el ^{125}I [59] o el ^3H [63]. Aquestes sondes s'han utilitzat per diverses aplicacions com la determinació de l'activitat de catepsines [36, 47, 64], la caracterització funcional del proteasoma [37, 65] i l'estudi de les proteïnes de tipus caspasa [47, 66]. Així mateix, els isòtops estables, com el ^2H , també s'han utilitzat en alguns casos per al disseny i marcatge de sondes basades en activitat [67].

Les etiquetes basades en radioisòtops permeten deteccions ràpides i amb una elevada sensibilitat, però presenten l'inconvenient intrínsec de la radioactivitat. En aquest sentit, un dels principals avenços en els mètodes d'etiquetat de les sondes basades en activitat ha estat la incorporació d'etiquetes fluorescents, molt més segures que els radioisòtops i amb una sensibilitat similar. L'ampli ventall de grups fluoròfors disponibles a nivell comercial ha permès la utilització d'una gran varietat de molècules fluorescents per a l'etiquetat de sondes basades en activitat, entre les quals cal destacar la fluoresceïna i la rodamina [68], el dansil [69], el NBD [70], el BODIPY [71] i els fluoròfors Cy [72]. A part de l'etiquetatge convencional, s'han desenvolupat sondes amb

grups que emeten a la regió de l'infraroig proper i permeten la seva visualització *in vivo* per tècniques no invasives [73, 74, 75], i sondes que combinen un desactivador i un fluoròfor, de manera que només emeten fluorescència quan reaccionen amb l'enzim al qual s'uneixen [76].

Les sondes marcades amb isòtops i fluorescència són extremadament sensibles i no requereixen una manipulació excessiva de la mostra, però no permeten una de les aplicacions principals de les sondes basades en activitat: l'aïllament d'enzims diana. Per a aquesta aplicació s'utilitzen les anomenades etiquetes d'afinitat, entre les quals cal destacar la biotina, àmpliament utilitzada per la seva interacció amb l'estreptavidina, que la converteix en una eina molt útil i potent per a la detecció i purificació d'enzims d'interès. Com a alternativa a la utilització de biotina, Borodovsky *et al.* en els seus estudis de caracterització funcional del proteasoma, han dissenyat sondes amb seqüències d'hemaglutinina que poden ser reconegudes específicament amb anticossos [60, 61, 77], mentre que altres laboratoris han preferit la unió de la sonda directament a un suport sòlid. En aquest sentit, cal destacar la immobilització covalent de sondes en resina per al seguiment de l'activitat de metal·loproteases [78, 79] i la immobilització d'un 1-aminoalquilfosfonat de difenil per a l'eliminació completa de quimotripsina de mostres biològiques [80]. Altres exemples d'immobilització de sondes basades en activitat en suport sòlid per al fraccionament de mesclures complexes són la immobilització d'una sonda basada en l'inhibidor SB-203580 per a la purificació i caracterització de quinases [81] i la immobilització del 2-aminoetilfosfonat de *p*-nitrofenil i de metil per a la purificació de l'acetilcolinesterasa [82]. Totes aquestes aproximacions faciliten el procés de purificació que es pot dur a terme per filtrat o precipitació, però alhora la presència d'un suport sòlid voluminós pot limitar la unió de la sonda a l'enzim diana per problemes d'accessibilitat.

Malgrat totes les seves virtuts, les etiquetes com la biotina o els fluoròfors sovint són voluminoses i poden provocar l'aparició d'impediments estèrics i reduir l'afinitat de les sondes per les proteïnes diana. Per intentar superar aquestes limitacions s'han desenvolupat estratègies per separar l'etapa d'unió de les sondes al proteoma de l'etapa de revelat amb les etiquetes de marcatge (veure figura 1.8, apartat A). En aquestes estratègies se sintetitzen sondes sense etiqueta amb les quals es realitza la caracterització funcional del proteoma i, posteriorment, un cop les sondes ja estan unides als enzims d'interès, es procedeix al seu revelat mitjançant la unió d'una etiqueta. El primer mètode desenvolupat per a aquest propòsit va ser l'anomenada reacció de lligació de Staudinger. Aquesta aproximació, desenvolupada inicialment per Bertozzi [83], consisteix en la reducció d'un grup azida i la reacció amb un grup fosfina per a la formació d'una amida estable entre la sonda i l'etiqueta, i ha estat utilitzada per a l'estudi funcional del proteasoma (veure figura 1.8, apartat B) [84]. El segon mètode descrit per a aquesta estratègia és l'anome-

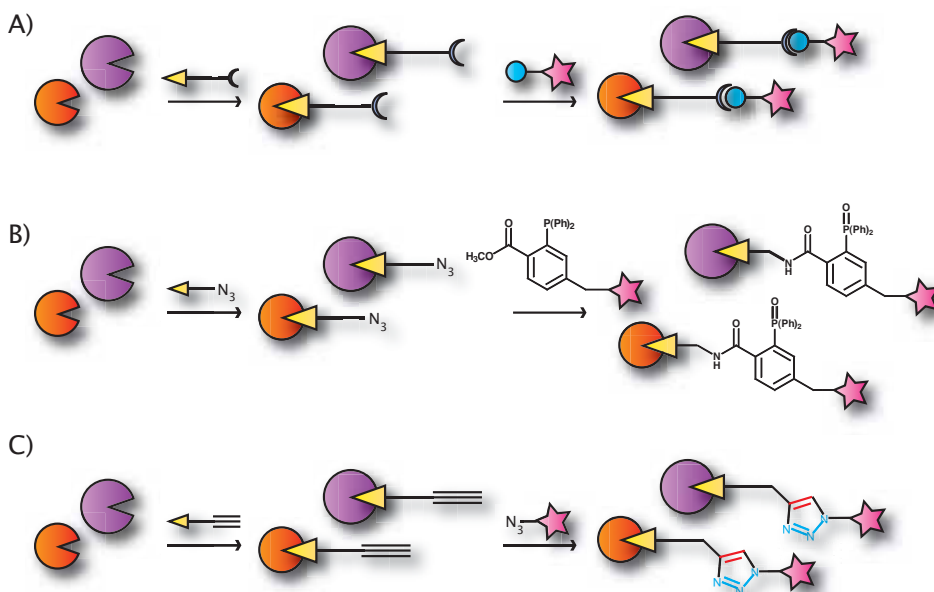


Figura 1.8: Estratègies d'unió d'etiquetes de revelat a les sondes basades en activitat. A) Esquema general de la caracterització funcional del proteoma mitjançant sondes sense etiqueta de revelat. B) Esquema de l'estratègia d'etiquetat basada en la reacció de lligació de Staudinger [83]. C) Esquema de l'estratègia d'etiquetat basada en la reacció de cicloaddició [2+3] de Huisgen [85, 86].

nada reacció de cicloaddició [2+3] de Huisgen que té lloc entre un grup alquí i una azida. Aquesta reacció, facilitada per un catalitzador de coure i popularment anomenada *click chemistry*, va ser desenvolupada inicialment per Sharpless [85] i Meldal [86] i adaptada a la proteòmica basada en activitat per Wang *et al.* [87] i Speers *et al.* [88] (veure figura 1.8, apartat C).

1.2 Proteïnes implicades en la biosíntesi i la inactivació dels neuropèptids

1.2.1 Els neuropèptids

Els neurotransmissors i les hormones peptídiques del teixit nerviós reben el nom de neuropèptids i són necessaris per a la comunicació intercel·lular en els processos de neurotransmissió i en la regulació de les funcions endocrines. Aquestes molècules poden actuar com a hormones, moduladors o transmissors i presenten una àmplia distribució ja que sovint es troben tant en el

sistema nerviós central com en plexes nerviosos d'alguns teixits perifèrics. Molts neuropèptids desenvolupen funcions tant en el sistema endocrí com en el sistema nerviós i un mateix neuropèptid pot actuar com a transmissor en algunes localitzacions i com a modulador o hormona en altres.

Els neuropèptids tenen una mida d'entre 3 i 40 residus aminoacídics i malgrat que s'han descrit centenars de neuropèptids, només un petit percentatge té una funció coneguda. Tot i així, existeix un gran nombre de processos fisiològics relacionats amb els neuropèptids que inclouen el creixement, els ritmes circadians, els circuits de recompensa, el dolor, l'ansietat, la memòria, el comportament, l'estat afectiu, el control del pes i de la temperatura corporal, el balanç hídric, així com el control cardiovascular, respiratori i gastrointestinal [89].

A tall d'exemple, cal comentar que s'han descrit neuropèptids com les endorfines α i β [90] i els neuropèptids FF, AF i SF [91] que modulen els sistemes sensorials, principalment alleugerint el dolor i afavorint l'analgèsia. Altres neuropèptids com la vasopresina, la CRH, la somatostatina, el NPY i la TRH milloren la memòria a curt termini, mentre que neuropèptids com la galanina tenen efectes oposats [92]. Així mateix, també cal destacar l'efecte inhibitor d'alguns neuropèptids com la somatostatina que inhibeixen la secreció d'hormona del creixement, insulina, gastrina, glucagó i TSH [93], mentre que altres, com la TRH, estimulen la secreció hormonal i augmenten l'excitabilitat neuronal. Alguns neuropèptids com la neurotensina, el NPY i les melanocortines ACTH i MSH α exerceixen un efecte neuromodulador tant en la neurotransmissió central com en la perifèrica modificant els efectes dels neurotransmissors tradicionals [93]. I finalment, cal destacar l'acció de neuropèptids com l'oxitocina i la vasopressina que, a part de les seves funcions endocrines, exerceixen diverses funcions en el sistema nerviós central com la termoregulació, la regulació cardiovascular, l'aprenentatge i el comportament social, sexual i maternal [93].

En els últims anys s'han descrit nous neuropèptids i noves funcions i aquests exemples, resumits a les taules 1.1 i 1.2, són només una petita mostra de l'àmpli ventall de funcions exercides per aquestes molècules que s'han consolidat com a factors imprescindibles per al bon funcionament de l'organisme. Per a una explicació detallada dels neuropèptids existents es pot recórrer als nombrosos articles de revisió i llibres publicats els últims anys [93].

1.2.2 Biosíntesi dels neuropèptids

La via clàssica

Els neuropèptids se sintetitzen per processament proteolític de proteïnes precursoras biològicament inactives que reben el nom de proneuropèptids o

Taula 1.1: Funcions regulades per neuropèptids del sistema nerviós i del sistema endocrí. Taula modificada de Hook, V. [94].

Neuropèptid	Funció
Encefalina	Analgèsia
Substància P	Millora de la memòria
Endorfina α i β	Analgèsia
NPFF, NPAF, NPSF	Analgèsia, Regulació endocrina i cardiovascular
ACTH	Producció d'esteroides i corticoïdes
MSH α	Gana, Pigmentació de la pell
CRF	Secreció d'ACTH
Insulina	Metabolisme de la glucosa
Glucagó	Metabolisme de la glucosa
Galanina	Cognició
NPY	Obesitat i Pressió sanguínia
Somatostatina	Regulació del creixement
Vasopressina	Balanç hídric
Calcitonina	Regulació del calci
Colicistoquinina	Aprenentatge, Memòria i Gana
PACAP	Diferenciació neuronal

prohormones [96, 97, 94, 98, 99]. Aquestes proteïnes poden contenir diferents còpies dels neuropèptids madurs (veure figura 1.9) i són empaquetades en vessícules de secreció a través del reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi. A mesura que les vessícules de secreció maduren es produeix el processament proteolític de les proteïnes precursors i es generen els neuropèptids actius que seran alliberats a l'espai extracel·lular en el moment oportú [100]. Durant aquest procés de maduració, els neuropèptids també poden ser modificats per la formació d'enllaços disulfur, glicosilacions [101], amidacions en C_{ter} [102], fosforilacions [103], sulfatacions [104] i acetilacions [105] que en modifiquen la seva activitat biològica.

El processament proteolític de les proteïnes precursors s'ha descrit tradicionalment en seqüències Lys-Arg↓, Lys-Lys↓, Arg-Arg↓ o Arg-Lys↓ que flanquegen els neuropèptids, encara que a vegades el processament pot tenir lloc en punts amb un sol residu bàsic (Arg↓) o en seqüències del tipus Lys/Arg-Xxx_n-Lys/Arg↓ amb n = 0, 2, 4 o 6. Segons la seqüència del punt de tall, els precursors s'han classificat en quatre tipus principals que es recullen a la taula 1.3 [114]. Els enzims responsables del processament d'aquests quatre tipus de precursors són proteïnes serina proteasa depenents de calci relacionades amb la subtilisina i la kexina de llevat [115, 98]. Aquests enzims reben el nom anglès *Prohormone convertase* (PC) i van ser descoberts per tècniques de clonatge per homologia amb el gen de llevat KEX2 [116] [117] que codifica la kexina, una proteïna serina proteasa dependent de Ca^{2+} necessària per al processament en seqüències bàsiques del factor *pro- α -mating* [118].

Taula 1.2: Llista d'alguns dels neuropèptids de mamífer agrupats per famílies. Taula modificada de Hökfelt, T. [95].

Hormones hipotalàmiques

Oxitocina (9 aa)
Vasopressina (9 aa)

Hormones hipotalàmiques estimuladores o inhibidores

Hormona alliberadora de corticotropina (CRH) (41 aa)
Hormona alliberadora de l'hormona del creixement (GHRH) (44 aa)
Hormona alliberadora de l'hormona luteinizant (LHRH) (10 aa)
Somatostatina (SOM) (14 aa)
Hormona alliberadora de tirotropina (TRH) (3 aa)

Taquiquinines

Neuroquinina α (NKA) (10 aa)
Neuroquinina β (10 aa)
Neuropèptid K (36 aa)
Substància P (11 aa)

Pèptids Opioïdes

Endorfina β (30 aa)
Dinorfina (17 aa)
Met- (i Leu-) Encefalina (5 aa)
NPY i pèptids relacionats
Neuropèptid tirosina (NPY) (36 aa)
Polipèptid pancreàtic (36 aa)
Pèptid Tyr-Tyr (36 aa)

Família VIP-Glucagó

Pèptid-1 similar al glucagó (GLP-1) (30 aa)
Pèptid His-Ile (PHI) (27 aa)
Pèptid activador de l'adenilat ciclase de pituïtària (PACAP) (27-38 aa)
Polipèptid intestinal vasoactiu (VIP) (28 aa)

Altres neuropèptids

Pèptid natriurètic de cervell (332 aa)
Pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) (37 aa)
Colecistoquinina (8 aa)
Pèptid similar al glucagó (30 aa)
Galanina (29-30 aa)
Amilina (IAPP) (37 aa)
Hormona concentradora de melanina (MCH) (19 aa)
Neuropèptid FF (8 aa)
Neurotensina (13 aa)
Proteïna relacionada amb l'hormona paratiroïdea (34-37 aa)

Neuropèptids nous

Proteïna relacionada amb el gen Agouti (AGRP) (131 aa)
CARTs
Corticostatina (14-29 aa)
Endomorfina 1 i 2 (4 aa)
5-HT-Modulina (4 aa)
Hipocretines (29-39 aa)
Nociceptina (17 aa)
Nocistatina (17 aa)
Pèptid alliberador de prolactina (20-31 aa)
Secretoneurina (33 aa)
Urocortina (40 aa)

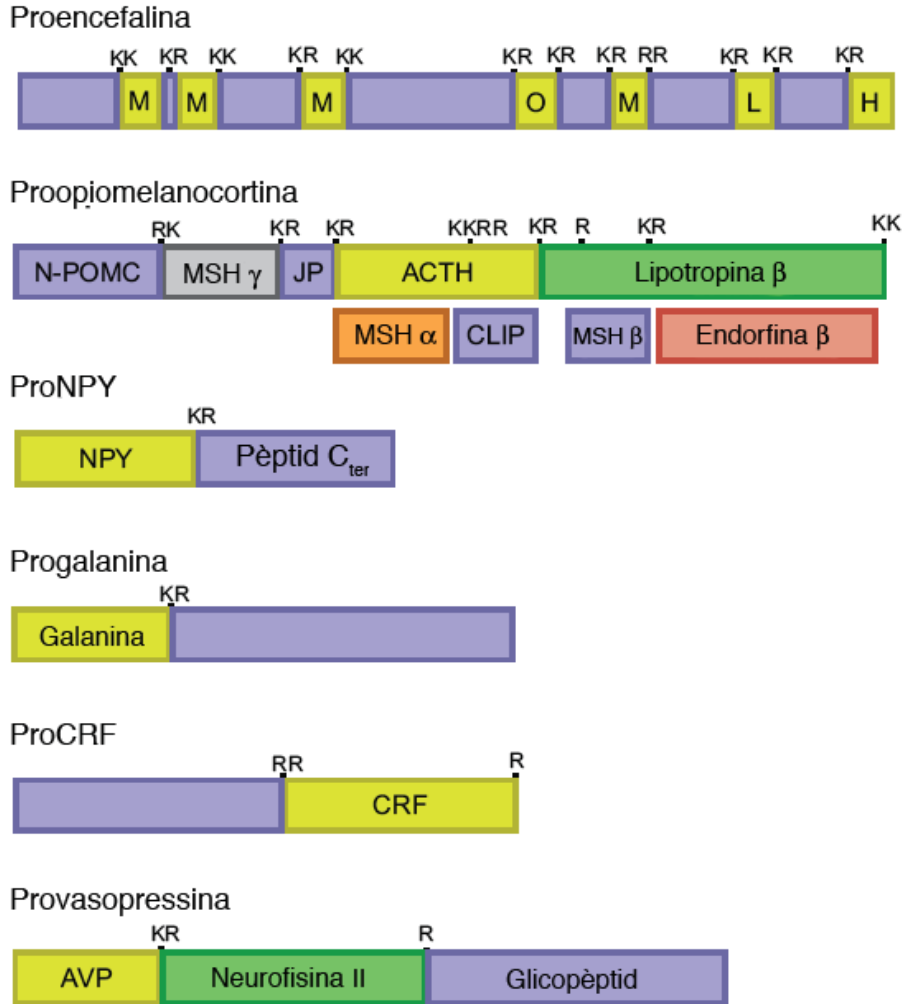


Figura 1.9: Proteïnes precursors de neuropèptids i hormones peptídiques. Les proteïnes precursors de neuropèptids i hormones peptídiques poden contenir diferents còpies dels neuropèptids madurs. Aquests precursors poden contenir una còpia del neuropèptid actiu com passa amb el proneuropèptid Y, la progalanina i la provasopressina [106, 107, 108] o contenir-ne múltiples còpies com és el cas de la proencefalina que conté 4 còpies de (Met)encefalina (M), una còpia de la (Leu)encefalina (L) i una còpia de ME-Arg-Gly-Leu (H) i de ME-Arg-Phe (O) [109, 110]. A més, es pot donar el cas que un precursor doni lloc a diferents neuropèptids madurs segons el teixit on es trobi. Així, per exemple, el precursor proopiomelanocortina pot generar ACTH a la pituitària anterior, però dona lloc a MSH α i endorfina β en el lòbul intermedi de la pituitària [111, 112, 113]. Esquema modificat de Hook *et al.* [94].

Taula 1.3: Classificació de les proteïnes precursors segons la seqüència del punt de tall. Taula modificada de Seidah *et al.* [114]

PROTEÏNA PRECURSORA	SEQÜÈNCIA DEL PUNT DE TALL									
PRECURSORS DE TIPUS I	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'		
[(R-X)-(K/R)-R]	[X-	X-	R-	X-	K/R-	R	↓	X- X]		
Pro-βNGF	Thr-His-	Arg	Ser-	Lys	Arg		↓	Ser-Ser		
Pro-Receptor de Leptina	Gln-Val-	Arg	Glu-	Lys	Arg		↓	Leu-Asp		
Integrina α6	Asn-Ser-	Arg	Lys-	Lys	Arg		↓	Glu-Ile		
HIV-1 gp160	Val-Gln-	Arg	Glu-	Lys	Arg		↓	Ala-Val		
Pro-fertilina α	Gln-Ser-	Arg	Met-	Arg	Arg		↓	Ala-Ala		
Pro-7B2	Glu-Arg-	Arg	Lys-	Arg	Arg		↓	Ser-Val		
PRECURSORS DE TIPUS II	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'		
[(K/R)-(K/R)]	[X-	X-	X-	X-	K/R-	K/R	↓	X- X]		
POMC (αMSH/CLIP)	Pro-Val-	Gly-	Lys-	Lys	Arg		↓	Arg-Pro		
(γLPH/βEnd)	Pro-Pro-	Lys	Asp-	Lys	Arg		↓	Tyr-Gly		
Pro-Insulina (Cadena B/C)	Thr-Pro-	Lys	Thr-	Arg	Arg		↓	Glu-Ala		
(Cadena A/C)	Gly-Ser-	Leu-	Gln-	Lys	Arg		↓	Gly-Ile		
Pro-Renina	Ser-Gln-	Pro-	Met-	Lys	Arg		↓	Leu-Thr		
PACAP-RP	Ala-Pro-	Leu-	Thr-	Lys	Arg		↓	His-Ser		
Integrina α4	His -Val-	Ile-	Ser-	Lys	Arg		↓	Ser-Thr		
Pro-fertilina β	Ser-Cys-	Lys	Leu-	Lys	Arg		↓	Arg-Gly		
PRECURSORS DE TIPUS III	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
[Només R]	(B)-	X-	(B)-	X-	(B)-	X-	X	R	↓	X- X]
Pro-Dinorfina (pèptid C)	Arg -Gln-	Phe-	Lys-	Val-	Val-	Thr-	Arg		↓	Ser-Gln
Pro-ANF	Arg -Ala-	Leu-	Leu-	Thr-	Ala-	Pro-	Arg		↓	Ser-Leu
Pro-Somatostatina (SS-28)	Glu-Met-	Arg	Leu-	Glu-	Leu-	Gln-	Arg		↓	Ser-Ala
Pro-IGF-I	Leu-Lys-	Pro-	Thr-	Lys	Ala-	Ala-	Arg		↓	Ser-Ile
Pro-IGF-II	Ala-Thr-	Pro-	Ala-	Lys	Ser-	Glu-	Arg		↓	Asp-Val
Pro-EGF (N-terminal)	Glu-Asp-	Gly-	His-	His	Leu-	Asp-	Arg		↓	Asn-Ser
Pro-EGF (C-terminal)	Asp-Leu-	Arg	Trp-	Trp-	Glu-	Leu-	Arg		↓	His-Ala
PRECURSORS DE TIPUS IV	P8	P7	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
[P2' = R/K]	(B)-	X-	(B)-	X-	(B)-	X-	(B)-	R/K	↓	X -R/K
PACAP-RP	Leu-Ala-	Ala-	Val-	Leu-	Gly-	Lys	Arg		↓	Tyr- Lys
Pro-Substància inhibidora de Muller	Glu-Gly-	Arg	Gly-	Arg	Ala-	Gly-	Arg		↓	Ser- Lys
Pro-Glucagó	Gln-Trp-	Leu-	Met-	Asn-	Thr-	Lys	Arg		↓	Asn- Arg
Pro-IGF-II	Glu-Ala-	Phe-	Arg-	Glu-	Ala-	Lys	Arg		↓	His- Arg
Pro-Receptor PTP- μ	Val-Glu-	Glu-	Glu-	Arg	Pro-	Arg	Arg		↓	Thr- Lys

Actualment, es coneixen set membres de la família de les convertases de prohormones o proproteïnes: la PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6 A i B, PC7 [119, 120] i la furina [121, 122]; i totes comparteixen una extensa homologia de seqüència amb la família bacteriana de la subtilisina [123]. Aquestes proteïnes presenten una estructura general basada en un pèptid senyal, un domini Pro, una subunitat catalítica i un domini P (veure figura 1.10) [124, 120]. El domini catalític està format per la tríada catalítica Asp, His i Ser, i un residu Asn que participa en l'estabilització d'un oxianió en el procés de catalització [125]. En aquest patró, la proteïna PC2 apareix com una excepció en el sentit que el residu Asn és substituït per un residu Asp que afavoreix la unió d'inhibidors endògens com el 7B2 [126].

Per altra banda, el domini P, present també en totes les convertases i amb una seqüència RGD altament conservada, és un domini crític per al correcte plegament d'aquestes proteïnes en el reticle endoplasmàtic. Tot i l'elevat grau d'homologia d'aquest domini en tots els membres de la família, la seqüència que segueix el domini P per l'extrem C_{ter} és molt variable. En aquest sentit, s'han descrit dominis rics en cisteïnes en la PACE4, PC5/6A, PC5/6B i la furina; dominis rics en serines i treonines en la PC7 i la kexina de llevat, i dominis transmembrana presents en la furina, PC5/6B, PC7 i la isoforma E de PACE4. D'aquesta manera, les proteïnes furina, PC5/6B, PC7 i la isoforma E de PACE4 són enzims associats a membrana mentre que les proteases PC1/3, PC2, PACE4-A i PC4 han estat descrites com enzims solubles [114].

Les proteïnes PC1/3 i PC2 es troben principalment en teixits neuroendocrins [97] i són considerades els membres de la família de les convertases més importants en la biosíntesi de neuropèptids (veure taula 1.4) [114]. L'activitat de les proteïnes PC1/3 i PC2 ha estat descrita en vessícules secretores del pàncrees [128], la pituitària [129, 130], la medulla adrenal [131] i en molts altres teixits neuroendocrins [97]. Així mateix, s'ha observat que aquestes proteïnes estan relacionades amb el processament de proinsulina [132], POMC (β LPH i ACTH) [133, 134], proencefalina [135], proneurotensina [136], prodinorfina [137], proglucagó [138], proMCH [139], proLHRH [114] i proCART [140], entre altres. En canvi, les proteïnes furina, PACE4 i PC7 tenen una expressió generalitzada i intervenen en el processament de substrats molt diversos que inclouen factors de creixement (proTGF β) [141] i neurotrofines (proNGF, proBDNF i proNT3), així com factors de coagulació, metal·loproteases i receptors [114].

Recentment, s'ha identificat una nova proteasa capaç de processar proneuropèptids en seqüències amb un o dos residus bàsics, però amb la peculiaritat de tractar-se d'una proteïna cisteïna proteasa. Els estudis realitzats en grànuls cromafins [142] van permetre determinar l'activitat responsable del processament de la proencefalina a la qual se li va donar el nom de *Prohormone*

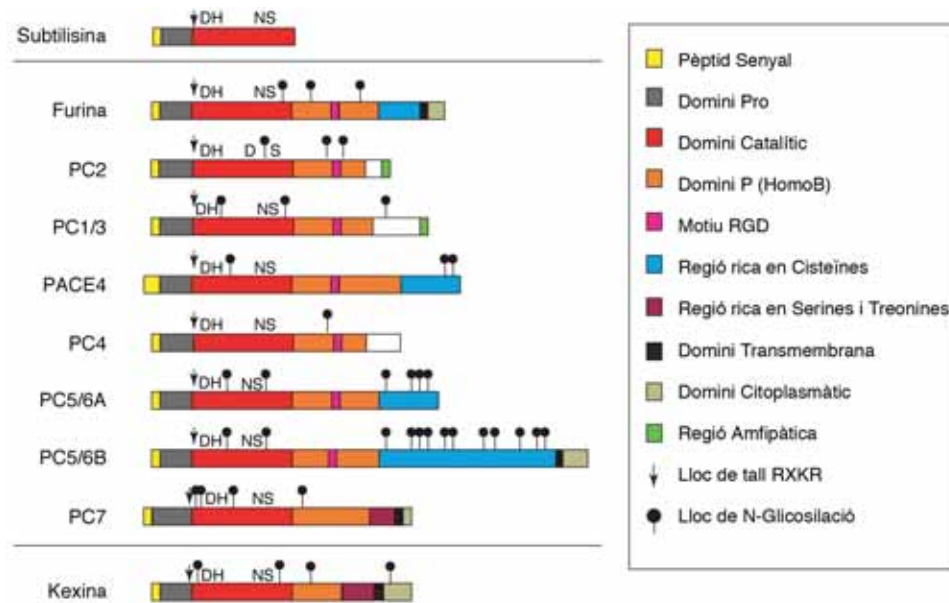


Figura 1.10: Estructura general de les convertases de prohormones. Els enzims responsables del processament dels proneuropèptids són proteïnes serina proteasa dependents de calci relacionades amb la subtilisina i la kexina de llevat. Tots ells presenten una estructura general basada en un pèptid senyal, un domini pro, una subunitat catalítica i un domini P. Es pot observar que, a part dels residus que formen la tríada catalítica, tots els enzims presenten un residu Asn amb funció estabilitzadora, excepte en PC2 on ha estat substituït per un residu Asp. La mutagènesi dirigida de Asp a Asn en PC2 no afecta la maduració ni l'activitat ni la localització subcel·lular de la proteïna [127], però redueix la unió de 7B2 [126]. La presència del residu Asp s'ha relacionat amb la unió amb inhibidors endògens.

Taula 1.4: Expressió i localització subcel·lular de les convertases de prohormones. Taula modificada de Seidah *et al.* [114]. EN: Endosomes; SC: Superfície cel·lular; TGN: Regió *trans* de l'aparell de Golgi; VS: Vessícules de secreció.

Convertasa	Expressió	Localització subcel·lular
Furina	Expressió àmplia	TGN, EN i SC
PC1/3	Cèl·lules endocrines i neuronals	TGN i VS
PC2	Cèl·lules endocrines i neuronals	VS
PACE4	Expressió àmplia	VS
PC4	Cèl·lules germinals de testicles i ovaris	TGN
PC5A	Cèl·lules endocrines i no endocrines	TGN i VS
PC5B	Sistema digestiu i Còrtex Adrenal	TGN
PC7	Expressió àmplia	TGN

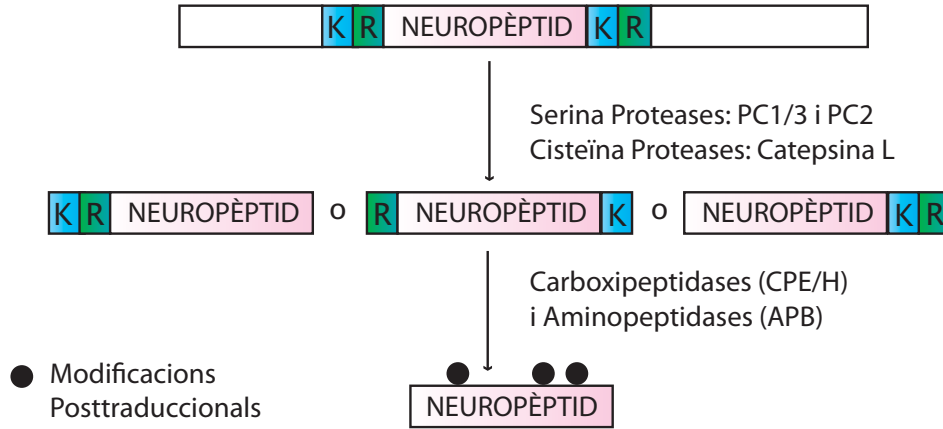


Figura 1.11: Esquema del processament de neuropèptids. L'activitat de les convertases de prohormones seguida de l'eliminació de l'arginina o la lisina en C_{ter} o N_{ter} per part de carboxipeptidases i aminopeptidases és una de les vies principals per a la conversió de proneuropèptids a hormones i neurotransmissors peptídics actius.

thiol protease complex (PTP) [143, 144]. Posteriorment, la utilització de tècniques de proteòmica basada en activitat ha permès comprovar que l'activitat cisteïna proteasa descrita corresponia en realitat a una nova funció de la catepsina L [145]. Els estudis d'especificitat de tall de la catepsina L han demostrat la seva preferència pel processament proteolític a l'extrem N_{ter} dels residus bàsics i entre les seqüències processades cal destacar $\downarrow\text{Arg}-\downarrow\text{Arg}$, $\downarrow\text{Arg}$, $\downarrow\text{Lys}-\downarrow\text{Lys}$, $\downarrow\text{Lys}$ i $\downarrow\text{Lys}-\downarrow\text{Arg}$.

En qualsevol cas, ja sigui mitjançant proteïnes serina proteasa o cisteïna proteasa, el processament proteolític de precursors peptídics origina pèptids amb residus bàsics a l'extrem C_{ter} (PC1/3 i PC2) o a l'extrem N_{ter} (catepsina L). Aquests residus són eliminats en l'últim pas de la biosíntesi dels neuropèptids per carboxipeptidases i aminopeptidases, respectivament, per generar el neuropèptid madur (veure figura 1.11). Concretament, l'activitat de les proteïnes serina proteasa PC1/3 i PC2 va acompanyada per l'eliminació de l'arginina o la lisina en C_{ter} per la carboxipeptidasa E/H (CPE/H) mentre que el processament de la proencefalina per part de la catepsina L va seguida de l'activitat aminopeptidasa B [146].

La via alternativa o atípica

La majoria de fenòmens de processament proteolític de proneuropèptids estan catalitzats per les proteïnes serina i cisteïna proteasa que actuen en seqüències R/K-(X)_n-R↓ amb n = 0, 2, 4 o 6. Tanmateix, en els últims anys, s'ha descrit la formació de pèptids bioactius per proteòlisi en seqüències no-consens, constituint el que sovint s'ha anomenat via alternativa de la biosíntesi de neuropèptids i hormones peptídiques [147]. Aquest tipus de processament proteolític s'ha observat en la generació de pèptids com l'endorfina α i γ [90], el factor plaquetari 4 [148], el fragment 1–19 de la provasopressina [149], el factor TNF α [150], així com en la producció dels pèptids amiloidogènics Aβ₄₀, Aβ₄₂ i Aβ₄₃ [151] i la formació del factor de transcripció SREBPS implicat en el metabolisme d'esterols [152, 153, 154, 155] (veure taula 1.5). Les proteases implicades en el processament proteolític en seqüències no-consens no són ben conegudes i malgrat que en els últims anys se n'han descrit alguns exemples, encara existeixen nombroses seqüències per a les quals se'n deconeix la proteasa que les processa.

La proteïna SKI-1/S1P és un dels enzims, recentment descrits, implicats en la proteòlisi de proneuropèptids en seqüències atípiques. Aquesta proteïna és un enzim serina proteasa depenent de Ca²⁺ similar a la subtilisina i la kexina [156], però es caracteritza pel processament proteolític de proneuropèptids en residus petits (σ) o hidrofòbics (φ) com la Leu, Val, Met, Ala i Thr en seqüències del tipus K/R-X-X-σ/φ↓ [157, 158]. L'activitat de SKI-1/S1P està implicada en la formació del factor de transcripció SREBPS per un procés proteolític en la seqüència Arg-Ser-Val-Leu-↓Ser-Phe/Val, seguit de l'acció de la isoforma S2P en la seqüència Arg-Ile-Leu-Leu-↓Cys-Val [152, 153, 154, 155]. Altres exemples de l'acció de SKI-1/S1P són el processament del pèptid proBDNF en la seqüència Arg-Gly-Leu-Thr-↓Ser-Leu [156] i el processament del factor de transcripció de resposta a l'estrès, ATF6, en seqüències Arg-Arg-His-Leu-↓Leu-Gly [158].

Altres proteïnes implicades en la proteòlisi en seqüències no-consens són la proteïna NARC-1, els enzims ECE i la proteïna PPE/ADAM-10 (*proTNF-processing enzyme*), una metal·loproteasa implicada en el processament atípic del factor proTNF mitjançant un tall en Ala-↓Val [150]. La proteïna NARC-1 (*Neural apoptosis-regulated convertase 1*) és un nou membre de la família de les proteïnes serina proteasa similars a la subtilisina i la kexina [159]. Aquesta proteïna s'expressa a fetge, ronyó, cerebel i intestí prim [159] on se sintetitza com a zimogen i pateix un processament proteolític autocatalític en la seqüència (Tyr/Ile)-Val-Val-(Val/Leu)-(Leu/Met)-↓. En canvi, les proteïnes ECE (*Endothelin-converting enzymes*) són metal·loproteases transmembrana responsables del processament *in vivo* de les endotelines, uns pèptids vasoconstrictors que requereixen un tall Trp-↓Val/Ile com a últim pas de la seva biosíntesi [160, 161]. Tot i això, diversos experiments *in vitro* han

Taula 1.5: Seqüències de tall atípiques de proneuropèptids i prohormones

Precursor	Seqüència al lloc de tall					
	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
SKI-1/S1P						
SREBP-1a	Arg-	Asn-	Val-	Leu-↓	Gly-	Thr
SREBP-2	Arg-	Ser-	Val-	Leu-↓	Ser-	F/V
proBDNF	Arg-	Gly-	Leu-	Thr-↓	Ser-	Leu
ATF6	Arg-	Arg-	His-	Leu-↓	Leu-	Gly
S2P						
SREBP-2	Arg-	Ile-	Leu-	Leu-↓	Cys-	Val
NARC-1						
Autocatàlisi	Val-	Val-	L/V-	L/M-↓	K/E-	Glu
ECE						
Endotelina 1	Asp-	Ile-	Ile-	Trp-↓	Val-	Asn
Altres						
Factor plaquetari 4	Val-	Lys-	Thr-	Thr-↓	Ser-	Gln
Endorfina α	Leu-	Val-	Thr-	Leu-↓	Phe-	Lys
Endorfina γ	Val-	Thr-	Leu-	Phe-↓	Lys-	Asn
Vasopressina 1-19 γ	Ala-	Leu-	Leu-	Leu-↓	Arg-	Leu
Secretasa $\beta_{\epsilon 1}$	Lys-	Met-	Asp-	Ala-↓	Glu-	Phe
Secretasa $\beta_{\epsilon 2}$	Asp-	Ser-	Gly-	Tyr-↓	Glu-	Val
Cromogranina A (291↓292)	Pro-	Gln-	Val-	Leu-↓	Phe-	Arg
Cromogranina B (609↓610)	Leu-	Ala-	Ala-	Met-↓	Asp-	Leu
Cromogranina B (609↓610)	Leu-	Ala-	Ala-	Met-↓	Asp-	Leu

descriu l'acció de les proteïnes ECE en el processament de neuropèptids i hormones peptídiques com la neurotensina, la substància P, la bradiquinina i la cadena B de la insulina [162, 163]. Aquesta observació, juntament amb l'elevada expressió de la isoforma ECE-2b en teixits neuroendocrins (cervell, pituïtària i glàndula adrenal), suggereix que aquests enzims podrien estar implicats en el processament *in vivo* de pèptids biològicament actius més enllà de les endotelines.

Per altra banda, en els últims anys, s'han realitzat nombrosos estudis de proteòmica i peptidòmica [164] per a la identificació [165, 166, 167, 168] i quantificació de neuropèptids [169, 170, 171]. L'aplicació de tècniques d'espectrometria de masses en la caracterització de teixits neuroendocrins de ratolins *Cpe^{fat}/Cpe^{fat}* ha portat a la identificació de nombrosos productes peptídics processats en seqüències no descrites anteriorment [172]. Entre els diversos productes identificats cal destacar diversos subproductes de la cromogranina B, una proteïna de la família de les cromogranines, expressada en cervell, glàndula pituïtària i medulla adrenal, que ha estat descrita com a possible precursora de nombrosos pèptids bioactius per processament tant en seqüències amb residus bàsics com en seqüències atípiques [173, 174, 175, 176, 177].

1.2.3 Inactivació proteolítica dels neuropèptids

Un cop alliberades per les cèl·lules emissores, les molècules encarregades de la comunicació intercel·lular, com els neuropèptids i els neurotransmissors no peptídics, transmeten senyals de curta durada cap a les cèl·lules diana.

En aquest context, és fonamental que aquestes molècules actuïn en el breu període de temps en el qual han de realitzar la seva funció i que, posteriorment, siguin inactivades o eliminades. Per garantir la brevetat de la comunicació intercel·lular existeixen diversos mecanismes que actuen tant a nivell del mediador alliberat com del seu receptor [178, 179]. Així, després de la unió dels neurotransmissors al receptor diana, existeix un procés d'internalització del complex lligand-receptor, que elimina certa quantitat de mediador, però aquest mecanisme sovint no és suficient per eliminar tot el lligand en excés. De fet, en els neurotransmissors no peptídics, l'eliminació completa del lligand es realitza per un procés de recaptació dels neurotransmissors per part de la cèl·lula productora. En el cas dels neuropèptids, però, no existeix un procés de recaptació equivalent al descrit pels neurotransmissors no peptídics i l'eliminació dels mediadors es realitza per l'acció de peptidases presents a l'espai extracel·lular—ja sigui en forma soluble o unides a membrana—que tallen i inactiven els neurotransmissors [97].

En els últims anys, s'han proposat diverses proteases que podrien estar implicades en el procés d'inactivació dels neuropèptids. Entre les proteïnes candidates hi ha metal·loproteases com les aminopeptidases, l'enzim que

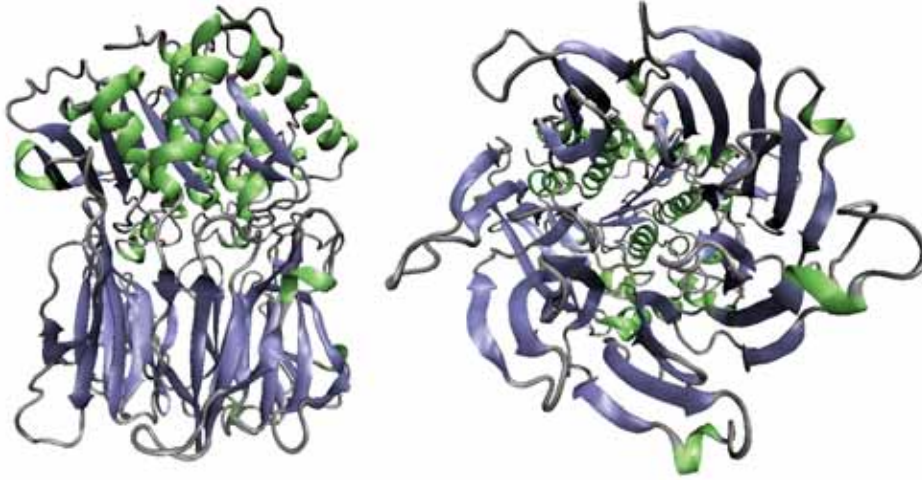


Figura 1.12: Estructura de raig X de la proteïna prolil oligopeptidasa de porc [181]. La proteïna prolil oligopeptidasa (POP) és un proteïna serina proteasa d'uns 80 kDa i de forma cilíndrica (~ 60 Å d'alçada i ~ 50 Å d'amplada) que processa pèptids en seqüències Pro-↓X. Està formada per un domini catalític amb un plegament α/β i un domini de tipus hèlix β que forma un túnel cilíndric per on s'hipotetitza que entren els substrats. La triada catalítica està formada pels residus Ser₅₅₄, Asp₆₄₁ i His₆₈₀ i es troba al final del túnel formant part del domini catalític.

processa l'angiotensina (ACE), la piroglutamil peptidasa II, la neprilisina o encefalinasa, i les endopeptidases 24.15 i 24.16 [97]. Precisament, aquestes tres últimes proteïnes han estat descrites com les responsables de la inactivació fisiològica de la neurotensina, mentre que l'aminopeptidasa M s'ha associat a la inactivació de la neuromedina N [180]. Tot i això, s'han descrit nombrosos compostos que són degradats per aquestes proteases en experiments *in vitro*. En aquest sentit, s'ha observat que la neprilisina degrada el factor natriurètic, la substància P, les neuroquinines, la neurotensina, les endotelines, i la bradiquinina, mentre que, l'aminopeptidasa N pot processar l'angiotensina II i III, la somatostatina, la dinorfina i la substància P [97]. Aquests resultats suggereixen que aquestes proteases podrien jugar un paper important en la modulació dels nivells fisiològics, no només de la neurotensina i la neuromedina, sinó de molts altres neuropèptids.

Per altra banda, entre les proteïnes proposades també hi ha proteïnes serina peptidasa com la prolil oligopeptidasa o POP (veure figura 1.12) [182, 183]. Aquesta proteïna és una peptidasa fonamentalment citoplasmàtica que processa pèptids de fins a 30 aminoàcids per trencament de l'enllaç peptídic en seqüències Pro-↓X i Ala-↓X, éssent X qualsevol aminoàcid excepte prolina. El gen que codifica la POP té una expressió àmplia i l'activitat de la POP

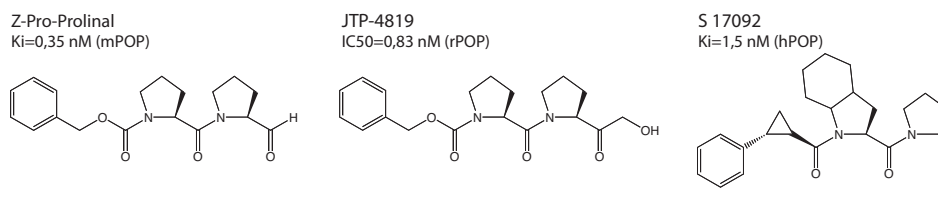


Figura 1.13: Estructura dels inhibidors de la proteïna prolil oligopeptidasa Z-Pro-Pro-H [192], JTP-4819 [193] i S17092 [194, 195]. mPOP: POP de ratolí; rPOP: POP de rata; hPOP: POP d'humà.

s'ha detectat en testicles, fetge, múscul esquelètic, pulmó, cervell i ronyó, així com en l'espai extracel·lular i en fluids corporals com el sèrum o el líquid cerebrospinal [184]. A més, de forma similar a les metal·loproteases, s'han descrit desenes de compostos peptídics, incloent-hi nombrosos neuropèptids, que poden ser processats *in vitro* per aquesta proteïna, com la substància P, la neurotensina, la TRH, la bradiquinina, la dinorfina, l'angiotensina, l'oxitocina i la vasopressina [185]. Evidentment, el pas d'aquestes observacions a l'assignació de funcions fisiològiques de la POP depèn de la seva confirmació en experiments *in vivo*. En aquest sentit, l'ús en mamífers de potents inhibidors específics com el JTP-4819, el S17092 i el Z-Pro-Pro-H (veure figura 1.13) ha permès relacionar la POP amb el procés d'inactivació proteolítica *in vivo* de la substància P [186, 187], la TRH [188, 187] i l'arginina-vasopressina [186, 189], així com en la conversió d'angiotensina II a Ang₁₋₇, un vasoconstrictor inhibidor de l'angiogènesi [185]. En canvi, no s'ha pogut demostrar la implicació de la POP en el processament de neuropèptids com la bradiquinina, l'oxitocina, la GnRH o l'endorfina β que, anteriorment, havien estat descrits com a substrats *in vitro* [185].

No obstant això, el mecanisme d'acció de la POP en el processament dels neuropèptids encara no és clar i, a part de la seva acció proteasa, alguns estudis proposen l'existència d'un mecanisme d'acció indirecte a través del metabolisme de l'inositol-1,4,5-P₃ [190, 191].

1.2.4 Interès farmacològic de les proteïnes implicades en la biosíntesi i inactivació de neuropèptids

Actualment, hi ha un interès creixent en les proteïnes responsables de la maduració i inactivació dels neuropèptids com a noves dianes terapèutiques ja que determinen els nivells de neuropèptid actiu i en controlen la seva acció. D'aquesta manera, la investigació d'aquestes proteïnes pot permetre l'aplicació de noves estratègies terapèutiques, basades en la modulació de la

seva activitat, que permetin regular els nivells fisiològics de neuropèptids i contrarestar-ne les alteracions patològiques [124]. En alguns casos, com en el tractament de la hipertensió o el desenvolupament d'inhibidors específics de la neprilisina, ja s'ha començat a explorar aquesta estratègia, però en altres, aquest camp encara està en els seus inicis.

La importància fisiològica de les proteïnes que participen en la maduració dels proneuropèptids s'ha posat de manifest amb la creació de ratolins amb gens o enzims no funcionals [196, 120, 99]. L'estudi d'aquests models ha permès observar les alteracions relacionades amb l'absència o inactivació d'aquestes proteïnes, determinar algunes de les seves funcions fisiològiques i identificar en quines alteracions podrien ser utilitzades com a possibles dianes terapèutiques.

En aquests sentit, s'ha observat que únicament l'absència o disfunció de la furina, la PC5/6 i la SKI-1/S1P són letals en estadis inicials del desenvolupament embrionari i s'han descrit models viables, però amb importants disfuncions neuroendocrines, per a les proteïnes PC1/3 i PC2. La presència d'un model amb la proteïna PC2 disfuncional [197] ha permès observar retards en el creixement, hipoglucèmies i deficiències de glucagó en sang. Així mateix, s'han descrit deficiències en el processament de la proCCK neuronal [198], la proneurotensina/neuromedina N [199], prodinorfina [200], la proorfana FQ/nociceptina i els pèptids derivats del precursor POMC [201], en clara consonància amb la implicació d'aquesta proteïna en el processament de molts precursors neuroendocrins. De forma similar a PC2, l'eliminació del gen de la proteïna PC1/3 provoca el processament defectuós de nombrosos proneuropèptids com la proGHRH, la POMC de pituïtària, la prooxitocina, la cromogranina A i B, la proinsulina i el glucagó intestinal, provocant hiperproinsulinèmia i retard en el creixement [202, 203, 204]. A més, en el cas de la proteïna PC1/3 s'han descrit dos casos de deficiència d'aquesta proteïna en humans que presentaven obesitat neonatal, alteració de l'homesotasi de la glucosa, defectes en l'absorció intestinal de monosacàrids i greixos, diarrea, etc. [205, 206].

Així mateix, s'han descrit nombroses afectacions addicionals que podrien estar relacionades amb alteracions en el processament dels neuropèptids i afectar processos com els ritmes circadians, els circuits de recompensa, el dolor, la memòria, el comportament i l'estat afectiu, comentats anteriorment [89]. A tall d'exemple, els neuropèptids CART, processats per PC1/3, PC2 i PC5/6A, podrien jugar un paper important en funcions fisiològiques com el sistema de recompensa, el desenvolupament, el processament sensorial, la regulació endocrina i l'estrès, i recentment s'han associat amb malalties com la diabetis i l'anorèxia [140, 207, 208, 209, 210, 211, 212]. La importància de les proteïnes que participen en la maduració dels proneuropèptids també s'ha descrit en l'establiment de la hipercolesterolemia [213], en la regulació

del creixement i progressió de tumors [214, 215] així com en l'activació de toxines bacterianes i amb la maduració de glicoproteïnes víriques del VIH i del virus de l'Ebola, entre altres [216, 217, 218, 219].

De la mateixa manera que les proteïnes implicades en la maduració dels pro-neuropèptids, les proteases que participen en el procés d'inactivació com les aminopeptidases, l'ACE, la neprilisina i les proteïnes serina proteasa també representen una important diana terapèutica. La inhibició d'aquestes proteases pot comportar un augment dels nivells de neuropèptids i, per tant, un increment o prolongació del seu efecte fisiològic a la cèl·lula diana.

En els darrers anys, s'han desenvolupat nombrosos inhidors específics de la neprilisina, l'ACE i l'aminopeptidasa N per al tractament de l'asma, la depressió, la hipertensió i la isquèmia de miocardi. Entre els inhibidors específics de la neprilisina cal destacar el tiol peptídic de tipus sintètic, tiorfan, i altres com el RB38B, el SQ 28,603 i el RB101; tots amb un fort efecte analgèsic i potenciadors de l'efecte antidepressiu dels opioïdes. L'inhibidor ES37 és una variant del tiorfan que inhibeix tant la neprilisina com l'ACE i s'ha mostrat com una molècula interessant per al tractament de desordres cardiovasculars [97]. Així mateix, s'han desenvolupat fàrmacs com el captopril, l'enalapril i el lisinopril que actuen sobre l'enzim ACE i que han estat àmpliament utilitzats per al tractament de la hipertensió, [97].

Finalment, cal destacar la importància de les proteïnes serina proteasa implicades en la inactivació de neuropèptids com a diana terapèutica ja que s'han detectat canvis en l'activitat de la proteïna prolil oligopeptidasa en el sèrum de pacients amb diversos desordres psiquiàtrics com la depressió, la mania i l'esquizofrènia [220], desordres alimentaris [221], i amb fenòmens d'ansietat induïda per l'estrès [222] i d'estrès posttraumàtic [223].

En aquest context, resulta evident que l'estudi de les proteïnes responsables de la biosíntesi i la inactivació de neuropèptids, així com la identificació de noves proteïnes implicades en aquest procés, és un camp d'investigació molt prometedor per a l'establiment de possibles noves dianes terapèutiques.

Capítol 2

Objectius

En aquesta tesi es pretén utilitzar la proteòmica basada en activitat per a la identificació de proteases que puguin estar implicades en el processament proteolític dels neuropèptids.

Per dur a terme aquesta identificació es pretén utilitzar precursors neuroptídics per als quals es desconeix la proteasa que els processa. Aquests precursors han de servir d'inspiració per al disseny de sondes basades en activitat que en mimetitzin la seqüència peptídica i permetin identificar les proteases d'interès.

Per a l'assoliment d'aquest objectiu general s'ha establert una sèrie d'objectius concrets que s'indiquen a continuació:

1. Posar a punt la metodologia per a la identificació de proteases de teixits neuroendocrins mitjançant tècniques de proteòmica basada en activitat.
 - a) Dissenyar i sintetitzar sondes basades en activitat amb un grup reactiu de tipus aldehyd que permetin la identificació de proteases d'interès.
 - b) Utilitzar les sondes basades en activitat dissenyades per a aïllar i identificar una proteïna model de tipus serina proteasa a partir d'extractes de cervell.
2. Explorar el proteoma de cervell i glàndula pituïtària mitjançant tècniques de proteòmica basada en activitat per a la identificació de noves proteases.
 - a) Dissenyar i sintetitzar sondes basades en activitat per a la identificació de proteases potencialment implicades en el processament de neuropèptids.

- b) Utilitzar les sondes basades en activitat dissenyades per a aïllar i identificar noves proteases a partir d'extractes de cervell i glàndula pituïtària.

Capítol 3

Resultats i discussió

3.1 Posada a punt de la metodologia

3.1.1 Introducció

En aquest primer apartat de la tesi es pretén desenvolupar i posar a punt una metodologia que permeti el marcatge, la purificació i la identificació de proteïnes de tipus proteasa a partir teixits neuroendocrins. Per aquesta aplicació es dissenyaran i sintetitzaran sondes basades en activitat que incorporin un grup reactiu d'ampli espectre de manera que la identificació de les proteases es realitzi amb independència de la seva classe enzimàtica, tal i com s'ha fet anteriorment amb els ésters de sulfonats [53, 39] i les α -cloracetamides [43].

Inicialment, la metodologia es posarà a punt amb una proteïna serina proteasa model, la prolil oligopeptidasa (POP). Aquesta proteïna s'ha escollit entre les diverses proteases conegudes per la seva possible implicació en l'alteració dels nivells de determinats neuropèptids i la seva relació amb certes neuropaties com l'esquizofrènia i el transtorn bipolar. Així mateix, aquesta proteïna ha estat àmpliament estudiada al grup d'investigació tant per a la cerca de nous inhibidors com per a l'elucidació del mecanisme d'acció [224, 225, 226, 227]. Aquestes característiques, juntament amb la disponibilitat de l'estructura tridimensional [181], d'inhibidors específics com el Z-Pro-Pro-H [192] i de les eines moleculars necessàries per a la seva expressió en sistemes recombinants [228], converteixen la POP en una bona proteïna model per a ser utilitzada per la posada a punt de la metodologia.

Per acomplir aquest objectiu es pretén sintetitzar sondes de tipus aldehid immobilitzades en suports sòlids, com partícules magnètiques o resines polimèriques, o marcades amb etiquetes de revelat que facilitin la purificació i la identificació de les proteïnes d'interès. Aquestes sondes incorporaran seqüències peptídiques per afavorir-ne la selectivitat i han de servir per aïllar

i identificar la POP, de forma específica i depenent d'activitat, directament d'extractes de cervell.

3.1.2 Sondes de tipus aldehyd

Introducció als inhibidors de tipus aldehyd

Els pèptids amb una funció aldehyd a l'extrem C_{ter} presenten interessants propietats inhibidores vers nombrosos enzims proteolítics [229]. En els últims anys, s'han descrit diversos inhibidors de tipus aldehyd, covalents i reversibles, per a proteïnes serina proteasa com la tripsina, la trombina i les convertases de prohormones [230, 231], així com per a diverses proteïnes cisteïna proteasa [232] com la cathepsina B [233], la cathepsina L [234, 235], la calpaïna [236, 237] i la papaïna [238]. De fet, des del descobriment de la leupeptina [239], un producte natural de tipus aldehyd que actua com a potent inhibidor de la tripsina, s'han descrit nombrosos enzims inhibits per aquests compostos. Així, a part de les proteïnes serina i cisteïna proteasa, també s'ha descrit la inhibició, per part de pèptids aldehyd, de proteïnes metal·loproteasa [240] i aspàrtic proteasa com la γ -secretasa, la proteasa del VIH [241] i la renina [242], però també d'algunes proteïnes no proteolítiques com la tirosina fosfatasa [243, 244] i els dominis SH2 [245].

En el cas de les proteïnes serina i cisteïna proteasa, els pèptids aldehyd formen un hemiacetal i un tiohemiacetal, respectivament, amb els residus de serina i cisteïna del centre actiu [246, 247, 248, 249]. En canvi, en les proteïnes metal·loproteasa i aspàrtic proteasa, l'aldehyd reacciona amb una molècula d'aigua i, un cop hidratat, interacciona amb l'àtom de zinc o amb els residus d'àcid aspàrtic presents al centre actiu (veure figura 3.1) [240, 241].

Tot i l'aparent falta de selectivitat dels compostos de tipus aldehyd a causa de la seva àmplia reactivitat, diversos estudis han aconseguit dirigir aquests inhibidors a determinats tipus enzimàtics. La millora de la selectivitat s'ha aconseguit mitjançant la síntesi de pèptids aldehyd i la modificació dels aminoàcids en posició P1 i P2 basant-se en l'estructura dels substrats naturals de cada enzim [250, 233, 237, 251].

En aquesta tesi, s'ha considerat la possibilitat d'incorporar els aldehyds com a grup reactiu de les sondes dissenyades per a l'exploració de les proteïnes processadores dels neuropèptids. La utilització dels aldehyds facilitaria l'exploració d'aquestes proteïnes amb independència de la seva classe enzimàtica, alhora que es podria modular la seva selectivitat mitjançant les seqüències aminoacídiques. D'aquesta manera, les sondes estarien formades per una seqüència aminoacídica, basada en els substrats naturals, i un grup aldehyd que permetria aïllar i identificar les proteïnes proteolítiques que les processen.

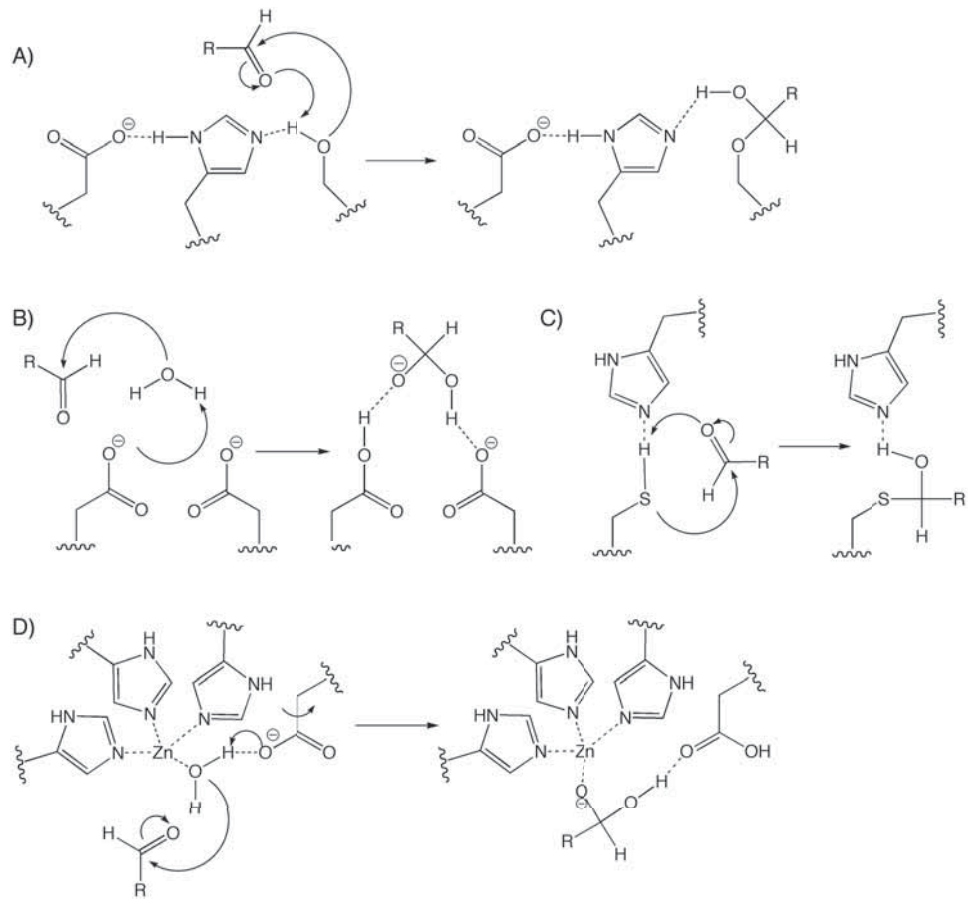


Figura 3.1: Mecanisme d'inhibició dels compostos aldehyds en A) proteïnes serina proteasa, B) proteïnes aspàrtic proteasa, C) proteïnes cisteïna proteasa, i D) metal·loproteasa.

A part de la reactivitat i la selectivitat, els aldehids presenten altres característiques que els fan atractius com a grup reactiu. Com ja s'ha comentat anteriorment, la capacitat inhibidora dels aldehids es basa en la formació d'un intermediari tetraèdric i, per tant, el seu mecanisme d'inhibició és dependent d'activitat. Aquesta característica permet la utilització dels aldehids per al desenvolupament de sondes basades en activitat que distingeixen les formes enzimàtiques actives de les formes inactives.

Així mateix, els aldehids constitueixen un grup funcional estèricament molt similar als carbonils dels grups amida presents als substrats naturals de manera que minimitzen els impediments estèrics i les interaccions no covalents entre la sonda i la proteïna. A més, la incorporació d'un grup aldehyd permet la síntesi de sondes en fase sòlida de forma similar a com ja han fet Kato *et al.* en la síntesi de sondes aciloximetilcetona emprades en l'estudi de les proteïnes cisteïna proteasa [47]. L'adaptació de la síntesi de sondes en fase sòlida en facilita l'obtenció i, alhora, obre les portes a la síntesi de biblioteques per obtenir sondes amb múltiples combinacions aminoacídiques [43, 252].

Malgrat que la síntesi d'aldehids en fase sòlida no està completament resolta i que s'han descrit alguns fenòmens d'epimerització [253], actualment existeixen suficients estratègies per fer front a la síntesi de pràcticament qualsevol seqüència [254, 255, 256]. En els últims anys, s'ha descrit la síntesi en fase sòlida dels derivats de tipus aldehyd de diversos residus aminoacídics, incloent-hi Asp [257], Ala, Phe i Trp [258, 259], entre d'altres, de manera que l'adopció d'un grup aldehyd, no ha de suposar, *a priori*, cap problema per a la síntesi de les sondes.

Disseny de les sondes de tipus aldehyd

La proteïna prolil oligopeptidasa (POP) és una proteïna serina proteasa que hidrolitza pèptids de fins a 30 aminoàcids en seqüències Pro-↓X. Entre els nombrosos inhibidors descrits per a aquesta proteïna, el Z-Pro-Pro-H [192] és un inhibidor basat en la seqüència dels substrats naturals i ha estat utilitzat com a punt de partida per al disseny de les sondes de tipus aldehyd.

S'han plantejat dues estratègies principals per a l'aïllament i detecció de la POP amb les sondes de tipus aldehyd, que consisteixen, per una banda, en la immobilització dels inhibidors en suports sòlids, i per l'altra, en el marcatge dels inhibidors amb biotina (veure figura 3.2).

En el primer cas, es pretén unir els inhibidors en un suport sòlid de manera que es pugui aïllar fàcilment la proteïna d'interès a partir d'una mescla complexa per filtrat o sedimentació. Aquesta aproximació és similar a diversos exemples descrits a la bibliografia com la immobilització de sondes per a la purificació de catepsines [260], per al seguiment de l'activitat de

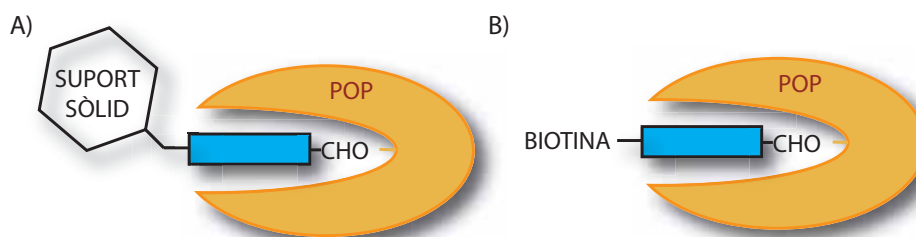


Figura 3.2: Disseny de les sondes de tipus aldehyd. A) Immobilització de les sondes de tipus aldehyd en suport sòlid, B) Marcatge de les sondes de tipus aldehyd amb una etiqueta de biotina.

metal·loproteases [78, 79], per a l'eliminació de quimotripsina [80] o per a la purificació de l'acetilcolinesterasa [82]. En aquesta estratègia cal que els inhibidors dissenyats siguin suficientment llargs per permetre a l'aldehyd interaccionar amb el centre actiu de la proteïna. D'aquesta manera, per evitar impediments estèrics entre el suport sòlid i la proteïna, els inhibidors de tipus Z-Pro-Pro-H s'han allargat amb residus d'àcid ϵ -aminohexanoic. La disponibilitat de l'estructura tridimensional de la POP [181, 228] ha permès calcular la distància entre el centre actiu i l'obertura principal de la proteïna, i determinar que són necessaris fins a cinc residus d'àcid ϵ -aminohexanoic per assolir el centre actiu. Amb aquestes dades, s'ha dissenyat l'inhibidor H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H (**2**) que incorpora els cinc residus d'àcid ϵ -aminohexanoic com a espaiador i els residus Pro-Pro-H en concordança amb l'inhibidor Z-Pro-Pro-H. Tanmateix, la presència dels residus d'àcid ϵ -aminohexanoic podria provocar la formació d'agregats a causa del seu fort caràcter hidrofòbic i, per evitar-ho, s'ha decidit dissenyar un inhibidor addicional, el H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H (**4**), que incorpora un residu d'arginina, de caràcter hidrofílic, enmig de l'espaiador. A part d'aquests dos inhibidors, s'han dissenyat les corresponents versions àcides H-(Ahx)₅-Pro-Pro-OH (**1**) i H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-OH (**3**) que es pretenen utilitzar com a controls negatius en els assajos d'immobilització i aïllament de la POP (veure figura 3.3). La utilització dels compostos àcids com a controls negatius es basa en la incapacitat d'aquestes molècules d'establir enllaços covalents permanents amb l'enzim de manera que la immobilització de la proteïna diana per part d'aquests inhibidors hauria de ser pràcticament nula.

Per altra banda, s'ha dissenyat una segona estratègia basada en el marcatge dels inhibidors amb biotina per eliminar possibles impediments estèrics entre les proteïnes i el suport sòlid. En aquesta estratègia s'han dissenyat inhibidors basats en els compostos anteriors, però substituint la immobilització en un suport sòlid, per la incorporació d'una etiqueta de biotina. A diferència de l'estratègia anterior, el reconeixement de la proteïna es realitza amb

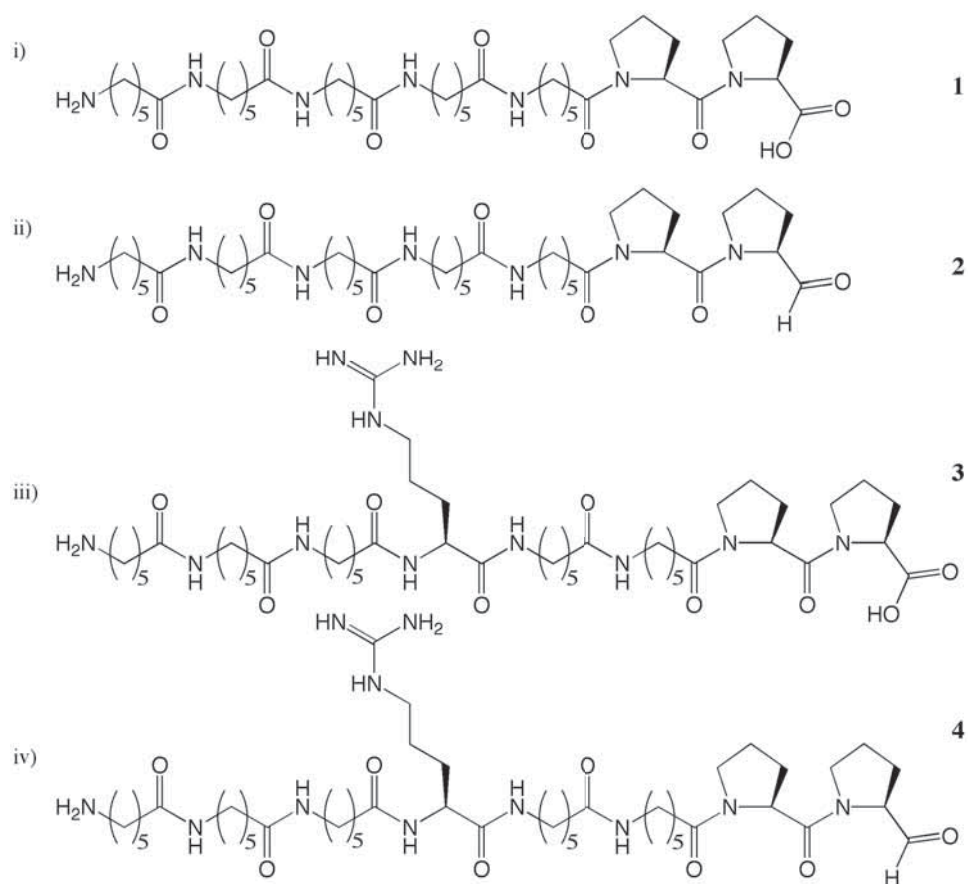


Figura 3.3: Estructura dels inhibidors de tipus aldehyd dissenyats per a ser immobilitzats en un suport sòlid. i) H-(Ahx)₅-Pro-Pro-OH (**1**), ii) H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H (**2**), iii) H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-OH (**3**) i iv) H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H (**4**).

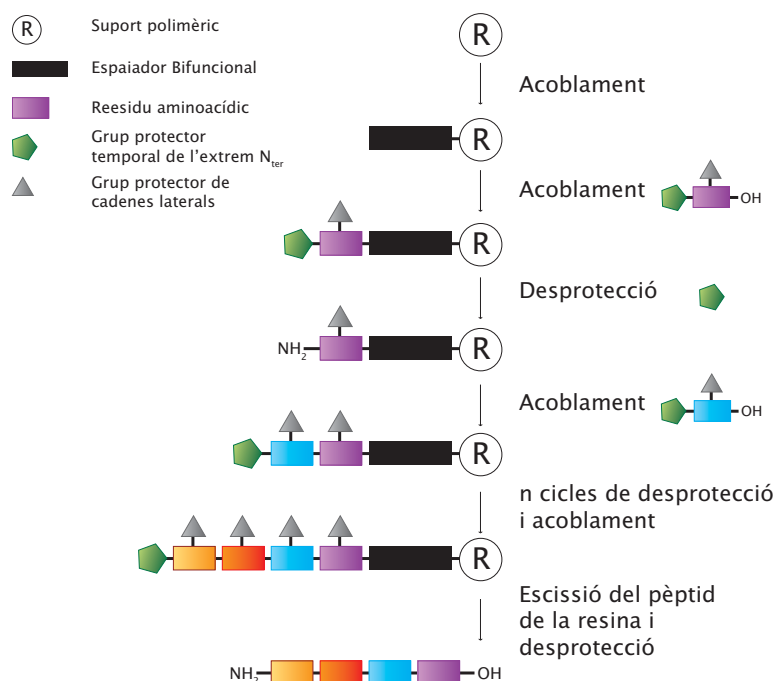


Figura 3.4: Esquema general de la síntesi de pèptids en fase sòlida. La síntesi de pèptids en fase sòlida, desenvolupada per Merrifield l'any 1963 [261], és una de les estratègies actualment més habituals per a l'obtenció de pèptids. Aquesta estratègia consisteix en l'acoblament per l'extrem C_{ter} d'un residu aminoacídic—amb la cadena lateral i l'extrem N_{ter} protegits—a un suport sòlid, seguit per la desprotecció de l'extrem N_{ter} i l'acoblament del següent residu aminoacídic. La repetició d'aquest cicle de successives etapes de desprotecció i acoblament permet l'elongació del pèptid des de l'extrem C_{ter} a l'extrem N_{ter} [262].

l'inhibidor lliure de manera que la interacció entre l'inhibidor i la proteïna es veu alliberada dels possibles impediments estèrics amb el suport sòlid. Posteriorment, el complex inhibidor – proteïna es pot detectar amb avidina o es pot aïllar per interacció amb avidina immobilitzada.

Síntesi dels inhibidors de tipus aldehid

La síntesi dels compostos 1–4 (veure figura 3.3) s'ha realitzat mitjançant una estratègia Fmoc/ t Bu de síntesi de pèptids en fase sòlida (veure figura 3.4).

Inicialment, el Fmoc-Pro-H (6) necessari per a la síntesi dels compostos H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H i H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H s'ha obtingut a partir de Fmoc-Pro-OH comercial en un procés de reducció i oxidació realitzat en

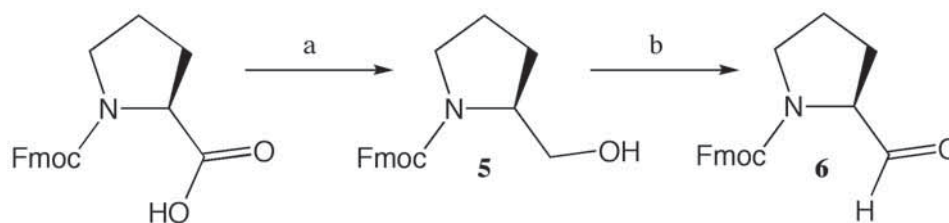


Figura 3.5: Esquema de la reacció de conversió de Fmoc-Pro-OH a Fmoc-Pro-H. a) 1,2 eq NMF, 1,2 IBCF, 50 min, de -78°C a 0°C ; b) 2,2 eq NaBH_4 , 2h, -78°C ; THF anhidre.

dues etapes (veure figura 3.5). En la primera etapa, la Fmoc-Pro-OH s'ha activat amb NMF i IBCF i s'ha reduït amb NaBH_4 per obtenir Fmoc-Prolinol (**5**) amb un rendiment mitjà del 83 %, mentre que en la segona etapa s'ha dut a terme la conversió de Fmoc-prolinol a Fmoc-Pro-H mitjançant una oxidació de Swern, amb un rendiment mitjà del 76 %.

Per a la síntesi dels compostos àcids **1** i **3** s'ha utilitzat una resina clorur de 2-clorotritil que ha estat escollida per evitar la formació de dicetopiperazines durant la síntesi peptídica [263]. En canvi, els compostos aldehids **2** i **4** s'han sintetitzat en una resina aminometil comercial funcionalitzada amb un grup semicarbazida per a l'ocasió, basant-se en el bon rendiment demostrat per aquestes resines en la síntesi de pèptids aldehid [264, 265].

Quant a la formació de dicetopiperazines, cal destacar que els pèptids **1**–**4** presenten, tots ells, la seqüència Pro-Pro a l'extrem C_{ter} que sovint s'ha posat com a exemple de seqüència particularment complicada per l'extensa formació de dicetopiperazines [262] (veure figura 3.6). La síntesi dels compostos **1** i **3** amb la resina de tipus clorur de 2-clorotritil [263] no ha comportat cap disminució significativa del rendiment relacionada amb la formació de dicetopiperazines. En canvi, la síntesi dels compostos aldehids **2** i **4** en resina semicarbazida va presentar, inicialment, serioses complicacions, donant lloc a rendiments no superiors al 2 %. En aquests casos, per comprovar si les complicacions sintètiques es derivaven de la formació de dicetopiperazines, es va decidir incorporar el segon i el tercer residu com un dipèptid protegit i evitar així un dels passos crítics en la formació d'aquests compostos lactàmics. La síntesi i posterior utilització del precursor Fmoc-Ahx-Pro-OH en l'obtenció dels compostos aldehids en resina semicarbazida ha millorat qualitativament els rendiments de síntesi, situant-se al 22 % per al compost **2** i al 15 % per al compost **4**. Aquests resultats semblen indicar que els baixos rendiments obtinguts en síntesis prèvies es devien, efectivament, a la formació indesitjada de dicetopiperazines i confirmen l'adequació d'utilitzar l'intermediari Fmoc-Ahx-Pro-OH en la síntesi dels compostos aldehids.

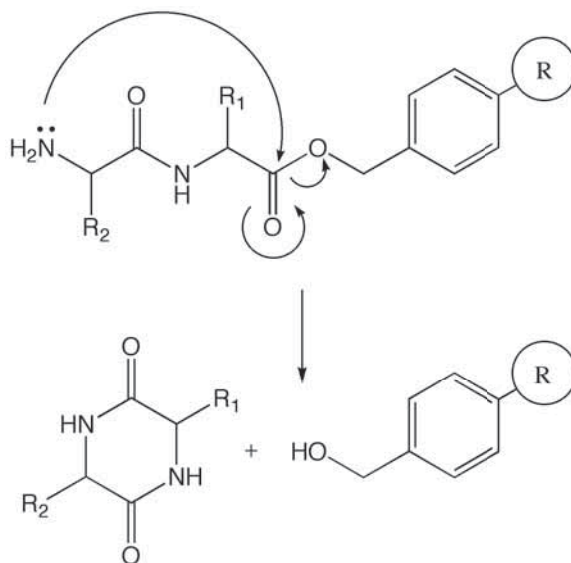


Figura 3.6: Esquema de formació de dicetopiperazines per reaccions secundàries de ciclació durant la síntesi en fase sòlida. Les dicetopiperazines són dipèptids cíclics resultat de l'establiment d'enllaços peptídics entre dos aminoàcids per a la formació d'una amida cíclica. La formació de dicetopiperazines és una reacció secundària freqüent en la síntesi de pèptids en fase sòlida que es produeix especialment durant la desprotecció del grup protector de l'extrem N_{ter} del segon aminoàcid. En aquests casos, el grup amino N_{ter} pot atacar al grup carboxil de l'extrem C_{ter} en una reacció intramolecular catalitzada per bases donant lloc a les dicetopiperazines. La formació d'aquests compostos lactàmics està afavorida cinèticament i termodinàmica i provoca l'escissió del pèptid amb la consegüent pèrdua de rendiment. A més, la presència, en primera o segona posició, d'aminoàcids que adopten conformacions *E* amb facilitat, com la glicina o la prolina, faciliten enormement aquesta reacció secundària [262].

Paral·lelament a la síntesi en resina semicarbazida, els compostos aldehid **2** i **4** es van intentar obtenir amb major rendiment i puresa per aproximacions alternatives descrites a la bibliografia, entre les quals cal destacar la síntesi en resina Weinreb [266, 267] i la conversió de pèptids alcohol a pèptids aldehid amb el reactiu de Dess-Martin [268].

En la primera aproximació es va procedir a la síntesi del compost **2** (H-Ahx₅-Pro-Pro-H) en resina Weinreb mitjançant un protocol estàndard de síntesi en fase sòlida seguit de l'escissió del pèptid aldehid per tractament de la resina amb LiAlH₄. L'anàlisi del cru (63 %) per espectrometria de masses (MALDI-TOF) va evidenciar la presència d'un ió majoritari amb $m/z = 665,51$ (m/z esperada de C₄₀H₇₁N₇O₇ + H⁺ = 762,64) corresponent al pèptid aldehid H-Ahx₅-Pro-H. L'aparició d'aquesta delectió, juntament amb el fet de no observar una millora qualitativa de la puresa i el rendiment, va fer desistir la síntesi d'aldehids per aquesta via.

Per altra banda, es va intentar una segona aproximació basada en la conversió de pèptids alcohol a pèptids aldehid amb el reactiu de Dess-Martin. Inicialment, en aquesta segona estratègia es va sintetitzar el H-Ahx₃-Arg(Pbf)-Ahx₂-Pro-Prolinol en resina de tipus clorur de 2-clorotritil obtenint el producte amb alt rendiment (53 %) i elevada puresa (HPLC, > 95%) per un procediment estàndard de síntesi de pèptids en fase sòlida. Posteriorment, aquest producte es va oxidar amb el reactiu de Dess-Martin en reaccions de 1, 2 i 16 h en les quals es va observar una formació progressiva del pèptid aldehid. Tanmateix, les reaccions no van ser completes i en tots els casos es va detectar producte de partida en el cru de reacció. L'anàlisi del cru de reacció per cromatografia en fase reversa va evidenciar un perfil cromatogràfic complex al voltant del producte aldehid d'interès (veure figura 3.7, apartat B) que es va intentar purificar amb una resina treonil aminometílica preparada per a l'ocasió. La resina treonil aminometílica, descrita per Sorg et al. [269], té la propietat de segrestar selectivament els compostos de tipus aldehid de manera que permet, teòricament, la purificació d'aquest tipus de compost a partir de mescles complexes o crus de reacció no purificats. Tot i això, la utilització d'aquesta resina en el cru de reacció obtingut amb el reactiu de Dess-Martin no va permetre simplificar la complexitat cromatogràfica i millorar, així, la puresa del producte d'interès. Els baixos rendiments—inclús amb temps de reacció llargs—obtinguts en la conversió del pèptid alcohol al pèptid aldehid, així com la complexitat cromatogràfica del cru de reacció, van propiciar l'abandonament d'aquesta estratègia en favor de la síntesi d'aldehids en resina semicarbazida.

Un cop sintetitzats els compostos **1–4** en les resines clorur de 2-clorotritil i semicarbazida, s'han escindit amb mescles de TFA i H₂O a diferents percentatges, però a diferència de les mescles d'escissió habituals, s'ha prescindit

del TIS perquè redueix el grup aldehid a alcohol, tal i com s'ha comprovat per espectrometria de masses MALDI-TOF (no es mostren els resultats). Els productes d'escissió s'han purificat per cromatografia en un aparell HPLC semipreparatiu per obtenir els compostos purs ($> 90\%$, HPLC) i amb rendiments elevats: 35% , **1**; 22% , **2**; 28% , **3** i 15% **4** (veure figura 3.7).

Assajos d'inhibició amb els inhibidors de tipus aldehid no immobilitzats

Els assajos d'inhibició realitzats amb POP recombinant humana (hrPOP) han permès calcular els valors de IC_{50} per als compostos sintetitzats (veure figura 3.8). Els resultats d'aquests assajos han permès determinar una $IC_{50} = 12$ ($R^2 = 0,99$) per al compost **2** i una $IC_{50} = 1,1$ nM ($R^2 = 0,97$) per al compost **4**, de manera que ambdós compostos aldehids són excel·lents inhibidors per a la POP. En canvi, els derivats àcids o bé no presenten activitat inhibidora com és el cas del compost **1** o bé presenten valors de IC_{50} molt més elevats ($IC_{50} = 370$ nM per al compost **3**, $R^2 = 0,99$). Respecte aquest últim compost, cal comentar que el valor de la IC_{50} és sorprenentment baix. Aquesta observació es podria justificar si es considera que el compost **3** pot tractar-se d'un inhibidor no covalent que competeixi amb el substrat de l'assaig d'inhibició. En qualsevol cas, aquest compost continuaria sent un bon control negatiu perquè no formaria cap enllaç permanent amb l'enzim.

Immobilització en suport sòlid dels inhibidors de tipus aldehid

Inicialment, es va considerar oportú utilitzar suports sòlids de tipus magnètic per a la immobilització dels inhibidors sintetitzats, a causa de la compatibilitat d'aquests materials amb medis aquosos, la seva disponibilitat comercial i el bon rendiment demostrat en l'aïllament, purificació i fraccionament de mostres biològiques [270, 271].

L'anclatge dels pèptids en aquest material s'ha realitzat un cop activats els grups carboxílics del suport sòlid [272] i, posteriorment, es van tractar les mostres amb etanolamina per bloquejar les posicions encara actives.

Un cop immobilitzats els inhibidors, i com a prova de concepte, s'han utilitzat per immobilitzar hrPOP pura i detectar-la amb tècniques d'espectrometria de masses i d'immunodetecció per transferència de Western. Aquests experiments s'han realitzat incubant hrPOP amb les partícules magnètiques carregades d'inhibidor immobilitzat i rentant amb PBST per eliminar les unions inespecífiques. En el cas de la detecció per espectrometria de masses, l'elució de la proteïna del suport sòlid s'ha realitzat per digestió trípica directa sobre les partícules magnètiques. En canvi, per a la immunodetecció s'ha practicat una elució per desplaçament amb un gran excés de l'inhibidor

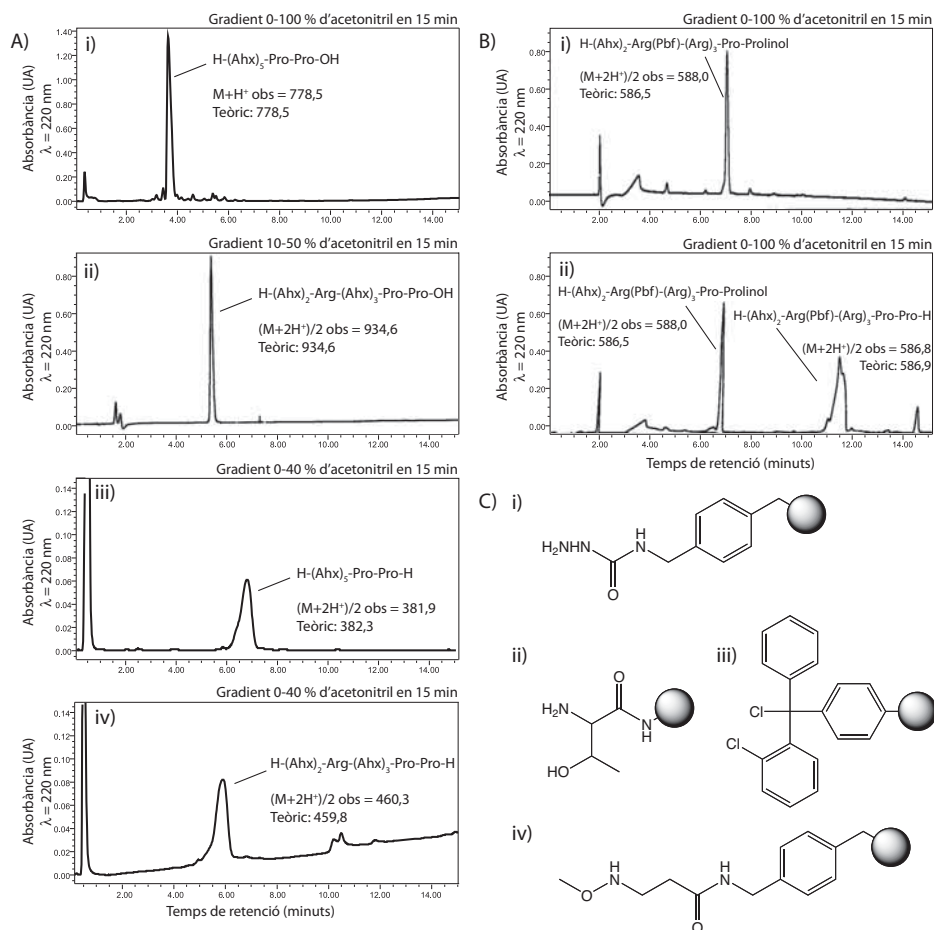


Figura 3.7: Cromatogrames de HPLC de la síntesi de sondes aldehyd i estructura de les resines utilitzades en síntesi en fase sòlida. A) Cromatogrames de HPLC dels productes purs i) H-(Ahx)₅-Pro-Pro-OH (**1**), ii) H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-OH (**3**), iii) H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H (**2**) i iv) H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H (**4**). Columna C8, X-Terra 3,5 μ m, 2,1 x 50 mm B) Cromatogrames de la síntesi de H-(Ahx)₃-Arg(Pbf)-(Ahx)₂-Pro-Prolinol (i) i de la seva conversió a pèptid aldehyd per oxidació amb el reactiu de Dess-Martin (ii). Columna C8, X-Terra 3,5 μ m, 2,1 x 50 mm C) Estructura de les resines aminometil semicarbazida (i), treonil aminometílica (ii), Clorur de 2-clorotritil (iii), i Weinreb (iv).

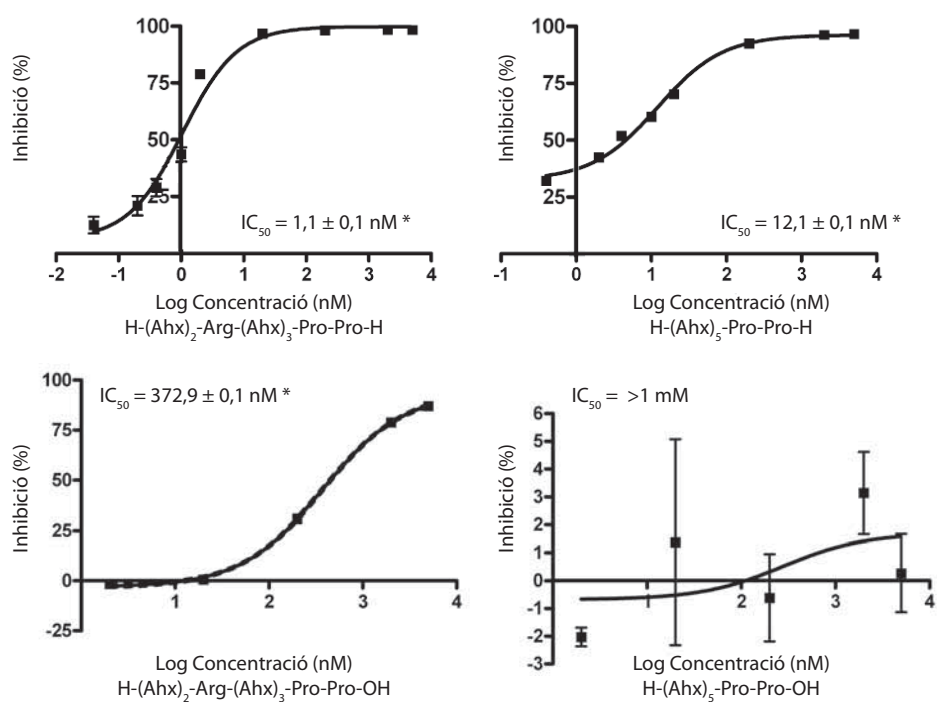


Figura 3.8: Assajos d'inhibició i càlcul de la IC_{50} dels compostos 1–4. Per a la realització dels assajos s'han utilitzat concentracions de 2 nM – 20 μ M per als compostos àcids i de 0,04 nM – 20 μ M per als compostos aldehid.

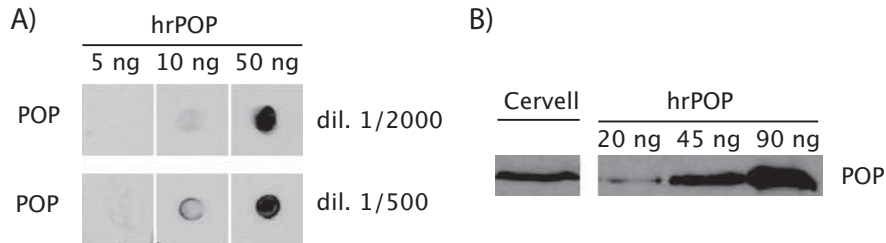


Figura 3.9: Valoració de l'anticòs vers la proteïna prolil oligopeptidasa i detecció de la proteïna endògena en extracte de cervell. A) Determinació de la sensibilitat i de la dilució òptima de l'anticòs per transferència de punts; B) Detecció de la POP endògena en extracte de cervell (5 μ g de proteïnes totals) per transferència de Western.

específic S17092 [194] o per reducció del pH amb àcid cítric, tal i com s'indica a les especificacions comercials. Tanmateix, ni per espectrometria de masses ni per les tècniques d'immunodetecció es va poder detectar la hrPOP de forma específica.

Cal remarcar que la realització dels experiments d'immunodetecció ha requerit el desenvolupament en conill d'un anticòs vers la POP a causa de la falta de disponibilitat comercial d'aquest tipus d'anticòs. La valoració de l'anticòs per transferència de punts ha permès determinar la dilució òptima d'utilització entre 1/500 i 1/2.000, i ha permès acotar la sensibilitat de l'anticòs entre 5 i 10 ng de POP (veure figura 3.9).

Els resultats negatius obtinguts tant per espectrometria de masses com per immunodetecció han plantejat la possibilitat que la unió dels pèptids a un suport sòlid alteri la seva capacitat inhibidora. En aquest sentit, la realització dels assajos d'inhibició amb inhibidors immobilitzats ha evidenciat una elevada variabilitat en les rèpliques que no permet observar diferències estadísticament significatives en el percentatge d'inhibició entre les mostres i el control negatiu (veure figura 3.10, apartat A).

La manca d'inhibició dels pèptids units al suport sòlid pot ser a causa de diversos factors entre els quals cal destacar els problemes estèrics, la ineficiència en la unió dels pèptids al suport sòlid o la reacció d'algun reactiu amb el grup funcional dels pèptids inhibidors.

Per descartar problemes derivats de la inactivació funcional dels aldehyd per part de l'etanolamina, s'han realitzat assajos d'inhibició amb inhibidors lliures pretractats amb aquest compost. L'etanolamina és utilitzada per bloquejar les posicions actives que no han reaccionat durant el procés d'immo-

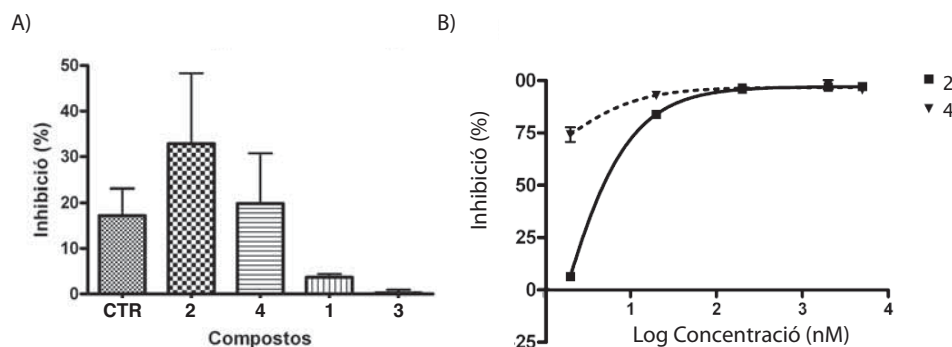


Figura 3.10: Assajos d'inhibició amb partícules magnètiques. A) Assaig d'inhibició amb pèptids immobilitzats en partícules magnètiques. Cada mostra correspon a 6,25 nmol dels compostos 1–4 immobilitzats en suport sòlid. La mostra *CTR* fa referència al control corresponent a les partícules magnètiques activades, però sense pèptid immobilitzat. B) Assaig d'inhibició del compost H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H lliure pretractat amb etanolamina (0,05 M, pH 8, 1 h a 25 °C).

bilització i podria reaccionar i inactivar els grups aldehids. Tanmateix, els resultats mostren que els inhibidors no es veuen afectats qualitativament pel procés d'ancoratge (veure figura 3.10, apartat B).

Per altra banda, la unió dels pèptids al suport sòlid s'ha intentat confirmar, sense èxit, per digestió triptica de l'inhibidor H-(Ahx)₂-Arg-(Ahx)₃-Pro-Pro-OH en forma lliure i immobilitzada. Els resultats negatius d'aquesta estratègia es deuen al fet que, malhauradament, la tripsina no reconeix l'arginina dels inhibidors com a punt de tall. A part de la digestió triptica, s'ha intentat comprovar la unió dels inhibidors per altres mètodes com l'espectrometria de masses directament sobre les partícules magnètiques o l'anàlisi d'aminoàcids. Tot i això, la realització d'aquests assajos directament sobre el suport sòlid donen resultats poc clars i no permeten confirmar que els inhibidors estiguin units correctament a les partícules magnètiques ni descartar que s'hi trobin adsorbits o que, simplement, no s'hi hagin unit.

Per resoldre els problemes plantejats en els assajos amb partícules magnètiques i intentar evitar problemes en la unió dels pèptids al suport sòlid s'ha decidit canviar les partícules magnètiques per un suport com la resina PEGA, el comportament de la qual és ben conegut pel grup d'investigació. En aquest sentit, la resina PEGA (veure figura 3.11, apartat B) és una resina que si bé no presenta la comoditat de les partícules magnètiques, té l'avantatge de ser un suport sòlid de composició ben caracteritzada, àmpliament utilitzat en síntesi de pèptids i compatible tant amb dissolvents orgànics com amb medi aquós [273].

Inicialment, aquesta resina s'ha funcionalitzat amb grups carboxílics mitjançant la reacció amb l'anhidre succínic i s'ha procedit a la immobilització dels inhibidors de forma equivalent al mètode utilitzat per a les partícules magnètiques. Els posteriors assajos d'inhibició amb hrPOP han permès eliminar la variabilitat experimental observada en els assajos anteriors i confirmen la capacitat inhibidora dels compostos **2**, **3** i **4** en estat immobilitzat (veure figura 3.11, apartat A). En aquest experiment s'ha incorporat un control de resina no activada amb inhibidor que en principi, al no estar activada, no hauria d'immobilitzar l'inhibidor. La presència d'aquest control permet descartar que els resultats observats siguin causats per fenòmens d'adsorció de l'inhibidor i confirmen la unió dels inhibidors al suport sòlid. Així mateix, l'experiment permet afirmar que els inhibidors són prou llargs per interaccionar amb el centre actiu de la hrPOP sense que existeixin problemes estèrics entre el suport sòlid i la proteïna diana. Aquests mateixos resultats s'han observat en assajos d'inhibició amb extracte de cervell (veure figura 3.11, apartats C i D).

Un cop confirmada la capacitat inhibidora dels pèptids ancorats a la resina PEGA, aquest complex ha estat utilitzat per intentar immobilitzar la proteïna prolil oligopeptidasa a partir de mostres de hrPOP pura i d'extracte de cervell. El protocol utilitzat per aquests experiments és equivalent a l'utilitzat amb les partícules magnètiques, però de la mateixa manera que en aquella ocasió, qualsevol intent de detecció de la POP, tant per espectrometria de masses com per tècniques d'immunodetecció, ha estat infructuós.

En un primer moment es va pensar en problemes derivats del límit de detecció i el rang dinàmic per explicar aquests resultats negatius, principalment en referència a les mostres de cervell. Tot i això, el fet de no poder immobilitzar la proteïna a partir de mostres de hrPOP pura en quantitats superiors a la POP endògena, fa pensar més aviat en problemes en la interacció entre l'inhibidor i la proteïna. En principi, els assajos d'inhibició han confirmat la correcta interacció entre l'inhibidor i la proteïna de manera que els resultats negatius es podrien deure no tant a problemes estèrics, sinó a problemes en l'estabilitat de la interacció al llarg del temps pel caràcter reversible de l'inhibidor.

Detecció de la proteïna prolil oligopeptidasa per inhibidors biotilats de tipus aldehid

La segona estratègia plantejada per a la detecció de la proteïna prolil oligopeptidasa és la utilització d'inhibidors marcats amb biotina. Com s'ha comentat anteriorment, la utilització d'inhibidors marcats amb biotina permet realitzar el reconeixement de la proteïna amb l'inhibidor lliure de manera que la interacció entre l'inhibidor i la proteïna es veu alliberada dels possi-

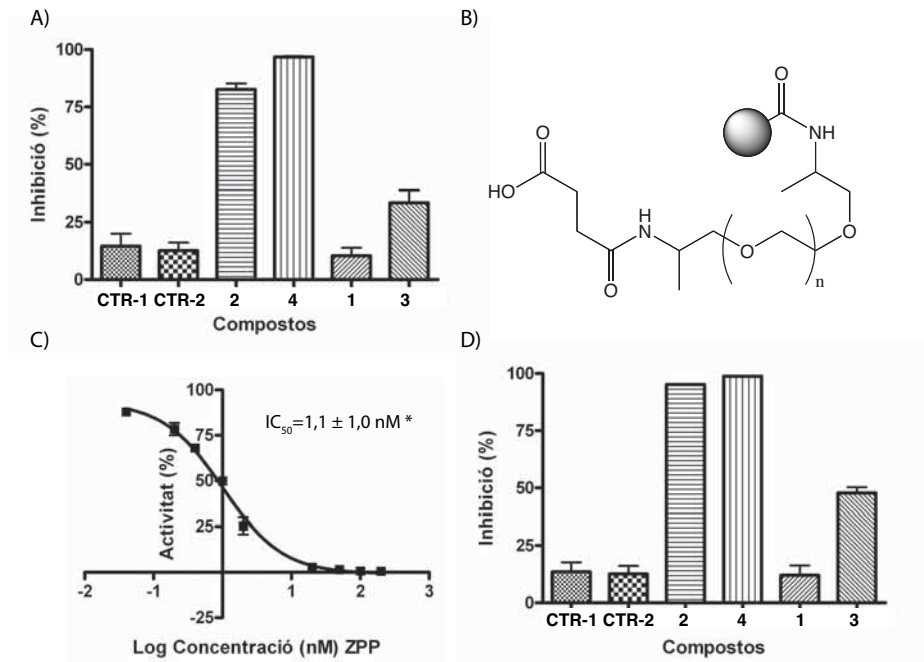


Figura 3.11: Assajos d'inhibició amb resina PEGA. A) Assaig d'inhibició de hrPOP amb pèptids immobilitzats en resina PEGA. Cada mostra correspon a 6,25 nmol dels compostos 1–4 immobilitzats en suport sòlid. La mostra *CTR-1* fa referència al control corresponent a la resina PEGA activada sense pèptid immobilitzat, mentre que la mostra *CTR-2* fa referència al control corresponent a la resina PEGA no activada tractada amb el compost 4. B) Estructura de la resina PEGA. C) Assaig d'activitat per comprovar l'activitat de l'extracte de cervell inhibible per Z-Pro-Pro-H, un inhibidor específic de la POP. Aquest assaig permet observar la presència d'activitat de la POP en l'extracte abans de realitzar altres assajos. D) Assaig d'inhibició en extracte de cervell amb pèptids immobilitzats en resina PEGA. Cada mostra correspon a 6,25 nmol dels compostos 1–4 immobilitzats en suport sòlid. La mostra *CTR-1* fa referència al control corresponent a la resina PEGA activada sense pèptid immobilitzat, mentre que la mostra *CTR-2* fa referència al control corresponent a la resina PEGA no activada tractada amb el compost 4.

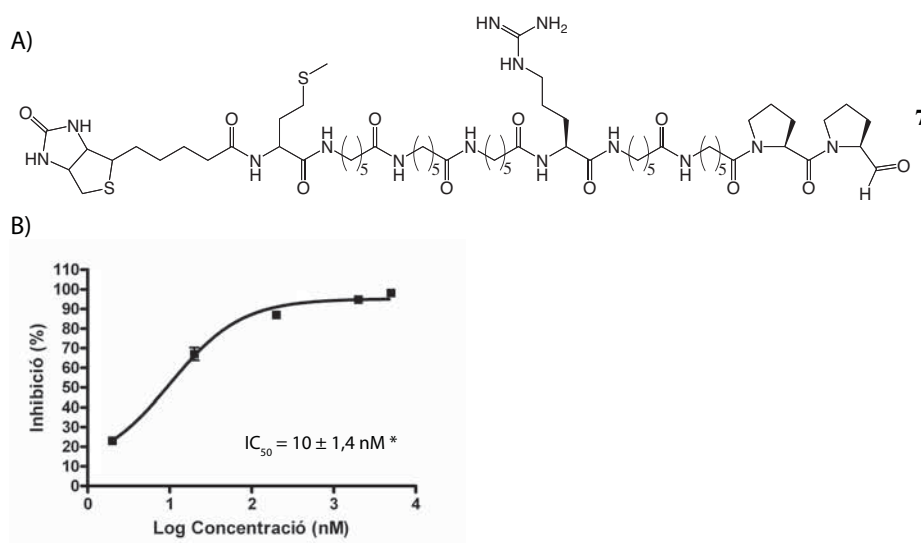


Figura 3.12: Estructura (A) i càlcul de la IC_{50} (B) del nou inhibidor biotinitat (compost 7).

bles impediments estèrics amb el suport sòlid. Un cop marcada la proteïna amb l'inhibidor biotinitat, el complex inhibidor – proteïna es pot detectar amb estreptavidina per transferència de Western o es pot aïllar per interacció amb estreptavidina immobilitzada.

Per dur a terme aquesta segona estratègia s'ha sintetitzat un nou inhibidor biotinitat (7) basat en el compost 4 (veure figura 3.12, apartat A). Aquest nou pèptid aldehyd s'ha obtingut per síntesi en fase sòlida en resina semicarbazida i conserva les propietats inhibidores dels compostos anteriors, amb una $IC_{50} = 10 \text{ nM}$ ($R^2 = 0,99$) (veure figura 3.12, apartat B). A més, aquest compost inclou un residu de metionina introduït per disposar d'un punt de tall amb BrCN que permeti, si es desitja, escindir-lo de la resina. En aquest sentit, aquesta metionina tindria una funció equivalent a la que s'havia previst inicialment per a la arginina si la tripsina la reconeixés correctament.

El marcatge de hrPOP amb l'inhibidor biotinitat ha permès la correcta visualització de la POP per transferència de Western amb estreptavidina (veure figura 3.13, apartat A (i)). Aquest mateix experiment s'ha repetit amb extracte de cervell per a la detecció de la POP endògena en una mescla complexa. En aquest cas, però, s'ha observat la presència d'una banda inespecífica de pes molecular similar a aquesta proteïna que impedeix la visualització de la POP (veure figura 3.13, apartat A (ii)). Per eliminar les proteïnes de l'extracte que interaccionen amb l'estreptavidina, s'ha passat l'homogenat de cervell, i hrPOP pura com a control, per una columna d'estreptavidina immobilitzada i, a continuació, s'ha marcat el proteoma amb l'inhibidor bi-

otinilat. La realització d'aquest experiment en presència de detergent en el tampó d'equilibrat i elució de la columna permet observar l'inhibidor lliure, però no el complex entre la proteïna i l'inhibidor biotinilat (veure figura 3.13, apartat B (i)). En canvi, en absència de detergent és possible detectar el complex proteïna – inhibidor biotinilat en les mostres de hrPOP pura (veure figura 3.13, apartat B (ii)), fet que suggereix que la presència de detergent pot malmetre la interacció entre l'inhibidor i la proteïna. Finalment, cal comentar que tot i el resultat positiu amb hrPOP pura en els experiments sense detergent, el complex proteïna – inhibidor no s'ha pogut detectar en les mostres d'extracte de cervell (veure figura 3.13, apartat B (ii)). Aquest resultat es pot atribuir probablement a la dilució de la mostra en la realització de la columna de manera que caldrà buscar solucions alternatives per augmentar la sensibilitat (per exemple, amb l'ús d'etiquetes fluorescents) o intentar concentrar la mostra.

Realitzats els experiments de marcatge directe, s'ha treballat amb mostres de hrPOP pura per immobilitzar el complex proteïna – inhibidor biotinilat mitjançant la utilització de partícules magnètiques recobertes d'estreptavidina. Aquesta immobilització ha de permetre aïllar i caracteritzar la proteïna de forma equivalent a com es pretén fer més endavant amb proteïnes desconegudes de l'extracte de cervell.

Per dur a terme la immobilització del complex proteïna – inhibidor s'ha fet una cerca de diferents condicions que inclouen variacions en la quantitat de proteïna (0,5 μg i 5 μg), la quantitat d'inhibidor (25 nmol i 25 pmol) i la presència de SDS (0,0 % i 1,0 %). L'anàlisi per tècniques d'immunodetecció de la proteïna immobilitzada al suport sòlid només permet detectar la hrPOP en les condicions de 5 μg de proteïna inicial, 25 nmol d'inhibidor i absència de SDS (veure figura 3.13, apartat C (i)).

Cal tenir en compte que la inclusió d'un petit percentatge de detergent durant la immobilització i els rentats posteriors té com a finalitat minimitzar les unions inespecífiques. D'aquesta manera, tot i els resultats negatius obtinguts en experiments anteriors, s'ha insistit en intentar trobar la concentració òptima de detergent que permeti obtenir resultats positius i alhora minimitzar les interaccions inespecífiques. No obstant això, al repetir l'experiment d'immobilització amb 5 μg de proteïna inicial, 25 nmol d'inhibidor i un gradient de SDS (0,0 – 0,5 %) (veure figura 3.13, apartat C (ii)) s'han obtingut els mateixos resultats però s'ha observat la presència de hrPOP immobilitzada inclús en absència d'inhibidor. Aquest resultat s'ha confirmat amb la realització d'un experiment d'immobilització de hrPOP inactivada per temperatura que hauria d'evitar la interacció de la proteïna amb el pèptid biotinilat. Tanmateix, la immobilització de hrPOP inactivada demostra l'existència d'importants interaccions inespecífiques de la proteïna amb el su-

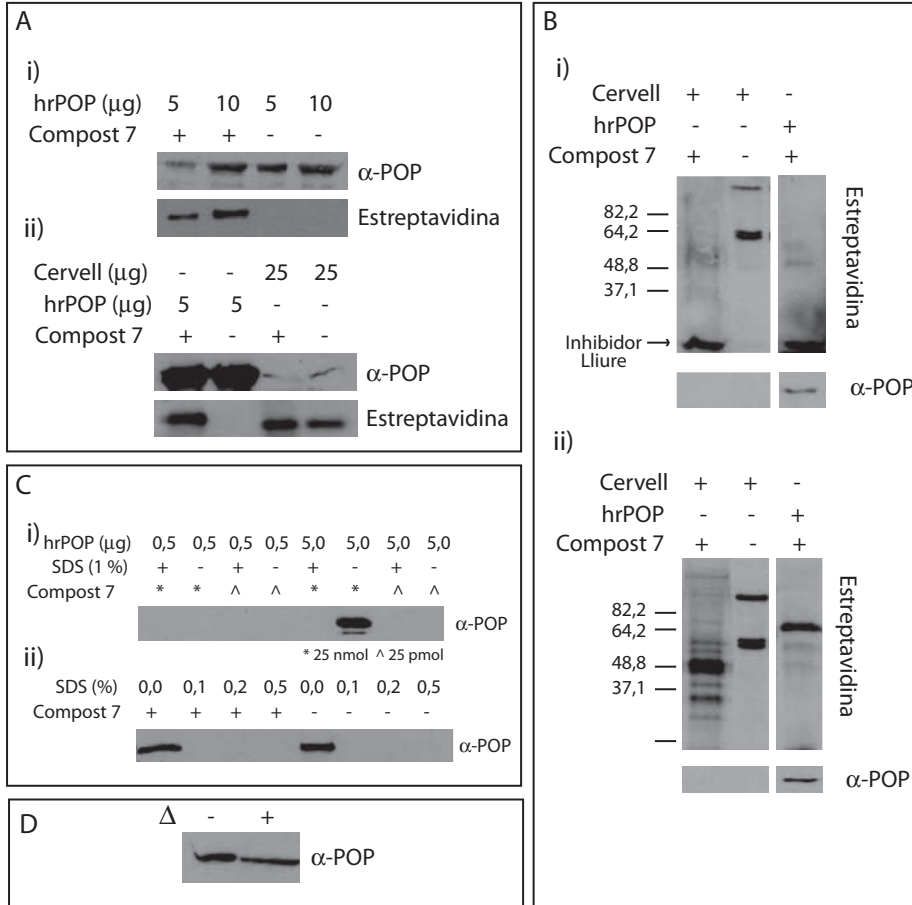


Figura 3.13: Marcatge de la proteïna prolil oligopeptidasa amb inhibidors de tipus aldehid biotinilats i detecció del complex proteïna – inhibidor amb estreptavidina i l'anticòs α -POP. A) Marcatge directe de hrPOP (i) i de POP endògena d'extracte de cervell (ii) amb l'inhibidor biotinilat **7**. B) Marcatge directe de POP endògena després d'eliminar les proteïnes de l'extracte de cervell que reaccionen amb l'estreptavidina amb una columna amb estreptavidina immobilitzada en presència (i) i absència (ii) de detergent. C) i) Exploració de diverses condicions (quantitat d'inhibidor, quantitat de hrPOP i presència de detergent) per a l'assaig d'immobilització del complex proteïna – inhibidor biotinilat; ii) Assaig d'immobilització del complex proteïna – inhibidor biotinilat amb $5 \mu\text{g}$ de hrPOP i un gradient de SDS (0,0 – 0,5 %) en presència (25 nmol) i absència d'inhibidor biotinilat. D) Assaig d'immobilització del complex proteïna – inhibidor biotinilat amb hrPOP activa ($5 \mu\text{g}$) i hrPOP ($5 \mu\text{g}$) inactivada per temperatura. En tots els casos la detecció de la POP s'ha realitzat amb estreptavidina o amb l'anticòs α -POP.

port sòlid que impedeixen diferenciar la detecció específica de la inespecífica (veure figura 3.13, apartat D).

Amb els resultats obtinguts, es pot concloure que en condicions suaus—absència de SDS—no s’eliminen correctament les interaccions inespecífiques i apareixen nombrosos falsos positius. En canvi, en condicions restrictives—presència de SDS—no és possible immobilitzar el complex hrPOP – inhibidor biotinitat. Segons aquests resultats, la presència de SDS en els experiments d’immobilització malmet la unió entre la POP i l’aldehid impedit-ne la seva detecció.

La detecció de hrPOP per electroforesi desnaturalitzant en els assajos de marcatge directe (veure figura 3.13, apartat A) es pot explicar considerant que un petit percentatge del complex hrPOP – inhibidor biotinitat roman intacte. Aquesta explicació concorda amb el fet d’haver d’utilitzar una elevada quantitat de hrPOP en aquests experiments (5 μg) per poder detectar la proteïna correctament. En canvi, en els experiments d’immobilització els rentats repetitius amb SDS per a l’eliminació de les interaccions inespecífiques farien disminuir el percentatge de complex intacte fins a superar el límit de detecció de la tècnica (veure figura 3.13, apartat C (i, ii)).

L’acció del detergent sobre el complex proteïna – inhibidor es podria explicar pel caràcter reversible dels inhibidors aldehid de manera que no establissin unions suficientment estables per mantenir la interacció durant el protocol d’immobilització. Una possible solució per aquesta situació pot ser la substitució del grup aldehid per un grup que formi enllaços covalents i irreversibles amb el centre actiu de les proteïnes proteolítiques.

Resum

En aquest apartat s’han plantejat dues estratègies per detectar i aïllar la proteïna prolil oligopeptidasa (POP) a partir de mostres de hrPOP pura i extracte de cervell. La primera estratègia ha consistit en immobilitzar compostos basats en l’inhibidor Z-Pro-Pro-H en un suport sòlid de tipus magnètic o en resina PEGA. Després de sondejar diverses estratègies de síntesi d’aldehids, s’han sintetitzat dos compostos de tipus aldehid (**2** i **4**) en resina semicarbazida. Ambdós compostos han demostrat ser excel·lents inhibidors de la POP tant en la seva versió lliure com ancorats a resina PEGA. Tanmateix, els intents per a l’aïllament de la POP mitjançant l’ús de resina PEGA amb els inhibidors ancorats han estat infructuosos. Descartats els problemes estèrics pels bons resultats dels assajos d’inhibició amb els inhibidors ancorats, s’ha apuntat a possibles problemes en l’estabilitat de la interacció inhibidor – proteïna al llarg del temps.

Aquesta sospita s’ha vist confirmada durant la realització dels experiments de marcatge i aïllament de la POP amb inhibidors biotinitats. La utilització

d'aquests inhibidors, no units a cap suport sòlid durant el marcatge de la proteïna, forma part de la segona estratègia plantejada en aquest apartat. Aquesta estratègia utilitza els inhibidors biotinitats en la seva forma lliure per al marcatge de les proteïnes diana i ha estat dissenyada per eliminar possibles impediments estèrics entre les proteïnes i el suport sòlid. Els experiments de marcatge directe realitzats amb inhibidors biotinitats **7** permeten la detecció de hrPOP per transferència de Western, però no s'ha pogut aïllar el complex proteïna – inhibidor biotinitat amb estreptavidina immobilitzada per a la seva caracterització. L'anàlisi dels resultats ha permès concloure que l'absència de detergent en els experiments d'aïllament no permet eliminar les interaccions inespecífiques, mentre que la seva presència malmet la interacció proteïna – inhibidor i n'impedeix l'aïllament.

Finalment, s'ha plantejat la substitució del grup aldehid per un grup inhibidor covalent i irreversible com una possible solució als problemes sorgits en aquest apartat, encara que això impliqui reduir el ventall de classes enzimàtiques de les potencials proteïnes diana.

3.1.3 Sondes de tipus fosfonat

Com s'ha comentat anteriorment, els aldehids reaccionen amb el centre actiu de les proteïnes serina i cisteïna proteasa formant un enllaç covalent i reversible. La naturalesa d'aquest enllaç ha demostrat no ser suficientment estable per mantenir la unió entre la sonda i la proteïna diana durant el procediment experimental. Així doncs, per evitar que la unió inhibidor – proteïna es pugui trencar en les etapes més exigents d'eliminació de les interaccions inespecífiques, s'ha decidit substituir el grup funcional de tipus aldehid per un grup funcional de tipus fosfonat que estableixi enllaços covalents i irreversibles amb el centre actiu de les proteïnes serina proteasa [274, 275].

Introducció als inhibidors de tipus fosfonat

Els fosfonats de diaril i de dialquil són una família d'inhibidors que reaccionen amb el centre actiu de les proteïnes serina hidrolasa i n'inhibeixen l'activitat mitjançant l'establiment d'un enllaç covalent i irreversible molt estable [276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286].

El procés d'inactivació de l'enzim comprèn una reacció de substitució nucleòfila durant la qual es forma un enllaç covalent entre l'alcohol de la serina i el grup fosfonat de l'inhibidor, mimetitzant l'intermediari tetraèdric d'alta energia [274]. Un dels dos substituents ariloxi (o alquiloxi) del fòsfor és expulsat en el moment de formació de l'enllaç mentre que el segon substituent es dissocia, posteriorment, per un procés d'envelliment induït per l'atac d'una

molècula d'aigua, tal i com s'observa en algunes estructures cristal·logràfiques (veure figura 3.14) [278].

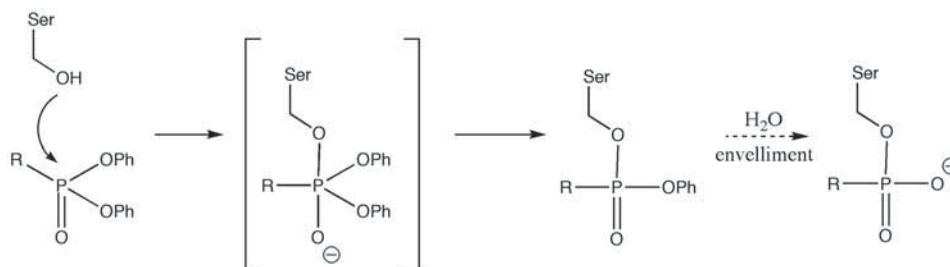


Figura 3.14: Mecanisme proposat de la inhibició de les serina proteases per part dels fosfonats de difenil.

Entre les diferents versions d'aquests compostos, cal destacar els fosfonats de diaril i de dialquil de tipus peptídic (veure figura 3.15). Aquestes molècules, també anomenades 1-aminoalcanofosfonats de diaril i de dialquil, són excel·lents inhibidors de les proteïnes serina proteasa i es caracteritzen per no presentar reaccions d'inhibició creuada amb altres tipus de proteases (veure taula 3.1).

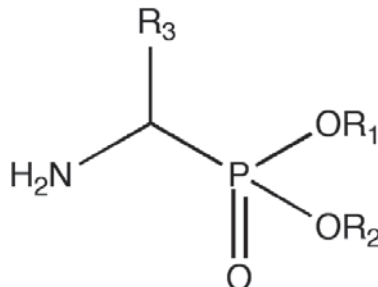


Figura 3.15: Estructura bàsica d'un fosfonat de diaril (o de dialquil) de tipus peptídic. R_1 i R_2 són cadenes alifàtiques o aromàtiques, i R_3 correspon a la cadena lateral d'algun aminoàcid o derivat. L'acoblament de residus aminoacídics addicionals en el grup amino permet la síntesi de fosfonats amb una cadena oligopeptídica.

Cal destacar que els fosfonats de tipus peptídic s'han utilitzat àmpliament com a eines metodològiques per al processament i caracterització de mostres biològiques. En aquest sentit, s'ha descrit la síntesi de fosfonats biotinitats, o amb grups fluorescents, com a etiquetes d'afinitat per a l'estudi de les proteïnes serina proteasa [33, 276, 293, 294] i, en alguns casos, s'han immobilitzat sondes fosfonat per al fraccionament o purificació de mescleres complexes. Alguns exemples d'aquestes aplicacions són la utilització d'un fluorofosfonat de rodamina per a l'estudi de proteïnes serina hidrolasa en proteomes complexos

Taula 3.1: Exemples d'aminoàcids per als quals s'ha sintetitzat el derivat fosfonat com a inhibidor de diverses proteïnes serina proteasa.

Aminoàcids	Proteïnes Inhibides	Referències
Phe, Leu, Val, Met	Quimiotripsina Elastases	[285, 284] [285, 284]
Lys, Orn, Homolisina, Arg	Tripsina Trombina Gramzimes A i K uPA	[281, 287] [281, 287] [282] [288]
Pro, Homoprolina	DPP IV	[289, 290, 291, 292, 293]
Asp, Glu	Proteinasa V8	[288]

[33], la immobilització de H-Ahe-Phe^P(OPh)₂ per a l'eliminació de quimiotripsina [80] o la immobilització del 2-aminoetilfosfonat de *p*-nitrofenil i de metil per a la purificació d'acetilcolinesterasa [82].

Tots aquests exemples suposen un bon referent bibliogràfic i recolzen la decisió de substituir el grup aldehyd per un grup fosfonat en les sondes dissenyades per a la detecció de la proteïna prolil oligopeptidasa.

Síntesi dels inhibidors de tipus fosfonat anàlegs de prolina

En aquest treball s'ha decidit sintetitzar els fosfonats de diaril i de dialquil derivats de prolina, Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (**12**), Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (**13**), Aha-Pro-Pro^P(OPh)OH (**14**) i Aha-Pro-Pro^P(OEt)OH (**15**) com a inhibidors específics de la proteïna prolil oligopeptidasa, basant-se, igual que s'havia fet amb les sondes de tipus aldehyd, amb l'inhibidor Z-Pro-Pro-H. La seqüència de dos prolines ha de donar especificitat a la sonda, mentre que la part corresponent a l'àcid hexinoic ha de servir per poder fer l'etiquetat amb biotina o grups fluorescents mitjançant una reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen.

La síntesi dels compostos **12** i **13** s'ha realitzat seguint l'esquema descrit per Boduszek *et al.* (veure figura 3.16) [290]. Inicialment, s'ha preparat el trímer de 1-pirrolina (**8**) a partir de pirrolidina segons el mètode de Nomura [295]. Aquest trímer és extremadament làbil i, al realitzar els rentats del cru, s'han observat conversions del trímer de 1-pirrolina a 1-pirrolina de fins al 100 % (veure figura 3.17). Per aquest motiu, s'ha decidit utilitzar el cru directament per a la següent reacció sense cap tipus de purificació addicional.

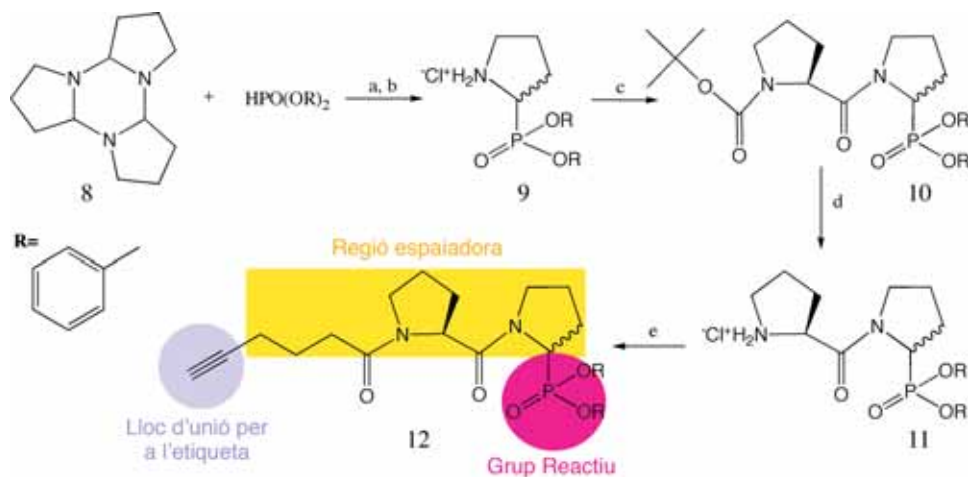


Figura 3.16: Esquema de la síntesi de Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (**12**). a) Fosfit de difenil (1 eq), 1,5 h a 85 °C. b) Trietilamina (1 eq), Boc-Pro-OH (1 eq), *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (1,2 eq) en DCM, 2 h a -10 °C i 20 h a 25 °C. c) 4 M HCl en 1,4-dioxà (25 ml/mmol) en gradient de 0 °C a 25 °C, 30 min. d) Trietilamina (1 eq), àcid 5-hexinoic (1 eq), *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (1,2 eq) en DCM, 2 h a -10 °C i 20 h a 25 °C.

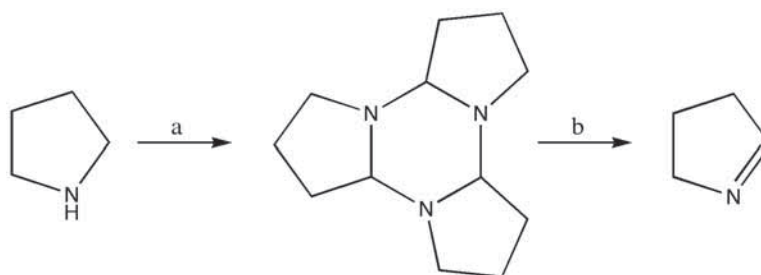


Figura 3.17: Esquema de la síntesi i degradació del trímer de 1-pirrolina. a) NaOH (2 eq), Na₂S₂O₈ (1 eq), AgNO₃ (0,005 eq), 2 h a 0 °C. b) El trímer de 1-pirrolina és extremadament làbil i passa ràpidament al monòmer de 1-pirrolina a temperatures de 40 °C o inclús en les condicions suaus d'un rentat del cru de reacció amb solucions aquoses.

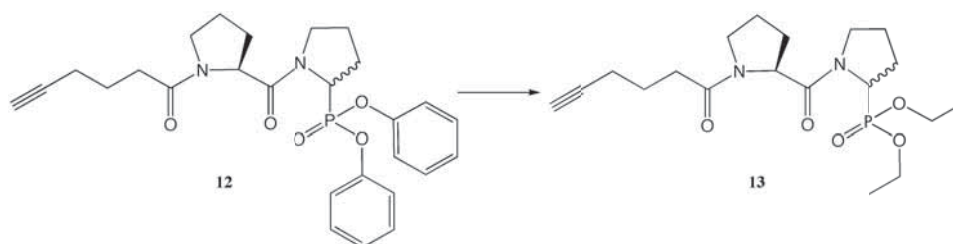


Figura 3.18: Esquema de la síntesi de Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ per transesterificació de Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂. KF (10 eq) i éter 18-corona-6 en etanol, 10 min a 80 °C i 16 h a 25 °C.

El 2-pirrolidilfosfonat de difenil HCl·H-Pro^P(OPh)₂ (**9**) s'ha sintetitzat per reacció del fosfit de difenil amb el trimer de 1-pirrolina (**8**) (Rendiment = 29,5 %). El posterior acoblament de Boc-Pro-OH a l'extrem N_{ter} de **9** ha donat lloc a Boc-Pro-Pro^P(OPh)₂ (**10**) (Rendiment = 37 %). Finalment, s'ha procedit a l'eliminació del grup protector Boc per obtenir **11** i a l'acoblament de l'àcid 5-hexinoic que ha permès l'obtenció de Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (**12**) (Rendiment = 33 %).

Un cop sintetitzat el compost **12** s'ha realitzat un procés de transesterificació per a l'obtenció de Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (**13**) mitjançant el mètode descrit per Szewczyk [296] amb un rendiment del 57 % (veure figura 3.18).

Durant un temps s'havia discutit que els fosfonats de monoalquil eren inerts a l'atac nucleòfil del centre actiu de les proteïnes serina proteasa a causa de la deslocalització de la càrrega negativa dels àtoms d'oxigen. Tanmateix, s'ha observat que els fosfonats de monoalquil poden unir-se covalentment al centre actiu de la tripsina, inhibint la seva activitat de forma irreversible [297]. Altres estudis han confirmat la unió irreversible d'aquests compostos i la inhibició de l'activitat catalítica de la trombina i de fragments recombinants d'anticossos, suggerint que aquesta reactivitat és una característica general dels fosfonats de monoalquil respecte les proteïnes serina proteasa [297, 298]. Aquestes dades, juntament amb el desconeixement de quin fosfonat reacciona millor amb la POP, han plantejat la síntesi del corresponent fosfonat de fenil, és a dir, Aha-Pro-Pro^P(OPh)OH (**14**).

La síntesi del compost **14** s'ha realitzat per hidròlisi del fosfonat **12** segons el mètode descrit per Szewczyk [296] per tractar-se del mètode més simple i de rendiments teòrics més elevats. Aquest mètode genera únicament el compost monoalquil i ha permès l'obtenció del compost **14** (Rendiment = 14 %) amb facilitat.

Tots aquests fosfonats s'han preparat com a mesclades de diastereoisòmers com a conseqüència de la manca d'estereoselectivitat en la reacció entre el fosfit de

difenil i el trímer de 1-pirrolina, fet que genera com a productes de la reacció els enantiòmers 2-(*R*)-pirrolidilfosfonat de difenil i 2-(*S*)-pirrolidilfosfonat de difenil.

Finalment, cal destacar que a la bibliografia s'han descrit nombrosos anàlegs de tipus fluorofosfonat d'aril o alquil [33] com a potents inhibidors de les proteïnes serina proteasa, però se n'ha descartat la seva síntesi perquè són molt inestables en solucions aquoses i presenten una elevada toxicitat [283]. A tall d'exemple, el derivat fluorofosfonat d'aril Cbz-(4-AmPhGly)^P(OPh)F té un temps de semivida en solució tampó de pH 7,5 de 4,5 segons [299].

Assajos d'inhibició amb els 1-aminoalcanofosfonats anàlegs de prolina

Per comprovar si les sondes **12**–**14** sintetitzades anteriorment són bones inhibidores de la POP, s'ha realitzat un assaig d'inhibició per competició amb el fluorofosfonat de rodamina (FP-rodamina) descrit per Patricelli *et al.* [68].

El fluorofosfonat de rodamina utilitzat és una sonda basada en activitat formada per un grup reactiu de tipus fluorofosfonat unit a rodamina mitjançant un espaiador de tipus polietilenglicol. Aquesta estructura permet a la sonda reaccionar amb nombroses proteïnes serina hidrolasa ja que no presenta cap element a la regió espaiadora que moduli la seva selectivitat.

L'assaig realitzat consisteix en incubar conjuntament hrPOP amb el fluorofosfonat de rodamina i la sonda o molècula en estudi (veure figura 3.19). Quan la sonda no té activitat inhibidora, el fluorofosfonat de rodamina s'uneix al centre actiu de la proteïna i al fer una electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida es pot observar una banda fluorescent corresponent a hrPOP marcada amb el fluorofosfonat de rodamina. En canvi, quan la molècula en estudi té capacitat inhibidora competeix amb el fluorofosfonat de rodamina per l'ocupació del centre actiu i disminueix la intensitat de la fluorescència.

La realització d'aquest experiment amb les sondes **12**, **13** i **14** permet observar que concentracions creixents de la sonda **13** produeixen una disminució en la intensitat de fluorescència a qualsevol concentració (veure figura 3.20), mentre que aquest fenomen no s'observa per a les sondes **12** i **14**. Aquests resultats mostren que la sonda **13** reconeix el centre actiu de la hrPOP i impedeix parcialment la unió del fluorofosfonat de rodamina, mentre que les sondes **12** i **14** no en desplacen la unió ja que o bé no reconeixen el centre actiu o bé no s'hi uneixen amb suficient afinitat. La diferència observada entre les sondes **12**, **13** i **14** es deu molt probablement a l'aparició d'impediments estèrics en les sondes **12** i **14** ja que els grups fenoxi d'aquestes sondes són molt més voluminosos que els grups etoxi de la sonda **13**.

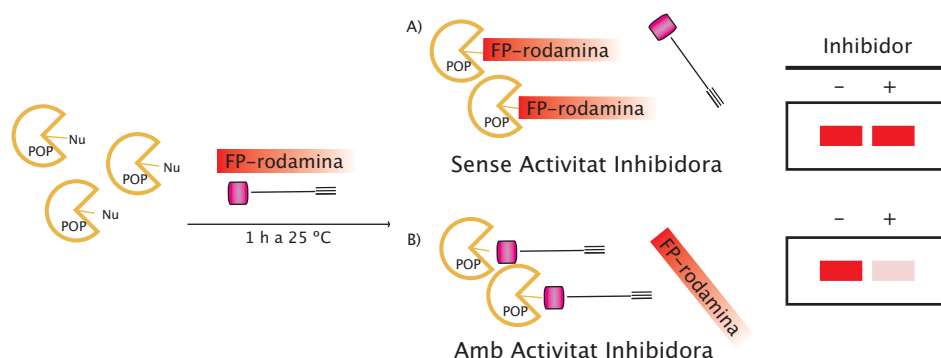


Figura 3.19: Esquema de l'assaig d'inhibició per competició amb el fluorofosfonat de rodamina (FP-rodamina) per a l'avaluació de les sondes de tipus 1-aminoalcanofosfonat. En aquest tipus d'assaig, si el compost assajat no té activitat inhibidora no impedeix la unió del fluorofosfonat de rodamina al centre actiu i, per tant, s'observa la fluorescència tant en absència com en presència del compost assajat. En canvi, si el compost assajat té capacitat inhibidora, llavors competeix amb el fluorofosfonat de rodamina pel centre actiu de les proteïnes i la intensitat de la fluorescència disminueix.

Com a conseqüència d'aquests resultats, l'1-aminoalcanofosfonat de dialquil Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ es considera el principal candidat per ser utilitzat amb èxit com a sonda per al marcatge de la POP en mostres de cervell de ratolí.

La utilització de la proteïna recombinant humana per extrapolar, posteriorment, els resultats a la proteïna de ratolí es basa en la gran similitud que presenten ambdues proteïnes (superior al 95 %) i en la disponibilitat de la proteïna recombinant humana al laboratori [228].

Anàlisi del proteoma amb els 1-aminoalcanofosfonat anàlegs de prolina mitjançant gels de fluorescència

Inicialment, s'ha fet un experiment de marcatge de les proteïnes serina proteasa del proteoma amb la FP-rodamina per determinar si és possible visualitzar la POP amb les sondes de tipus fosfonat. En aquest tipus d'experiment, les proteïnes corresponents a interaccions específiques de la sonda FP-rodamina, depenents d'activitat, es poden identificar fàcilment per la desaparició de la fluorescència en les motres desnaturalitzades per temperatura. En canvi, les proteïnes corresponents a interaccions inespecífiques de la sonda FP-rodamina, no depenents d'activitat, s'identifiquen perquè la seva intensitat de fluorescència no es veu afectada ni per la presència del Z-Pro-Pro-H ni per la temperatura (veure figura 3.21).

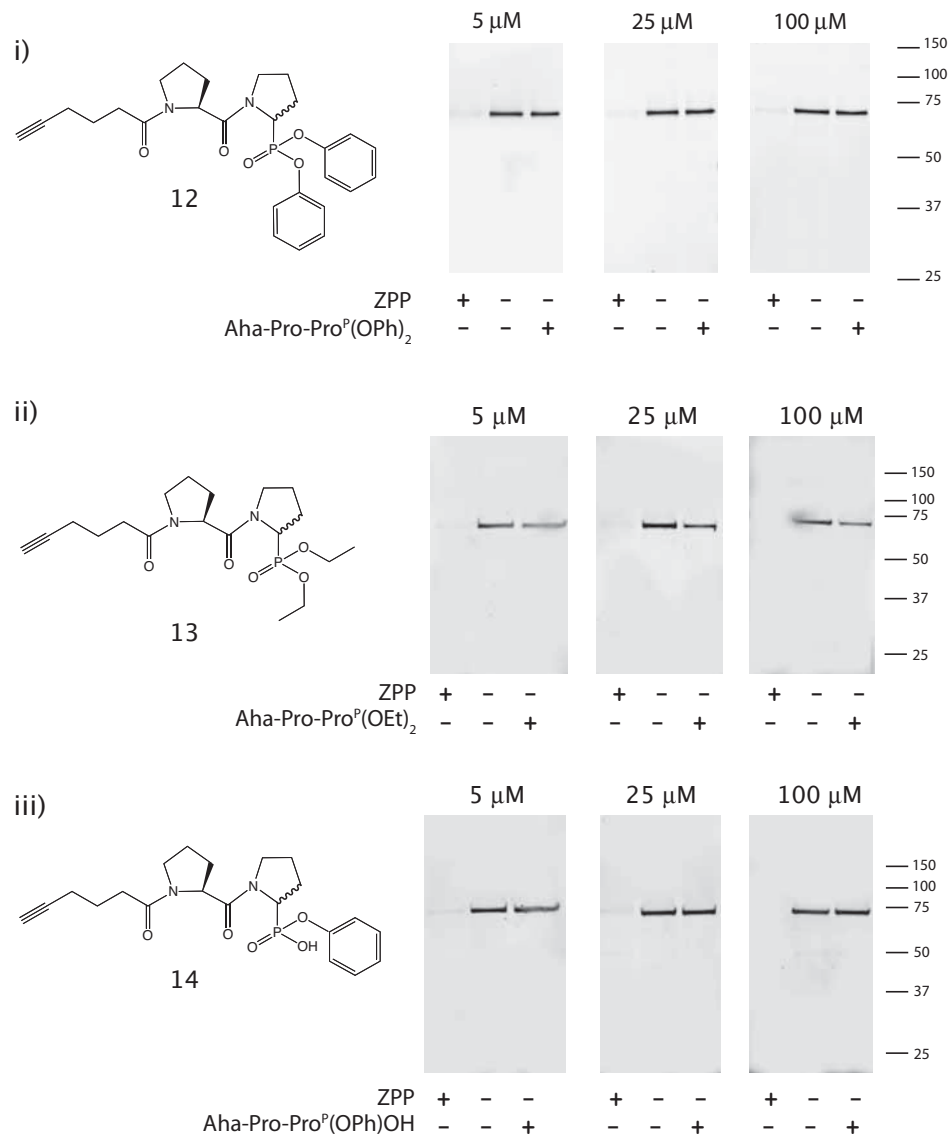


Figura 3.20: Assaig d'inhibició per competició amb el fluorofosfonat de rodamina per a l'avaluació de les sondes de tipus fosfonats anàlegs de prolina. Cada mostra conté 20 ng de hrPOP incubada amb Z-Pro-Pro-H o Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (i), Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (ii), i Aha-Pro-Pro^P(OPh)OH (iii) a diferents concentracions (5 μ M, 25 μ M i 100 μ M). Com a control de l'assaig d'inhibició s'utilitza el Z-Pro-Pro-H (ZPP), un inhibidor específic per la POP, que bloqueja l'accés al centre actiu i evita la unió del fluorofosfonat de rodamina.

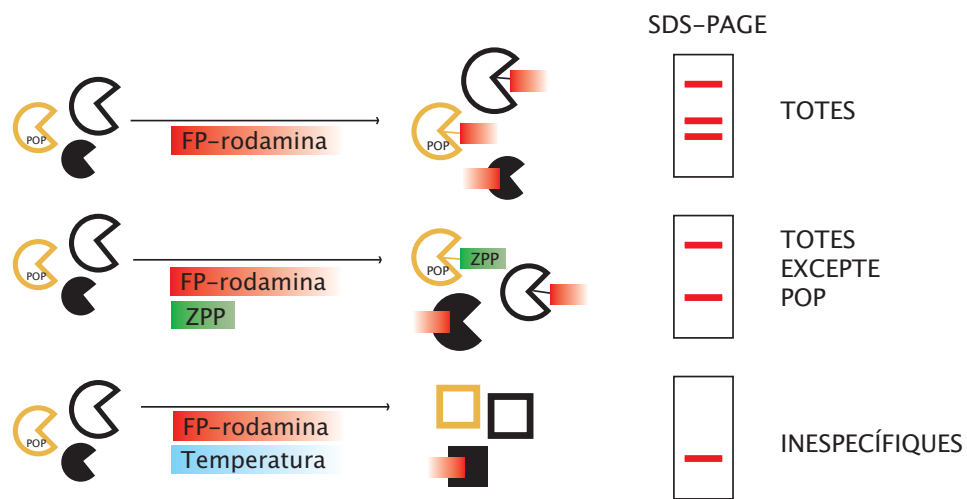


Figura 3.21: Esquema de l'etiquetat del proteoma mitjançant el fluorofosfonat de rodamina. Aquesta sonda reacciona amb el centre actiu de les proteïnes serina proteasa de forma específica, però també pot reaccionar inespecíficament amb altres proteïnes. Per localitzar la POP entre les unions inespecífiques es pot utilitzar el Z-Pro-Pro-H (ZPP), un inhibidor específic per aquesta proteïna, que bloqueja l'accés al centre actiu. Mentre que per diferenciar les unions específiques de les inespecífiques s'utilitza la desnaturització del proteoma per temperatura.

Els experiments de fluorescència realitzats han permès detectar de forma específica la POP endògena i la hrPOP pura (carrils 1-3 de la figura 3.22). Aquesta detecció és específica i depenent d'activitat ja que l'ocupació del centre actiu per part del Z-Pro-Pro-H (carrils 4-6) o la desnaturalització de les mostres per temperatura (carrils 7-9) evita la unió de la FP-rodamina a la proteïna. Els assajos amb Z-Pro-Pro-H permeten la identificació de la POP ja que, en presència d'aquest compost, totes les proteïnes mantenen els nivells de fluorescència excepte aquelles com la POP per a les quals el Z-Pro-Pro-H actua com a inhibidor covalent dirigit al centre actiu. La presència de la POP en totes les condicions assajades, independentment de la intensitat de la fluorescència, s'ha confirmat per assajos d'immunodetecció (veure figura 3.22, apartat ii). A diferència dels assajos de fluorescència, la immunodetecció no permet detectar la POP endògena a causa de la menor sensibilitat que presenten els assajos d'immunodetecció realitzats.

A part de la POP i les bandes inespecífiques, els experiments amb el fluorofosfonat de rodamina mostren la presència d'altres bandes (per exemple, bandes a 250 kDa, 70 kDa i < 37 kDa) corresponents a altres proteïnes serina proteasa detectades específicament. La detecció d'un ampli ventall de proteïnes serina proteasa es deu a la pròpia estructura del fluorofosfonat de rodamina. Aquesta molècula està formada per un grup fluorofosfonat, un espaiador de tipus polietilenglicol, i una rodamina, que actua d'etiqueta fluorescent per a la seva visualització. Com ja s'ha comentat anteriorment, el grup fosfonat és un inhibidor covalent i irreversible de les proteïnes serina proteasa [279]. El fet d'utilitzar un espaiador de tipus polietilenglicol minimitza les restriccions espacials i permet que el fluorofosfonat de rodamina reaccioni amb el centre actiu de proteïnes serina proteasa molt diverses, convertint aquesta molècula en una sonda d'ampli espectre, és a dir, poc selectiva. Tanmateix, el propòsit últim d'aquest treball és identificar proteases basant-se en el coneixement del substrat, és a dir, no es tracta d'identificar tot el conjunt de proteïnes serina proteasa d'un extracte, sinó identificar de forma selectiva aquell subconjunt de proteïnes serina proteasa que processen un determinat tipus de substrat. Per tant, cal utilitzar sondes que mimetitzin el substrat i acotin les identifications de tipus específic al subconjunt de proteïnes serina proteasa d'interès.

La proteïna prolil oligopeptidasa (POP) és una proteïna serina proteasa que, com s'ha vist anteriorment, processa pèptids de fins a 30 aminoàcids per trencament de l'enllaç peptídic en seqüències Pro-↓X, éssent X qualsevol aminoàcid excepte prolina. Per aquest motiu, s'ha repetit l'experiment anterior, però en aquest cas utilitzant una sonda fosfonat basada en els substrats naturals d'aquesta proteïna i en l'inhibidor Z-Pro-Pro-H. Entre les diverses sondes fosfonat sintetitzades s'ha analitzat el proteoma amb la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (**13**) d'acord amb els resultats d'inhibició anteriors. L'exploració del proteoma de cervell de ratolí amb aquesta sonda ha permès

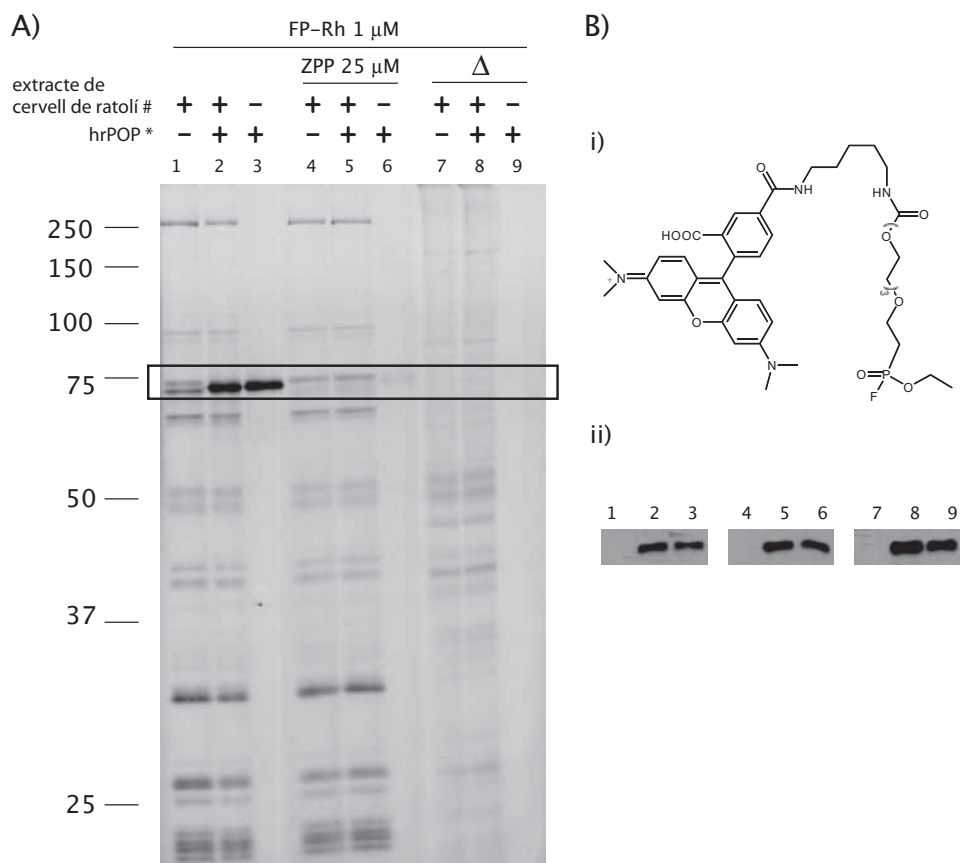


Figura 3.22: Etiquetat funcional del proteoma amb el fluorofosfonat de rodamina. A) Diferents mostres d'hrPOP (10 ng) i extracte de cervell de ratolí (25 μ g) han estat etiquetades amb el fluorofosfonat de rodamina (1 μ M) en absència i presència de Z-Pro-Pro-H (ZPP, 25 μ M). Les interaccions inespecífiques s'han controlat amb la desnaturalització per temperatura (Δ) de les mostres abans de l'etiquetat. B) i) Estructura del fluorofosfonat de rodamina (FP-rodamina); ii) Detecció de la proteïna proliil oligopeptidasa per transferència Western i immunodetecció amb l'anticòs α -POP.

confirmar la detecció específica i altament selectiva de la POP endògena de ratolí i la proteïna hrPOP pura.

Inicialment, s'ha incubat l'extracte de cervell amb la sonda basada en substrat Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (**13**) per al marcatge selectiu de la proteïna serina proteasa d'interès. Un cop establerta la interacció entre la sonda i les proteïnes de l'extracte, les interaccions es revelen mitjançant la incorporació d'una etiqueta TriN₃ per cicloaddició [2+3] de Huisgen i es detecten per fluorescència. A la figura 3.23 es pot observar com a l'incubar l'extracte de cervell amb aquesta sonda han desaparegut les bandes de 250 kDa i de baix pes molecular corresponents a altres proteïnes serina proteasa que es detectaven específicament amb el fluorofosfonat de rodamina i que ara no apareixen.

Per altra banda, cal remarcar que l'augment de la concentració de sonda de 25 a 100 μ M no augmenta considerablement la senyal de les bandes específiques, però sí que provoca un augment notable en el nombre i la intensitat de les bandes inespecífiques. D'aquesta manera, es constata que la concentració de sonda és un paràmetre important que caldrà tenir en compte en futurs experiments per tal de maximitzar la relació entre bandes específiques i bandes inespecífiques.

La realització d'aquest mateix experiment amb l'1-aminoalcanofosfonat de diaril Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (**12**, 25 μ M) no ha permès la detecció de cap banda específica (veure figura 3.24).

La identificació de la POP per part de l'1-aminoalcanofosfonat de dialquil Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ s'ha confirmat per espectrometria de masses (Q-TOF) mitjançant l'escissió i digestió tròptica de la banda del gel de poliacrilamida segons el protocol descrit per Kinter et al. [300] i la posterior anàlisi dels pèptids digerits (veure figura 3.25). Malgrat que el recobriment de la seqüència sigui només del 4 %, els pèptids detectats són suficients per a la identificació estadísticament significativa de la POP.

Un cop s'ha comprovat la possibilitat de detectar la POP, s'han substituït els residus de prolina de Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ per alanina i leucina per determinar la importància de la seqüència aminoacídica en la selectivitat de les sondes fosfonat. A la figura 3.26 s'observa com el canvi d'aminoàcids en aquest experiment provoca que la sonda deixi de reconèixer de forma específica la hrPOP. A la vista d'aquests resultats, es pot afirmar que la seqüència aminoacídica present a les sondes 1-aminoalcanofosfonat de diaril o dialquil és un factor clau per a la seva selectivitat. Per tant, podem concloure que aquesta aproximació pot ser un bon mètode per a la identificació de proteases ja que implica que donada la seqüència aminoacídica d'un neuropèptid podem generar el corresponent anàleg de tipus 1-aminoalcanofosfonat i identificar de forma selectiva la proteasa implicada en la seva via biosintètica.

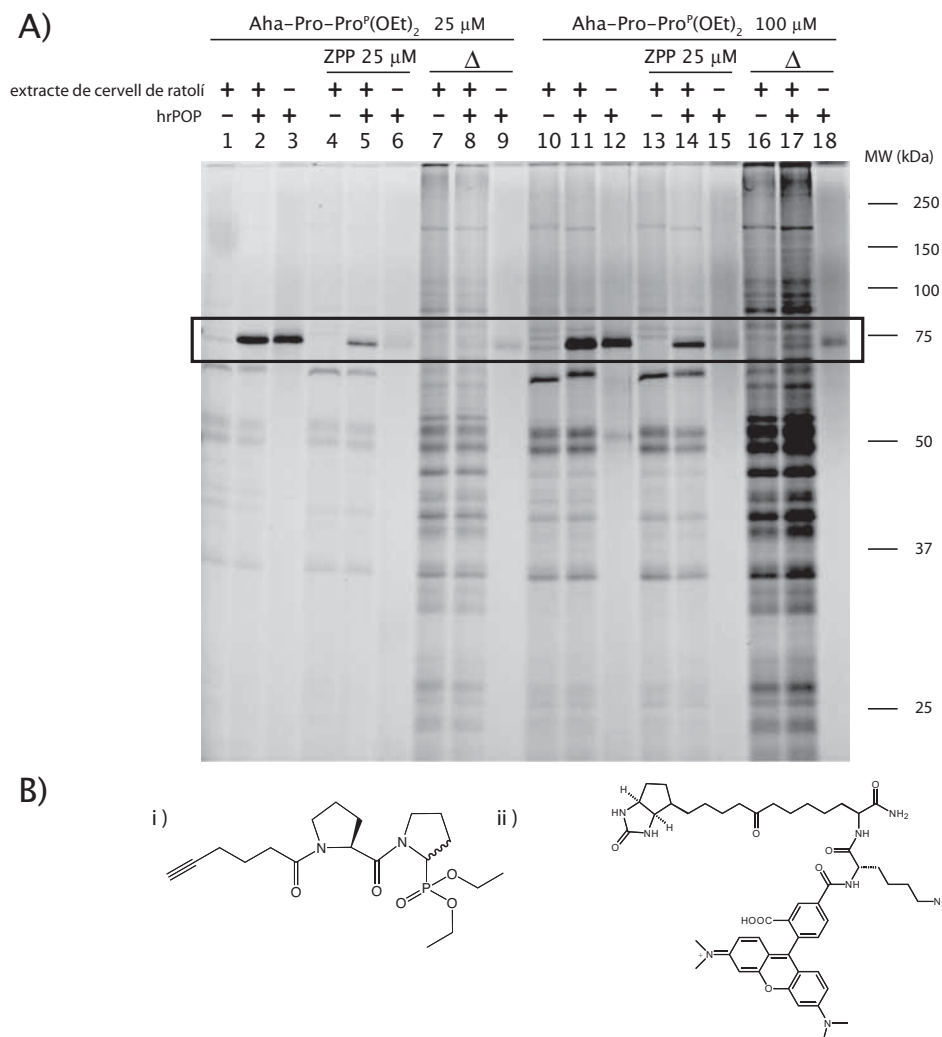


Figura 3.23: Etiquetat funcional del proteoma amb l'1-aminoalcanofosfonat de dietil anàleg de prolina Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂. A) Diferents mostres d'hrPOP pura (10 ng) i extracte de cervell de ratolí (25 μg) han estat etiquetades amb l'1-aminoalcanofosfonat de dietil anàleg de prolina (25 i 100 μM) en absència i presència de Z-Pro-Pro-H (ZPP, 25 μM). Les interaccions inespecífiques s'han controlat amb la desnaturalització per temperatura (Δ) de les mostres abans de l'etiquetat. B) Les interaccions de la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (i) s'han revelat per fluorescència mitjançant la incorporació per cicloadició de l'etiqueta trifuncional TriN₃ (ii).

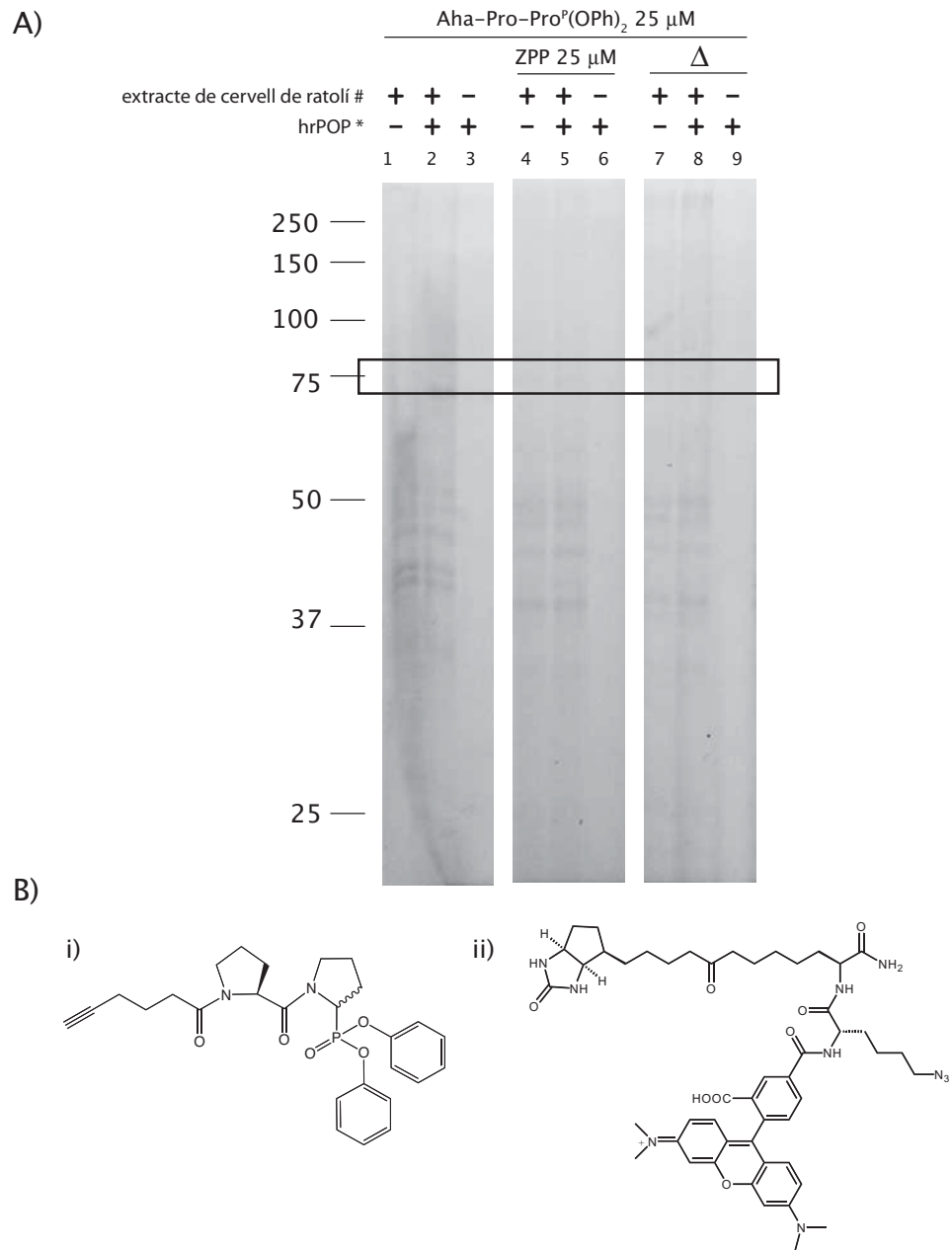


Figura 3.24: Etiquetat funcional del proteoma amb l'1-aminoalcanofosfonat de dietil anàleg de prolina Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂. A) Diferents mostres d'hrPOP pura (10 ng) i extracte de cervell de ratolí (25 μg) han estat etiquetats amb l'1-aminoalcanofosfonat de dietil anàleg de prolina (25 μM) en absència i presència de Z-Pro-Pro-H (ZPP, 25 μM). Les interaccions inespecífiques s'han controlat amb la desnaturalització per temperatura (Δ) de les mostres abans de l'etiquetat. B) Les interaccions de la sonda Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (i) s'han revelat per fluorescència mitjançant la incorporació per cicloadició de l'etiqueta trifuncional TriN₃ (ii).

```

      10      20      30      40      50      60
MLSFQYPDVY RDETSVQEYH GHKICDPYSW LEDPDSEQTK AFVEAQNKIT VPFLEQCPIR

      70      80      90     100     110     120
GLYKERMTTEL YDYPKYSCHF KKGKRYFYFY NTGLQNQRVL YVQDSLEGEA RVFLDPNTLS

      130     140     150     160     170     180
DDGTVALRGY AFSEEDGEYFA YGLSASGSDW VTIKFMKVDG AKELPDVLER VKFTCMAWTH

      190     200     210     220     230     240
DGKGMFYNSY PQQDGKSDGT ETSTNLHQKL CYHVLGTDQS EDILCAEFPD EPKWMGGAEL

      250     260     270     280     290     300
SDDGRYVLLS IWEGCDPVNR LWYCDLQQEP NGITGILKWV KLIDNFEGEY DYVTNEGTVF

      310     320     330     340     350     360
TFKTNRNSPN YRLINIDFTD PDESKWKVLV PEHEKDVLEW VACVRSNFLV LCYLHDVKNI

      370     380     390     400     410     420
LQLHDLTTGA LLKTFPLDVG SVVGYSGRKK DSEIFYQFTS FLSPGVIYHC DLTKEELEPM

      430     440     450     460     470     480
VFREVTVKGI DAADYQTIQI FYPSKDGTKI PMFIVHKKGI KLDGSHPAFL YGYGGFNISI

      490     500     510     520     530     540
TPNYSVSRLI FVRHMGGVLA VANIRGGGEY GETWHKGGIL ANKQNCFDDE QCAAAYLIKE

      550     560     570     580     590     600
GYTSPKRLTI NGGSNGGLLV AACANQRPD LFGCVIAQGV MDMLKFHKFT IGHAWTTDYG

      610     620     630     640     650     660
CSDTKQHFEE LLKYSPLHNV KLPEADDIQY PSMLLLTADH DDRVVPLHSL KFIATLQYIV

      670     680     690     700     710
GRSRKQSNPL LIHVDTKAGH GAGKPTAKVI EEVSDMFAFI ARCLNIEWIQ

```

Figura 3.25: Seqüència de la proteïna prolil oligopeptidasa amb els pèptids identificats per espectrometria de masses marcats en vermell (Percentatge de recobriment de la seqüència = 4 %).

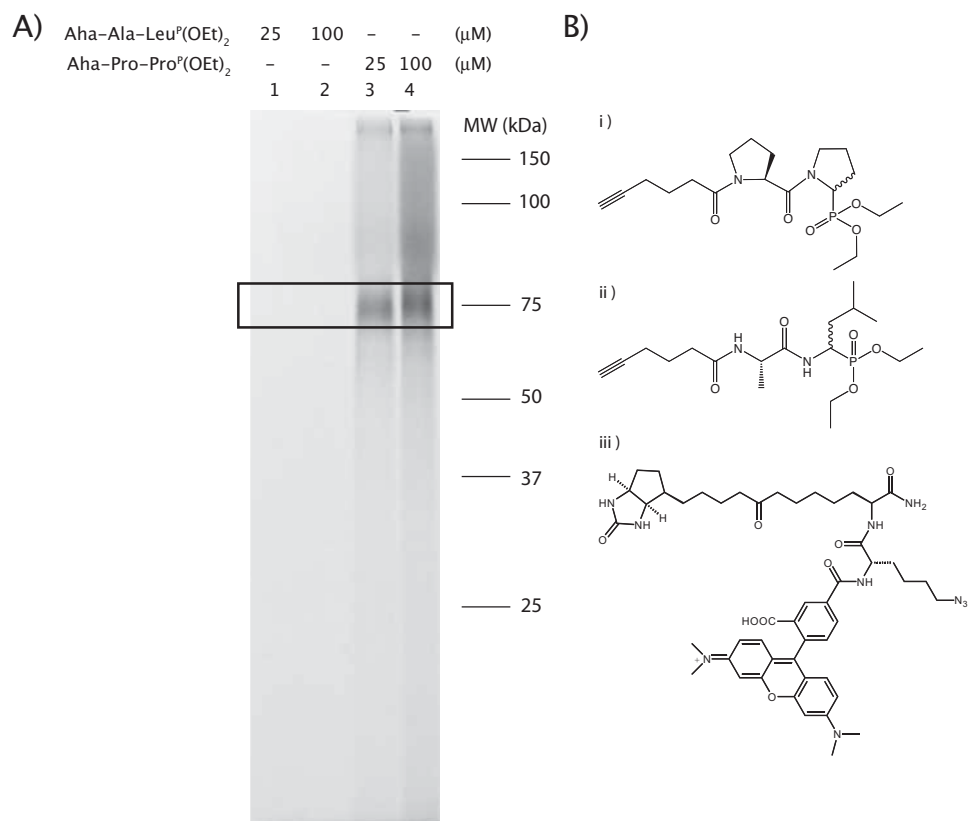


Figura 3.26: Etiquetat funcional de hrPOP pura amb l'1-aminoalcanofosfonat de dietil anàleg de prolina Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ i l'anàleg de leucina Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂. A) Diferents mostres amb hrPOP pura (10 ng) han estat etiquetades amb l'anàleg de leucina (25 i 100 μM, carrils 1–2) o amb l'anàleg de prolina (25 i 100 μM, carrils 3–4). La interacció de les sondes Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (i) i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ (ii) amb la hrPOP s'ha revelat amb la sonda trifuncional TriN₃ (iii).

Anàlisi del proteoma amb els 1-aminoalcanofosfonat anàlegs de prolina mitjançant tècniques de 2D LC-MS/MS (MudPIT)

El marcatge del proteoma mitjançant sondes basades en activitat i la posterior anàlisi per electroforesi unidimensional (SDS-PAGE) permet el processament de desenes de mostres per dia i és ideal per obtenir una primera visualització de les proteïnes d'interès presents al proteoma.

Tot i això, la utilització d'aquesta tècnica per a la resolució i identificació de proteïnes per espectrometria de masses presenta diverses limitacions, similars a les detectades en l'electroforesi bidimensional (2D PAGE) [16]. En aquest sentit, aquestes tècniques presenten dificultats en la identificació de proteïnes poc abundants, a conseqüència del baix poder de resolució—especialment en electroforesis unidimensionals—i l'elevat rang dinàmic de les mescles complexes [17]. Així mateix, s'han detectat problemes en la separació de proteïnes amb pesos moleculars o punts isoelèctrics extrems que apareixen subrepresentades, fet que en dificulta la seva correcta identificació. I finalment, aquestes tècniques requereixen una elevada manipulació de les mostres i una gran dedicació per part de l'investigador ja que, per a la identificació de les proteïnes, és necessària l'escisió i digestió de les bandes d'interès de forma individual.

Per superar aquestes limitacions, en els últims anys s'han descrit diverses aproximacions cromatogràfiques, acoblades a espectrometria de masses, per a la separació i identificació de pèptids i proteïnes [301]. Aquestes separacions cromatogràfiques poden ser de tipus unidimensional (LC-MS/MS) o multidimensional (2D LC-MS/MS), però els proteomes d'alta complexitat biològica sovint sobrepassen la capacitat de resolució de les tècniques unidimensionals i han de ser resolts per cromatografia bidimensional de tipus ortogonal.

Entre les tècniques de separació cromatogràfica bidimensional cal destacar l'anomenada tècnica multidimensional d'identificació de proteïnes (o MudPIT, de l'anglès *Multidimensional protein identification technology*) [302, 303, 304] (veure figura 3.27). Aquesta tècnica està basada en una separació per cromatografia bidimensional d'intercanvi catiònic i fase reversa, seguida de l'anàlisi per espectrometria de masses en tàndem. La tecnologia MudPIT ha estat utilitzada en l'anàlisi del proteoma de llevat [303, 305], i posteriorment, ha estat adaptada a la proteòmica basada en activitat per Jessani *et al.* [306] en un estudi per a la identificació de dianes terapèutiques per al càncer de mama. A part, també s'ha utilitzat per a la caracterització de complexos proteïcs [307], la identificació de biomarcadors [308] i l'estudi de l'estrès hídric [309].

L'adaptació de la tecnologia MudPIT a la proteòmica basada en activitat ofereix una plataforma analítica d'alta resolució per a l'anàlisi en profun-

ditat de proteomes d'elevada complexitat biològica i es presenta com una metodologia de gran utilitat per a l'estudi i identificació de proteases en el proteoma de cervell i glàndula pituïtària de ratolí.

L'aplicació de la tecnologia MudPIT en l'estudi i identificació de proteases ha de permetre una identificació directa de les proteïnes d'interès, amb una mínima manipulació de les mostres i una elevada sensibilitat. No obstant això, abans d'utilitzar aquesta aproximació per a l'exploració del proteoma a la cerca de proteases desconegudes, s'ha posat a punt la metodologia utilitzant la POP com a control de la tècnica. Així doncs, s'ha realitzat un etiquetat funcional del proteoma amb la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ i s'ha comprovat si és possible detectar la proteïna control mitjançant aquesta tècnica d'espectrometria de masses.

Inicialment, aquesta aproximació implica el tractament del proteoma amb sondes basades en activitat per tal que reaccionin amb les proteases d'interès. Un cop realitzat l'etiquetat funcional del proteoma, s'incorpora una biotina a les sondes utilitzades mitjançant una cicloadició de l'etiqueta trifuncional TriN3. Finalment, les proteïnes marcades es capturen amb avidina unida a suport sòlid, es digereixen amb tripsina i s'analitzen per cromatografia líquida bidimensional i espectrometria de masses.

L'anàlisi del proteoma de cervell de ratolí etiquetat amb la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (**13**) i la comparació amb els controls de proteoma inactiu (desnaturalització per temperatura) i d'absència de sonda ha permès observar una elevada diferència en el nombre de comptes espectrals d'aquesta proteïna entre les mostres i els respectius controls (veure figura 3.28). Aquestes diferències tan marcades, que no apareixen per a cap altra proteïna de l'extracte, permeten confirmar la detecció específica de la POP i la idoneïtat d'aquesta tècnica per a la identificació de proteases.

Els assajos d'identificació s'han realitzat per comparació amb la base de dades *International Protein Index* (IPI) de ratolí elaborada pel *European Bioinformatics Institute* ja que respecte altres opcions, com les bases de dades UniProt o NCBI *Entrez Protein Database*, la base de dades IPI representa una opció equilibrada entre el grau de completesa i el grau de redundància.

Aquestes anàlisis es van realitzar durant una estada al laboratori del professor Benjamin F. Cravatt de *The Scripps Research Institute* (La Jolla) i, posteriorment, s'ha implementat la tecnologia MudPIT al centre d'elaboració d'aquesta tesi. La posada a punt d'aquesta tècnica ha precisat l'elaboració i adaptació dels mètodes als aparells disponibles, la preparació de columnes cromatogràfiques, i la tria d'un mètode de tractament i anàlisi de dades fiable per a la identificació qualitativa de proteïnes. Aquesta implementació s'ha iniciat amb la reproducció dels resultats de detecció i identificació de la POP i ha estat possible gràcies a una estreta col·laboració amb el personal de la unitat d'espectrometria de masses de l'Institut de Recerca Biomèdica.

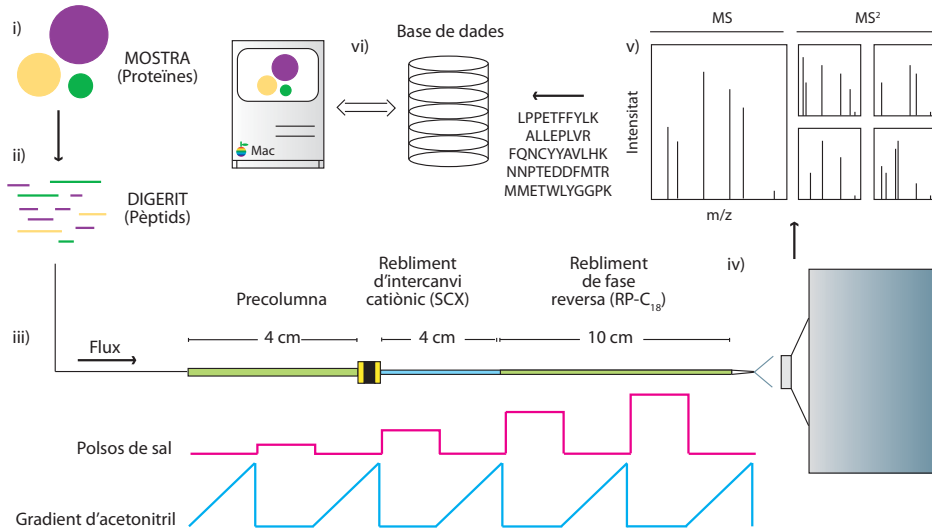


Figura 3.27: La tècnica multidimensional d'identificació de proteïnes (o MudPIT, de l'anglès *Multidimensional protein identification technology*) es basa en la utilització d'una columna bifàsica que inclou un rebliment d'intercanvi catiònic (SCX) i un rebliment de fase reversa (RP-C₁₈) que permet realitzar una separació cromatogràfica bidimensional d'elevada resolució. Inicialment, les mostres a analitzar (i) es digereixen amb tripsina i la mescla de pèptids s'acidifica i s'injecta a la columna cromatogràfica (ii). En aquest moment, els pèptids queden atrapats al rebliment d'intercanvi catiònic present a la columna i, mitjançant polsos de sal a concentracions creixents (iii), els pèptids van sent desplaçats per valors creixents de *pI* cap al rebliment de fase reversa. Per a cada pols de sal, una fracció de pèptids arriba al rebliment de fase reversa on es resol amb un gradient d'acetonitril i, un cop finalitzat, la columna es reequilibra per absorbir la següent fracció de pèptids procedents del rebliment d'intercanvi catiònic. Cal destacar que, un cop injectada la mostra, aquesta ja no requereix cap manipulació addicional ja que els pèptids són eluïts directament de la columna cromatogràfica cap a l'espectròmetre de masses on són analitzats (iv). L'espectròmetre de masses en tàndem (MS/MS) és capaç de fragmentar els pèptids resolts per cromatografia de manera que en pot deduir la seqüència (v) i, amb programes de cerca en bases de dades com SEQUEST o Mascot [310, 311, 312], identificar les proteïnes presents a la mostra (vi).

A)

	Mostres (CE)	Control Bullit (CE)	Control Teixit (CE)	Ratio M/C
cDNA clone:4631430M22 product:prolyl endopeptidase, full insert sequence (IPI00132089)	107 ± 44	3 ± 3	0 ± 0	71,3
Prolyl endopeptidase (IPI00761930)	116 ± 48	3 ± 3	0 ± 0	69,2

B)

Figura 3.28: A) Identificació de la proteïna prolil oligopeptidasa per MudPIT a partir d'extractes de cervell de ratolí. En els assajos d'identificació, s'han utilitzat les comptes espectrals (CE), és a dir, el nombre d'espectres MS/MS que apunten a cada proteïna, per determinar l'abundància relativa de les proteïnes presents a les mostres respecte els controls [313]. Així mateix, s'han utilitzat els paràmetres interns X_{corr} i ΔC_n de la funció de puntuació de SEQUEST [303] per minimitzar el percentatge d'identificacions errònies. El valor d'aquests paràmetres s'ha establert mitjançant la cerca en la base de dades anterior i acotant el percentatge màxim de falsos positius a l'1% [314] ($X_{corr} = 1,8 (+1), 2,5 (+2), 3,5 (+3), 4,5 (+4)$; i $\Delta C_n = 0,08$). B) Elaboració de la base de dades utilitzada en els experiments de MudPIT per mescla a l'atzar i posterior unió a la base de dades original a partir de la base de dades *International Protein Index* (IPI) de ratolí elaborada pel *European Bioinformatics Institute*.

Inicialment, les columnes cromatogràfiques es van estirar manualment amb l'ajuda d'una flama d'hidrogen per obtenir una punta amb un diàmetre proper als $10\ \mu\text{m}$ i, a continuació, es van empaquetar amb rebliment de tipus fase reversa i intercanvi catiònic amb bombes d'alta pressió. L'elaboració manual de les columnes cromatogràfiques permet una disposició quasi il·limitada de columnes i suposa un important estalvi econòmic i de temps, ja que per a cada mostra es pot utilitzar una columna nova i obviar-ne el rentat. Tanmateix, les proves realitzades amb aquestes columnes han evidenciat una baixa reproductibilitat en el diàmetre de la punta i s'ha hagut de recórrer a l'ús de columnes comercials per a la resta d'experiments.

Per altra banda, el tractament de les dades obtingudes per espectrometria de masses és un altre punt que ha calgut revisar. En general, els pèptids són identificats a partir dels espectres MS/MS utilitzant un programa informàtic de cerca en bases de dades com SEQUEST o Mascot [310, 311, 312] i, un cop establertes les seqüències peptídiques, aquestes es poden utilitzar per inferir les proteïnes presents en la mostra original.

Com s'ha comentat anteriorment, en els assajos d'identificació s'han utilitzat les comptes espectrals per determinar l'abundància relativa de les proteïnes d'interès i s'ha utilitzat, a més de la base de dades original, una reordenació a l'atzar de la base de dades (*reshuffled*) per minimitzar el percentatge d'identificacions errònies. Tanmateix, la utilització de bases de dades reordenades per a l'estimació dels falsos positius ha estat, en alguns casos, criticada a la bibliografia [315] argumentant que no hi ha un consens generalitzat respecte com generar aquestes bases de dades reordenades: invertides o a l'atzar, separades o unides a l'original, etc. Per aquest motiu, s'han estudiat mètodes d'anàlisi de dades alternatius entre els quals cal destacar la validació estadística tant a nivell de l'assignació de les seqüències peptídiques com en la inferència de les proteïnes presents a la mostra (veure figura 3.29) [316, 317]. Aquesta tècnica ha estat proposada en contraposició a la utilització de bases de dades reordenades com a mètode de control dels falsos positius [315] i permet determinar la presència o absència d'una proteïna a la mostra amb la seva probabilitat associada.

Els resultats d'espectrometria de masses obtinguts a l'Institut de Recerca Biomèdica s'han analitzat tant per comptes espectrals com per validació estadística, i els resultats han permès confirmar en ambdós casos la detecció específica de la POP mitjançant la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂. D'aquesta manera, s'ha aconseguit reproduir amb èxit els resultats de detecció i identificació de la POP obtinguts a *The Scripps Research Institute* i es confirma la correcta implementació—tant de la fase experimental com analítica—de la tècnica MudPIT a l'Institut de Recerca Biomèdica.

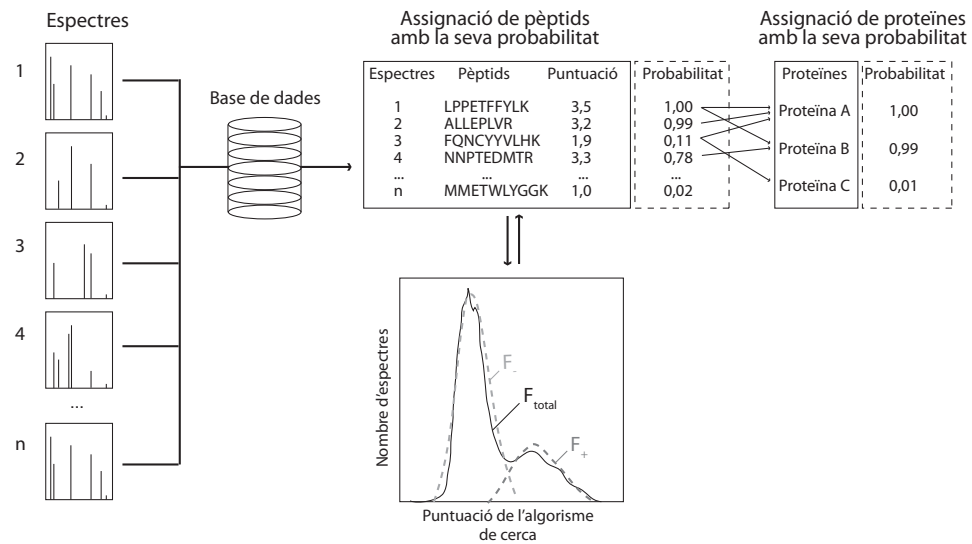


Figura 3.29: Funcionament del mètode de validació estadística emprat en l'anàlisi dels resultats d'espectrometria de masses. Inicialment, el model de validació estadística treballa amb la llista de pèptids assignats i la puntuació de cadascun d'ells obtinguda en la búsqueda a la base de dades. Com que cada assignació es pot classificar únicament com a correcta o incorrecta, la distribució total (F_{total}) de la puntuació de tots els pèptids assignats pot ser representada com una mescla de dues distribucions: les distribucions d'identificacions correctes (F_{+}) i d'identificacions incorrectes (F_{-}). A partir d'aquestes dades es determinen les distribucions més probables de pèptids correctament assignats i incorrectament assignats i per a cada pèptid es calcula la probabilitat de ser correcte. Finalment, el mètode fa un reajust de les probabilitats en el pas d'identificació de les proteïnes presents a la mostra en funció dels pèptids identificats. En aquest sentit, a partir de la llista d'assignacions peptídiques i les seves probabilitats associades el mètode calcula la probabilitat que una proteïna estigui present a la mostra. Cal tenir en compte que, malgrat que el pas de pèptids a proteïnes no és immediat, la majoria de mètodes només realitzen controls a nivell de pèptids, fet que augmenta el percentatge d'errors en la identificació de proteïnes [315, 318].

Resum

En aquest apartat s'han sintetitzat tres noves sondes basades en activitat per a la detecció de la proteïna model protil oligopeptidasa (POP). Concretament, s'han sintetitzat les sondes Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂, Aha-Pro-Pro^P(OPh)OH i Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ en les quals s'ha substituït el grup reactiu de tipus aldehid per un grup covalent i irreversible de tipus fosfonat.

Aquesta substitució ha permès detectar la proteïna model tant per marcatge directe en gels de fluorescència com per espectrometria de masses (MudPIT). Aquests resultats han permès resoldre els problemes sorgits amb les sondes de tipus aldehid i han confirmat les sospites que l'enllaç covalent i reversible dels aldehids és el responsable dels resultats obtinguts en l'apartat anterior.

Així mateix, el fet de poder detectar selectivament la POP únicament quan s'utilitza una sonda basada en un substrat conegut ha permès validar el disseny metodològic i confirmar que la incorporació de dos aminoàcids en la regió espaciadora de la sonda és suficient per conferir-li la selectivitat desitjada.

3.1.4 Retorn a les sondes de tipus aldehid

En els apartats anteriors, la utilització de sondes de tipus 1-aminoalcanofosfonat de dialquil ha permès la visualització de l'activitat de la proteïna protil oligopeptidasa (POP) en gels de poliacrilamida i la seva detecció per espectrometria de masses (2D LC-MS/MS). Els bons resultats aconseguits amb les sondes de tipus 1-aminoalcanofosfonat de dialquil semblen indicar que l'enllaç covalent reversible dels aldehids no seria suficient per utilitzar aquest grup funcional per al disseny de sondes basades en activitat. Per confirmar aquest punt es vol modificar i adaptar les sondes de tipus aldehid d'apartats anteriors perquè incorporin un grup que estableixi un enllaç irreversible entre la sonda i l'enzim diana.

En aquest sentit, existeixen a la bibliografia alguns exemples d'adaptació d'inhibidors no covalents per al disseny de sondes basades en activitat. Un dels casos més explorats ha estat l'estudi funcional de les proteïnes metal·loproteasa que es caracteritzen perquè el seu mecanisme catalític es basa en l'acció d'una molècula d'aigua activada per zinc que no condueix a la formació d'intermediaris covalents. Per superar aquesta limitació i poder desenvolupar sondes basades en activitat a partir d'inhibidors no covalents Chan *et al.* [72] i Saghatelian *et al.* [38] han incorporat grups fotoreactius en inhibidors de tipus hidroximat [319] que permeten, un cop posicionats al centre actiu, la creació per fotoentrecreuament d'enllaços covalents irreversibles entre el grup fotoreactiu i l'enzim. La formació d'un enllaç covalent fotoinduït permet la utilització d'aquests compostos com a sondes basades

en activitat per a la caracterització funcional del proteoma.

Anteriorment, Li *et al.* ja havien realitzat un estudi que contemplava la incorporació d'un grup fotoreactiu en sondes basades en hidroxietilens i inspirades en l'inhibidor reversible L-685,458 [52, 320] per a la caracterització de la proteïna aspàrtic proteasa γ -secretasa [320]. De la mateixa manera que les proteïnes metal·loproteasa, les proteïnes aspàrtic proteasa utilitzen una molècula d'aigua en el seu mecanisme catalític que té lloc sense la formació d'intermediaris covalents entre el substrat i l'enzim. D'aquesta manera, la incorporació d'un grup fotoreactiu permet la conversió d'inhibidors reversibles en sondes basades en activitat.

Donats aquests precedents, s'ha decidit sintetitzar sondes de tipus aldehyd que incorporin un grup fotoreactiu per tal d'intentar convertir l'enllaç covalent reversible dels aldehyds en una unió irreversible que permeti l'etiquetat de les proteïnes d'interès i la seva anàlisi posterior per tècniques electroforètiques i espectroscòpiques. Amb aquestes sondes es pretén poder detectar específicament la POP i superar així els problemes sorgits amb les sondes inicials de tipus aldehyd.

Com ja s'ha comentat anteriorment, la posada a punt d'unes sondes de tipus aldehyd per a la detecció de proteïnes proteolítiques és de gran interès per les característiques que ofereixen aquests compostos. En primer lloc, aquestes sondes permetrien l'exploració basada en activitat del proteoma amb independència de la classe enzimàtica de les proteïnes diana. Així mateix, per la seva similitud amb els substrats naturals, els aldehyds es presenten com a excel·lents grups reactius per a les sondes ja que minimitzen els impediments estèrics entre la sonda i la proteïna. I finalment, cal destacar que els grups aldehyds són compatibles amb la síntesi en fase sòlida, fet que permet obtenir les sondes amb facilitat i sintetitzar biblioteques amb múltiples combinacions aminoacídiques per modular-ne la selectivitat.

En aquest context, s'han dissenyat tres sondes de tipus aldehyd que incorporen dos residus de prolina a les posicions P1 i P2, i un grup fotoreactiu de tipus benzofenona situat en una posició variable per assegurar l'entrecreuament i minimitzar els impediments estèrics (veure figura 3.30). A diferència de les sondes anteriors de tipus aldehyd, aquestes sondes incorporen un triple enllaç terminal de forma equivalent a les sondes de tipus fosfonat. Un cop fet el marcatge funcional del proteoma, aquest grup permet la incorporació d'etiquetes amb grups fluorescents o amb biotina per cicloaddició [2+3] de Huisgen que faciliten la detecció i la purificació de les proteases d'interès, ja sigui per gels de fluorescència o per espectrometria de masses. La síntesi de les noves sondes de tipus aldehyd s'ha realitzat en suport sòlid utilitzant una resina semicarbazida [264, 265] com ja s'havia fet anteriorment. Per evitar la formació de dicetopiperazines s'han sintetitzat els compostos intermediaris Fmoc-Bpa-Pro-OH, Fmoc-Ahx-Pro-OH i Fmoc-Peg-Pro-OH que

s'han utilitzat per a la síntesi de Aha-Bpa-Pro-Pro-H (Rendiment = 59 %), Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H (Rendiment = 51 %) i Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H (Rendiment = 66 %).

Els assajos d'inhibició per competició amb el fluorofosfonat de rodamina han confirmat l'activitat inhibidora dels tres compostos sintetitzats i per tant, permeten afirmar que la incorporació del grup fotoreactiu, en qualsevol de les seves posicions, no altera significativament el comportament de les sondes aldehid (veure figura 3.30).

Un cop sintetitzades les sondes i establerta la seva capacitat inhibidora s'ha comprovat si l'estratègia del fotoentrecruament permet a les sondes aldehid etiquetar específicament la hrPOP pura en la seva forma activa i distingir-la de la seva forma inactiva. La realització d'assajos de caracterització funcional en gels de poliacrilamida en les condicions d'irradiació de Salisbury *et al.* [321] permet observar que a concentracions baixes (1 μM) qualsevol de les tres sondes sintetitzades pot distingir l'estat actiu i inactiu (desnaturalització per temperatura) de la proteïna (veure figura 3.31). En canvi, quan s'augmenta la concentració de les sondes, els fenòmens de fotoentrecruament inespecífics augmenten considerablement impeding la distinció entre les formes enzimàtiques actives i les inactives. Com a conseqüència d'aquests resultats s'ha establert una concentració de 1 μM com la concentració òptima de sonda per als assajos posteriors.

Els assajos de caracterització funcional amb sondes fotoreactives solen dividir-se en dues etapes. La primera etapa consisteix en la incubació de la sonda i el proteoma (25 °C) per permetre el correcte posicionament de la sonda al centre actiu de les proteïnes diana. En canvi, a la segona etapa es realitza el procés de fotoentrecruament per irradiació ($\lambda = 365 \text{ nm}$, 4 °C) entre la sonda i les proteïnes. Resulta evident que qualsevol modificació de la durada de cadascuna d'aquestes etapes pot fer variar el grau d'especificitat i la intensitat de la senyal dels assajos de caracterització funcional. A tall d'exemple, es podria argumentar que la supressió de la primera etapa provocaria l'aparició de processos de fotoentrecruament inespecífics, mentre que l'escurçament de la segona etapa podria disminuir els processos de fotoentrecruament i per tant, disminuir la intensitat de la senyal. Per aquest motiu és important optimitzar les condicions d'incubació i irradiació dels assajos de caracterització funcional. Inicialment, aquests assajos s'han realitzat en mostres d'extracte de cervell de ratolí amb hrPOP afegida i la sonda Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H (1 μM) (veure figura 3.32). Aquests assajos permeten observar que la reducció del temps d'irradiació de 60 minuts a 30 minuts comporta una disminució de la intensitat de la senyal i que els temps òptims d'incubació i irradiació per als assajos de caracterització funcional són 15 minuts (o 30 minuts) per a la primera etapa i 60 minuts per a la segona (veure figura 3.32). Com a conseqüència d'aquests resultats s'ha establert un

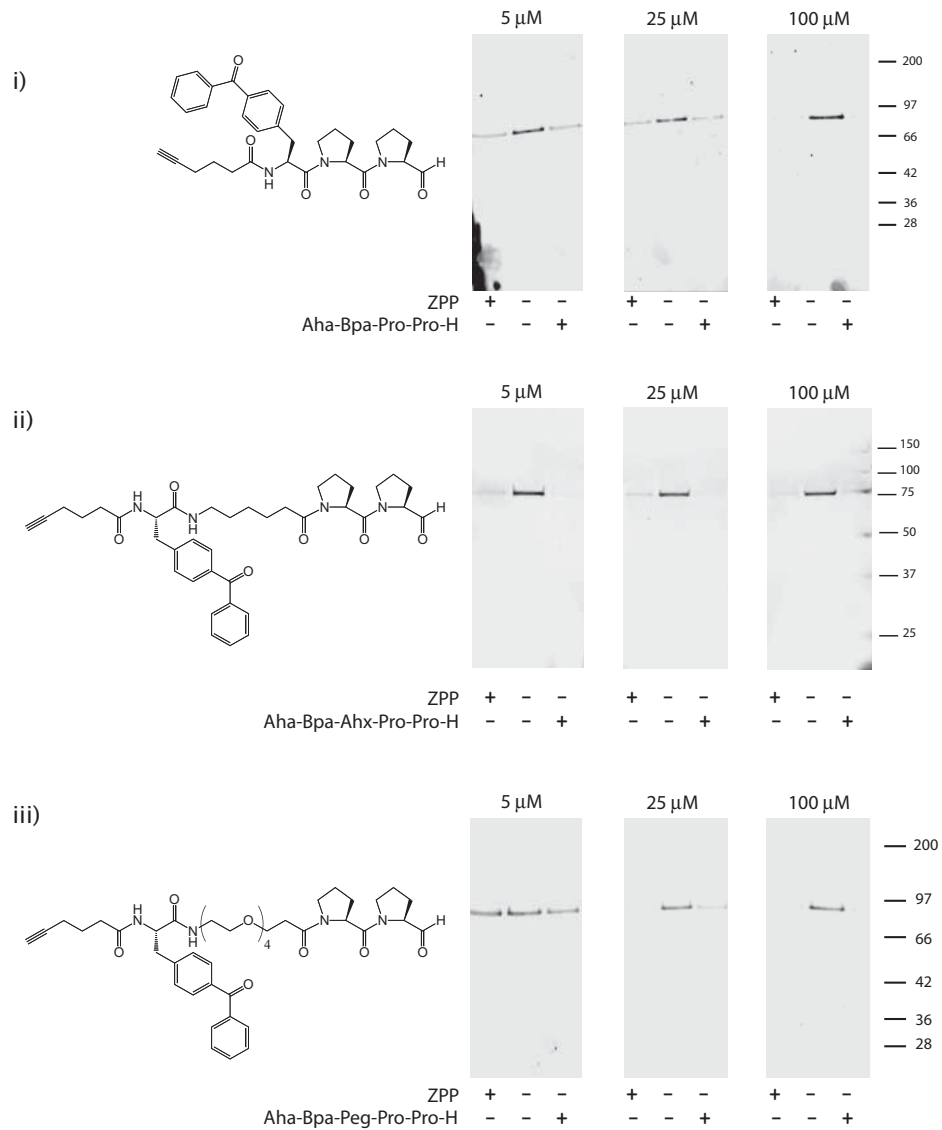


Figura 3.30: Esquema de l'assaig d'inhibició per competició amb el fluorofosfonat de rodamina per a l'avaluació de les sondes de tipus aldehyd. Cada mostra conté hrPOP amb Z-Pro-Pro-H (ZPP, 5 μ M, 25 μ M i 100 μ M) o Aha-Bpa-Pro-Pro-H (i), Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H (ii), i Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H (iii) a diferents concentracions (5 μ M, 25 μ M i 100 μ M).

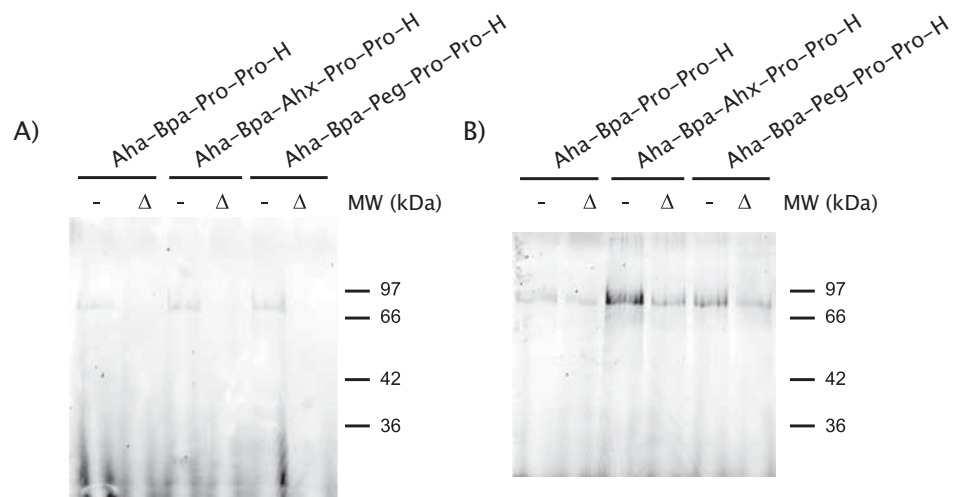


Figura 3.31: Optimització de la concentració de les sondes aldehyd Aha-Bpa-Pro-Pro-H, Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H i Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H. Cada carril conté 250 ng de hrPOP etiquetada amb les diferents sondes aldehyd a 1 μ M (A) i 25 μ M (B). Totes les mostres s'han agitat a 25 °C durant 15 minuts i, posteriorment s'han irradiat 60 minuts a 4 °C amb llum ultraviolada ($\lambda = 365$ nm) per a la inducció del fotoentrecruament entre la benzofenona i l'enzim.

temps de 15 minuts per a la primera etapa i 60 minuts per a la segona com la temporització òptima per als assajos posteriors. Així mateix, la utilització d'extracte de cervell de ratolí amb hrPOP afegida, en comptes de hrPOP pura, permet comprovar que les sondes no només detecten la proteïna POP en condicions privilegiades de proteïna pura sinó també en condicions menys favorables en les quals milers de proteïnes que podrien segrestar, inactivar o degradar les sondes, competeixen amb la proteïna d'interès.

Determinades les condicions òptimes d'incubació i irradiació i la concentració òptima de sonda, s'han realitzat assajos funcionals per a la detecció de la POP en extracte de cervell de ratolí. Inicialment, aquests assajos s'han realitzat en mostres d'extracte de cervell de ratolí amb hrPOP afegida (veure figura 3.33). Aquests assajos permeten afirmar que amb les mateixes condicions, la sonda Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H detecta la POP amb una intensitat lleugerament superior a les sondes Aha-Bpa-Pro-Pro-H i Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H. Aquests resultats es deuen a l'estereoquímica de les diferents sondes ja que segons la posició del residu de benzofenona poden aparèixer problemes estèrics o, per contra, es pot afavorir l'establiment d'enllaços covalents per fotoentrecreuament.

En canvi, en els assajos amb mostres d'extracte de cervell sense hrPOP afegida no es detecta la POP de ratolí amb cap de les tres sondes de tipus aldehid utilitzades (veure figura 3.34). El grau de sensibilitat de les sondes fotoreactives de tipus aldehid s'ha determinat amb un assaig amb extracte de cervell de ratolí amb diferents quantitats de hrPOP afegida (2,5 – 250 ng). Aquestes mostres han estat etiquetades amb la sonda Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H i s'ha establert que la sensibilitat d'aquesta sonda permet la detecció de fins a 10 ng de POP en gels desnaturalitzants de poliàcrilamida (veure figura 3.35). La quantitat de POP endògena en cervell de ratolí s'ha estimat per densiometria en transferència de Western en uns 10 ng per cada 150 μg de proteïnes totals. Això implica que en els assajos de marcatge directe en gels de fluorescència es treballa amb 1,6 ng de POP endògena, quantitat inferior al límit de detecció d'aquestes sondes.

Cal tenir en compte que a diferència de les sondes de tipus fosfonat, que s'utilitzen a concentracions de 25 μM i 100 μM , les sondes de tipus aldehid s'han d'utilitzar a concentracions menors (1 μM) per tal d'obtenir una bona relació entre les senyals específiques i les inespecífiques. Aquesta menor concentració de treball, juntament amb la introducció del pas addicional de fotoentrecreuament, podrien explicar la menor sensibilitat observada per a aquestes sondes en comparació amb les sondes de tipus fosfonat. Tanmateix, la introducció d'altres mètodes d'anàlisi més sensibles, com l'espectrometria de masses, o la introducció d'estratègies per augmentar la concentració de sonda sense malmetre l'especificitat podrien millorar el límit de detecció i situar aquestes sondes al nivell de les sondes de tipus fosfonat.

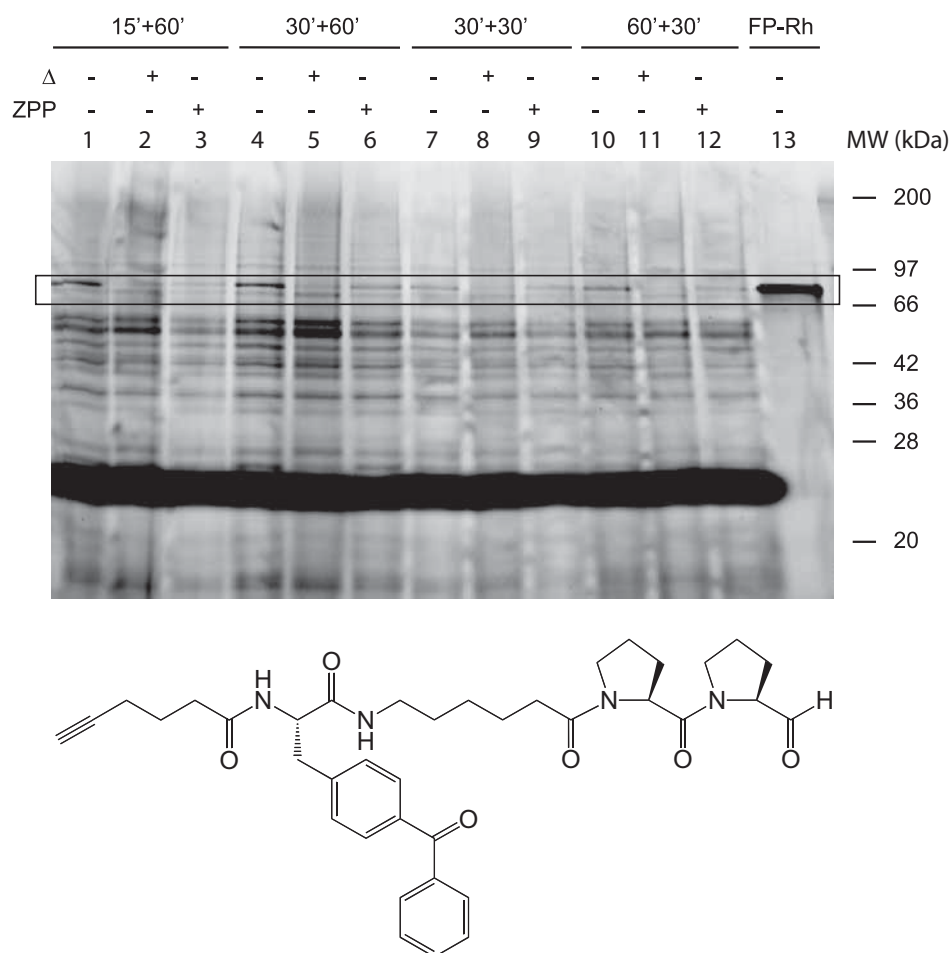


Figura 3.32: Optimització de les condicions per a la detecció de POP amb la sonda aldehyd Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H ($1 \mu\text{M}$). Cada carril conté extracte de cervell de ratolí amb 250 ng de hrPOP afegida. Per a les diferents mostres s'han assajat diferents temps d'agitació a 25°C i d'irradiació amb llum ultraviolada ($\lambda = 365 \text{ nm}$, 60 min, 4°C) per a la inducció del fotoentrecreuament entre la benzofenona i l'enzim; p. e., una mostra 15' + 60' ha estat 15 minuts en agitació a 25°C i 60 minuts a 4°C en irradiació (condicions de Salisbury *et al.* [321]). L'últim carril correspon a 250 ng de hrPOP pura etiquetada amb el fluorofosfonat de rodamina ($1 \mu\text{M}$) sense irradiació utilitzada com a control.

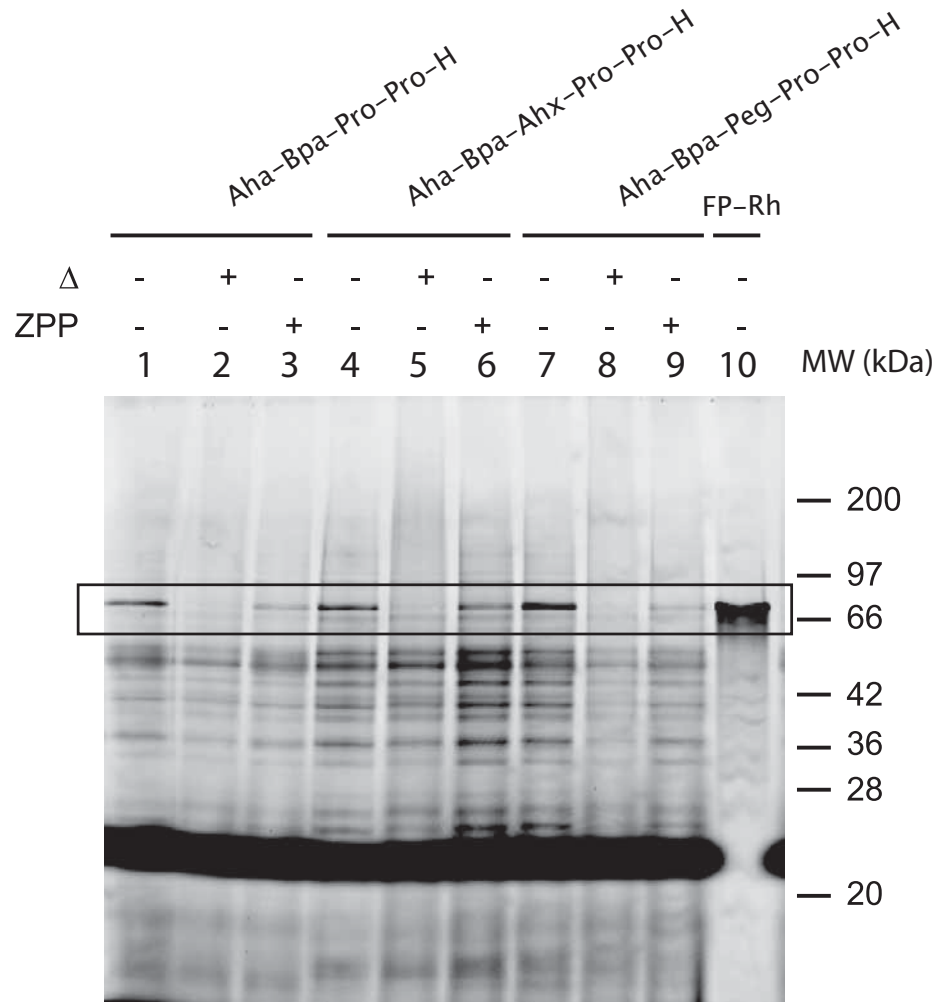


Figura 3.33: Detecció de la proteïna prolil oligopeptidasa en extractes de cervell de ratolí amb hrPOP. Cada carril conté extracte de cervell de ratolí i hrPOP (250 ng) etiquetats amb les sondes aldehyd Aha-Bpa-Pro-Pro-H (carrils 1-3), Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H (carrils 4-6) i Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H (carrils 7-9) a $1 \mu\text{M}$. Un cop afegides les sondes, totes les mostres han estat en agitació 15 minuts a 25°C i en irradiació 60 minuts a 4°C amb llum ultraviolada ($\lambda = 365 \text{ nm}$) per a la inducció del fotoentrecreuament entre la benzofenona i l'enzim. L'últim carril correspon a 250 ng de hrPOP pura etiquetada amb el fluorofosfonat de rodamina ($1 \mu\text{M}$) sense irradiació utilitzada com a control.

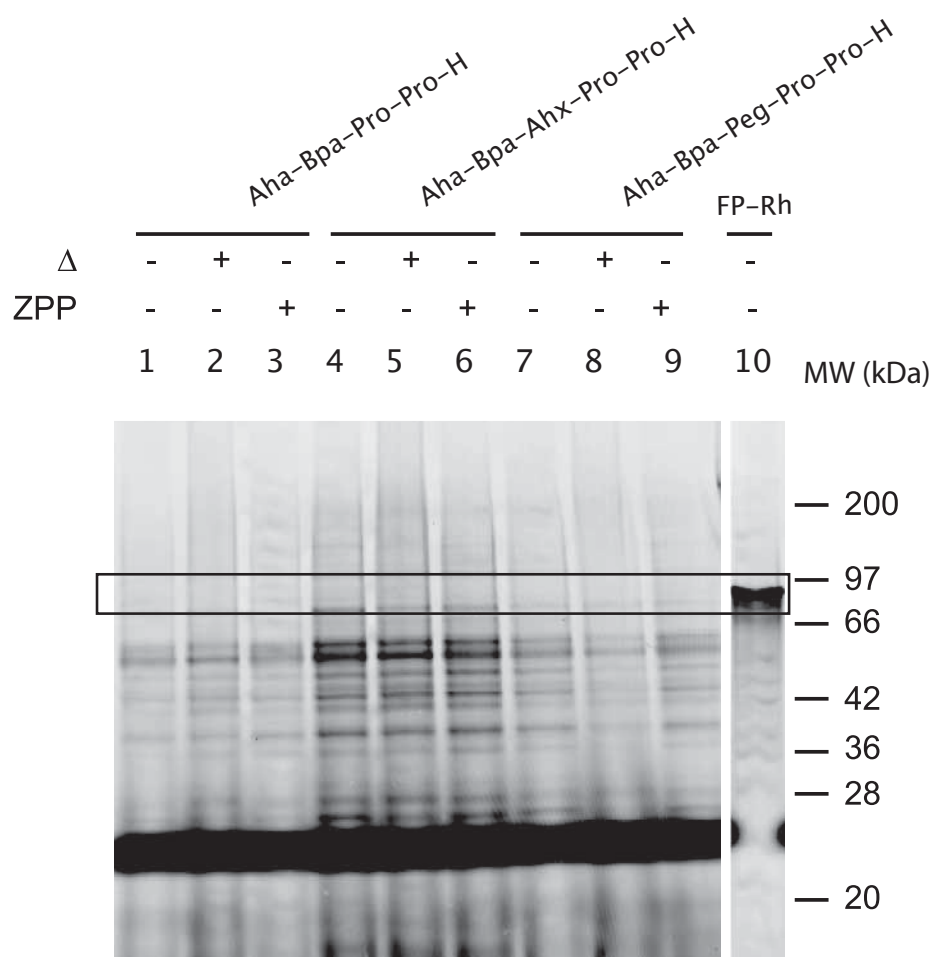


Figura 3.34: Detecció de proteïna prolil ologopeptidasa en extractes de cervell de ratolí. Cada carril conté extracte de cervell de ratolí etiquetat amb les sondes aldehyd Aha-Bpa-Pro-Pro-H (carrils 1-3), Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H (carrils 4-6) i Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H (carrils 7-9) a $1 \mu\text{M}$. Un cop afegides les sondes, totes les mostres han estat en agitació 15 minuts a 25°C i en irradiació 60 minuts a 4°C amb llum ultraviolada ($\lambda = 365 \text{ nm}$) per a la inducció del fotoentrecreuament entre la benzofenona i l'enzim. L'últim carril correspon a 250 ng de hrPOP pura etiquetada amb el fluorofosfonat de rodamina ($1 \mu\text{M}$) sense irradiació utilitzada com a control.

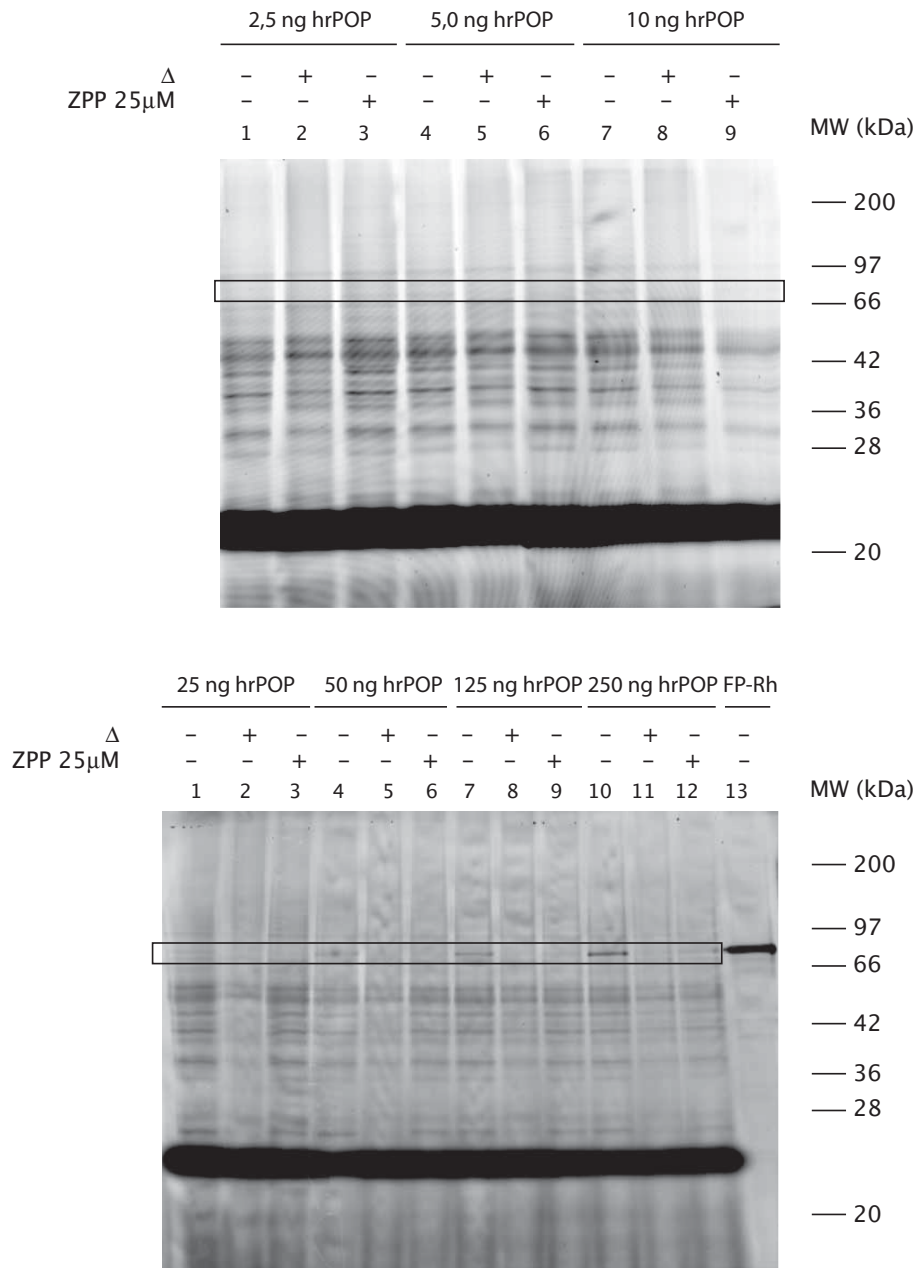


Figura 3.35: Determinació del límit de detecció de POP amb la sonda al·dehid Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H mitjançant electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida. Cada carril conté extracte de cervell de ratolí amb diferents quantitats de hrPOP afegida (2,5 – 250 ng). Totes les mostres s'han mantingut en agitació 15 minuts a 25 °C i posteriorment han estat irradiades amb llum ultraviolada ($\lambda = 365$ nm, 60 min, 4 °C) per induir el fotoentrecreuament entre la benzofenona i l'enzim. L'últim carril correspon a 250 ng de hrPOP pura etiquetada amb el fluorofosfonat de rodamina (1 μ M) sense irradiació utilitzada com a control.

Finalment, la sonda Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H s'ha utilitzat per repetir els assajos d'immobilització del complex proteïna – inhibidor que s'havien fet en apartats anteriors amb sonda aldehyd biotinilada (veure secció 3.1.2). Aquests assajos s'han realitzat per fotoentrecreuament mantenint les concentracions relatives de hrPOP (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i sonda (1 μM), que anteriorment han permès la detecció específica de hrPOP en gels fluorescents (veure figura 3.31). Un cop format el complex proteïna – sonda, s'ha incorporat una etiqueta de biotina per cicloaddició, s'ha immobilitzat el complex en avidina unida a suport sòlid i, després dels rentats pertinents, s'ha procedit a la detecció tant per transferència de Western com per espectrometria de masses (LC-MS/MS) (veure figura 3.36).

Ambdues estratègies han permès detectar la POP de forma específica. Aquests resultats confirmen que els problemes d'immobilització i detecció específica de la proteïna amb les versions anteriors de tipus aldehyd es devien a l'absència d'un enllaç covalent i irreversible.

Així mateix, amb aquests resultats, es pot afirmar que s'ha desenvolupat un nou tipus de sonda basada en activitat formada per la combinació d'un grup reactiu de tipus aldehyd, un grup benzofenona fotoreactiu i una cadena peptídica que permet determinar la selectivitat de la sonda per dirigir-la a determinats subconjunts enzimàtics. El desenvolupament d'aquestes sondes obre les portes a la detecció, basada en activitat, de múltiples classes enzimàtiques com les proteïnes serina proteasa, cisteïna proteasa i metal·loproteasa i, juntament amb la reducció dels problemes estèrics, la facilitat de síntesi i la possibilitat d'elaborar biblioteques amb diferents combinacions aminoacídiques, esdevenen una eina de gran valor per a la cerca de noves dianes terapèutiques i l'estudi de complexos proteïcs.

Resum

En aquest apartat s'ha tornat a treballar amb les sondes de tipus aldehyd amb l'objectiu de redissenyar-les i desenvolupar sondes basades en activitat. En aquest sentit, s'ha introduït un grup fotoreactiu que permet, un cop posicionades al centre actiu, establir un enllaç covalent i irreversible entre la proteïna d'interès i la sonda. Amb aquesta estratègia s'ha aconseguit sintetitzar un nou tipus de sondes basades en activitat caracteritzades per la presència d'un grup reactiu de tipus aldehyd i una benzofenona. Les sondes desenvolupades, amb dos residus de prolina, permeten la detecció específica de la proteïna prolil oligopeptidasa (POP), però la substitució dels dos residus de prolina per combinacions aminoacídiques diverses ha de permetre utilitzar aquest nou tipus de sonda per a l'estudi de diverses classes enzimàtiques de forma específica i selectiva.

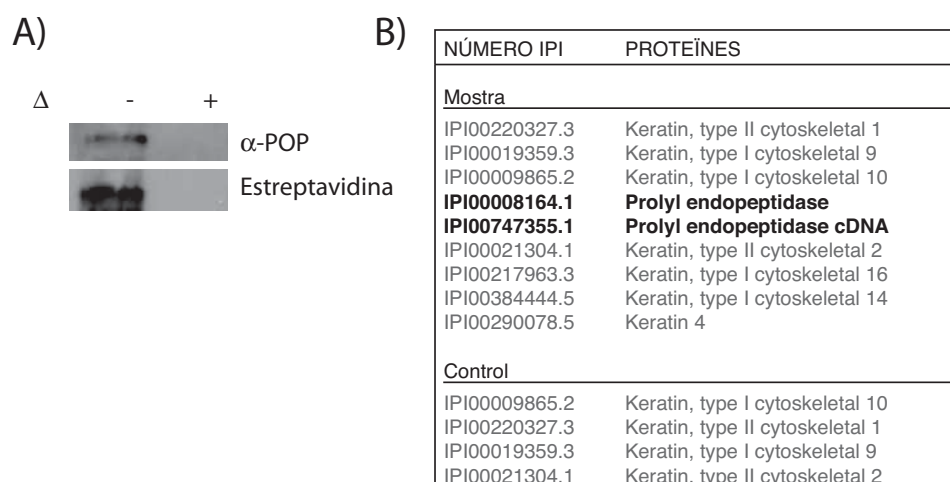


Figura 3.36: Assaig d'immobilització del complex proteïna – inhibidor amb la sonda Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H. A) Immunodetecció per transferència de Western del complex hrPOP – sonda biotinitada després d'un fotoentrecreuament entre hrPOP (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i la sonda Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H (1 μM) i una immobilització en avidina unida a suport sòlid seguint el protocol de preparació de mostres per a MudPIT. Totes les mostres s'han mantingut en agitació 15 minuts a 25 $^{\circ}\text{C}$ i posteriorment han estat irradiades amb llum ultraviolada ($\lambda = 365 \text{ nm}$, 60 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) per induir el fotoentrecreuament entre la benzofenona i l'enzim. B) Detecció per espectrometria de masses (LC-MS/MS) del complex hrPOP – sonda biotinitada processat com a l'a-partat anterior. A la figura es mostren les proteïnes identificades i validades estadísticament tant en les mostres com en els controls; els experiments s'han fet per duplicat.

3.2 Exploració del proteoma per a la identificació de noves proteases

3.2.1 Introducció

En les últims anys, s'han realitzat nombrosos estudis per al descobriment i caracterització de nous neuropèptids que s'han vist accelerats amb l'aparició de les tècniques de proteòmica i la seva aplicació en el camp de les neurociències [322, 164, 165, 166, 167, 168]. Aquests estudis han permès descriure nombrosos neuropèptids derivats de precursors com les cromogranines A i B, la secretonina II, la proopiomelanocortina i la proencefalina, entre d'altres [323, 172, 324, 325, 177]. Alguns d'aquests neuropèptids estan flanquejats en el precursor per seqüències consens típiques d'un procés de biosíntesi clàssica com el PE-11 [173, 175] i la secretoneurina [326, 327, 328], mentre que altres estan situats en seqüències que suggereixen un processament proteolític no convencional [172, 176]. En aquest sentit, s'han descrit nombroses seqüències atípiques en els precursors del factor plaquetari 4 [329, 148], dels neuropèptids FF i SF [330] i de diversos neuropèptids derivats de la secretogranina II i la cromogranina A i B [172, 176] (veure taula 3.2).

Precisament, en aquest punt de la tesi, es pretén utilitzar aquestes seqüències atípiques, de les quals se'n desconeix la proteasa que les processa, per a la síntesi de sondes basades en activitat. D'aquesta manera, un cop posada a punt la metodologia amb la proteïna prolil oligopeptidasa (POP), la utilització d'aquestes sondes en l'etiquetat del proteoma i l'anàlisi en gels de fluorescència i MudPIT, hauria de facilitar l'aïllament i caracterització d'aquestes proteases.

Per al disseny de les sondes basades en activitat, s'han escollit diverses seqüències de la cromogranina B, una proteïna precursora present en els grànuls de secreció de diversos teixits neuroendocrins [174, 331, 332] que genera múltiples productes per processament proteolític [333, 177]. Concretament, s'han escollit les seqüències Asp-Trp-↓Trp, Arg-Trp-↓Trp, Ala-Leu-↓Phe, Arg-Leu-↓Gly i Glu-Leu-↓Gln, descrites en diversos estudis d'identificació i caracterització de neuropèptids [172, 177]. L'elecció d'aquestes seqüències s'ha basat en l'elevat grau de conservació que presenten entre diferents espècies de mamífer i en l'existència de diversos precedents en el processament de seqüències de tipus Trp-↓ i Leu-↓ (veure figura 3.37). En aquest sentit, cal recordar que la presència de residus hidrofòbics, com la leucina, és recurrent en moltes seqüències atípiques (veure taula 1.5) i a la bibliografia s'han descrit alguns enzims com les proteïnes ECE (*Endothelin converting enzyme*) que processen les endotelines en seqüències Trp-↓Val i Trp-↓Ile.

D'aquesta manera, s'han dissenyat les sondes Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂, Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂, Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂, Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂, Aha-Glu-

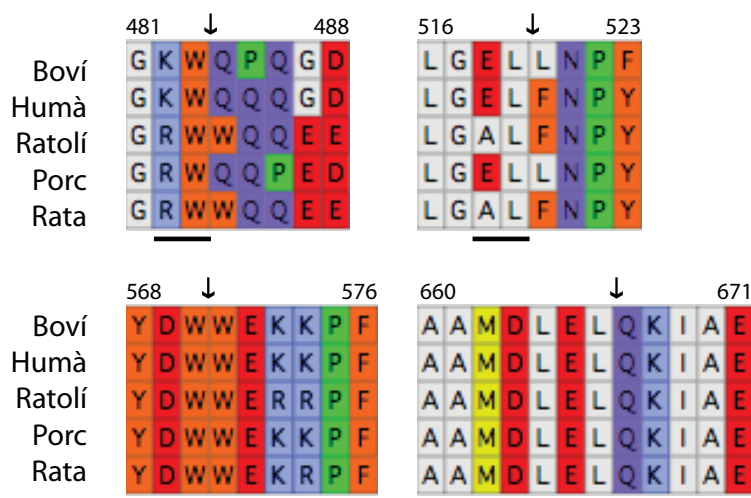


Figura 3.37: Alineament múltiple de la seqüència de tall (↓) de diversos fragments derivats de la proteïna cromogranina B en diverses espècies de mamífer. L'alineament s'ha realitzat amb el programari Kalign (EMBL-EBI) [334] i la numeració correspon als residus aminoacídics de la seqüència de ratolí. La barra inferior resalta els residus aminoacídics P1 i P2 que s'utilitzaran per al disseny i la síntesi de les noves sondes basades en activitat.

$\text{Leu}^P(\text{OPh})_2$, $\text{Aha-Glu-Leu}^P(\text{OEt})_2$, $\text{Aha-Asp-Trp}^P(\text{OPh})_2$ i $\text{Aha-Asp-Trp}^P(\text{OEt})_2$ que s'utilitzaran per explorar el proteoma de glàndula pituïtària i cervell de ratolí a la recerca de proteïnes que processin la cromogranina B per les seqüències descrites (veure figura 3.38). La utilització d'un fosfonat com a grup reactiu, en comptes d'un grup aldehyd, es justifica pel fet que el desenvolupament correcte de les sondes de tipus aldehyd (veure *Retorn a les sondes aldehyd*) és cronològicament posterior.

3.2.2 Noves sondes de tipus fosfonat

Síntesi de $\text{Aha-Ala-Leu}^P(\text{OPh})_2$ i $\text{Aha-Ala-Leu}^P(\text{OEt})_2$

La síntesi de l'1-aminoalcanofosfonat de difenil anàleg de la leucina s'ha fet mitjançant un esquema de síntesi en cinc etapes (veure figura 3.39). Inicialment, s'ha realitzat una α -amidoalquilació del fosfit de trifenil amb benzilcarbamat i 3-metilbutanal en àcid acètic, segons el mètode general descrit per Oleksyszyn [335], per obtenir **15** en forma de mescla racèmica (Rendiment = 77 %).

A continuació, s'ha desprotegit el grup benziloxycarbonil per obtenir **16** (Rendiment = 92 %) i s'ha acoblat el compost Boc-Ala-OH per obtenir **17** (Ren-

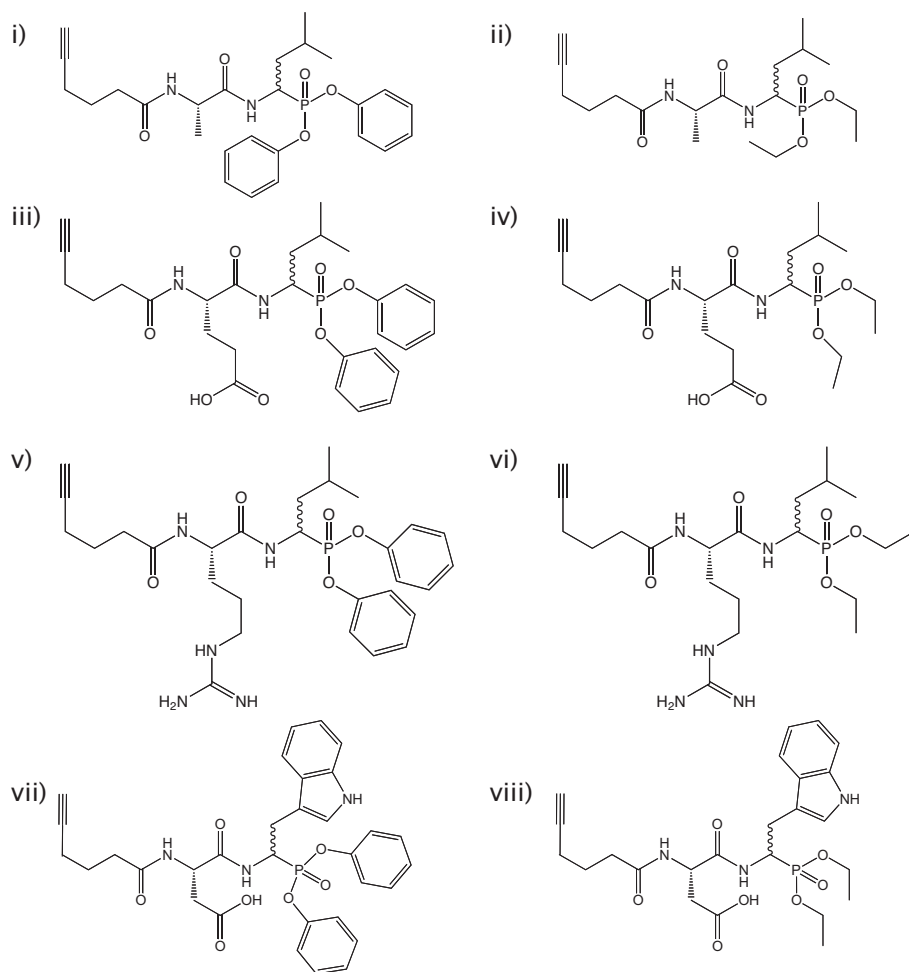


Figura 3.38: Estructura de les noves sondes de tipus fosfonat: i) Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂, ii) Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂, iii) Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂, iv) Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂, v) Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂, vi) Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂, vii) Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i viii) Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂.

Taula 3.2: Algunes seqüències atípiques derivades de la identificació i caracterització de nous neuropèptids.

Precursor	Seqüència	Teixit	Referència
proFF-SF	Gln-Ala-↓Phe	Pituitària i Cervell	[330]
	Phe-Trp-↓Ser	Cervell	[330]
NAP-2	Leu-Tyr-↓Ala	Cèl. Endotelials	[148]
PF-4	Ala-Asp-↓Glu	Cèl. Endotelials	[148]
	Thr-Thr-↓Ser	Cèl. Endotelials	[148]
Cg A	Lys-Glu-↓Leu	Med. Adrenal	[176]
	Asp-Asn-↓Arg	Med. Adrenal	[176]
Cg B	Asp-Gln-↓Leu	Med. Adrenal	[176]
	Glu-Leu-↓Gln	Med. Adrenal	[176]
	Glu-Ile-↓Lys	Med. Adrenal	[176]
	Glu-Leu-↓Gln	Med. Adrenal	[177]
	Pro-Gln-↓Glu	Med. Adrenal	[177]
	Ala-Met-↓Asp	Med. Adrenal	[177]
	Ser-Ser-↓Met	Med. Adrenal	[177]
	Ser-Ala-↓Ala	Med. Adrenal	[177]
	Leu-Asn-↓Gln	Med. Adrenal	[177]
	Arg-Trp-↓Trp	Pituitària	[172]
	Arg-Leu-↓Gly	Pituitària	[172]
	Ala-Leu-↓Phe	Pituitària	[172]
Asp-Trp-↓Trp	Pituitària	[172]	
Sg II	Gln-Ala-↓Phe	Med. Adrenal	[176]

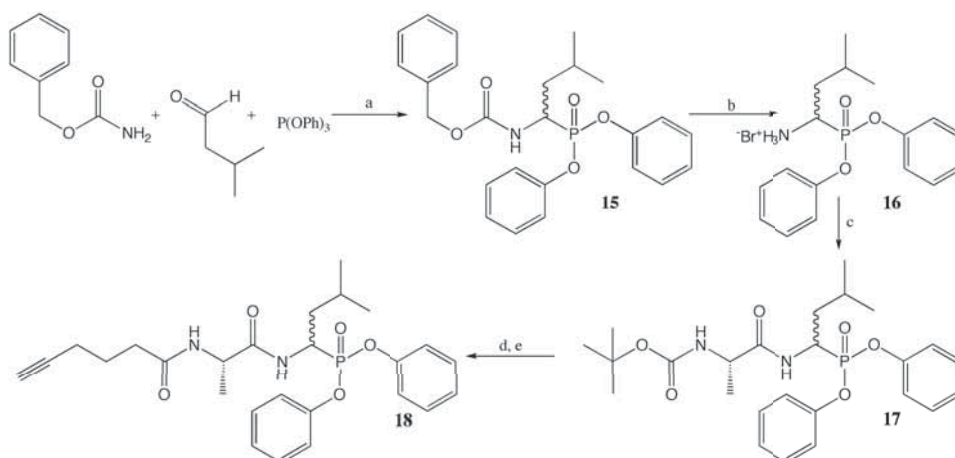


Figura 3.39: Esquema de la síntesi de Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂. a) Àcid acètic, 1 h a 25 °C i 16 h a 50 °C. b) HBr en àcid acètic, 1 h a 25 °C. c) HATU (1 eq), DIEA (2 eq) i Boc-Ala-OH (1 eq) en DMF, 16 h a 25 °C. d) 4 M HCl en 1,4-dioxà (25 ml/mmol) en gradient de 0 °C a 25 °C, 30 min. e) HATU (1 eq), DIEA (2 eq) i àcid 5-hexinoic (1 eq) en DMF, 16 h a 25 °C.

diment = 99 %). Finalment, la desprotecció del grup Boc (Rendiment = 96 %) i l'acoblament de l'àcid 5-hexinoic ha permès obtenir la sonda Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ (**18**) amb bon rendiment (Rendiment = 68 %).

La conversió de **18** a Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ (**19**) s'ha dut a terme per la reacció de transesterificació descrita per Szewczyk [296] i ja utilitzada anteriorment per a la síntesi de Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (**13**) (Rendiment = 66 %, veure figura 3.40).

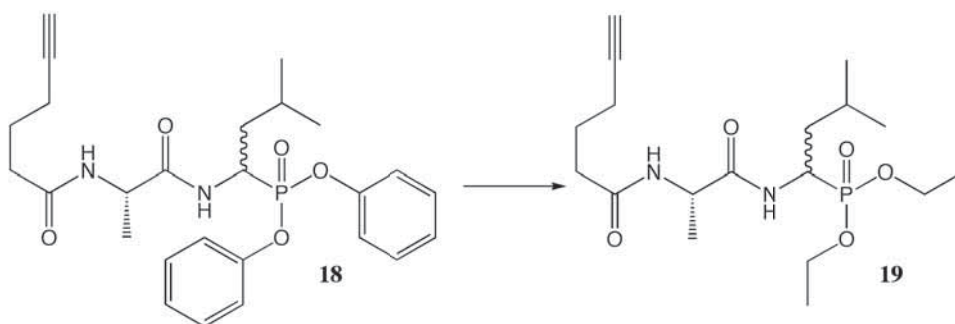


Figura 3.40: Esquema de la síntesi de Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ per transesterificació de Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂. KF (10 eq) i éter 18-corona-6 en etanol, 10 min a 80 °C i 16 h a 25 °C.

Síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂

En la síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂, la presència d'un residu d'arginina obliga a plantejar-se una estratègia de síntesi alternativa en la qual es protegeixi convenientment la cadena lateral d'aquest aminoàcid. En aquesta nova estratègia cal utilitzar un grup protector pel grup NH₂ del C_α i un grup protector pel grup guanidini de la cadena lateral de caràcter ortogonal i que no requereixin la hidrogenació com a mètode de desprotecció ja que s'ha descrit la substitució dels grups *O,O*-diaril dels 1-aminoalcanofosfonats en processos d'hidrogenació [336].

Inicialment, es va decidir sintetitzar la sonda Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ utilitzant la parella de Boc i Cbz com grups protectors del grup N_{ter} i del grup guanidini, respectivament, ja que el grup protector Boc es pot eliminar de forma selectiva, sense afectar el grup Cbz, amb HCl 4 M en 1,4-dioxà [337, 338] (veure figura 3.41).

Malauradament, la desprotecció del grup Cbz del compost **22** no va generar el producte desitjat, sinó una mescla complexa de difícil caracterització, segurament, per l'aparició de reaccions d'addició electròfila del HBr —utilitzat durant la desprotecció— sobre el triple enllaç.

Els problemes sorgits en l'estratègia anterior van portar a plantejar-se noves vies de síntesi per a l'obtenció de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ que evitin la presència de HBr i que superin les incompatibilitats dels grups protectors. Així doncs, s'ha utilitzat una nova via de síntesi en la qual s'ha obtingut la sonda Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ a partir de **16** i Fmoc-Arg(Pbf)-OH (veure figura 3.42). En aquest cas, s'han utilitzat els grups protectors Fmoc i Pbf que presenten l'ortogonalitat desitjada i substitueixen l'ús de HBr per TFA que no malmet el triple enllaç de l'àcid 5-hexinoic, tal i com s'ha comprovat, prèviament, en la síntesi en fase sòlida de les sondes aldehid.

Aquesta nova via de síntesi basada en els grups protectors Fmoc i Pbf ha permès l'obtenció de les sondes Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂, però l'eliminació en solució del grup protector Fmoc és complicada i poc eficaç i genera rendiments baixos. Per evitar aquest pas de desprotecció i, d'aquesta manera, millorar els rendiments, s'ha repetit la síntesi anterior combinant estratègies de síntesi en fase sòlida i de síntesi en solució. Concretament, s'ha realitzat una adaptació de l'estratègia de síntesi en solució assistida per polímer emprada per Senten *et al.* [339] en la qual s'ha utilitzat *N,N'*-díciclohexilcarbodiimida unida a suport sòlid per sintetitzar **23** a partir de **16** i **27** amb bon rendiment (veure figura 3.43). La sonda Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ (**28**) s'ha obtingut per transesterificació de **26** (veure figura 3.44).

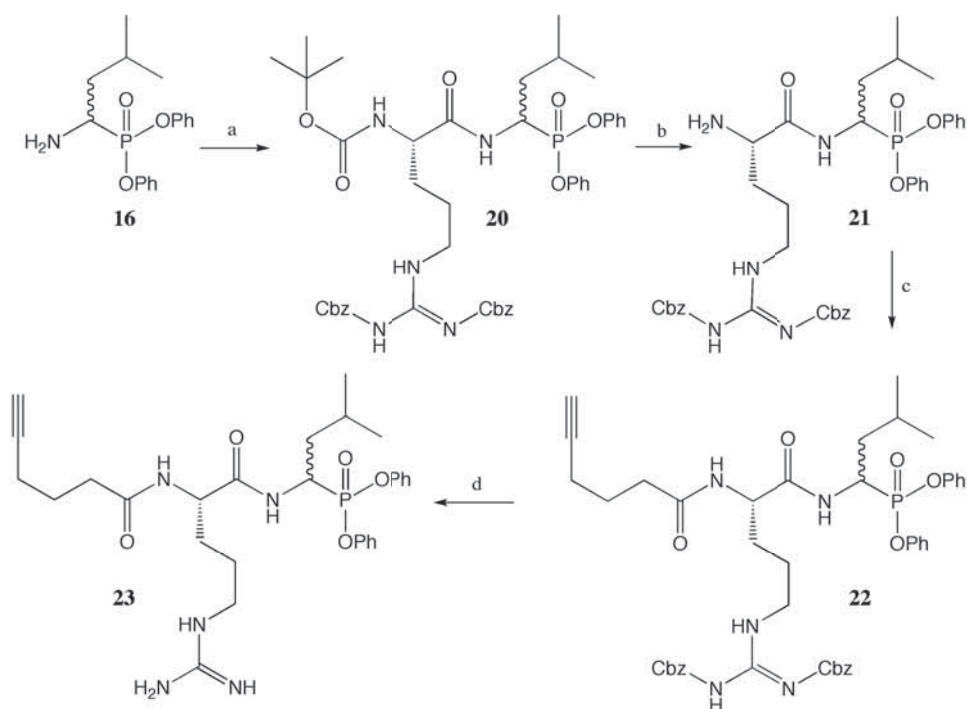


Figura 3.41: Esquema de la síntesi de Aha-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂. a) HATU (1 eq), DIEA (2 eq) i Boc-Arg(diCbz) (1 eq) en DMF, 16 h a 25 °C. b) 4 M HCl en 1,4-dioxà (25 ml/mmol) en gradient de 0 °C a 25 °C, 30 min. c) HATU (1 eq), DIEA (2 eq) i àcid 5-hexinoic (1 eq) en DMF, 16 h a 25 °C. d) HBr en àcid acètic, 1 h a 25 °C. S'obté una mescla complexa de difícil caracterització.

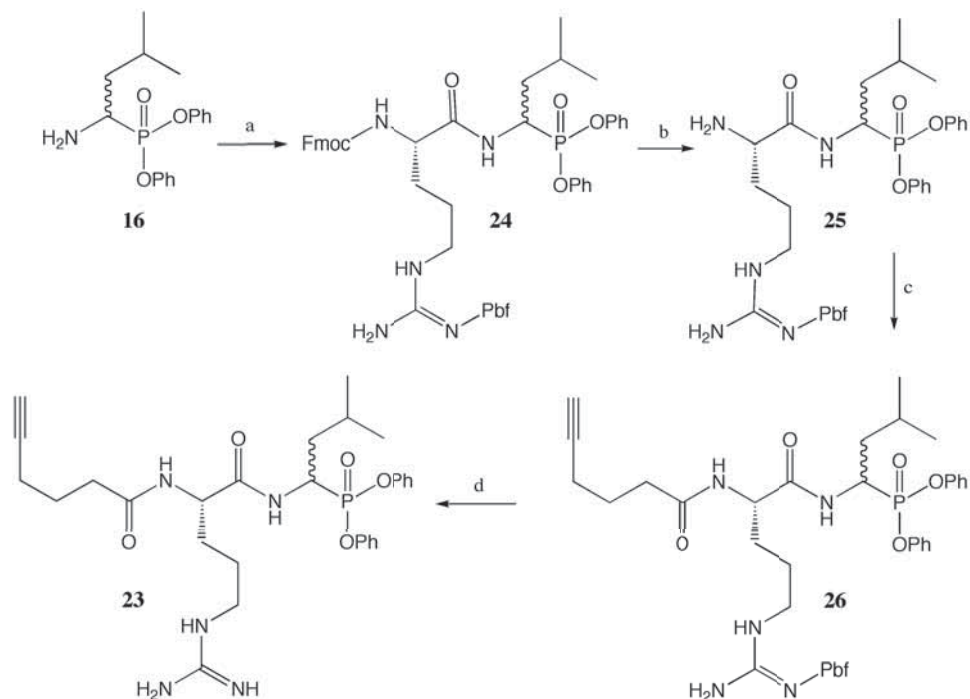


Figura 3.42: Esquema de la síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂. a) HATU (1 eq), DIEA (2 eq) i Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1 eq) en DMF, 16 h a 25 °C. b) Dietilamina (0,5 M) en DMF, 3 h en gradient de 0 °C a 25 °C. c) HATU (1 eq), DIEA (2 eq) i àcid 5-hexinoic (1 eq) en DMF, 16 h a 25 °C. d) TFA:H₂O (95:5), 1,5 h a 25 °C.

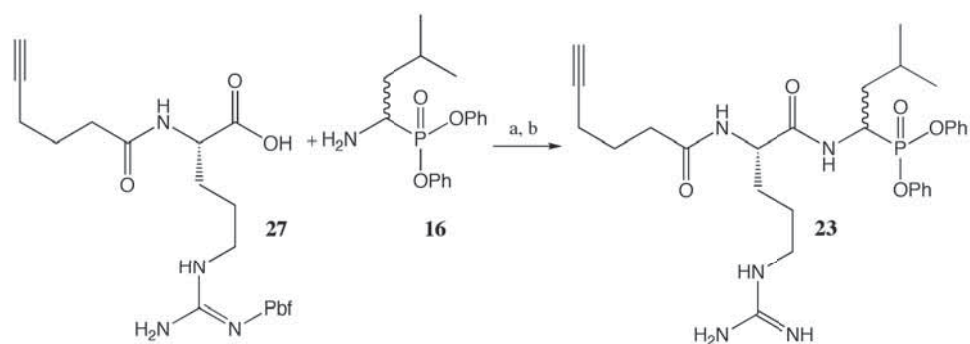


Figura 3.43: Esquema de la síntesi assistida per polímer de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ a) *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (3 eq) en DMF, 24 h a 25 °C. b) TFA:H₂O (95:5), 1,5 h a 25 °C.

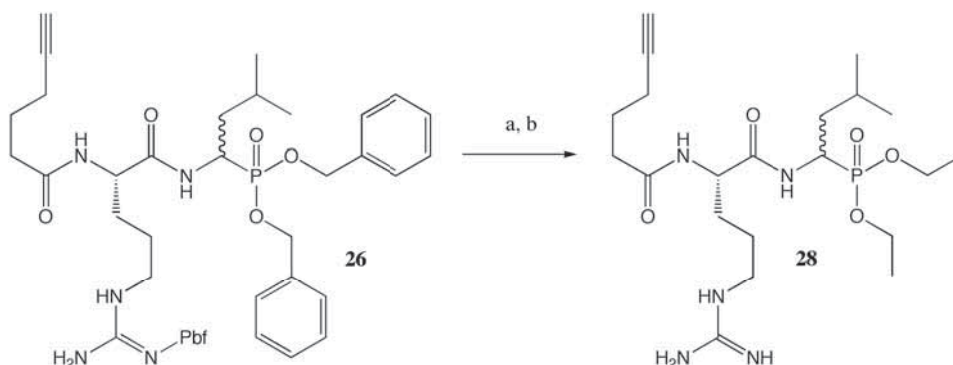


Figura 3.44: Esquema de la síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ per transesterificació de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂. a) KF (10 eq) i éter 18-crona-6 en etanol, 10 min a 80 °C i 16 h a 25 °C, b) TFA:H₂O (95:5), 1,5 h a 25 °C.

Síntesi de Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂

La síntesi de les sondes Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂, s'ha realitzat, inicialment, seguint la mateixa estratègia emprada per a les sondes Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ (**23**) i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ (**28**), utilitzant el grup protector Fmoc per al N_{ter} i el grup tBu per a la cadena lateral de l'àcid glutàmic (veure figura 3.45).

Tanmateix, i de forma anàloga a la síntesi dels 1-aminoalcanofosfonats amb residus d'arginina, s'ha modificat la via de síntesi anterior per evitar l'ús del grup Fmoc i millorar així els rendiments. D'aquesta manera, la síntesi de les sondes Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ s'ha realitzat, finalment, seguint l'estratègia de síntesi en solució assistida per polímer emprada per a la síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ (veure figura 3.46). La sonda Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ s'ha obtingut per transesterificació de **31** (veure figura 3.47).

Síntesi de Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂

La síntesi dels 1-aminoalcanofosfonats anàlegs del triptofan ha estat descrita per Bergin *et al.* [336] i utilitzada per Agamennone *et al.* [340] per a la síntesi d'inhibidors de metal·loproteases, però en ambdós casos, la falta de detalls sintètics i informació complementària, dificulta la reproducció de la ruta sintètica.

Inicialment, es va intentar sintetitzar el fosfonat de triptofan mitjançant la reacció d' α -amidoalquilació descrita per Oleksyszyn [335]. Aquest mètode ja s'ha utilitzat en la síntesi de les sondes Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂, així com en la síntesi de diversos fosfonats derivats d'amino-

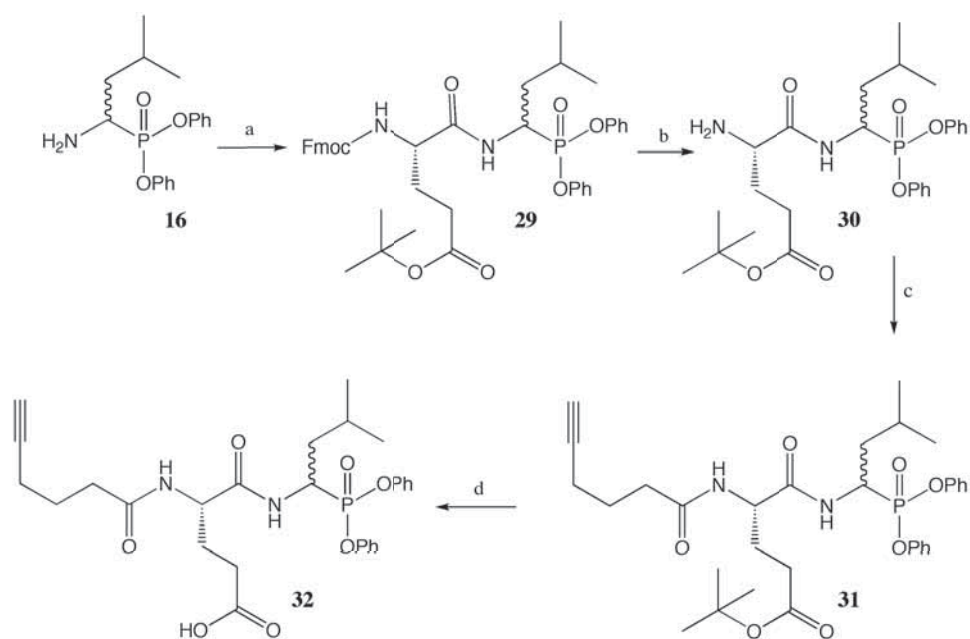


Figura 3.45: Esquema de la síntesi de Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂. a) HATU (1 eq), DIEA (2 eq) i Fmoc-Glu(tBu)-OH (1 eq) en DMF, 16 h a 25 °C. b) Dietilamina (0,5 M) en DMF, 3 h en gradient de 0 °C a 25 °C. c) HATU (1 eq), DIEA (2 eq) i àcid 5-hexinoic (1 eq) en DMF, 16 h a 25 °C. d) TFA:H₂O (95:5), 1,5 h a 25 °C.

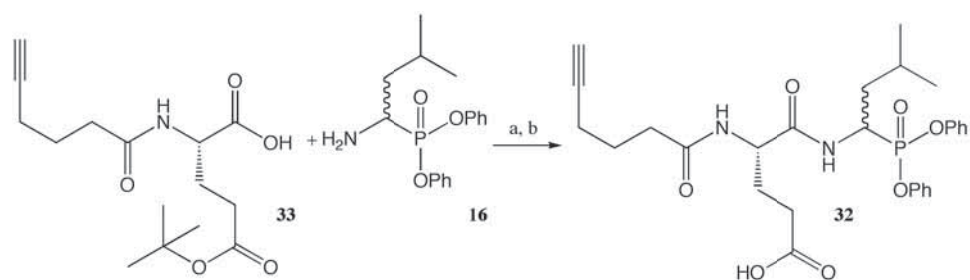


Figura 3.46: Esquema de la síntesi assistida per polímer de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ a) *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (3 eq) en DMF, 24 h a 25 °C. b) TFA:H₂O (95:5), 1,5 h a 25 °C.

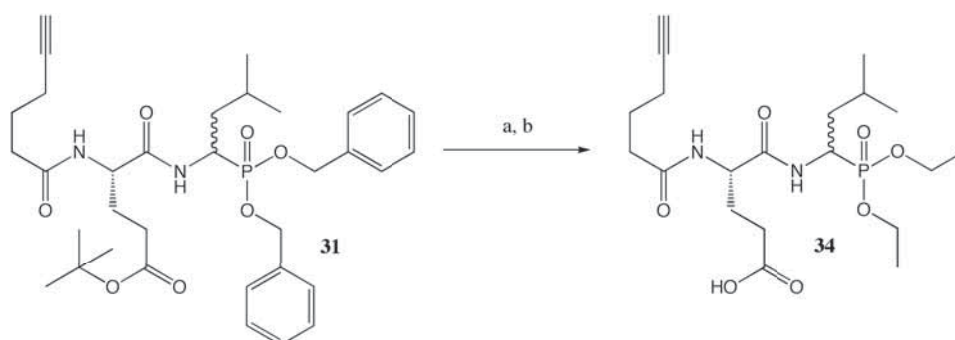


Figura 3.47: Esquema de la síntesi de Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ per transesterificació de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂. a) KF (10 eq) i éter 18-corona-6 en etanol, 10 min a 80 °C i 16 h a 25 °C, b) TFA:H₂O (95:5), 1,5 h a 25 °C.

àcids senzills com la valina i la fenilalanina [80], i d'altres aminoàcids amb cadenes laterals més complexes com la lisina [282] i l'arginina [341, 342]. Per dur a terme aquesta estratègia s'han sintetitzat els compostos **36** i **37** a partir del 3-cianometilindole (**35**) adaptant l'esquema de síntesi descrit per Martin *et al.* [343] (veure figura 3.48). Tanmateix, qualsevol intent de sintetitzar el fosfonat de triptofan mitjançant la reacció d' α -amidoalquilació ha estat infructuós.

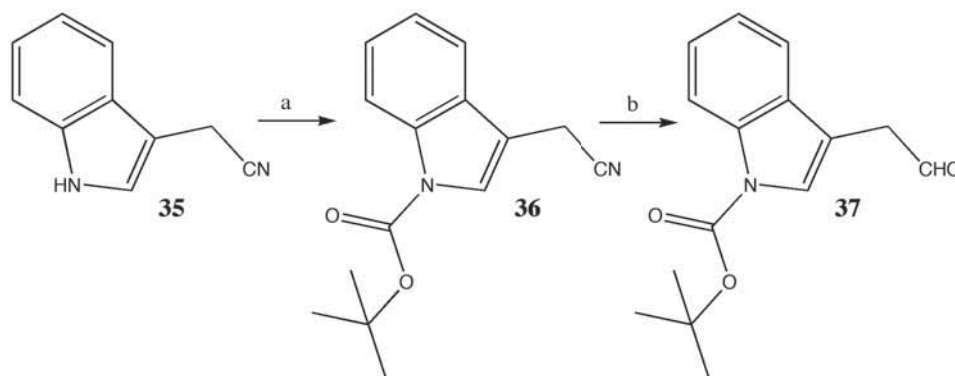


Figura 3.48: Esquema de síntesi del *N*-(*tert*-butoxycarbonil)-3-acetaldehidindole a partir del 3-cianometilindole. a) 4-dimetilaminopiridina (1,5 eq), dicarbonat de di-*tert*-butil (1,5 eq), trietilamina (1,5 eq) en DCM, 2 h a 25 °C. b) DIBAL (1,1 eq) en DCM, 45 min a -78 °C i 5h a 25 °C.

Donats aquests resultats, s'ha decidit realitzar la síntesi del fosfonat de triptofan adaptant l'esquema proposat per Bergin *et al.* [336]. Aquesta ruta de síntesi consta d'una reacció Michaelis-Arbuzov, una eliminació del grup ftalamido per a l'alliberació del grup amino, una conversió d'aquest grup en una imina, una alquilació i una desprotecció final.

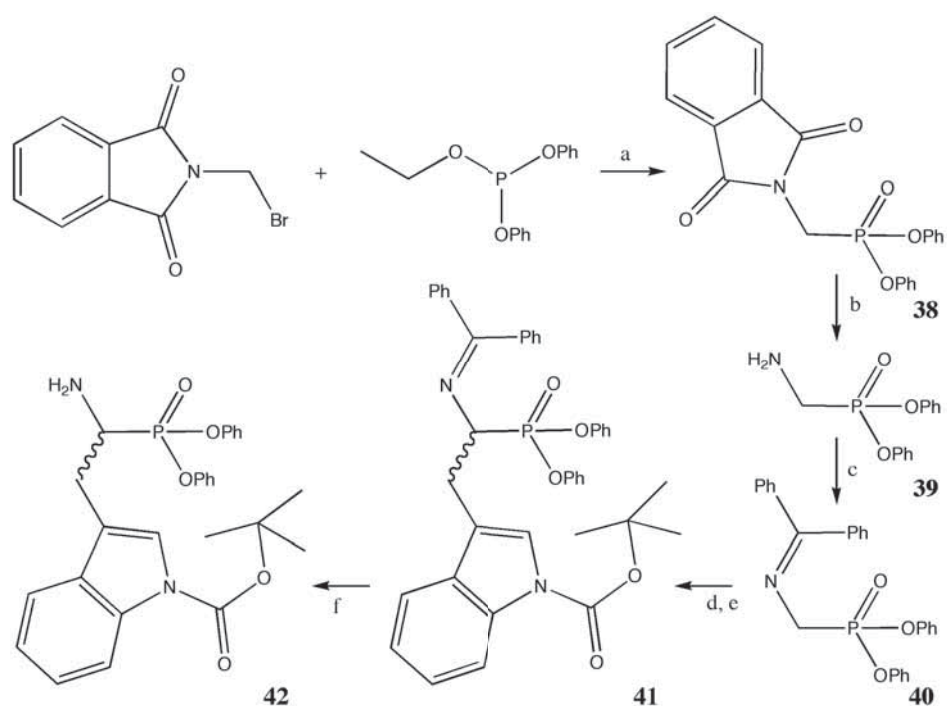


Figura 3.49: Esquema de síntesi de Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂. a) Xilè, 5 dies a reflux. b) Hidrazina (4 eq) en THF, 72 h a 70 °C. c) Benzofenona (1,1 eq) en toluè, 12 h a reflux, *Dean Stark*. d) HMDA (6 eq), KHMDS (2,5 eq) en THF, 30 min a -78 °C. e) *tert*-butil-3-bromometilindole-1-carboxilat (2 eq) en THF, 4 h a -78 °C. f) H₂O (1 %), TFA (3 %) en DCM, 1 h a 25 °C.

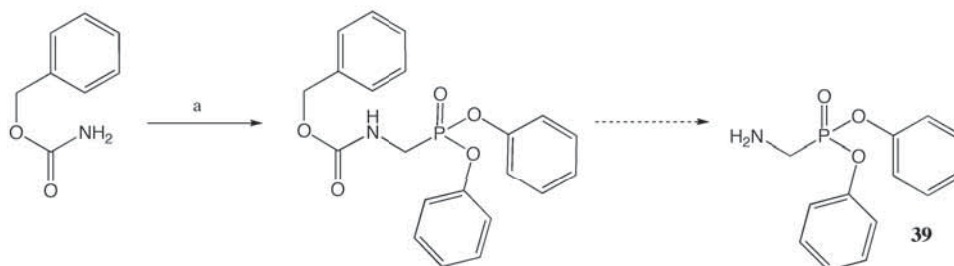


Figura 3.50: Esquema de la síntesi de l'1-aminometilfosfonat de difenil. a) Fosfit de trifenil (1 eq), paraformaldehyd (1 eq) o formaldehyd (1 eq) en àcid acètic, 1 h a 25 °C i 16 h a 50 °C. La reacció no ha donat el producte esperat.

Inicialment, s'ha sintetitzat el reactiu fosfit d'etil i difenil [344] (veure figura 3.49) i s'ha utilitzat per a l'obtenció de l'intermediari **38** mitjançant una reacció Michaelis-Arbuzov. Aquesta reacció s'ha mantingut a 150-160 °C durant 5 dies (Rendiment = 35 %) ja que temps de reacció menors impliquen rendiments més baixos. Tot i això, no s'ha observat una millora notable del rendiment per a temps de reacció més llargs. Aquesta mateixa reacció s'ha intentat dur a terme, sense èxit, substituint el fosfit d'etil i difenil per fosfit de trifenil comercial.

A continuació, s'ha eliminat el grup ftalamido per alliberar el grup amino i obtenir **39**. En aquesta cas, ha calgut explorar diversos mètodes (veure taula 3.3) ja que les condicions descrites per Bergin *et al.* per a l'eliminació del grup ftalamido (1 eq hidrazina, 1 eq àcid acètic, 70 °C, 4 h) generen rendiments baixos (< 35 %). L'eliminació de l'àcid acètic i l'augment dels equivalents d'hidrazina i del temps de reacció han permès assolir rendiments superiors al 70 %. La síntesi de **39** també s'ha intentat per α -amidoalquilació del fosfit de trifenil amb benzilcarbamat i paraformaldehyd o formaldehyd, però sense èxit (veure figura 3.50).

Taula 3.3: Condicions assajades per a la desprotecció del grup ftalamido.

R (%)	Hidrazina (eq)	À. acètic (eq)	T (°C)	t (h)	Dissolvent
32	2	1	70	4	THF
74	4	0	70	72	THF
0	1,05	0	25	4	etanol
0	(15 %)	0	50	0,75	DMF

Taula 3.4: Condicions assajades per al procés d'alquilació del compost (difenílmetileneamino)metilfosfonat de difeníl

R (%)	Base (eq)	T ₁ , en °C (t)	T ₂ , en °C (t)	R-Br (eq)
0,0	KHMDS(1,1)	-78(10')+0(20')	-78(1,5h)+25(16h)	1,1
0,0	LHMDS(1,5)	-78(30')	-78(1,5h)+25(16h)	1,2
0,0	KHMDS(1,1)	-78(30')	-78(1,5h)+25(16h)	2,0
0,0	KHMDS(1,1)	-78(30')	-78(1,5h)+25(16h)	2,0
27,3	KHMDS(2,5) +HMPA(6)	-78(30')	-78(4h)	2,0

Un cop desprotegit el grup amino, s'ha procedit a la formació de la imina per obtenir **40**. Inicialment, es va dur a terme la reacció amb benzofenonaimina (DCM, 25 °C), però la substitució d'aquest reactiu per la benzofenona, la utilització d'un aparell *Dean Stark* i l'augment de temperatura (Toluè, 120 °C) ha permès augmentar el rendiment de valors propers al 25 % a valors superiors al 45 %.

El procés d'alquilació de **40** s'ha dut a terme en una reacció de dues etapes en les quals primer s'arrenca un protó del grup metilè i a continuació s'alquila amb bromur de 3-(*N*-*tert*-butoxicarbonil-indolil)metil. A la bibliografia s'han trobat descripcions d'alquilacions similars com la introducció de grups bromoalquil utilitzant *n*-BuLi (THF, -78 °C) [345], KHMDS [336] o LHMDS (THF, -100 °C) [346]. S'han probat diverses condicions de síntesi modificant la temperatura i el temps de la primera i la segona etapa, augmentant els equivalents de bromoalquil i probant bases més fortes com la LHMDS (veure taula 3.4). Finalment, l'anió de **40** s'ha generat amb KHMDS i HMPA en THF anhidre a -78 °C i s'ha alquilat amb el *tert*-butil-3-bromometilindole-1-carboxilat comercial, adaptant les condicions descrites per a la síntesi de derivats fosfinats [347]. Aquesta reacció ha permès obtenir **41** amb un rendiment del 27 %.

Finalment, s'ha eliminat la benzofenona, que actua com a protector del grup amino, per obtenir **42** que s'ha acoblat amb el dipèptid Aha-Asp(*t*Bu)-OH (**43**) mitjançant síntesi en solució assistida. Aquesta reacció genera el compost **44** i, posteriorment, per desprotecció s'obté la sonda Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ (**45**) de forma equivalent a com s'han obtingut les sondes Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ (veure figura 3.51 i 3.52). La sonda Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ (**46**) s'ha obtingut per transesterificació i desprotecció de **44**.

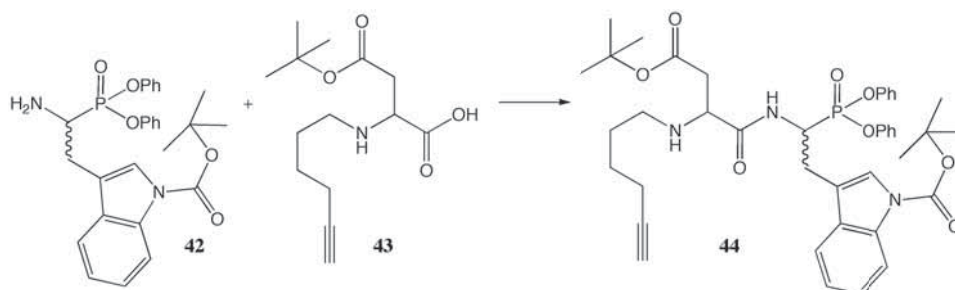


Figura 3.51: Esquema de la síntesi assistida per polímer de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc)^P(OPh)₂: *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (3 eq) en DMF, 24 h a 25 °C.

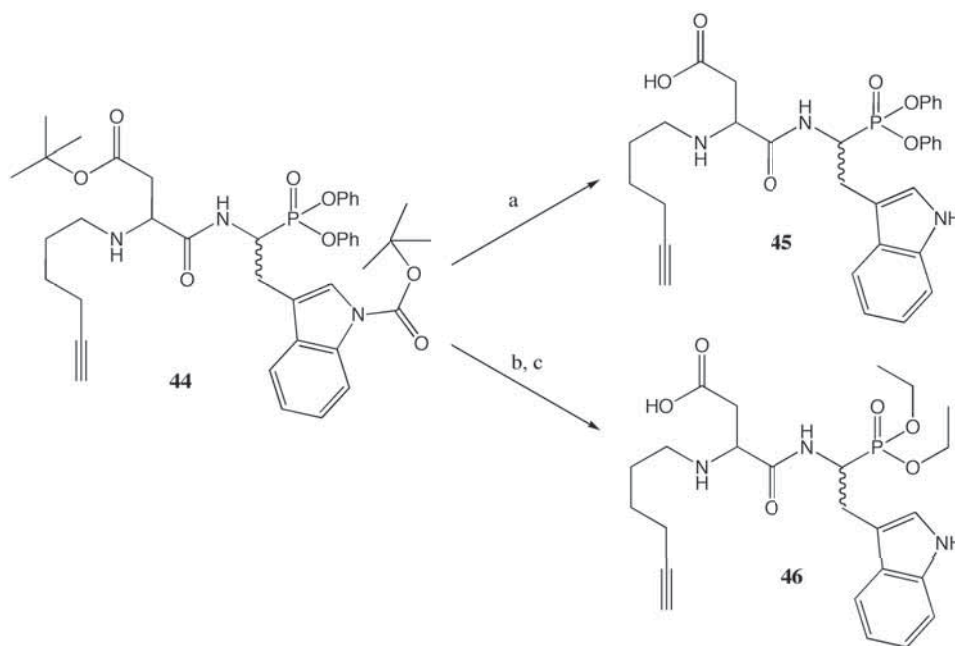


Figura 3.52: Esquema de la síntesi de Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ per transesterificació de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc)^P(OPh)₂. a) TFA:DCM (1:1), 1 h a 25 °C. b) KF (10 eq) i éter 18-corona-6 en etanol, 10 min a 80 °C i 16 h a 25 °C. c) TFA:DCM (1:1), 1 h a 25 °C.

Resum

En aquest apartat s'han dissenyat les noves sondes de tipus fosfonat per a l'exploració del proteoma de cervell i glàndula pituïtària. El disseny d'aquestes sondes s'ha realitzat a partir de la seqüència de diversos pèptids derivats de la cromogranina B descrits a la bibliografia.

La síntesi de les sondes Aha-Ala-Leu^P(OR)₂ s'ha realitzat per la incorporació en solució dels residus Boc-Ala-OH i Aha-OH a un residu H-Leu^P(OR)₂, mentre que les sondes Aha-Arg-Leu^P(OR)₂, Aha-Glu-Leu^P(OR)₂ i Aha-Arg-Trp^P(OR)₂ s'han obtingut, després d'optimitzar la síntesi del residu H-Trp^P(OR)₂, per síntesi convergent assistida per polímer.

3.2.3 Anàlisi del proteoma

Obtenció dels homogenats de cervell i pituïtària

Com s'ha vist anteriorment, la majoria de proteases implicades en la biosíntesi i degradació dels neuropèptids es troben formant part de les vesícules de secreció, ja sigui en forma soluble o unides a membrana. Tot i això, l'aïllament subcel·lular de la fracció microsomal de glàndula pituïtària de ratolí s'ha considerat inviable per la gran quantitat de material necessari per a la realització dels experiments. D'aquesta manera, en els experiments d'exploració del proteoma que es plantejaran en els apartats següents s'ha treballat amb el proteoma soluble, entenent com a tal, el conjunt de proteïnes de la cèl·lula no unides a membrana.

Per a l'obtenció del proteoma soluble s'ha practicat un protocol d'homogenització i trencament de membranes basat en cicles de congelació-descongelació acompanyats d'una homogenització amb èmbol de vidre [348, 349, 350, 351]. Tot i això, existeix la possibilitat que aquest protocol no sigui suficient per trencar les estructures membranoses i calguin protocols més agressius, per exemple, amb la presència de detergents. Per aquest motiu, s'han realitzat assajos d'immunodetecció per a determinar la capacitat d'aquest protocol per trencar les estructures membranoses en presència i absència de detergent. En aquest sentit, s'ha procedit a la detecció per transferència de Western de les proteïnes Convertasa de prohormones 1/3 (PC 1/3) i Carboxipeptidasa E/H (CPE/H) dels extractes obtinguts. L'elecció d'aquestes dues proteïnes es deu al fet de tractar-se de dues proteïnes solubles, de l'interior dels microsomes, implicades en el processament de neuropèptids. Els resultats d'aquest assaig permeten afirmar que la detecció d'ambdues proteïnes microsomals és possible tant en presència com en absència de detergent (veure figura 3.53, apartat A) i per tant, que la presència de detergent no és un factor indispensable per obtenir la fracció soluble de l'interior dels microsomes. Tanmateix, a partir

dels resultats també es pot observar que el tractament amb Tritó X-100 afavoreix la presència d'aquestes proteïnes a l'extracte soluble, segurament per la implicació del detergent en el trencament dels microsomes.

Davant la possibilitat d'utilitzar Tritó X-100 en la preparació dels extractes, s'ha comprovat que aquest detergent no interfereixi en la reacció de cicloadició, necessària per al marcatge de les sondes amb una etiqueta fluorescent o de biotina per a la seva detecció. Aquests assajos s'han realitzat amb hr-POP pura a la qual, un cop etiquetada amb la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂, s'ha afegit Tritó X-100 a concentracions creixents i s'ha realitzat la reacció de cicloadició (veure figura 3.53, apartat B). Els resultats mostren que la presència de detergent no interfereix en la reacció de cicloadició durant la incorporació de biotina o etiquetes fluorescents.

Malgrat aquests resultats prometedors, cal tenir en compte, que en els assajos de proteòmica basada en activitat, el marcatge del proteoma es realitza en funció de l'activitat de les proteïnes i, en algunes ocasions, la presència de detergents pot fer minvar aquesta activitat. Per aquest motiu, abans d'incorporar el detergent en el protocol d'homogenització dels extractes tissulars s'ha comprovat la influència del Tritó X-100 en el procés d'etiquetat funcional (veure figura 3.53, apartat C). L'anàlisi d'aquests resultats mostra la disminució de les interaccions inespecífiques en presència del detergent (carril 1 vers carril 4), però alhora, s'observa la disminució, o inclús la desaparició, d'algunes bandes específiques (carril 2 vers carril 3, →).

Així doncs, la presència de Tritó X-100 pot millorar la sensibilitat i reduir les interaccions inespecífiques, però alhora pot comportar la pèrdua d'activitat d'algunes proteïnes impedit-ne l'etiquetat i la seva posterior detecció. Davant d'aquest compromís entre major sensibilitat o major activitat, s'ha decidit no incorporar el detergent Tritó X-100 en els protocols d'homogenització.

Anàlisi del proteoma mitjançant sondes de tipus 1-aminoalcanofosfonat

En l'anàlisi del proteoma mitjançant sondes de tipus 1-aminoalcanofosfonat es pretén cercar proteïnes serina hidrolasa que reconguin específicament les sondes utilitzades i, per tant, que puguin estar implicades en el processament de precursors peptídics com la cromogranina B.

En aquests experiments s'han utilitzat les sondes de tipus 1-aminoalcanofosfonat sintetitzades anteriorment i l'anàlisi del proteoma s'ha realitzat tant per marcatge directe en gels fluorescents com per MudPIT, de forma equivalent als assajos de proteòmica basada en activitat realitzats amb la proteïna prolil oligopeptidasa.

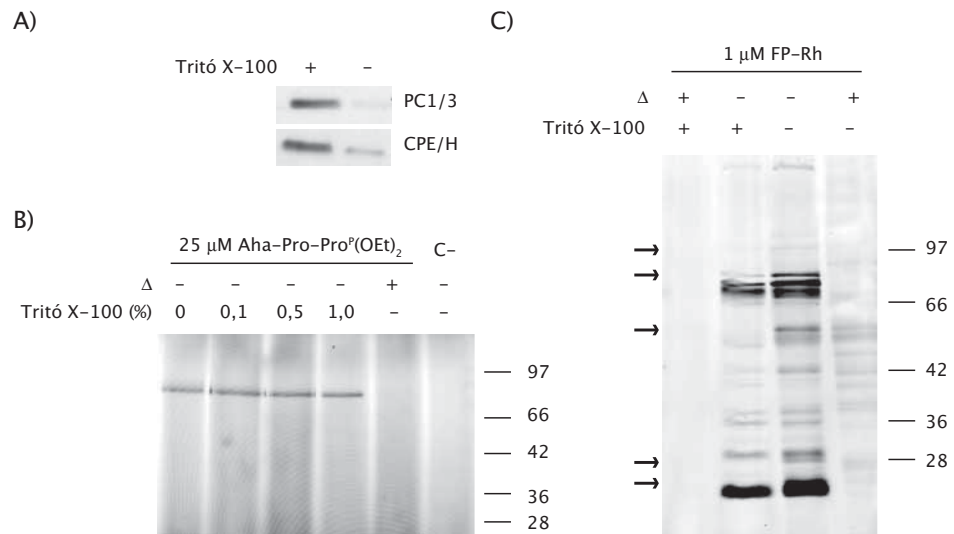


Figura 3.53: Assajos per a la incorporació de tritó X-100 en el protocol d'homogenització de teixits. A) Detecció de CPE/H i PC1/3 en els extractes de glàndula pituitària en absència i presència (1 %) de tritó. En les mostres amb presència de tritó X-100, aquest s'ha afegit a les mostres després del protocol d'homogenització, i s'han agitat suaument durant 1 h a 4 °C. B) Anàlisi de la reacció de cicloaddició en presència de concentracions creixents de Tritó X-100. Els assajos s'han realitzat amb hrPOP pura (2 μ g/ml) etiquetada amb la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (25 μ M). A la proteïna etiquetada s'ha afegit Tritó X-100 a concentracions creixents (0,0 – 1,0 %) i s'ha procedit a realitzar la reacció de cicloaddició. Els últims dos carrils corresponen al control amb la proteïna inactivada per temperatura (Δ +) i al control sense sonda (C-). C) Etiquetat del proteoma de cervell de ratolí (1 mg/ml) amb el fluorofosfonat de rodamina (FP-Rh, 1 μ M) en presència i absència de Tritó X-100 (1 %).

Inicialment, l'anàlisi del proteoma soluble per gels de fluorescència amb les sondes Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ i la comparació amb l'anàlisi del proteoma inactiu (desnaturalització per temperatura) ha permès detectar una banda específica d'uns 80 kDa en cervell (veure figura 3.54) i una banda específica situada a uns 60 kDa en glàndula pituïtària (veure figura 3.55). Així mateix, l'etiquetat funcional amb les sondes Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ ha permès detectar tres bandes específiques d'uns 79, 40 i 24 kDa en extractes de cervell (veure figura 3.56) i una banda específica d'uns 85 kDa en glàndula pituïtària (veure figura 3.57). En canvi, la utilització de les sondes Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ no ha permès detectar cap banda específica evident (veure figures 3.58 i 3.59), mentre que l'anàlisi del proteoma soluble amb les sondes Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ ha permès observar una banda específica d'uns 92 kDa en extracte de cervell (veure figura 3.56) i dues bandes específiques d'uns 85 i 42 kDa en extracte de glàndula pituïtària (veure figura 3.56).

Totes aquestes bandes, resumides a la taula 3.5, han estat detectades de forma específica i teòricament corresponen a proteïnes serina hidrolasa que reconeixen la seqüència peptídica de la sonda i reaccionen específicament amb el grup reactiu. L'escissió i l'anàlisi per espectrometria de masses de les bandes d'interès ha permès identificar un seguit de possibles proteïnes candidates (veure taula 3.6).

Entre les proteïnes identificades en l'anàlisi del proteoma de cervell amb la sonda Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ (*Banda 1*) cal destacar la presència d'una proteïna de 83 kDa (IPI00876255) que inclou un domini serina proteasa dependent d'ATP (família S16, MEROPS) i que presenta inhibidors com el Z-Gly-Leu-Phe-clorometà i el fluorofosfonat DFP. Aquesta proteïna està relacionada amb la proteasa Lon-A d'*E. coli* i intervé en la hidròlisi de substrats com la glutaril-Ala-Ala-Phe-metoxinaftilamina i la succinil-Phe-Leu-Phe-metoxinaftilamina [352] que són substrats amb seqüències aminoacídiques similars a la seqüència present a la sonda. Més enllà d'aquesta proteïna, també s'han identificat altres proteïnes com el precursor de la serotransferrina, la proteïna thimet oligopeptidasa i la proteïna dipeptidil peptidasa III. El precursor de la serotransferrina és una proteïna implicada en el transport de ions Fe³⁺, però que també inclou un domini serina proteasa i podria presentar alguna activitat catalítica interessant. Així mateix, també cal remarcar la detecció de la proteïna thimet oligopeptidasa i la proteïna dipeptidil peptidasa III per a les quals s'han descrit inhibidors de tipus fluorofosfonat així com alguns pèptids fosfínics [353, 354]. La proteïna thimet oligopeptidasa està relacionada amb la degradació de neuropèptids [180] mentre que la proteïna dipeptidil peptidasa III està implicada en la hidròlisi d'enllaços peptídics, però sense un substrat conegut. Tanmateix, ambdues proteïnes són metal·loproteases i és poc probable que corresponguin a les proteïnes eti-

quetades amb la sonda ja que, tal com s'ha discutit anteriorment, en aquest tipus d'enzims no es formen enllaços covalents entre la sonda i l'enzim durant el mecanisme d'acció.

Per altra banda, l'anàlisi del proteoma de cervell amb la sonda Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i l'escisió de les bandes d'interès (*Banda 3* i *5*) ha permès obtenir una llista de proteïnes candidates entre les quals apareixen algunes proteïnes identificades a la *Banda 1* com la proteïna de 83 kDa, el precursor de la serotransferrina i les proteïnes thimet oligopeptidasa i dipeptidil peptidasa III. A part, també apareixen proteïnes addicionals com la dinamina, la sinapsina, la proteïna 14-3-3, aldolases, les proteïnes CRMP i les proteïnes Ezrina, la Moesina i Radixina. Tanmateix, cap d'aquestes proteïnes correspon a proteïnes del tipus serina proteasa, encara que algunes d'elles presenten activitat hidrolasa com la dinamina que hidrolitza el GTP o les proteïnes CRMP membres de la família d'hidrolases dependents de metalls implicades en la hidròlisi d'enllaços amida.

L'escisió de la *Banda 4* corresponent a l'etiquetat funcional del cervell amb la sonda Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ ha permès la identificació de la proteïna Ndr2 que ha estat descrita en diversos teixits i que és especialment abundant en cervell. Aquesta proteïna forma part de la superfamília α/β -hidrolasa que inclou proteïnes serina proteasa de les famílies S9, S37, S10, S15 i S28 i no té assignada encara cap funció concreta, encara que se l'ha relacionat amb processos d'histogènesi i organogènesi [355] i amb la malaltia de l'Alzheimer [356].

Finalment, l'anàlisi del proteoma de glàndula pituïtària amb les sondes Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ i l'escisió de les bandes d'interès (*Banda 9a* i *9b*) ha permès identificar la proteïna adenosilhomocisteïnasa. Aquesta proteïna no correspon a una serina proteasa, però apareix en tots els replicats analitzats i està descrita com una hidrolasa implicada en la regulació de processos de metilació.

A part de les proteïnes identificades a les bandes *1*, *3*, *4* i *5* cal remarcar que en alguns casos aquesta estratègia no ha permès identificar cap proteïna candidata, com és el cas de la *Banda 7* i de la majoria de bandes corresponents a mostres de glàndula pituïtària.

Evidentment, totes les proteïnes identificades per escisió de bandes i digestió tríptica només són possibles proteïnes candidates ja que quan es desconeix la proteïna marcada i cal identificar-la, l'estratègia del marcatge directe no permet identificar la proteïna d'interès sense ambigüitats. En aquest sentit cal argumentar que al no realitzar-se cap procés de purificació en l'estratègia del marcatge directe, la mostra i el control tenen la mateixa composició de proteïnes, diferenciable per fluorescència, però indistingible per espectrometria de masses.

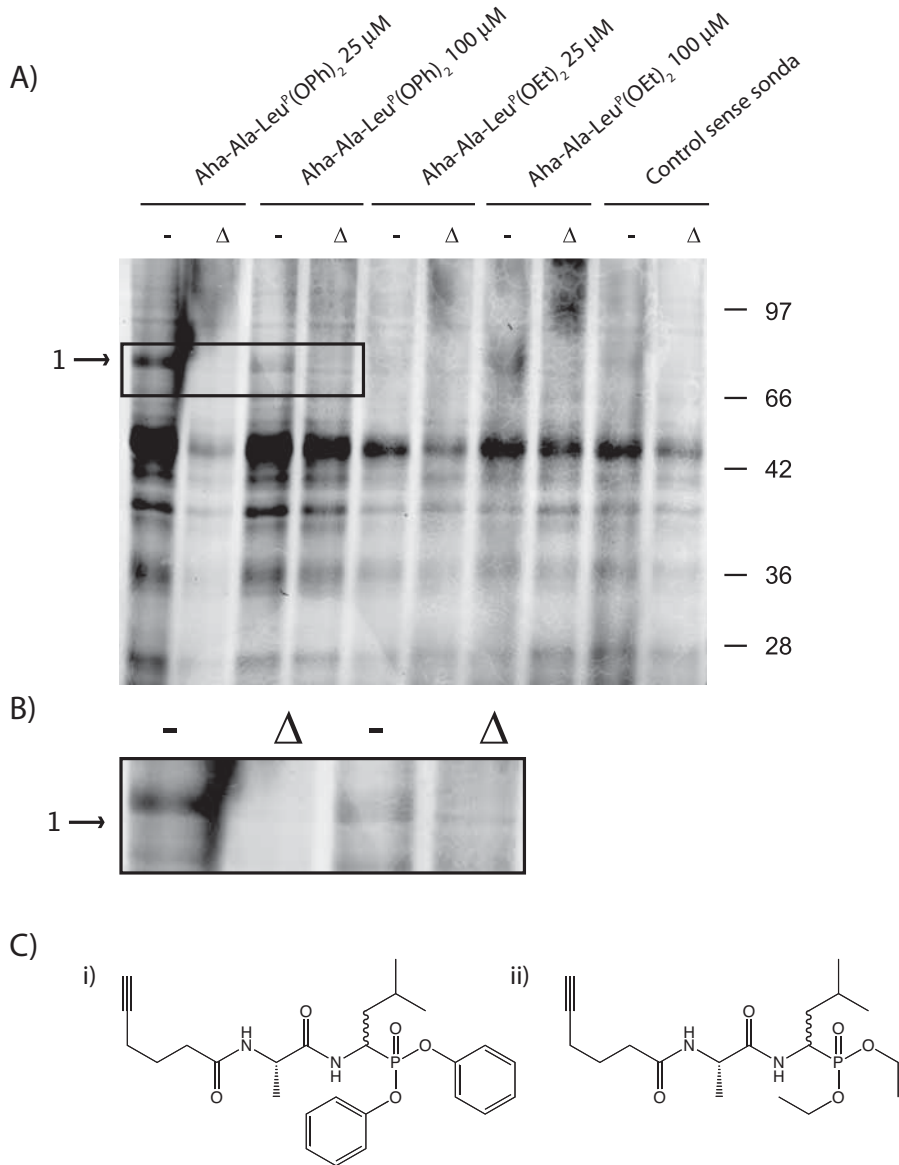


Figura 3.54: Etiquetat funcional del proteoma de cervell de ratolí amb la sonda Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂. A) Mostres d'extracte de cervell de ratolí (25 μg) etiquetades amb les sondes Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ a 25 i 100 μM. El revelat s'ha realitzat per incorporació d'una etiqueta fluorescent (TriN₃) mitjançant la reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen. B) Amplificació de les bandes corresponents a proteïnes detectades específicament. C) Estructura de les sondes Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ (i) i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ (ii).

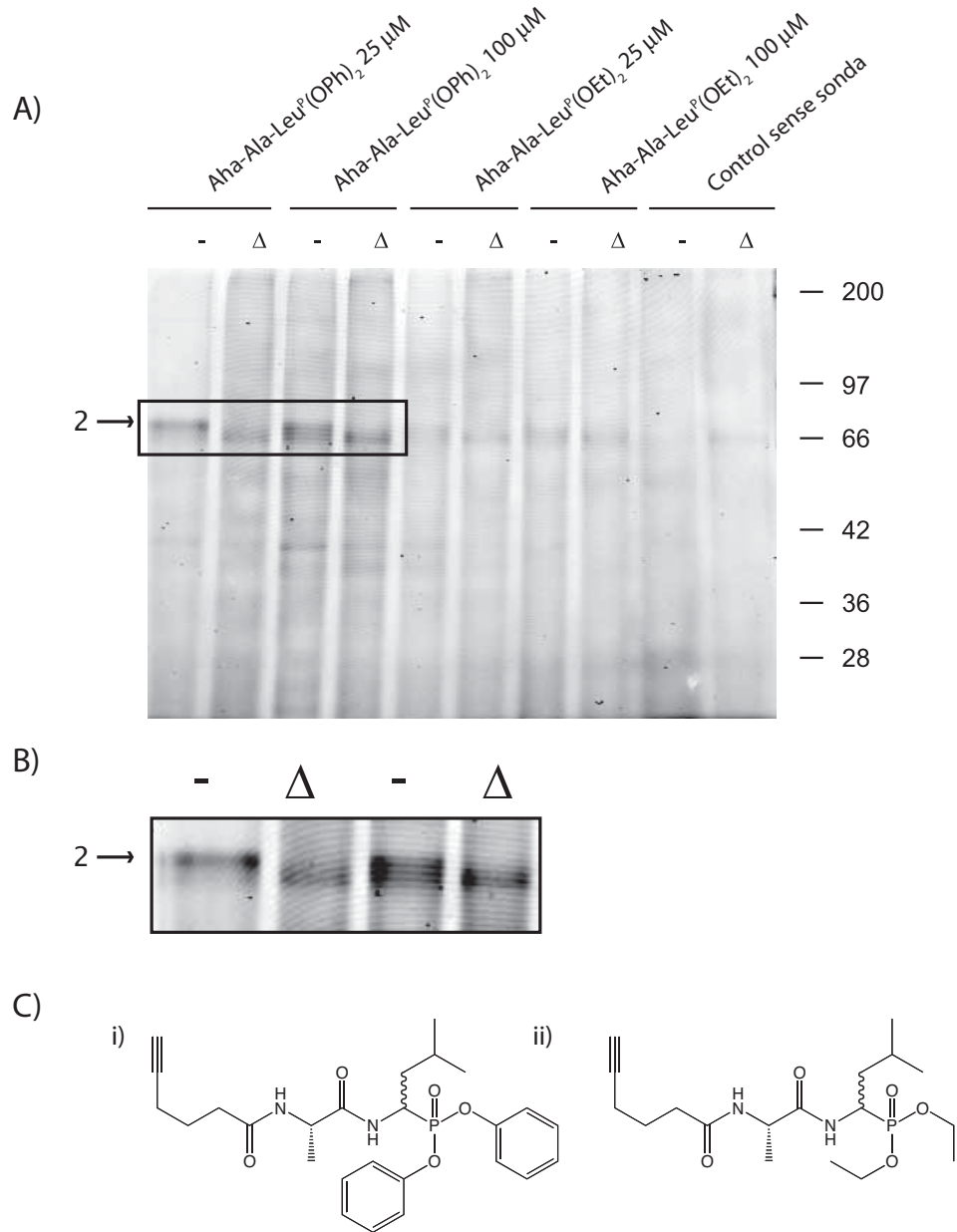


Figura 3.55: Etiquetat funcional del proteoma de glàndula pituïtària de ratolí amb la sonda Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂. A) Mostres d'extracte de glàndula pituïtària de ratolí (12,5 μg) etiquetades amb les sondes Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ a 25 i 100 μM. El revelat s'ha realitzat per incorporació d'una etiqueta fluorescent (TriN₃) mitjançant la reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen. B) Amplificació de les bandes corresponents a proteïnes detectades específicament. C) Estructura de les sondes Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ (i) i Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ (ii).

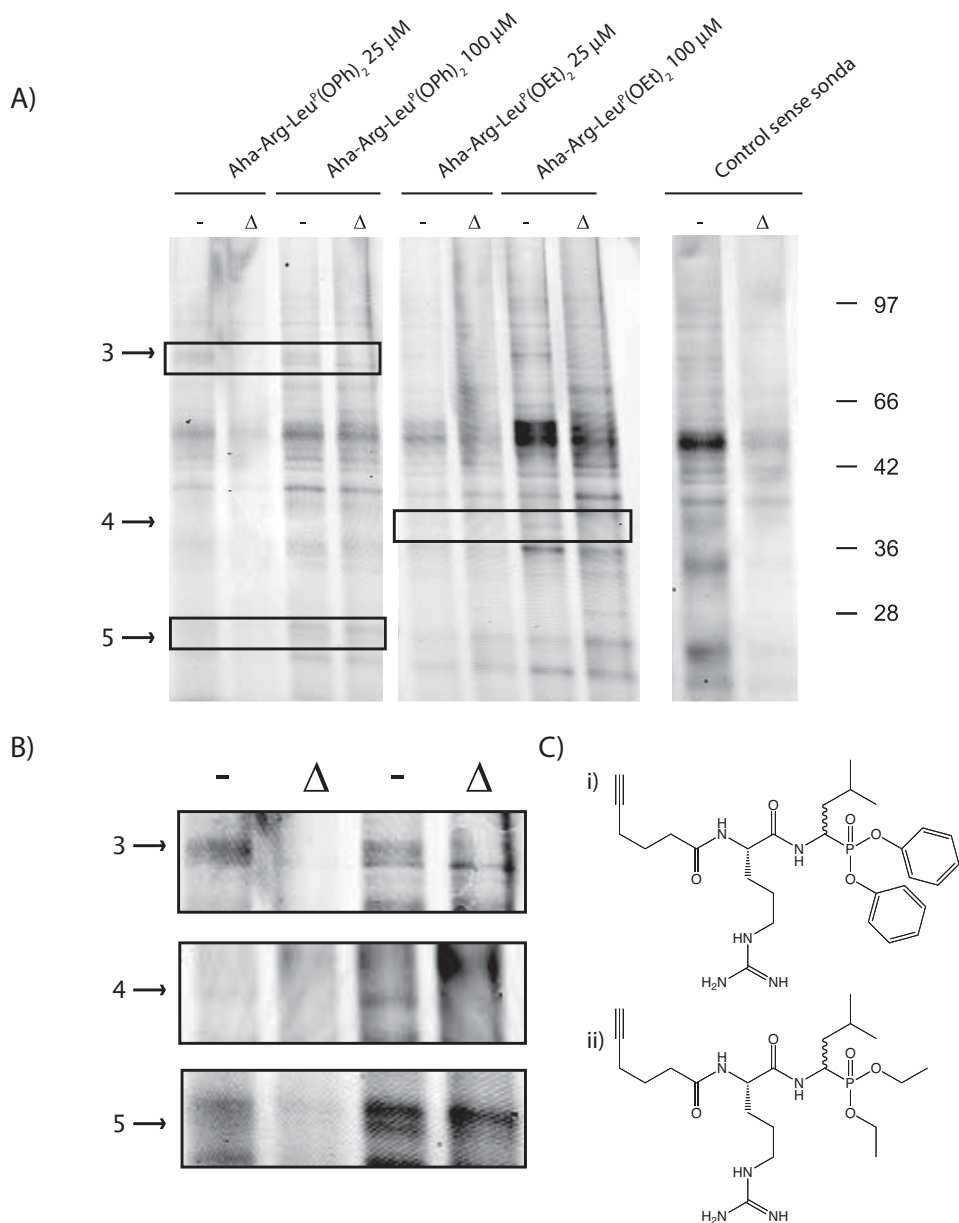


Figura 3.56: Etiquetat funcional del proteoma de cervell de ratolí amb la sonda Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂. A) Mostres d'extracte de cervell de ratolí (25 μg) etiquetades amb les sondes Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ a 25 i 100 μM. El revelat s'ha realitzat per incorporació d'una etiqueta fluorescent (TriN₃) mitjançant la reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen. B) Amplificació de les bandes corresponents a proteïnes detectades específicament. C) Estructura de les sondes Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ (i) i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ (ii).

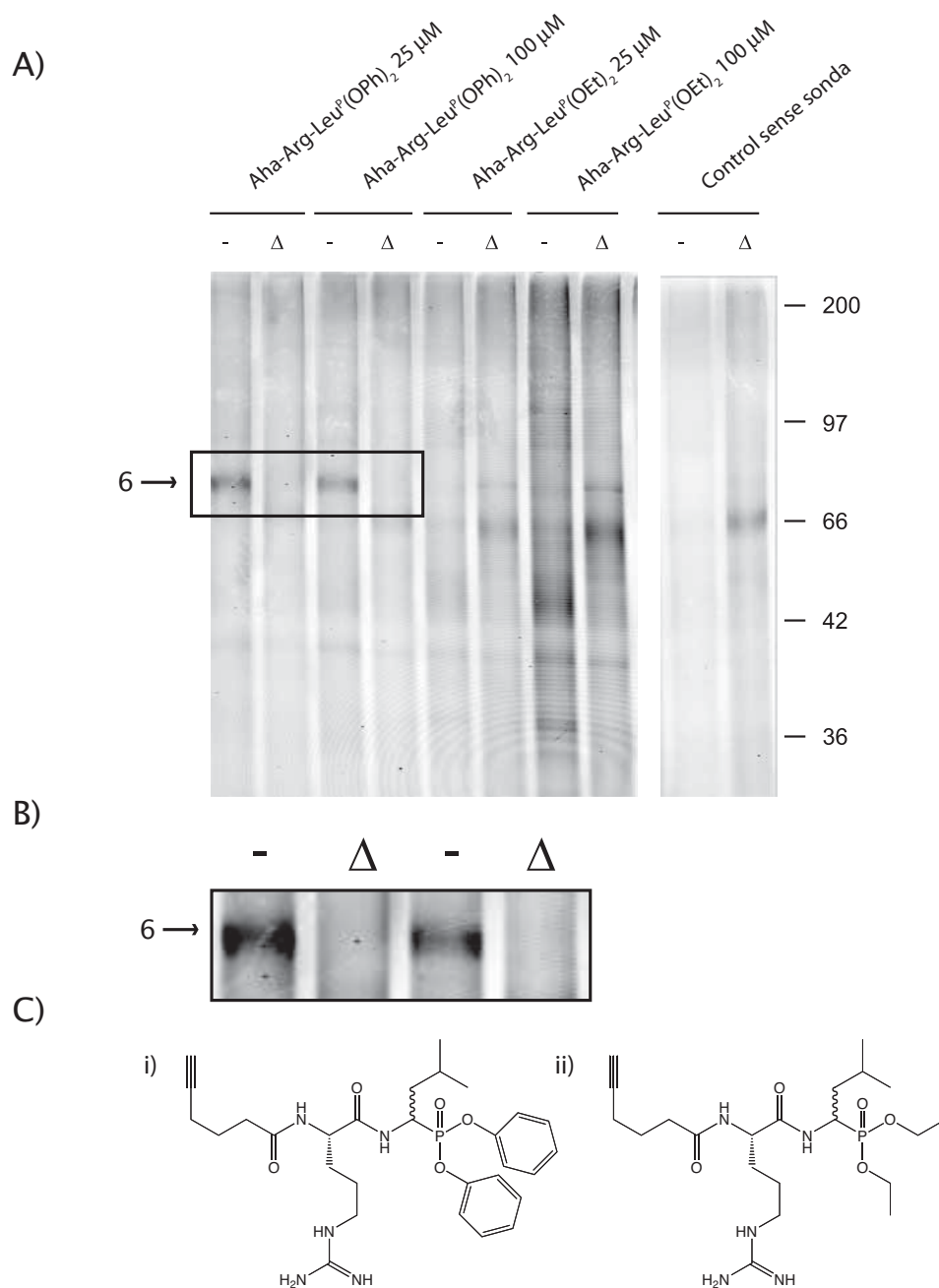


Figura 3.57: Etiquetat funcional del proteoma de glàndula pituïtària de ratolí amb la sonda Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂. A) Mostres d'extracte de glàndula pituïtària de ratolí (12,5 μg) etiquetades amb les sondes Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ a 25 i 100 μM. El revelat s'ha realitzat per incorporació d'una etiqueta fluorescent (TriN₃) mitjançant la reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen. B) Amplificació de les bandes corresponents a proteïnes detectades específicament. C) Estructura de les sondes Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ (i) i Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ (ii).

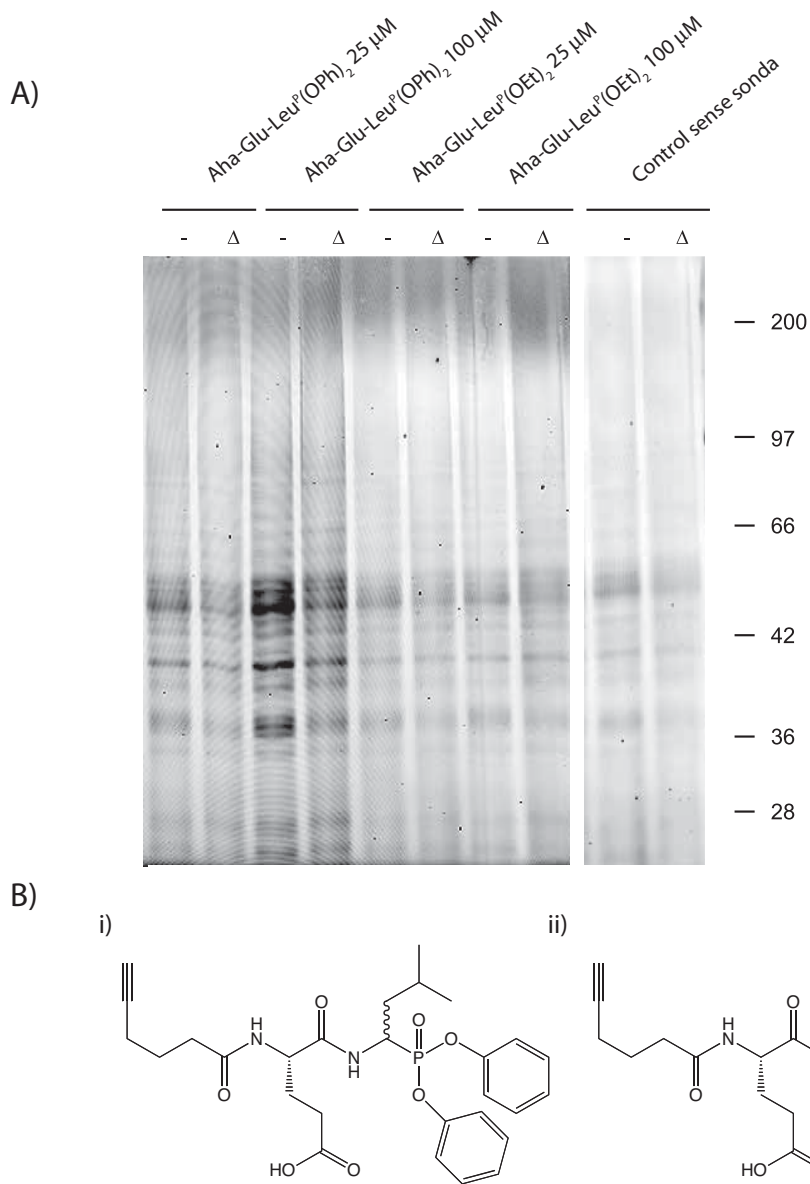


Figura 3.58: Etiquetat funcional del proteoma de cervell de ratolí amb la sonda Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂. A) Mostres d'extracte de cervell de ratolí (25 μg) etiquetades amb les sondes Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ a 25 i 100 μM. El revelat s'ha realitzat per incorporació d'una etiqueta fluorescent (TriN₃) mitjançant la reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen. B) Estructura de les sondes Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ (i) i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ (ii).

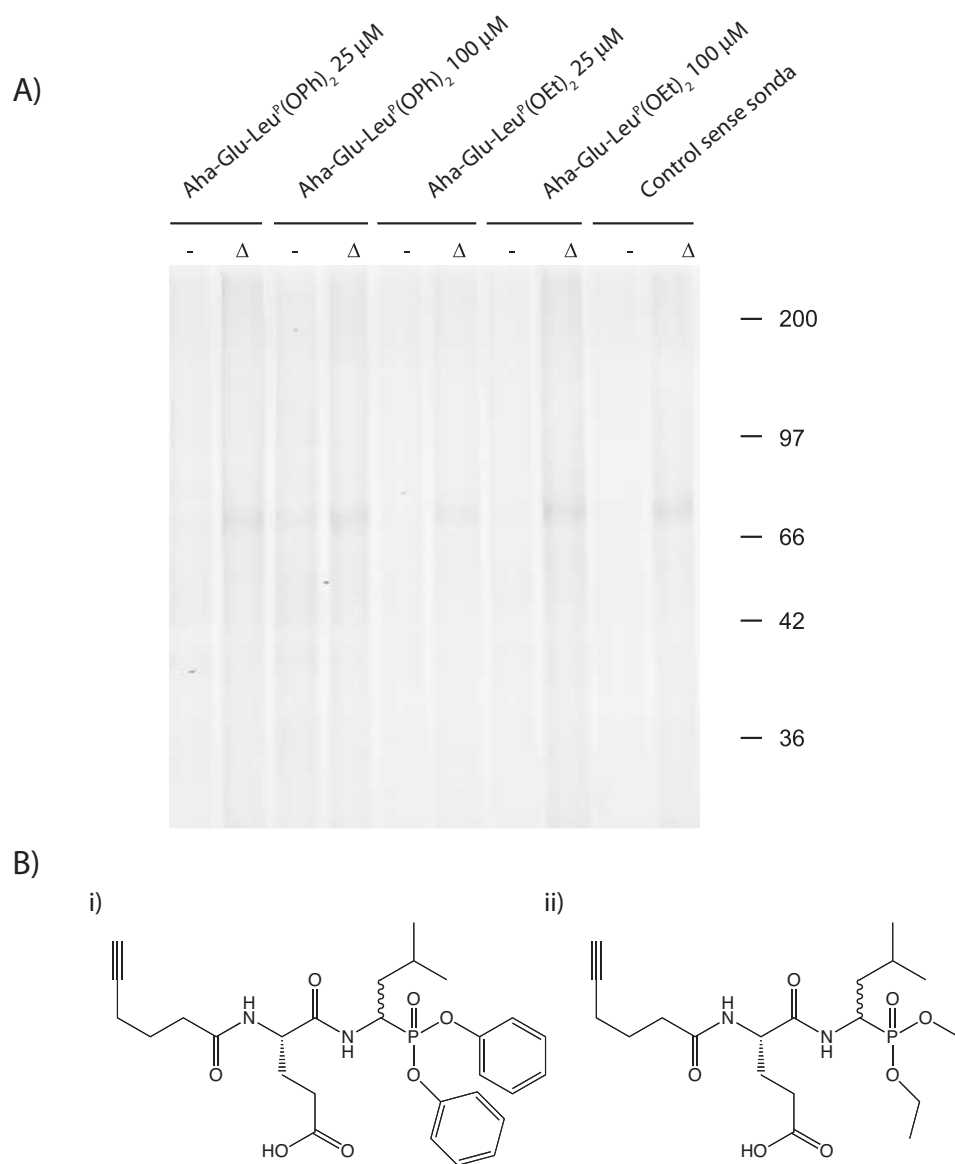


Figura 3.59: Etiquetat funcional del proteoma de glàndula pituïtària de ratolí amb la sonda Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂. A) Mostres d'extracte de glàndula pituïtària de ratolí (12,5 μg) etiquetades amb les sondes Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ a 25 i 100 μM. El revelat s'ha realitzat per incorporació d'una etiqueta fluorescent (TriN₃) mitjançant la reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen. B) Estructura de les sondes Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ (i) i Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ (ii).

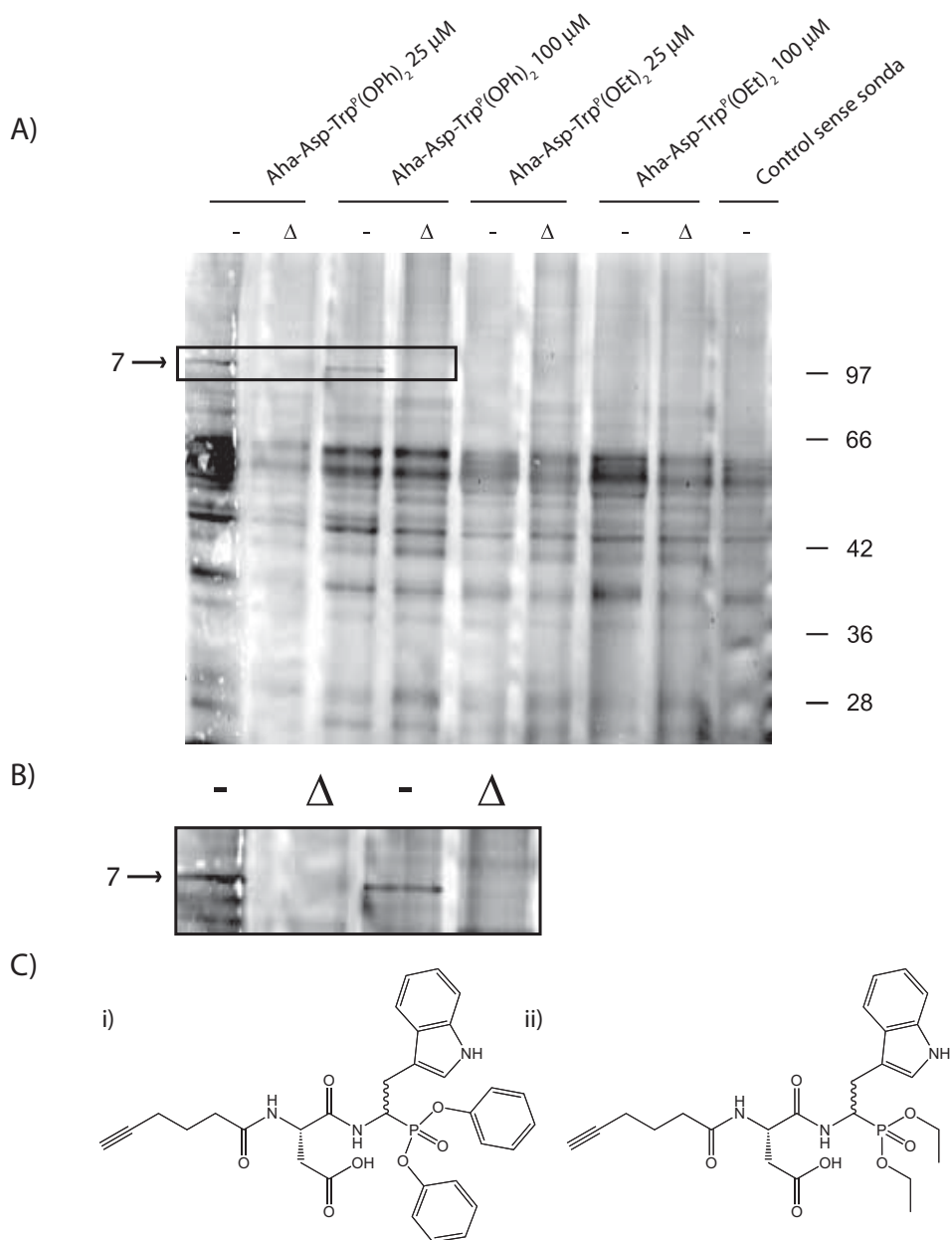


Figura 3.60: Etiquetat funcional del proteoma de cervell de ratolí amb la sonda Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂. A) Mostres d'extracte de cervell de ratolí (25 μg) etiquetades amb les sondes Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ a 25 i 100 μM. El revelat s'ha realitzat per incorporació d'una etiqueta fluorescent (TriN₃) mitjançant la reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen. B) Amplificació de les bandes corresponents a proteïnes detectades específicament. C) Estructura de les sondes Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ (i) i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ (ii).

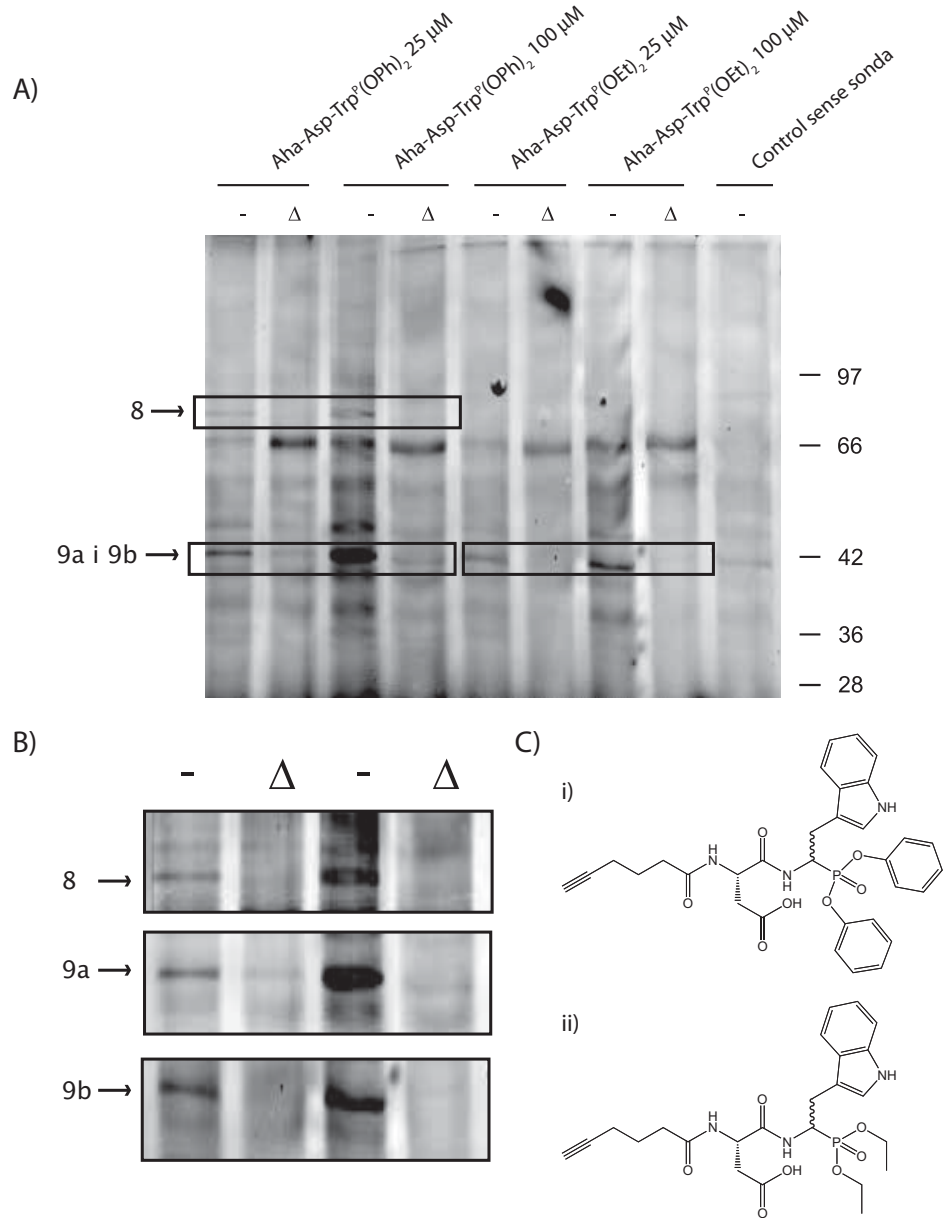


Figura 3.61: Etiquetat funcional del proteoma de glàndula pituïtària de ratolí amb la sonda Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂. A) Mostres d'extracte de glàndula pituïtària de ratolí (12,5 μg) etiquetades amb les sondes Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ a 25 i 100 μM. El revelat s'ha realitzat per incorporació d'una etiqueta fluorescent (TriN₃) mitjançant la reacció de cicloadició [2+3] de Huisgen. B) Amplificació de les bandes corresponents a proteïnes detectades específicament. C) Estructura de les sondes Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ (i) i Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ (ii).

Taula 3.5: Proteïnes detectades específicament en gels de fluorescència mitjançant l'ús sondes de tipus fosfonat

Sonda	Cervell	Gl. Pituitària
Aha-Ala-Leu ^P (OPh) ₂	<i>Banda 1</i> a ~80 kDa	<i>Banda 2</i> a ~60 kDa
Aha-Ala-Leu ^P (OEt) ₂	–	–
Aha-Arg-Leu ^P (OPh) ₂	<i>Banda 3</i> a ~79 kDa <i>Banda 5</i> a ~24 kDa	<i>Banda 6</i> a ~85 kDa
Aha-Arg-Leu ^P (OEt) ₂	<i>Banda 4</i> a ~40 kDa	–
Aha-Glu-Leu ^P (OPh) ₂	–	–
Aha-Glu-Leu ^P (OEt) ₂	–	–
Aha-Asp-Trp ^P (OPh) ₂	<i>Banda 7</i> a ~92 kDa –	<i>Banda 8</i> a ~85 kDa <i>Banda 9a</i> a ~42 kDa
Aha-Asp-Trp ^P (OEt) ₂	–	<i>Banda 9b</i> a ~42 kDa

Taula 3.6: Proteïnes identificades per escissió de les bandes d'interès dels gels de fluorescència.

Proteïna Identificada	Referència	PM (kDa)
Banda 1		
Vesicle-fusing ATPase	IPI00656325.2	82,5
83 kDa protein	IPI00876255.1	82,5
Thimet oligopeptidase	IPI00322150.8	78,0
Serotransferrin precursor	IPI00139788.2	76,7
Dipeptidyl-peptidase 3	IPI00116134.1	82,9
FAST kinase containing protein 3	IPI00762204.2	75,3
Banda 2		
Heat shock cognate 71 kDa protein	IPI00323357.3	70,8
71 kDa protein	IPI00457741.4	70,7
Hspa8 protein	IPI00886297.1	68,7
Serum albumin precursor	IPI00131695.3	68,6
Banda 3		
6-phosphofructokinase	IPI00331541.5	85,2
Isoform 2 of Dynamin-1-like protein	IPI00172221.2	80,2
Isoform 1 of Dynamin-1-like protein	IPI00556723.1	82,6
Isoform Ia of Synapsin-1	IPI00649886.1	74,0
Isoform Ib of Synapsin-1	IPI00136372.3	70,0
6-phosphofructokinase	IPI00554862.2	85,2
Dipeptidyl-peptidase 3	IPI00116134.1	82,9
Crmp1 protein	IPI00312527.4	74,2
Crmp4A	IPI00406447.3	73,8
LOC100044177 Ezrin	IPI00330862.5	69,4
Vesicle-fusing ATPase	IPI00656325.2	82,6
83 kDa protein	IPI00876255.1	82,5
Thimet oligopeptidase	IPI00322150.8	77,9
Moesin	IPI00110588.4	67,7
Radixin	IPI00308324.2	68,6
Radixin isoform a	IPI00653921.2	68,5
Serotransferrin precursor	IPI00139788.2	76,7
Protein kinase C gamma type	IPI00122069.1	78,3

NOTA: No es mostren les actines, les tubulines ni les queratines.

Taula 3.7: Proteïnes identificades per escissió de les bandes d'interès dels gels de fluorescència (Continuació).

Proteïna Identificada	Referència	PM (kDa)
Banda 4		
Fructose-bisphosphate aldolase A	IPI00221402.7	39,3
cDNA Aldolase-like protein	IPI00649880.2	39,3
Protein beta-actin-like	IPI00221528.1	42,0
Fructose-bisphosphate aldolase	IPI00133580.1	39,3
cDNA, Actin-like protein	IPI00457901.1	37,3
Isoform 1 of Protein NDRG2	IPI00136134.1	40,7
Isoform 2 of Protein NDRG2	IPI00759847.1	39,2
EG622339 predicted gene	IPI00123176.1	36,5
LOC100041204 similar to G3PDH	IPI00271869.1	36,0
LOC100044981 similar to G3PDH	IPI00319731.2	37,4
Malate dehydrogenase	IPI00336324.11	36,5
Banda 5		
Protease, serine 1	IPI00130391.1	26,1
21 kDa protein aldolase-like	IPI00856247.1	20,8
26 kDa protein aldolase-like	IPI00858310.1	25,8
24 kDa protein enolase-like	IPI00649143.2	23,9
Enolase	IPI00649551.1	20,9
SET translocation	IPI00755843.1	24,9
LOC671392 similar to I-2PP2A	IPI00850678.1	29,5
Got1 Protein	IPI00856409.1	20,4
Try10-like trypsinogen	IPI00395100.1	26,5
Try10 trypsin 10	IPI00719897.1	26,2
14-3-3 protein zeta/delta	IPI00116498.1	27,7
LOC100047236 similar to 14-3-3Z	IPI00853851.1	24,1
Banda 9a		
Creatine kinase B-type	IPI00136703	42,7
Adenosylhomocysteinase	IPI00230440	47,7
Banda 9b		
Creatine kinase B-type	IPI00136703	42,7
Adenosylhomocysteinase	IPI00230440	47,7

NOTA: No es mostren les actines, les tubulines ni les queratines.

S'ha intentat introduir un procés de purificació de les proteïnes marcades mitjançant avidina immobilitzada entre el marcatge i l'escissió de bandes. Tanmateix, aquest procés provoca una pèrdua i una dilució excessiva de les proteïnes d'interès que situa la quantitat de proteïna per sota del límit de detecció visual i impedeix localitzar i escindir les bandes correctament.

D'aquesta manera, les anàlisis per marcatge directe en gels de fluorescència permeten analitzar en poc temps nombroses mostres en diferents condicions, teixits i sondes i obtenir una llista preliminar de proteïnes candidates. A partir d'aquesta informació, s'han seleccionat aquelles combinacions de teixits i sondes més interessants i s'ha procedit a una anàlisi per espectrometria de masses MudPIT. Tal i com s'ha comentat anteriorment, aquesta aproximació inclou un procés de purificació de les proteïnes marcades mitjançant avidina immobilitzada i requereix la comparació de la mostra d'interès amb els controls de proteoma inactiu (desnaturalització per temperatura) i d'absència de sonda.

Entre els resultats més prometedors obtinguts per MudPIT (veure taules 3.8, 3.9 i 3.10), cal destacar la identificació del precursor de la carboxilesterasa de fetge i similars obtingut en l'anàlisi del proteoma de glàndula pituïtària amb la sonda Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂. Les proteïnes identificades en aquesta anàlisi, realitzada a *The Scripps Research Institute*, coincideixen en PM a la banda identificada per gels de fluorescència (veure figura 3.55) i corresponen a una família de proteïnes serina hidrolasa que participen en la hidròlisi tant d'enllaços éster com d'enllaços amida [357, 358, 359, 360]. Aquestes dades, juntament amb la identificació d'aquestes proteïnes a la glàndula pituïtària, les converteixen en unes bones candidates per estar implicades en la hidròlisi d'enllaços amida del tipus Ala-Leu↓ i, en última instància, en el processament de neuropèptids.

Per a la resta de sondes i teixits, els resultats obtinguts o bé no mostren diferències significatives amb els controls—com en l'anàlisi de la glàndula pituïtària amb algunes sondes—o bé no permeten associar directament les proteïnes identificades amb una activitat serina proteasa. Tot i això, s'identifiquen algunes proteïnes que han estat descrites com a hidrolases o per a les quals s'han predit dominis amb aquesta activitat. Entre aquestes identificacions cal destacar proteïnes com la Sinaptojanina-1 (IPI00850983), la proteïna CRMP1 (IPI00312527) o la proteïna Titin isoforma N2A (IPI00604969). Tant aquestes proteïnes com aquelles per a les quals no s'ha predit un domini serina proteasa podrien presentar activitats no descrites i, malgrat ser poc probable, no es pot descartar la seva implicació en fenòmens de processament de pèptids.

Per altra banda, cal destacar que els resultats obtinguts a l'Institut de Recerca Biomèdica no són tant clars, en termes de sensibilitat i comptes espectrals, com els aconseguits a *The Scripps Research Institute*. Aquesta menor sen-

Taula 3.8: Proteïnes identificades per espectrometria de masses MudPIT

Proteïna Identificada	Referència	PM (kDa)
Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ – Pituitària		
Similar to Liver carboxylesterase N prec. 1	IPI00553586*	62,1
Similar to Liver carboxylesterase N prec. 6	IPI00678863*	62,1
Similar to Liver carboxylesterase N prec. 2	IPI00677642*	62,1
Similar to Liver carboxylesterase N prec. 5	IPI00675322*	62,1
Similar to Liver carboxylesterase N prec. 3	IPI00672511*	62,1
Similar to Liver carboxylesterase N prec. 4	IPI00667966*	62,1
Similar to Liver carboxylesterase N prec. 5	IPI00662318*	62,1
Liver carboxylesterase N precursor	IPI00138342*	61,0
Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ – Cervell		
Malate dehydrogenase	IPI00336324	36,5
Isoform Ia of Synapsin-1	IPI00649886	74,1
Isoform Ib of Synapsin-1	IPI00136372	70,0
Isoform 3 of Synapsin-1	IPI00649467	71,4
Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00407130	57,8
Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00845840	57,9
ALS2CR homolog	IPI00128338	76,3
Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ – Cervell		
Glutamine synthetase	IPI00626790	42,1
Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00407130	57,8
Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00845840	57,9
Titin isoform N2-A	IPI00604969	371,6
Isoform 1 of Titin	IPI00756257	390,6
Titin	IPI00750829	375,5
Titin	IPI00750701	913,5
Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ – Cervell		
Crmp1 protein	IPI00312527	74,0
Crmp1 dihydropyrimidinase-related protein	IPI00875117	62,2
Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00407130	57,8
Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00845840	57,9

NOTA: No es mostren les actines, les tubulines ni les queratines.

* Els codi IPI d'aquestes proteïnes fan referència a la versió 3.23 IPI Mouse DB.

Taula 3.9: Proteïnes identificades per espectrometria de masses MudPIT
(Continuació – 1a part)

Proteïna Identificada	Referència	PM (kDa)
Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ – Cervell		
LOC100044223 Alpha-enolase	IPI00462072	47,1
Enolase	IPI00648821	39,7
Isoform 1 of Syntaxin-binding protein	IPI00415402	67,5
Isoform 2 of Syntaxin-binding protein	IPI00415403	68,7
Fructose-bisphosphate aldolase A	IPI00221402	39,3
26 kDa protein Aldolase-like	IPI00858310	25,8
Fructose-bisphosphate aldolase	IPI00856379	45,1
Transketolase	IPI00137409	67,3
Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP)	IPI00137730	20,8
21 kDa protein PEBP-like	IPI00340165	20,8
17 kDa protein Enolase-like	IPI00830694	17,2
24 kDa protein Enolase-like	IPI00649143	23,9
Enolase	IPI00473227	35,1
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase α	IPI00320850	79,3
Isoform A of AP-2 complex α	IPI00108780	107,6
Isoform B of AP-2 complex α	IPI00622911	105,5
Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00407130	57,8
Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00845840	57,9
Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ – Pituïtària		
Hemoglobin β Subunit	IPI00316491	15,8
β -2-globin (Fragment)	IPI00885376	15,7
β -2-globin (Fragment)	IPI00828873	15,7
Hbb- β 2 Globin-like protein	IPI00621417	15,8

NOTA: No es mostren les actines, les tubulines ni les queratines.

Taula 3.10: Proteïnes identificades per espectrometria de masses MudPIT
(Continuació – 2a part)

Proteïna Identificada	Referència	PM (kDa)
Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ – Cervell		
Hemoglobin subunit α	IPI00469114	15,1
Phosphatidylethanolamine-binding protein	IPI00137730	20,8
21 kDa protein PEBP-like	IPI00340165	20,8
Enolase	IPI00648821	39,8
Aspartate aminotransferase	IPI00117312	47,4
Glutamine synthetase	IPI00626790	42,1
28 kDa GTP-binding protein	IPI00831365	27,6
21 kDa protein GTP-binding protein	IPI00831184	20,7
Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00407130	57,8
Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00845840	57,9
Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha	IPI00320850	79,3
Propionyl-CoA carboxylase α chain	IPI00330523	79,9
Transitional ER ATPase	IPI00622235	89,3
LOC675857 similar to valosin	IPI00676914	88,8
Isoform 4 of 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	IPI00420882	117,7
Isoform 3 of 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	IPI00845652	118,2
Isoform 2 of 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	IPI00719841	116,0
Isoform 1 of 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	IPI00626237	116,4
Synaptojanin-1	IPI00850983	172,6

NOTA: No es mostren les actines, les tubulines ni les queratines.

sibilitat es pot deure a qüestions de rang dinàmic, al valor de paràmetres interns de l'aparell o a la menor longitud de les columnes comercials, entre d'altres, que caldrà optimitzar per a assajos futurs. Tot i això, cal remarcar que aquesta menor sensibilitat, que ja va ser detectada en la posada a punt de la metodologia, no va impedir la correcta detecció de la proteïna prolioligopeptidasa, i amb ella, la validació de la tècnica.

Finalment, cal recordar que la identificació de proteïnes per proteòmica basada en activitat representa el primer pas per a l'assignació funcional de les proteïnes. D'aquesta manera, a partir d'uns resultats com els mostrats en aquesta tesi caldrà realitzar una validació de les proteïnes identificades començant per aquelles identificacions més clares i amb un major suport bibliogràfic que faci pensar que poden ser bones candidates. Aquesta validació pot comportar assajos molt diversos com assajos de clonació i expressió de les proteïnes identificades per comprovar-ne l'activitat *in vitro*, assajos de colocalització dels neuropèptids i les proteïnes d'interès, assajos *in vivo* amb ratolins amb gens i enzims no funcionals, assajos de caracterització estructural, etc. (veure Annex).

Resum

En aquest últim apartat de la tesi s'han utilitzat les sondes de tipus fosfonat sintetitzades en els apartats anteriors per fer una exploració preliminar del proteoma de cervell i glàndula pituïtària. L'anàlisi del proteoma soluble s'ha realitzat tant per marcatge directe en gels de fluorescència i posterior escissió i anàlisi de les bandes d'interès com per tecnologia MudPIT. Aquestes tècniques han permès identificar algunes proteïnes candidates com el precursor de la carboxilesterasa de fetge, la proteïna de 83 kDa, el precursor de la serotransferrina, la proteïna Ndr2 i les proteïnes thimet oligopeptidasa i dipeptidil peptidasa III.

Capítol 4

Discussió general

Un dels principals objectius d'aquesta tesi ha estat establir una metodologia per a la identificació de proteases d'extracte de cervell mitjançant sondes basades en activitat que incorporin un grup reactiu de tipus aldehyd i una seqüència aminoacídica basada en substrats naturals.

Per assolir aquest objectiu, inicialment, s'han dissenyat i sintetitzat diverses sondes de tipus aldehyd basades, en substrats naturals o inhibidors coneguts, per aïllar i identificar una proteïna model a partir d'extractes de cervell. Aquests compostos han demostrat ser excel·lents inhibidors de la proteïna model tant en la seva versió lliure com en la seva versió immobilitzada. Tanmateix, l'ancoratge d'aquestes sondes en suports sòlids de tipus magnètic o en resina PEGA no ha permès immobilitzar i aïllar la proteïna model de forma específica. Un cop descartats els problemes estèrics pels bons resultats dels assajos d'inhibició i dels experiments de marcatge directe amb inhibidors biotinilats, s'ha plantejat la possibilitat que els problemes observats derivin del caràcter covalent i reversible de l'enllaç que estableix el grup aldehyd de les sondes amb el centre actiu de les proteïnes. D'aquesta manera, el caràcter reversible de l'enllaç seria insuficient per mantenir l'estabilitat de la interacció inhibidor – proteïna durant el protocol d'aïllament de la proteïna i eliminació de les interaccions inespecífiques i justificaria la incapacitat d'immobilitzar i aïllar la proteïna model de forma específica.

Per aquest motiu s'ha substituït el grup reactiu de les sondes per un grup de tipus fosfonat. Aquest grup només reacciona amb proteïnes serina proteasa, però a diferència de l'aldehyd, estableix enllaços covalents i irreversibles amb el centre actiu de les proteïnes diana. La síntesi i utilització de les noves sondes amb un grup reactiu de tipus fosfonat ha permès aïllar i detectar específicament la proteïna model tant per marcatge directe en gels de fluorescència com per espectrometria de masses (MudPIT). Aquests resultats han resolt els problemes sorgits amb les sondes de tipus aldehyd i han confir-

mat la necessitat d'establir un enllaç covalent i irreversible entre les sondes i la proteïna d'interès. Així mateix, la detecció selectiva de la proteïna model únicament quan s'utilitza una sonda basada en un substrat conegut ha permès validar el disseny metodològic i confirmar que la utilització de seqüències aminoacídiques en la regió espaciadora és fonamental per dirigir les sondes cap a les proteïnes que processen substrats similars.

L'experiència adquirida en els assajos anteriors ha permès redissenyar les sondes de tipus aldehid per incorporar-hi un grup fotoreactiu addicional que estableixi un enllaç covalent i irreversible entre la proteïna d'interès i la sonda. D'aquesta manera, s'han desenvolupat sondes basades en activitat de tipus aldehid que, després de ser irradiades amb llum ultraviolada, s'uneixen de forma covalent i irreversible a les proteïnes d'interès. La utilització de sondes de tipus aldehid facilita l'exploració de les proteases d'interès amb independència de la seva classe enzimàtica, alhora que permeten modular-ne la selectivitat mitjançant les seqüències aminoacídiques. Aquestes sondes són lleugerament menys sensibles que les sondes de tipus fosfonat, però permeten la caracterització del proteoma mantenint les característiques dels aldehids com són l'àmplia reactivitat, la reducció de problemes estèrics i la facilitat de síntesi.

Per altra banda, s'ha procedit a assolir el segon objectiu principal de la tesi: l'exploració del proteoma de cervell i glàndula pituïtària mitjançant tècniques de proteòmica basada en activitat per a la identificació de noves proteases. Per assolir aquest objectiu, s'han dissenyat i sintetitzat noves sondes basades en activitat de tipus fosfonat per a l'exploració del proteoma. El disseny d'aquestes sondes s'ha realitzat a partir de la seqüència peptídica de diversos fragments de la cromogranina B descrits a la bibliografia i s'han sintetitzat les sondes Aha-Ala-Leu^P(OR)₂, Aha-Arg-Leu^P(OR)₂, Aha-Glu-Leu^P(OR)₂ i Aha-Arg-Trp^P(OR)₂ combinant estratègies de síntesi en solució i síntesi en fase sòlida.

Aquestes sondes s'han utilitzat per a aïllar i identificar noves proteases a partir d'extractes de cervell i glàndula pituïtària tant per marcatge directe en gels de fluorescència i posterior escissió i anàlisi de les bandes d'interès com per tecnologia MudPIT. Aquestes tècniques han permès identificar algunes proteïnes candidates com el precursor de la carboxilesterasa de fetge, la proteïna de 83 kDa, el precursor de la serotransferrina, la proteïna Ndr2 i les proteïnes thimet oligopeptidasa i dipeptidil peptidasa III.

Capítol 5

Conclusions

1. Les sondes basades en activitat de tipus aldehid, H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H, H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H i Biotina-Met-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H, són bones inhibidores de la proteïna prolil oligopeptidasa tant en la seva forma lliure com immobilitzada en suport sòlid, però no permeten l'aïllament específic de la proteïna prolil oligopeptidasa.
2. L'enllaç covalent i reversible que les sondes aldehid estableixen amb el centre actiu de les proteïnes diana no és suficientment estable per a l'aïllament específic de les proteïnes d'interès ja que en presència de detergent la unió sonda-proteïna desapareix.
3. La substitució del grup reactiu aldehid per un grup reactiu de tipus fosfonat i la síntesi de sondes Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂, Aha-Pro-Pro^P(OPh)OH i Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ permet aïllar i caracteritzar la proteïna prolil oligopeptidasa de forma específica tant per marcatge directe en gels de fluorescència com per tecnologia MudPIT.
4. Entre les sondes sintetitzades, la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ apareix com una bona inhibidora de la proteïna prolil oligopeptidasa i ha permès posar a punt la metodologia proposada per a la identificació de proteases d'extracte de cervell mitjançant tècniques de proteòmica basada en activitat.
5. La substitució dels residus de prolina de la sonda Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ per alanina i leucina provoca que la sonda deixi de reconèixer de forma específica la hrPOP i confirma la importància de la seqüència aminoacídica, present a les sondes 1-aminoalcanofosfonat de diaril i de dialquil, en la seva selectivitat.
6. La incorporació d'un residu benzofenona a les sondes de tipus aldehid permet establir enllaços covalents i irreversibles per irradiació amb

- llum ultraviolada i converteix les sondes de tipus aldehyd en sondes basades en activitat que poden ser utilitzades per a la caracterització del proteoma.
7. Les sondes de tipus aldehyd Aha-Bpa-Pro-Pro-H, Aha-Bpa-Pro-Pro-H i Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H incorporen un residu benzofenona i permeten la detecció específica de hrPOP tant per marcatge directe en gels de fluorescència com per tècniques d'espectrometria de masses LC-MS/MS.
 8. La combinació d'estratègies de síntesi en fase sòlida i síntesi en solució assistida per polímer ha resultat la millor estratègia per a la síntesi de les sondes Aha-Arg-Leu^P(OR)₂, Aha-Glu-Leu^P(OR)₂ i Aha-Arg-Trp^P(OR)₂.
 9. La utilització de tritó X-100 per a l'obtenció del proteoma soluble s'ha mostrat més efectiu que els cicles de congelació–descongelació, però la seva utilització en la preparació dels extractes d'interès s'ha descartat perquè malmet l'activitat de nombroses proteïnes.
 10. La utilització de les sondes basades en activitat Aha-Ala-Leu^P(OR)₂, Aha-Arg-Leu^P(OR)₂, Aha-Glu-Leu^P(OR)₂ i Aha-Arg-Trp^P(OR)₂ per a l'exploració del proteoma soluble de cervell i glàndula pituïtària ha permès aïllar i identificar algunes proteïnes candidates com el precursor de la carboxilesterasa de fetge, la proteïna de 83 kDa, el precursor de la serotransferrina, la proteïna Ndr2 i les proteïnes thimet oligopeptidasa i dipeptidil peptidasa III.

Capítol 6

Annex

6.1 Introducció

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'anàlisi del proteoma de pituitària amb la sonda Ahx-Ala-Leu^P(OPh)₂ i el posterior anàlisi per MudPIT ha permès identificar les proteïnes serina hidrolasa de pituitària de ratolí que interaccionen de forma específica amb aquesta sonda. Emprant aquesta tècnica, s'han identificat dues proteïnes: el Precursor de la carboxilesterasa N de fetge i una Proteïna similar al precursor de la carboxilesterasa N de fetge. Ambdues proteïnes comparteixen un alt percentatge de la seqüència aminoacídica i malgrat que els pèptids identificats confirmen la presència del Precursor de la carboxilesterasa N de fetge, no es pot descartar que l'altra proteïna també hi sigui present (veure figura 6.1).

La proteïna similar al precursor de la carboxilesterasa N de fetge (*Liver carboxylesterase N precursor-like*, Protein-NCBI: NP_001074841) apareix a les bases de dades com una proteïna hipotètica codificada per un gen predit computacionalment i confirmat per EST (EntrezGene: LOC382044). En canvi, el Precursor de la carboxilesterasa N de fetge (*Liver carboxylesterase N precursor*), també conegut com a *Lung surfactant convertase*, Esterasa-1 o PES-N (UniProtKB: P23953), està codificat pel gen *es1* (EntrezGene: 13884) i pertany a la família de les proteïnes carboxilesterases.

La família de proteïnes carboxilesterasa comprèn un seguit de proteïnes α , β serina hidrolasa que s'expressen fonamentalment als pulmons, l'intestí prim, el ronyó i el fetge [362, 359, 363] on juguen un paper fonamental en la conversió del surfactant pulmonar, en la inactivació de xenobiòtics i en l'activació de profàrmacs per hidròlisi dels enllaços éster i amida [357, 359].

Les proteïnes carboxilesterases presenten una activitat predominantment de tipus esterasa, però s'han descrit diversos casos de carboxilesterases que participen en la hidròlisi d'enllaços amida com els enllaços presents a la butinili-

```

LOC384022      MWLHALVWASLALCPWGHSPSSPVVDTTQGKILGKYTSLEGFEHPVAVFLGVFPAKPP
ES1            MWLHALVWASLAVCPILGHSLLPPVVDTTQGKVLGKYISLEGFEQPVAVFLGVFPAKPP
*****:*** ** .*****:*** *****:*****

LOC384022      GSLRFAPPEPAEPWSFVKNATSYPPMCSQDAVAVQLSDMLSTKESIPPLFSEDCLYLN
ES1            GSLRFAPPQPAEPWSFVKNATSYPPMCSQDAGWAKILSDMFSTEKEILPLKISEDCLYLN
*****:***** .:*****:**:* :* :*****

LOC384022      IYSPADLTKSSLLPVMVWIHGGGLMTGGASLYNGLALSAHENVVVVTIQYRLGIWGLFST
ES1            IYSPADLTKSSQLPVMVWIHGGGLVIGGASPYNGLALSAHENVVVVTIQYRLGIWGLFST
***** *****: *** *****

LOC384022      GDEHSRGNWAHLQLAALRWVQDNIANFGGNPDSVTVFGSSAGGVSVSVLVLSPLAKNLF
ES1            GDEHSPGNWAHLQLAALRWVQDNIANFGGNPDSVTVFGSSGGISVSVLVLSPLGKDLF
***** *****:*.*.**:* *****.*:**

LOC384022      HRAISESSVLENIVITLDLVACDLSQMIATVSGCNDTSSTAMVQCLRQKTENELLEITV
ES1            HRAISESGVIN--TNVGKKNIQAVNEI IATLSQCNDTSSAAMVQCLRQKTESELLEISG
*****.***:. . . :.:**:* *****:*****.*****:

LOC384022      KLEVTKVGGAAASAKDNTSMSTVIDGVVLPKAPPEEILAEKSFSTVPYIVGFNKQEFGWII
ES1            KLVQYNIS-----LSTMIDGVVLPKAPPEEILAEKSFNTVPYIVGFNKQEFGWII
** :. . :**:* *****:*****

LOC384022      PTMLGDDLSEGMNEETASLLRRFHSDLNISESLIPAVIEKYLRTDDPAKRRDLLDM
ES1            PMLQNLPEGMNEETASLLRRFHSSELNISESMIPAVIEQYLRGVDDPAKSELILDM
* * .**.* *****:*****.*****.*****.***

LOC384022      FSDVFFGIPAVLLSRSLRDAGVSTYMYEFRYRPSFVSDKRPQTVEGDHGDEIFSVFGIPL
ES1            FGDIFFGIPAVLLSRSLRDAGVSTYMYEFRYRPSFVSDKRPQTVEGDHGDEIFFVFGIPL
*.*:***** ***** ***** ** **

LOC384022      LKEGTSEEETNLSKMVMKFWANFARNGNPNGEGLPHWPEYDEKEGYLQIGATTQQAORLK
ES1            LKFCASEEETNLSKMVMKFWANFARNGNPNGEGLPHWPEYDEQEGYLQIGATTQQAORLK
*****:***** ***** *****

LOC384022      AEEVAFWTELLAKNPPETDPTEHREHK
ES1            AEEVAFWTELLAKNPPETDPTEHTEHK
***** ***** **

```

Figura 6.1: Alineament de les seqüències proteïques codificades pels gens *LOC384022* i *es1* amb els pèptids identificats per espectrometria de masses ressaltats en rosa. L'alineament s'ha realitzat amb el programari Clustal W (EMBL-EBI) [361].

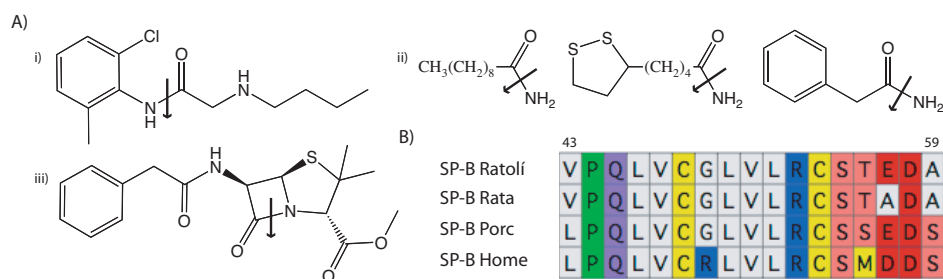


Figura 6.2: Substrats de tipus amida processats per carboxilesterases. A) Estructura d'algunes amides processades per carboxilesterases com la butanilcaïna (i), diverses amides terminals (ii), i l'èster metílic de la benzilpenicil·lina (iii). B) Alineament múltiple del fragment 43 – 59 de la proteïna surfactant B madura de ratolí, rata, porc i home que conté la possible seqüència diana de la carboxilesterasa.

caïna [359] o en la hidròlisi de β -lactames i d'amides terminals, catalitzades per la carboxilesterasa de fetge de porc [358, 360] (veure figura 6.2, apartat A). A més a més, recentment, aquesta proteïna s'ha relacionat amb el processament de la proteïna surfactant B (SP-B), present en els agregats de surfactant pulmonar i necessària per a la seva activitat [364, 365, 366, 367, 368]. Els estudis *in vitro* de Ruppert *et al.* han permès la identificació d'un subproducte de 12 kDa de la proteïna surfactant B i malgrat que no se n'ha determinat la seqüència completa, els autors proposen la seqüència Arg₅₂↓-Cys₅₃ del pèptid madur com a possible lloc de tall [369, 367]. Tanmateix, tenint en compte que les proteïnes serina proteasa del tipus tripsina no tallen aquesta proteïna [369] i que la carboxilesterasa N de fetge de ratolí reacciona específicament amb la sonda Ahx-Ala-Leu^P(OPh)₂, es podria pensar més aviat amb la seqüència Val₅₀-Leu₅₁↓-Arg₅₂, altament conservada (veure figura 6.2, apartat B), com a candidata per al processament de la proteïna surfactant B. Sigui com sigui, tots aquests experiments descrits a la bibliografia demostren que, més enllà de l'activitat esterasa, algunes carboxilesterases poden presentar també una certa activitat proteasa.

Així mateix, les proteïnes carboxilesterasa es caracteritzen per tenir un centre actiu molt similar a les proteïnes serina proteasa, format pels residus de serina, àcid glutàmic i histidina, que constitueixen la triada catalítica. De forma equivalent a les proteïnes serina proteasa, el mecanisme d'acció s'inicia amb l'atac nucleòfil per part del grup β -hidroxil de la serina, formant així l'intermediari tetraèdric i l'acil-enzim que serà hidrolitzat per una molècula d'aigua (veure figura 6.3) [359, 363].

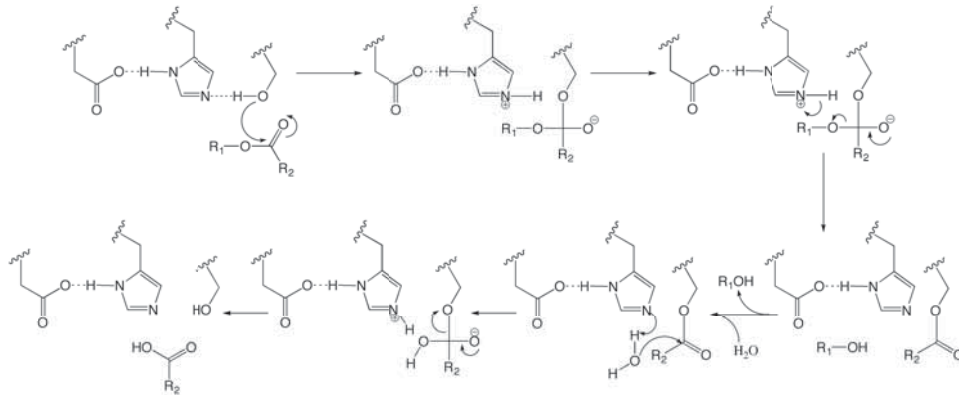


Figura 6.3: Mecanisme d'acció de les proteïnes carboxilesterases

Aquestes característiques, juntament amb la localització subcel·lular d'aquestes proteïnes, presents a la llum del reticle endoplasmàtic i als microsomes [370, 359, 363], ha motivat la clonació i l'expressió de les proteïnes identificades en pituïtària de ratolí per comprovar si poden estar implicades en la hidròlisi d'enllaços amida del tipus Ala-Leu↓ i, en última instància, en el processament de neuropèptids.

6.2 Clonació dels gens *es1* i *LOC382044*

Els gens *es1* i *LOC382044* estan situats en tàndem al cromosoma 8 i la seva expressió en glàndula pituïtària no ha estat descrita amb anterioritat (UniGene: Mm.88078 i Mm.334706). Per confirmar l'expressió i activitat del gen *es1* i comprovar si també s'expressa el gen *LOC382044*, s'ha decidit adoptar dues aproximacions alternatives per a l'amplificació i clonació d'aquests gens. Així doncs, per una banda s'ha treballat amb un clon comercial de la ATCC del gen *es1* de ratolí, i per l'altra, amb ADNc de pituïtària comercial a partir del qual es pretén amplificar l'ADNc del gen *es1* i/o del gen *LOC382044*.

Per a l'amplificació específica dels ADNc d'interès, s'ha dissenyat una única parella d'oligonucleòtids que actuen d'encebadors en la reacció en cadena de la polimerasa tant en l'amplificació del gen *es1* com del gen *LOC382044*. Aquests oligonucleòtids han estat dissenyats perquè incorporin una diana de restricció *NdeI* a l'extrem 5' i una diana de restricció *EcoRI* a l'extrem 3' de l'ADNc, que han de permetre la clonació orientada i en pauta de lectura en el vector d'expressió pET-28A. L'elecció d'aquest vector facilita la introducció d'una seqüència de sis histidines a l'extrem N_{ter} de la proteïna que simplifiquen considerablement el procés de purificació.

El gen *es1* amplificat i purificat a partir del clon comercial s'ha digerit amb *EcoRI* i *NdeI* i s'ha inserat directament al vector pET-28A (Novagen) per a

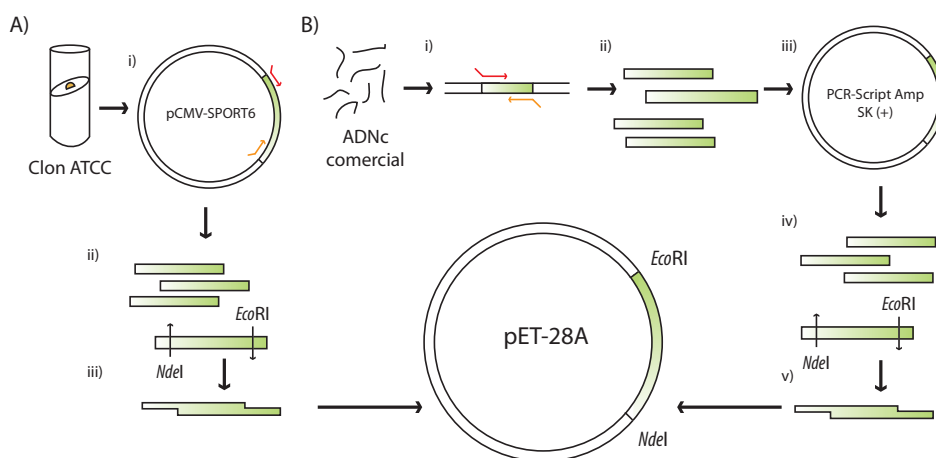


Figura 6.4: Esquema de les estratègies de clonació emprades a partir d'un clon comercial de la ATCC (A) i ADNc (B). A) A partir d'un clon comercial amb el gen *es1* inserat al vector pCMV-SPORT6, s'ha amplificat (i) el fragment d'interès amb els oligonucleòtids 5'-CGGAATTCTCATCATTGTGTTCTCTGTGCTCAGTAGGGTCTG-3' i 5'-GGGAATTCCATATGTGGCTCCATGCTCTGGTCTGGG-3' per reacció en cadena de la polimerasa (5 min a 94 °C; 35 cicles: 30 s a 94 °C, 1 min 55 °C, 4 min 72 °C; i 10 min a 72 °C). A continuació, els productes amplificats s'han digerit (ii) amb els enzims de restricció *EcoRI* i *NdeI* (2h, 37 °C), i el fragment resultant (iii) s'ha inserat de forma orientada al vector d'expressió pET-28A. B) A partir d'ADNc s'ha realitzat una amplificació per reacció en cadena de la polimerasa de forma equivalent a l'apartat A. Els productes amplificats (ii) s'han inserat en un vector PCR-Script-AMP SK(+) i s'han seqüenciat (iii) per a la seva identificació. Finalment, el fragment d'interès s'ha digerit (iv) amb els enzims de restricció *EcoRI* i *NdeI* (2h, 37 °C), i el fragment resultant s'ha inserat de forma orientada al vector d'expressió pET-28A.

la seva expressió en cèl·lules *E. coli* BL21 (DE3) i *E. coli* Origami (DE3). En canvi, els productes amplificats a partir de l'ADNc comercial de pituïtària de ratolí no s'han pogut inserar directament al vector pET-28A i ha calgut clonar-los i inserar-los, prèviament, en un vector de clonació de productes d'amplificació (veure figura 6.4).

L'amplificació per PCR de l'ADNc de pituïtària de ratolí ha donat lloc a 12 clons, tots ells idèntics entre si i iguals a la seqüència codificadora del gen *es1* (veure figura 6.5). El fet que tots els clons obtinguts siguin idèntics entre si es pot explicar fàcilment si es té en compte que la majoria de soques de ratolí utilitzades en el laboratori són altament cosanguínies, i per tant, homozigotes per a tots els gens.

En canvi, el fet que tots els clons corresponguin a l'ADNc del gen *es1* i no a l'ADNc del gen *LOC382044* es pot deure a diverses causes, entre les quals la més plausible és la manca d'expressió del gen *LOC382044* a la glàndula pituïtària. D'aquesta manera, la identificació per espectrometria de masses del producte del gen *LOC382044* seria fruit de la seva similitud amb el gen *es1* més que de la seva presència real al teixit estudiat. Tot i això, abans de descartar definitivament l'expressió del gen *LOC382044*, cal tenir en compte altres possibilitats com el fet que l'ADNc del gen *LOC382044* no estigui representat en el conjunt d'ADNc comercials adquirits o hi estigui representat en una abundància relativa molt petita i que, per tant, el nombre de clons obtinguts no sigui suficient per a l'obtenció dels productes minoritaris.

En qualsevol cas, la clonació de l'ADNc del gen *es1* a partir de l'ADNc comercial, juntament amb els resultats obtinguts per espectrometria de masses, ha permès detectar, per primera vegada, l'expressió d'aquest gen a la glàndula pituïtària de ratolí.

6.3 Expressió del gen *es1*

Inicialment, s'ha considerat oportú realitzar l'expressió del gen *es1* en cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) en un medi d'autoinducció utilitzat anteriorment al laboratori per a l'expressió d'altres proteïnes amb rendiments excepcionals: superiors a 50 mg proteïna per litre de cultiu. Aquest mètode està basat en la utilització d'un medi amb diverses fonts de carboni, incloent-hi la glucosa, el glicerol i la lactosa, que condueix a un creixement bacterià diàuxic [371, 372, 373]. Inicialment, els bacteris utilitzen la glucosa com a font de carboni, però quan aquesta s'acaba, la lactosa entra a la cèl·lula i reemplaça la glucosa. La presència de lactosa a l'interior cel·lular indueix l'expressió de la polimerasa d'ADN T7 del fag λ DE present al genoma bacterià. Finalment, aquesta polimerasa s'uneix al promotor T7 del vector pET-28A i indueix l'expressió de l'insert d'interès.

L'expressió del gen *es1* en medi d'autoinducció (veure taula 6.1, apartat 1, i figura 6.6), i la posterior purificació per cromatografia d'afinitat [374], ha permès obtenir la proteïna d'interès, però amb un rendiment considerablement baix (0,18 mg/l). El rendiment obtingut es deu a la formació de cossos d'inclusió ja que s'ha comprovat la presència de proteïna en els sediments no solubles de l'extracte bacterià. Així mateix, la realització d'un assaig d'activitat de tipus esterasa [375] ha evidenciat la falta d'activitat de la proteïna recombinant.

Per intentar evitar la formació de cossos d'inclusió i promoure un plegament correcte que permeti l'obtenció de proteïna recombinant activa, s'ha disminuït la temperatura fins als 16 °C (veure taula 6.1 (apartat 2) i figura 6.6)

[376]. No obstant això, aquesta modificació no ha donat els resultats esperats ja que no s'ha detectat l'expressió de la proteïna d'interès.

Davant d'aquesta situació, s'ha decidit coexpressar el gen d'interès amb les xaperones GroEL i GroES per cotransformació de les cèl·lules d'*E. coli* Origami 2 (DE3) amb el plasmidi pET-28A i el plasmidi pGro7 que incorpora els gens *groES* i *groEL* sota un promotor *araB* induït per L-Arabinosa [377] i un gen de resistència al cloramfenicol (*Cm*). La soca d'*E. coli* Origami 2 presenta una mutació als gens de la tioredoxina reductasa i de la glutatió reductasa que millora la formació de ponts disulfur i afavoreix el plegament de les proteïnes. La utilització d'aquesta soca, juntament amb el plasmidi pGro7, ha estat descrita per Böttcher *et al.* per a l'expressió, en *E. coli*, de l'isoenzim γ de la proteïna carboxilesterasa de fetge de porc amb excel·lents resultats tant en qüestió de rendiment com d'activitat [378].

Inicialment, aquest sistema de doble expressió no ha funcionat correctament amb el mètode d'autoinducció (veure taula 6.1 (apartat 3) i figura 6.6) ja que no permet controlar amb precisió l'inici de l'expressió de cadascuna de les proteïnes recombinants. En canvi, la realització d'un cultiu convencional amb medi LB amb expressió induïda per L-Arabinosa i IPTG (veure taula 6.1 (apartat 4) i figura 6.6) ofereix un major control del sistema d'expressió i permet iniciar l'expressió dels gens *groES* i *groEL* abans que el gen *es1*. L'expressió del gen *es1* en aquestes condicions ha permès l'obtenció de proteïna recombinant activa (Rendiment = 1,8 mg/l) purificada per cromatografia d'afinitat.

6.4 Assajos d'activitat del precursor de la carboxilesterasa N de fetge de ratolí

L'activitat de tipus esterasa dels extractes recombinants purificats s'ha comprovat mitjançant un assaig espectrofotomètric de conversió d'acetat de *p*-nitrofenil en *p*-nitrofenol ($\lambda = 405$ nm) [375]. Els resultats d'aquests assajos han evidenciat l'absència d'activitat en l'extracte obtingut per autoinducció (veure taula 6.1, apartat 1) i han confirmat la presència d'activitat de tipus esterasa en l'extracte induït per IPTG i cotransfectat amb el vector pGro7 (veure taula 6.1, apartat 4). La utilització d'un extracte control permet atribuir l'activitat esterasa observada a la proteïna recombinant d'interès (veure figura 6.7).

Un cop comprovada l'activitat esterasa del precursor de la carboxilesterasa N de fetge, s'ha realitzat una sèrie d'assajos per determinar si la proteïna d'interès és capaç també d'hidrolitzar enllaços amida. Per comprovar l'activitat de tipus proteasa s'han utilitzat els pèptids comercials Z-Ala-Ala-Leu-pNA, Boc-Gly-Gly-Leu-pNA i Boc-Gly-Gly-Leu-AMC i s'han sintetitzat

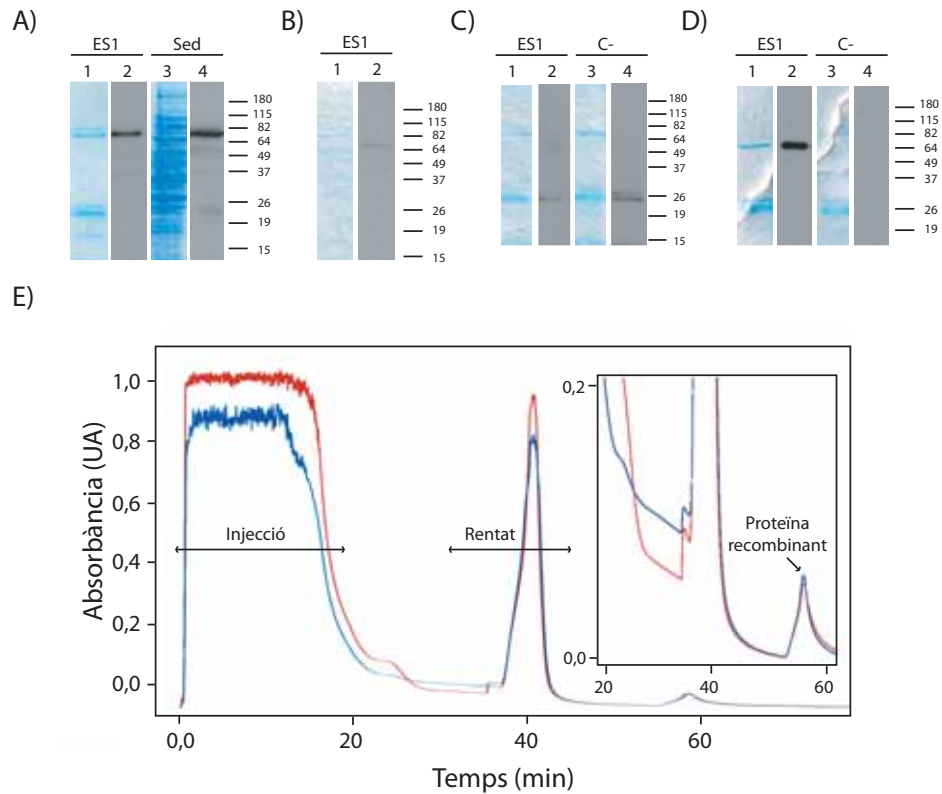


Figura 6.6: Obtenció del precursor N de la carboxilesterasa de fetge (gen *es1*) en diferents condicions d'expressió. A) Electroforesi (blau Coomassie) i transferència Western (α -HisTag) de la proteïna d'interès en l'extracte purificat (ES1, carril 1 i 2) i en el sediment (Sed, carrils 3 i 4), expressada segons les condicions 1 (veure taula 6.1). B) Electroforesi (blau Coomassie) i transferència Western (α -HisTag) de la proteïna d'interès en l'extracte purificat (ES1, carril 1 i 2), expressada segons les condicions 2. C) Electroforesi (blau Coomassie) i transferència Western (α -HisTag) de la proteïna d'interès en l'extracte recombinant purificat (ES1, carril 1 i 2) i en el l'extracte control purificat (C-, carrils 3 i 4), expressada segons les condicions 3. D) Electroforesi (blau Coomassie) i transferència Western (α -HisTag) de la proteïna d'interès en l'extracte recombinant purificat (ES1, carril 1 i 2) i en l'extracte control purificat (C-, carrils 3 i 4), expressada segons les condicions 4. E) Perfil cromatogràfic ($\lambda = 254$ nm (roig) i 280 nm (blau)) de la purificació del precursor N de la carboxilesterasa de fetge (gen *es1*) per cromatografia d'afinitat.

Taula 6.1: Mètodes, condicions i resultats de l'expressió del gen *esl* en cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) i Origami 2 (DE3)

Mètode	Condicions	Resultats
1. Autoinducció (<i>Kan</i>) BL21 (DE3)	4 h a 37 °C 4 h a 25 °C 24 h a 19 °C	Expressió 0,18 mg/l Activitat No
2. Autoinducció (<i>Kan</i>) BL21 (DE3)	4 h a 37 °C 4 h a 25 °C 48 h a 16 °C	Expressió - Activitat -
3. Autoinducció GroEL, GroES (<i>Kan</i> i <i>Cm</i>) Origami 2 (DE3)	48 h a 25 °C	Expressió - Activitat -
4. IPTG GroEL, GroES (<i>Kan</i> i <i>Cm</i>) Origami 2 (DE3)	DO ₅₉₅ \simeq 1 a 37 °C Arabinosa 1mg/ml 1 h a 16 °C IPTG 1 mM, 24 h a 16 °C	Expressió 1,8 mg/ml Activitat Sí

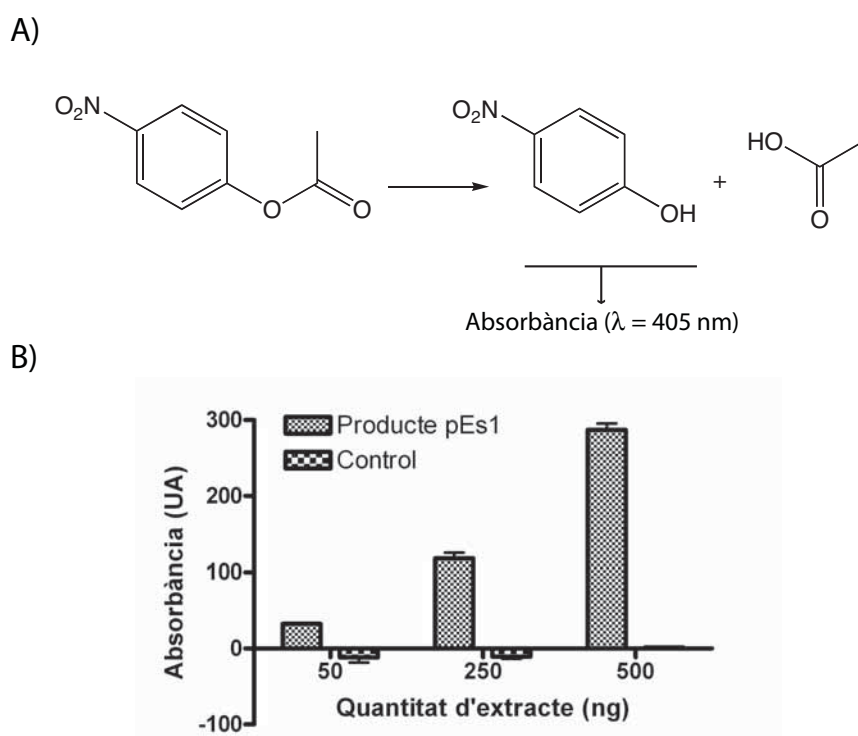


Figura 6.7: Assaig per a la determinació de l'activitat esterasa del precursor de la carboxilesterasa N de fetge de ratolí. A) Reacció de conversió de l'acetat de *p*-nitrofenil en *p*-nitrofenol en la qual es fonamenta l'assaig d'activitat esterasa. B) Resultats de l'activitat esterasa del precursor de la carboxilesterasa N de fetge de ratolí en comparació amb el control, en quantitats creixements de proteïna.

els pèptids H-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe(*p*-CF₃)-Asn-OH i CH₃CO-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe-Asn-NH₂ que simulen la seqüència del neuropèptid en el qual s'ha inspirat la sonda Ahx-Ala-Leu^P(OPh)₂.

Els pèptids comercials inclouen un grup cromòfor (pNA) o fluoròfor (AMC) que en cas de ser alliberats per hidròlisi de l'enllaç Leu↓-pNA o Leu↓-AMC poden ser detectats fàcilment per mètodes colorimètrics o de fluorescència. En canvi, el pèptid sintetitzat H-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe(*p*-CF₃)-Asn-OH incorpora tres àtoms de fluor que permeten detectar la hidròlisi de l'enllaç Leu↓-Phe(*p*-CF₃) per una variació en el desplaçament químic d'aquest àtom per RMN de ¹⁹F [379, 380, 225]. Finalment, també s'ha realitzat el seguiment dels assajos d'activitat per HPLC utilitzant el pèptid anterior i una versió amb l'extrem N_{ter} acetilat i l'extrem C_{ter} amidat, sintetitzat per evitar la presència de càrregues que puguin interferir en el reconeixement molecular. Així mateix, aquest nou pèptid tampoc inclou els àtoms de fluor, en un intent d'imitar al màxim el potencial neuropèptid substrat i minimitzar qualsevol possible impediment estèric.

Els assajos d'activitat amb el precursor de la carboxilesterasa N de fetge s'han realitzat no només amb diversos substrats i mètodes de detecció, sinó també a diferents valors de pH. En aquest sentit, inicialment els assajos s'han realitzat a pH lleugerament bàsic (pH = 8,0) d'acord amb els assajos d'activitat esterasa realitzats per Van Lith *et al.* [381] i en consonància amb els assajos de caracterització funcional de les proteases NARC-1 [159] i ECE [163]. Posteriorment, s'han repetit aquests mateixos assajos a pH lleugerament àcid (pH = 5,5) i en presència de Ca²⁺ en unes condicions anàlogues a les utilitzades en els assajos d'activitat de les convertases de prohormones dependents de calci [117].

Tanmateix, no s'ha pogut detectar activitat proteasa en cap dels assajos realitzats, ja sigui per mètodes cromatogràfics, colorimètrics, de fluorescència o de RMN de ¹⁹F. Si bé és cert que aquests resultats no són prometedors, tampoc permeten descartar definitivament la implicació de la carboxilesterasa estudiada en la hidròlisi d'enllaços peptídics.

En aquest sentit, cal remarcar que les condicions assajades en l'assaig enzimàtic no abarquen totes les condicions possibles i caldria explorar nous factors com la presència de determinats ions o coenzims, ampliar el rang de pH, diversificar els substrats assajats, etc. Així mateix, cal tenir en compte que el precursor de la carboxilesterasa N de fetge de ratolí ha estat descrit com una glicoproteïna d'uns 72 kDa (61 kDa en estat desglicosidat). Aquestes glicosilacions poden ser un factor fonamental per a l'activitat proteasa de la proteïna [365, 366], però no es reproduïxen en el sistema d'expressió procariota. La manca de glicosilacions podria justificar l'absència d'activitat i una possible solució per a solventar aquest aspecte podria ser l'expressió de la proteïna en cèl·lules d'insecte.

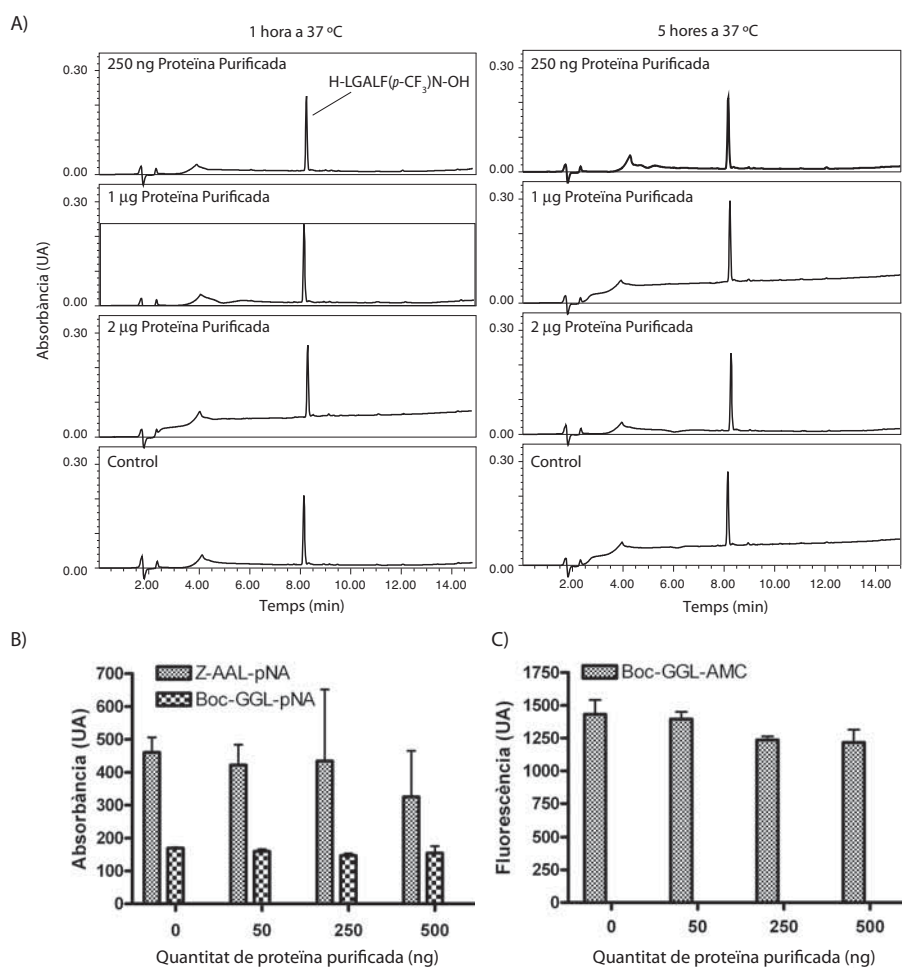


Figura 6.8: Assajos per a la determinació de l'activitat proteasa. A) Assaig d'HPLC per a la determinació de l'activitat proteasa de la proteïna purificada amb el substrat H-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe(*p*-CF₃)-Asn-OH (0,1 mM), a 1 i 5 h. En aquest assaig es pot observar que el reactiu de partida roman inalterat al llarg del temps. B) Assaig colorimètric per a la determinació de l'activitat proteasa de la proteïna purificada amb els substrats Z-Ala-Ala-Leu-pNA (0,1 mM) i Boc-Gly-Gly-Leu-pNA (0,1 mM). C) Assaig de fluorescència per a la determinació de l'activitat proteasa de la proteïna purificada amb el substrat Boc-Gly-Gly-Leu-AMC (0,1 mM).

Capítol 7

Metodologia

7.1 Síntesi i caracterització de compostos

7.1.1 Consideracions generals

Reactius

Els aminoàcids protegits, les resines comercials i el PyBOP utilitzats per a la síntesi de pèptids en fase sòlida s'obtenen de Novabiochem, Iris Biotech i Neosystem. El HOBt es compra a Albatros Chem, l'HOAt s'obté de GL Biochem Shangai i els dissolvents per a la síntesi de pèptids i l'anàlisi i purificació per HPLC s'obtenen de Scharlau i SDS. La resta de reactius, si no s'indica el contrari, s'han comprat a Sigma, Aldrich o Fluka Chemika.

Caracterització de compostos

La caracterització dels compostos sintetitzats per cromatografia HPLC es realitza en un aparell Alliance 2695 (Waters) amb un detector Photodiode array detector 996 (Waters) a $\lambda=220$ nm i $\lambda=254$ nm. S'utilitza una columna Symmetry 100 (C₁₈, 5 μ m, 150 x 4,6 mm, Waters) o una columna XTerra MS 125 (C₈, 3,5 μ m, 2,1 x 50 mm, Waters) i, excepte que s'especifiqui el contrari, els compostos s'analitzen mitjançant un gradient 0–100 % de Solució B en 15 minuts a un flux de 1 ml/min. Les cromatografies realitzades amb la columna XTerra MS 125 estan marcades amb un asterisc (*). Solució A: H₂O amb 0.045 % TFA. Solució B: Acetonitril amb un 0.036 % de TFA. Les dades cromatogràfiques s'analitzen amb el programari Millennium (v4.0, Waters).

En canvi, la caracterització per HPLC-ESI es realitza en un aparell d'HPLC Alliance 2796 (Waters) amb un detector Waters 2487 UV/vis dual λ absor-

bance (Waters) i un aparell ESI-MS Micromass ZQ (Waters). S'utilitza una columna Symmetry 300 (C_{18} , $5 \mu\text{m}$, $150 \times 3,9 \text{ mm}$, Waters) i, excepte que s'especifiqui el contrari, els compostos s'analitzen mitjançant un gradient 0–100 % de Solució B en 15 minuts a un flux de 1 ml/min. Solució A: H_2O amb 0,1 % d'àcid fòrmic. Solució B: Acetonitril amb un 0,07 % d'àcid fòrmic. Les dades cromatogràfiques s'analitzen amb el programari Masslynx (v4.0, Waters)

Les anàlisis per espectrometria de masses es realitzen en un espectròmetre MALDI-TOF Voyager DE RP (Applied Biosystems) utilitzant una matriu ACH, mentre que per a les anàlisis de masses exactes (HRMS) dels compostos finals s'utilitza un aparell ESI-TOF micrOTOF (Brucker).

La caracterització per ressonància magnètica nuclear dels compostos sintetitzats es realitza en un espectròmetre de RMN Mercury 400 (Varian).

Purificació de compostos

La purificació de compostos per HPLC semipreparatiu s'ha realitzat amb un equip Waters 600 (Waters) amb un detector Waters 2487 UV/vis dual λ absorbance (Waters) i una columna Symmetry 100 (C_{18} , $5 \mu\text{m}$, $100 \times 30 \text{ mm}$, Waters). Els compostos es purifiquen mitjançant gradient linial de Solució A i B, amb una durada de 40 minuts i a un flux de 10 ml/min. Solució A: H_2O amb 0,1 % de TFA. Solució B: Acetonitril amb un 0,05 % de TFA. Les dades cromatogràfiques s'analitzen amb el programari Masslynx (v4.0, Waters)

Tests colorimètrics

Test de Kaiser El test de Kaiser [382] s'utilitza per detectar la presència d'amines primàries lliures en un suport polimèric i, d'aquesta manera, avaluar qualitativament l'acoblament d'un nou residu aminoacídic. 1 mg de resina seca es deposita en un tub d'assaig i se li afegeixen 120 μl de Reactiu A i 40 μl de Reactiu B; la mescla s'escalfa 3 min a 110 °C. Una coloració blavosa indica la presència d'amines lliures, mentre que una coloració groguenca és sinònim d'absència d'amines lliures. Reactiu A: 2 M fenol, 5 % etanol, 4,5 mM KCN, 50 % piridina. Reactiu B: 0,3 M Ninhidrina en etanol.

Test del cloranil El test del cloranil [383] s'utilitza per avaluar els acoblaments sobre amines secundàries com la prolina. 1 mg de resina seca es deposita en un tub d'assaig i se li afegeixen 240 μl d'acetona i 100 μl d'una solució de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona en toluè (30 mg/l); la mescla s'agita durant 5 min a 25 °C. Una coloració verdosa indica la presència d'amines secundàries lliures i, per tant, és sinònim d'un acoblament incomplet.

Test de De Clercq El test de De Clercq [384] s'utilitza per detectar la presència d'amines secundàries lliures en un suport polimèric i, d'aquesta manera, evaluar qualitativament l'acoblament d'un nou residu aminoacídic. 1 mg de resina seca es deposita en un tub d'assaig i se li afegeixen 200 μ l del Reactiu A; la mescla s'escalfa 10 min a 70 °C. A continuació es renta la resina amb DMF i DCM i s'observa el color de la resina. Una coloració vermellova indica la presència d'amines lliures, mentre que la manca de color és sinònim d'absència d'amines lliures. Reactiu A: 20 mM *p*-nitrofenil Red Dye I éster en acetonitril.

7.1.2 Síntesi d'aldehids

Síntesi de H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H (2)

100 μ mol de resina aminometil semicarbazida ($f = 0,7$ mmol/g) s'utilitzen per a la síntesi de H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H mitjançant successives etapes d'acoblament i desprotecció de Fmoc-Pro-H, Fmoc-Pro-Ahx-OH i Fmoc-Ahx-OH segons el protocol estàndard de síntesi de pèptids en fase sòlida. El Fmoc-Pro-H (5 eq) inicial s'incorpora dissolt en THF amb un 1 % d'àcid acètic, sense cap més agent d'acoblament addicional, en una reacció de 16 h a 25 °C. Els reactius PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) i DIEA (12 eq) s'utilitzen com a agents d'acoblament per als residus Fmoc-Ahx-Pro-OH (4 eq) i Fmoc-Ahx-OH (4 eq) sobre prolina, mentre que per a la incorporació dels residus Fmoc-Ahx-OH (4 eq) s'utilitzen PyBOP (4 eq), HOBt (12 eq) i DIEA (12 eq). L'escissió del pèptid de la resina es realitza amb una mescla TFA:H₂O (80:20) (2 ml, 1 h) i s'elimina el dissolvent del cru de reacció per evaporació a pressió reduïda. El cru de reacció es purifica en HPLC semipreparatiu amb un gradient 0–40 % d'acetonitril en 30 minuts (Columna C₈, Symetry 5 μ m, 30x100 mm) per obtenir 16,4 mg (21,5 μ mol) de H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 21 %. HPLC-ESI* RT = 5,3 min. $M+2H^+/2 m/z = 381,9$ (m/z esperada de C₄₀H₇₁N₇O₇ + H⁺ = 762,5). MALDI-TOF = $M+H^+ m/z = 762,52$ (m/z esperada de C₄₀H₇₁N₇O₇ + H⁺ = 762,54).

Síntesi de Fmoc-Prolinol (5) 2,05 g de Fmoc-L-Pro-OH comercial (6,1 mmols) es dissolen en THF anhidre (30 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. Amb l'ajuda d'una xeringa s'addicionen 0,8 ml de *N*-metilmorfolina (7,3 mmol) i 0,95 ml de *iso*-butilcloroformiat (7,3 mmol). La reacció es deixa agitant-se durant 10 minuts a -78 °C. Passat aquest temps, s'escalfa el sistema a 0 °C i es manté a aquesta temperatura durant 40 minuts. A continuació, es refreda el sistema a -78 °C i s'addiciona una suspensió de 0,505 g de borohidruir sòdic (13,4 mmol) en metanol (3 ml). La reacció s'atura per addició d'una solució aquosa saturada de clorur d'amoni

(40 ml) i es fan extraccions amb acetat d'etil (3 x 20 ml). La fase orgànica se seca amb MgSO_4 , es filtra i es rotavapora. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:1 a 1:6 per obtenir 1,64 g (5,1 mmol) de Fmoc-Prolinol pur (TLC). Rendiment = 83 %. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 7,76$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,59$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,41$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,32$ ppm (m, 2H), $\delta = 4,42$ ppm (m, 2H), $\delta = 4,25$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,99$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,63$ ppm (m, 2H), $\delta = 3,54$ ppm (m, 2H), $\delta = 3,38$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,03$ – $1,83$ ppm (m, 4H).

Síntesi de Fmoc-Pro-H (6) 0,86 ml de dimetilsulfòxid (12,2 mmols) es dissolen en DCM (40 ml) en un matràs amb atmosfera inerta de $\text{N}_{2(g)}$ i es refreda a -78 °C. 1,12 ml de clorur d'oxalil (11,2 mmols) s'addicionen amb l'ajuda d'una xeringa i es deixa reaccionar el sistema durant 30 minuts a -78 °C en constant agitació. Posteriorment, s'afegeixen 1,64 g de Fmoc-Prolinol (5,1 mmols) dissolts en DCM anhidre (15 ml) i la reacció s'agita durant 60 minuts a -78 °C. S'afegeixen 4,48 ml de trietilamina (30,4 mmols) gota a gota i deixar reacciona durant 50 minuts a -78 °C. Finalment, s'escalfa la reacció a 0 °C durant 25 minuts. El cru de reacció es renta amb $\text{NaCl}_{(sat)}$ (3 x 15 ml) i la fase orgànica se seca amb MgSO_4 , es filtra i es rotavapora. Es realitza una purificació en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:1 a 1:3 per obtenir 1,23 g (3,8 mmol) Fmoc-Prolinal pur (TLC). Rendiment = 75 %. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 9,56$ – $9,22$ ppm (s, 1H), $\delta = 7,76$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,61$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,53$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,39$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,32$ ppm (m, 2H), $\delta = 4,47$ ppm (m, 2H), $\delta = 4,27$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,53$ ppm (m, 2H), $\delta = 2,10$ – $1,77$ ppm (m, 4H).

Síntesi de Fmoc-Ahx-Pro-OH 1 mmol de resina de tipus clorur de 2-clorotritil ($f = 1,5$ mmol/g) s'utilitzen per a la síntesi de Fmoc-Ahx-Pro-OH seguint el protocol estàndard de síntesi de pèptids en fase sòlida. La Fmoc-Pro-OH (0,5 eq) inicial s'incorpora amb DIEA (5 eq); finalitzat l'acoblament, les posicions lliures addicionals es bloquegen amb metanol a raó de 0,8 ml/g de resina (10 min, 25 °C). El Fmoc-Ahx-OH s'incorpora amb els reactius PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) i DIEA (12 eq). L'escissió del pèptid de la resina es realitza amb una mescla TFA:DCM (5:95) (2 ml, 3 x 5 minuts) i s'elimina el dissolvent del cru de reacció per evaporació a pressió reduïda per obtenir 191,6 mg (424,5 μmol) de Fmoc-Ahx-Pro-OH pur (HPLC, > 90 %). Rendiment = 85 %. HPLC-ESI* RT = 11,3 min. $\text{M}+\text{H}^+$ $m/z = 451,4$ (m/z esperada de $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}^+ = 451,2$).

Preparació de la resina aminometil semicarbazida Una solució de CDI (5 eq) em DMF (3 ml) s'afegeix a una resina aminometilada de poliestirè ($f = 1,1$ mmol/g) prèviament rentada amb DMF (3 x 5 ml, 5 minuts) i la mescla es deixa en agitació 3 h a 25 °C. La resina es renta amb DMF (3 x 5 ml), s'addiciona una solució de Boc-NH-NH₂ (5 eq) en DMF (3 ml) i es deixa progressar la reacció durant 3 h a 25 °C. Passat aquest temps la resina es renta amb DMF (3 x 5 ml) i DCM (3 x 5 ml) per obtenir la resina semicarbazida protegida amb el grup Boc. Aquesta resina, ben seca i en atmosfera de N₂, pot emmagatzemar-se indefinidament. Abans de poder utilitzar aquesta resina cal eliminar el grup protector Boc amb un tractament amb una solució TFA:DCM (1:1) durant 1 h a 25 °C.

Síntesi de H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H en resina Weinreb 100 μmol de resina Fmoc-Weinreb ($f = 0,7$ mmol/g) es desprotegeixen amb piperidina al 20 % en DMF (3 ml, 2 x 10 minuts) i s'utilitzen per a la síntesi de H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H mitjançant successives etapes d'acoblament i desprotecció de Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ahx-Pro-OH i Fmoc-Ahx-OH segons el protocol estàndard de síntesi de pèptids en fase sòlida. Els reactius DIPCDI (5 eq) i HOAt (5 eq) s'utilitzen com a agents d'acoblament per als residus Fmoc-Pro-OH (5 eq), Fmoc-Ahx-Pro-OH (5 eq) i Fmoc-Ahx-OH (5 eq) sobre prolina, mentre que per a la incorporació dels residus Fmoc-Ahx-OH (4 eq) s'utilitzen PyBOP (4 eq), HOBt (12 eq) i DIEA (12 eq). Completada la síntesi, el complex pèptid-resina es resuspèn en THF anhidre amb atmosfera inerta de N_{2(g)} i el sistema es refreda a 0 °C. A continuació, s'afegeixen 500 μl de LiAlH₄ 1M en THF (500 μmol, 5 eq) gota a gota i la reacció s'agita durant 30 minuts a 0 °C. Passat aquest temps, la reacció s'atura amb l'addició lenta de KHSO_{4(aq)} al 5 %. El cru de reacció es filtra per eliminar la resina, es dilueix en DCM (15 ml) i es renta amb KHSO_{4(aq)} al 5 % (1 x 10 ml), NaHCO_{3(sat)} (1 x 10 ml), NaCl_(sat) (1 x 10 ml) i H₂O (2 x 50 ml). La fase orgànica se seca amb MgSO₄, es filtra i es rotavapora per obtenir 47,9 mg de cru no purificat. Rendiment brut = 63 %. MALDI-TOF $m/z = 665,51$ (m/z esperada de C₄₀H₇₁N₇O₇ + H⁺ = 762,64).

Síntesi de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H (4)

100 μmol de resina aminometil semicarbazida ($f = 0,7$ mmol/g) s'utilitzen per a la síntesi de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H mitjançant successives etapes d'acoblament i desprotecció de Fmoc-Pro-H, Fmoc-Pro-Ahx-OH i Fmoc-Ahx-OH segons el protocol estàndard de síntesi de pèptids en fase sòlida. El Fmoc-Pro-H (5 eq) inicial s'incorpora dissolt en THF amb un 1 % d'àcid acètic, sense cap més agent d'acoblament addicional, en una reacció de 16 h a 25 °C. Els reactius PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) i DIEA (12 eq) s'utilitzen com a agents d'acoblament per als residus Fmoc-Ahx-Pro-OH (4

eq) i Fmoc-Ahx-OH (4 eq) sobre prolina, mentre que per a la incorporació dels residus Fmoc-Arg-OH (4 eq) i Fmoc-Ahx-OH (4 eq) s'utilitza PyBOP (4 eq), HOBt (12 eq) i DIEA (12 eq). L'escissió del pèptid de la resina es realitza amb una mescla TFA:H₂O (80:20) (2 ml, 1 h) i s'elimina el dissolvent del cru de reacció per evaporació a pressió reduïda. El cru de reacció es purifica en HPLC semipreparatiu amb un gradient 0–40 % d'acetonitril en 30 minuts (Columna C8, Symetry 5 μ m, 30 x 100 mm) per obtenir per obtenir 14,7 mg (15,4 μ mol) de H-(Ahx)₅-Pro-Pro-H pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 15 %. HPLC-ESI* RT = 4,6 min. (Columna C8, X-Terra 3,5 μ m, 2,1 x 50 mm), M+2H⁺/2 m/z = 460,3 (m/z esperada de C₄₆H₈₃N₁₁O₈ + H⁺ = 918,6). MALDI-TOF = M+H⁺ m/z = 918,58 (m/z esperada de C₄₆H₈₃N₁₁O₈ + H⁺ = 918,64).

Síntesi de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-H amb el reactiu Dess-Martin 100 μ mol de resina de tipus clorur de 2-clorotritil ($f = 0,7$ mmol/g) s'utilitzen per a la síntesi de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Prolinol mitjançant successives etapes d'acoblament i desprotecció de Fmoc-Prolinol, Fmoc-Pro-Ahx-OH, Fmoc-Arg-OH i Fmoc-Ahx-OH segons el protocol estàndard de síntesi de pèptids en fase sòlida. Els reactius PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) i DIEA (12 eq) s'utilitzen com a agents d'acoblament per als residus Fmoc-Ahx-Pro-OH (4 eq) i Fmoc-Ahx-OH (4 eq) sobre prolina, mentre que per a la incorporació dels residus Fmoc-Ahx-OH (4 eq) s'utilitzen PyBOP (4 eq), HOBt (12 eq) i DIEA (12 eq). El Fmoc-Prolinol (3 eq) inicial s'incorpora amb piridina (6 eq). L'escissió del pèptid de la resina es realitza amb una mescla TFA:DCM (5:95) (2 ml, 3 x 5 minuts) i s'elimina el dissolvent del cru de reacció per evaporació a pressió reduïda per obtenir 33,4 mg (28,5 μ mol) de H-(Ahx)₃-Arg(Pbf)-(Ahx)₂-Pro-Prolinol pur (HPLC, > 90 %). Rendiment = 28 %. HPLC-ESI* RT = 6,95 min. (M+2H⁺/2 m/z = 588,0 (m/z esperada de C₅₉H₁₀₁N₁₁O₁₁S + H⁺ = 1172,0). Per a la reacció d'oxidació del pèptid alcohol al seu derivat aldehid, 5 mg (4,25 μ mol) de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Prolinol s'addicionen a 3,6 mg (8,50 μ mol, 2,0 eq) del reactiu Dess-Martin en DCM (200 μ l) i es deixa reaccionar en agitació 1, 2 i 16 h a 25 °C. A continuació, es renta el cru de reacció amb NaHCO₃ (3 x 1 ml), s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda i el cru de reacció es dissol en una mescla metanol:DMF:DCM (30:3:2) amb un 1 % d'àcid acètic. 17 μ mol (4 eq) de resina treonil aminometílica preparada per l'ocasió s'addicionen a la mescla que es deixa en agitació 1h a 25 °C per a la unió específica del pèptid aldehid a la resina. Passat aquest temps, s'elimina el dissolvent per filtrat i la resina es tracta amb una mescla TFA:H₂O:TIS (95:2,5:2,5) durant 1 h a 25 °C per eliminar els grups protectors del pèptid aldehid ancorat. La resina es renta amb DCM (5 x 2 ml) i s'escindeix el pèptid aldehid ancorat amb una mescla d'àcid acètic:H₂O:DCM:metanol (10:5:5:80) (3 x 20 min.) a 25 °C. El producte es rotavapora, es redissol

en una mescla d'acetonitril i H₂O, es liofilitza i s'analitza per HPLC-ESI i MALDI TOF. HPLC-ESI* RT = 11,25 min. (M+2H⁺/2 *m/z* = 586,7 (*m/z* esperada de C₅₉H₉₉N₁₁O₁₁S + H⁺ = 1169,9).

Preparació de la resina treonil aminometilica 397,5 mg de Fmoc-Thr(^tBu)-OH (1 mmol) s'acoblen a 200 μmol de resina aminometil (funcionalització = 1,1 mmol/g) amb PyBOP (5 eq), HOBt (5 eq) i DIEA (10 eq) en una reacció de 1 h a 25 °C. Posteriorment, es desprotegeix el grup Fmoc amb piperidina al 20 % en DMF (5 ml, 2 x 10 min) i s'elimina el grup ^tBu amb una mescla TFA:H₂O (95:5) (5 ml, 1 h).

Síntesi de H-(Ahx)₅-Pro-Pro-OH (1)

200 μmol de resina de tipus clorur de 2-clorotritil (f = 1,5 mmol/g) s'utilitzen per a la síntesi de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Prolinol mitjançant successives etapes d'acoblament i desprotecció de Fmoc-Prolinol, Fmoc-Pro-Ahx-OH i Fmoc-Ahx-OH segons el protocol estàndard de síntesi de pèptids en fase sòlida. La Fmoc-Pro-OH (0,5 eq) inicial s'incorpora amb DIEA (5 eq); finalitzat l'acoblament, les posicions lliures addicionals es bloquegen amb metanol a raó de 0,8 ml/g de resina (10 min, 25 °C). Els reactius PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) i DIEA (12 eq) s'utilitzen com a agents d'acoblament per als residus Fmoc-Ahx-Pro-OH (4 eq) i Fmoc-Ahx-OH (4 eq) sobre prolina, mentre que per a la incorporació dels residus Fmoc-Ahx-OH (4 eq) s'utilitzen PyBOP (4 eq), HOBt (12 eq) i DIEA (12 eq). L'escissió del pèptid de la resina es realitza amb una mescla TFA:DCM (5:95) (2 ml, 3 x 5 minuts) i s'elimina el dissolvent del cru de reacció per evaporació a pressió reduïda per obtenir 27,4 mg (35,2 μmol) de H-(Ahx)₅-Pro-Pro-OH pur (HPLC, > 90 %). Rendiment = 35 %. HPLC-ESI* RT = 5,2 min. M+H⁺ *m/z* = 778,4 (*m/z* esperada de C₄₀H₇₁N₇O₈ + H⁺ = 778,5). MALDI-TOF = M+H⁺ *m/z* = 778,52 (*m/z* esperada de C₄₀H₇₁N₇O₈ + H⁺ = 778,54).

Síntesi de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-OH (3)

200 μmol de resina de tipus clorur de 2-clorotritil (f = 1,5 mmol/g) s'utilitzen per a la síntesi de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Prolinol mitjançant successives etapes d'acoblament i desprotecció de Fmoc-Prolinol, Fmoc-Pro-Ahx-OH i Fmoc-Ahx-OH segons el protocol estàndard de síntesi de pèptids en fase sòlida. La Fmoc-Pro-OH (0,5 eq) inicial s'incorpora amb DIEA (5 eq); finalitzat l'acoblament, les posicions lliures addicionals es bloquegen amb metanol a raó de 0,8 ml/g de resina (10 min, 25 °C). Els reactius PyBOP (4 eq), HOAt (12 eq) i DIEA (12 eq) s'utilitzen com a agents d'acoblament per als residus Fmoc-Arg-OH (4 eq) i Fmoc-Ahx-Pro-OH (4 eq) i Fmoc-Ahx-OH (4 eq)

sobre prolina, mentre que per a la incorporació dels residus Fmoc-Ahx-OH (4 eq) s'utilitzen PyBOP (4 eq), HOBT (12 eq) i DIEA (12 eq). L'escissió del pèptid de la resina es realitza amb una mescla TFA:DCM (5:95) (2 ml, 3 x 5 minuts). A continuació, s'elimina el dissolvent del cru de reacció per evaporació a pressió reduïda i el pèptid es desprotegeix amb una mescla TFA:Tioanisol:H₂O:EDT:TIS:Fenol (81,5:5:5:2,5:5) (2 ml, 2 h). Finalment, es torna a eliminar el dissolvent del cru de reacció per evaporació a pressió reduïda i es precipita el pèptid en *tert*-butilmetil éter. El precipitat es purifica en HPLC Semipreparatiu amb un gradient 10-50 % d'acetonitril en 30 minuts (Columna C8, Symetry 5 μ m, 30 x 100 mm) per obtenir 26,3 mg (28,2 μ mol) de H-(Ahx)₃-Arg-(Ahx)₂-Pro-Pro-OH que (HPLC, > 95 %). Rendiment = 28 %. HPLC-ESI* RT = 4,7 min. M+H⁺ *m/z* = 934,7 (*m/z* esperada de C₄₆H₈₃N₁₁O₉ + H⁺ = 934,6). MALDI-TOF = M+H⁺ *m/z* = 934,59 (*m/z* esperada de C₄₆H₈₃N₁₁O₉ + H⁺ = 934,64).

Síntesi de Aha-Bpa-Pro-Pro-H

402 mg (1,25 mmol) de Fmoc-Proinal dissolts en THF anhidre i àcid acètic a l'1 % s'afegeixen a 250 mg de resina semicarbazida (250 μ mol) i es deixa reaccionar 16 a 25 °C. La desprotecció del grup Fmoc es realitza amb l'addició de piperidina al 20 % en DMF (2 x 5 ml) durant 10 minuts i a 25 °C. Els posteriors acoblaments de Fmoc-Bpa-Pro-OH i àcid 5-hexinoic es realitzen amb 12 eq de DIEA, 12 eq d'HOBT, 4 eq de PyBOP i 4 eq de l'aminoàcid corresponent. La desprotecció del grup Fmoc es realitza amb l'addició de piperidina al 20 % en DMF (2 x 5 ml) durant 10 minuts i a 25 °C després de cada acoblament dels aminoàcids protegits amb Fmoc. Per a l'escissió del pèptid de la resina s'addiciona una mescla TFA:H₂O (8:2) (1 x 5 ml) i es deixa en agitació durant 1 h a 25 °C. Posteriorment, es recull la solució i es renta bé la resina amb DCM (3 x 5 ml). Solució i rentats s'ajunten i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. El sòlid obtingut es dissol en una mescla acetonitril:H₂O (1:1) i es liofilitza per obtenir 80 mg de Aha-Bpa-Pro-Pro-H pur (HPLC, > 98 %). Rendiment = 59 %. HPLC-ESI RT = 9,8 min. (M+H⁺ *m/z* 542,8; *m/z* esperada de C₃₂H₃₅N₃O₅ + H⁺ = 542,3). ¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ = 9,32 ppm (d, 1H), δ = 7,68 ppm (m, 5H), δ = 7,54 ppm (m, 2H), δ = 7,45 ppm (m, 2H), δ = 4,76 ppm (m, 1H), δ = 4,62 ppm (m, 1H), δ = 3,74 ppm (m, 2H), δ = 3,56 ppm (m, 2H), δ = 2,99–2,82 ppm (m, 2H), δ = 2,71 ppm (m, 2H), δ = 2,19–2,11 ppm (m, 3H), δ = 1,97 ppm (m, 4H), δ = 1,89 ppm (m, 4H), δ = 1,53 ppm (m, 2H).

Síntesi de Fmoc-Bpa-Pro-OH La síntesi de Fmoc-Bpa-Pro-OH es fa per síntesi en fase sòlida sobre resina 2-clorotritil (*f* = 1,5 mmol/g) a una escala de 1 mmol. Per al primer acoblament, 337 mg de Fmoc-Pro-OH (1 mmol) i 1,65 ml de DIEA (5 mmol, 5 eq) es dissolen en DCM (2 ml) i es

mesclen amb 1,29 g de resina 2-clorotritil. La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps es desactiven les posicions lliures de la resina amb metanol (1,2 ml, 10 minuts), es filtra l'excés de reactius i es renta la resina amb DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i DMF (3 ml, 3 x 2 minuts). A continuació, es procedeix a la desprotecció del grup Fmoc de l'extrem N_{ter} amb una solució de piperidina al 20 % en DMF (3ml, 2 x 10 minuts), es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i s'inicia el següent acoblament. 982 mg Fmoc-Bpa-OH (2 mmol, 2 eq.) s'acoblen amb PyBOP (2 mmol, 2 eq.), HOBt (6 mmol, 6 eq.) i DIEA (6 mmol, 6 eq.). La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps, es filtra l'excés de reactius, es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i es comprova l'acoblament amb el test de De Clercq (veure apartat *Tests colorimètrics*). A continuació, es tracta la resina amb una solució de TFA al 2 % en DCM (2 ml, 3 x 2 minuts) per escindir el compost de la resina. Es filtra la resina i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. El sòlid obtingut es dissol en una mescla acetonitril:H₂O (1:1) i es liofilitza per obtenir 584 mg de Fmoc-Bpa-Pro-OH pur (HPLC, > 98 %). Rendiment quantitatiu. HPLC-ESI RT = 13,2 min. ($M+H^+$ m/z 589,7; m/z esperada de $C_{36}H_{32}N_2O_6 + H^+ = 589,2$).

Síntesi de Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H

402 mg (1,2 mmol) de Fmoc-Proinal dissolts en THF anhidre i àcid acètic a l'1 % s'afegeixen a 250 mg de resina semicarbazida (250 μ mol) i es deixa reaccionar 16 a 25 °C. La desprotecció del grup Fmoc es realitza amb l'addició de piperidina al 20 % en DMF (2 x 5 ml) durant 10 minuts i a 25 °C. Els posteriors acoblaments de Fmoc-Ahx-Pro-OH, Fmoc-Bpa-OH i àcid 5-hexinoic es realitzen amb 12 eq de DIEA, 12 eq d'HOBt, 4 eq de PyBOP i 4 eq de l'aminoàcid corresponent. La desprotecció del grup Fmoc es realitza amb l'addició de piperidina al 20 % en DMF (2 x 5 ml) durant 10 minuts i a 25 °C després de cada acoblament dels aminoàcids protegits amb Fmoc. Per a l'escissió del pèptid de la resina s'addiciona una mescla TFA:H₂O (8:2) (1 x 5 ml) i es deixa en agitació durant 1 h a 25 °C. Posteriorment, es recull la solució i es renta bé la resina amb DCM (3 x 5 ml). Solució i rentats s'ajunten i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. El sòlid obtingut es dissol en una mescla acetonitril:H₂O (1:1) i es liofilitza per obtenir 84 mg de Aha-Bpa-Ahx-Pro-Pro-H pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 51 %. HPLC-ESI RT = 15,9 min. ($M+H^+$ m/z 655,3; m/z esperada de $C_{38}H_{46}N_4O_6 + H^+ = 655,3$). ¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ = 9,50 ppm (d, 1H), δ = 7,80–7,70 ppm (m, 4H), δ = 7,60 ppm (m, 1H), δ = 7,53–7,45 ppm (m, 2H), δ = 7,35–7,25 ppm (m, 2H), δ = 4,72–4,58 ppm (m, 2H), δ = 3,95–3,85 ppm (m, 1H), δ = 3,75–3,50 ppm (m, 4H), δ = 3,30–3,00 ppm (m, 4H), δ = 2,45–2,30 ppm (m, 4H), δ = 2,25–2,15 ppm (m, 5H), δ = 2,15–1,90 ppm (m,

6H), $\delta = 1,85\text{--}1,70$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,65\text{--}1,53$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,50\text{--}1,35$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,30\text{--}1,10$ ppm (m, 2H). HRMS (mode positiu) $m/z = 655,3486$ (m/z esperada de $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_6 + \text{H}^+ = 655,3490$).

Síntesi de Fmoc-Ahx-Pro-OH La síntesi de Fmoc-Aha-Pro-OH es fa per síntesi en fase sòlida sobre resina 2-clorotritil ($f = 1,5$ mmol/g) a una escala de 1 mmol. Per al primer acoblament, 337 mg de Fmoc-Pro-OH (1 mmol) i 1,65 ml de DIEA (5 mmol, 5 eq) es dissolen en DCM (2 ml) i es mesclen amb 1,29 g de resina 2-clorotritil. La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps es desactiven les posicions lliures de la resina amb metanol (1,2 ml, 10 minuts), es filtra l'excés de reactius i es renta la resina amb DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i DMF (3 ml, 3 x 2 minuts). A continuació, es procedeix a la desprotecció del grup Fmoc de l'extrem N_{ter} amb una solució de piperidina al 20 % en DMF (3ml, 2 x 10 minuts), es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i s'inicia el següent acoblament. 706 mg Fmoc-Aha-OH (2 mmol, 2 eq.) s'acoblen amb PyBOP (2 mmol, 2 eq.), HOBt (6 mmol, 6 eq.) i DIEA (6 mmol, 6 eq.). La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps, es filtra l'excés de reactius, es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i es comprova l'acoblament amb el test de De Clercq (veure apartat *Test colorimètrics*). A continuació, es tracta la resina amb una solució de TFA al 2 % en DCM (2 ml, 3 x 2 minuts) per escindir el compost de la resina. Es filtra la resina i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. El sòlid obtingut es dissol en una mescla acetonitril: H_2O (1:1) i es liofilitza per obtenir 442 mg de Fmoc-Ahx-Pro-OH pur (HPLC, > 98 %). Rendiment quantitatiu. HPLC-ESI RT = 17,5 min. ($\text{M}+\text{H}^+$ m/z 451,3; m/z esperada de $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}^+ = 451,2$).

Síntesi de Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H

402 mg (1,25 mmol) de Fmoc-Proinal dissolts en THF anhidre i àcid acètic a l'1 % s'afegeixen a 250 mg de resina semicarbazida (250 μmol) i es deixa reaccionar 16 a 25 °C. La desprotecció del grup Fmoc es realitza amb l'addició de piperidina al 20 % en DMF (2 x 5 ml) durant 10 minuts i a 25 °C. Els posteriors acoblaments de Fmoc-Peg-Pro-OH, Fmoc-Bpa-OH i àcid 5-hexinoic es realitzen amb 12 eq de DIEA, 12 eq d'HOBt, 4 eq de PyBOP i 4 eq de l'aminoàcid corresponent. La desprotecció del grup Fmoc es realitza amb l'addició de piperidina al 20 % en DMF (2 x 5 ml) durant 10 minuts i a 25 °C després de cada acoblament dels aminoàcids protegits amb Fmoc. Per a l'escissió del pèptid de la resina s'addiciona una mescla TFA: H_2O (8:2) (1 x 5 ml) i es deixa en agitació durant 1 h a 25 °C. Posteriorment, es recull la solució i es renta bé la resina amb DCM (3 x 5 ml). Solució i rentats s'ajunten i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. El sòlid obtingut es

dissol en una mescla acetonitril:H₂O (1:1) i es liofilitza per obtenir 130 mg de Aha-Bpa-Peg-Pro-Pro-H pur (HPLC, > 98 %). Rendiment = 66 %. HPLC-ESI RT = 9,1 min. (M+H⁺ *m/z* 790,2; *m/z* esperada de C₄₃H₅₆N₄O₁₀ + H⁺ = 789,4). ¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ = 9,28 ppm (d, 1H), δ = 7,67 ppm (m, 5H), δ = 7,54 ppm (m, 2H), δ = 7,41 ppm (m, 2H), δ = 4,55 ppm (m, 2H), δ = 4,18 ppm (m, 1H), δ = 3,73 ppm (m, 1H), δ = 3,60–3,54 ppm (m, 3H), δ = 3,50–3,47 ppm (m, 12H), δ = 3,41 ppm (m, 4H), δ = 3,36 ppm (m, 2H), δ = 3,19 ppm (m, 2H), δ = 3,03 ppm (m, 1H), δ = 2,82 ppm (m, 1H), δ = 2,71 ppm (m, 2H), δ = 2,19–2,11 ppm (m, 3H), δ = 1,97 ppm (m, 4H), δ = 1,89 ppm (m, 4H), δ = 1,53 ppm (m, 2H).

Síntesi de Fmoc-Peg-Pro-OH La síntesi de Fmoc-Peg-Pro-OH es fa per síntesi en fase sòlida sobre resina 2-clorotritil (f = 1,5 mmol/g) a una escala de 1 mmol. Per al primer acoblament, 337 mg de Fmoc-Pro-OH (1 mmol) i 1,65 ml de DIEA (5 mmol, 5 eq) es dissolen en DCM (2 ml) i es mesclen amb 1,29 g de resina 2-clorotritil. La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps es desactiven les posicions lliures de la resina amb metanol (1,2 ml, 10 minuts), es filtra l'excés de reactius i es renta la resina amb DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i DMF (3 ml, 3 x 2 minuts). A continuació, es procedeix a la desprotecció del grup Fmoc de l'extrem N_{ter} amb una solució de piperidina al 20 % en DMF (3ml, 2 x 10 minuts), es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i s'inicia el següent acoblament. 975 mg Fmoc-Peg-OH (2 mmol, 2 eq.) s'acoblen amb PyBOP (2 mmol, 2 eq.), HOBT (6 mmol, 6 eq.) i DIEA (6 mmol, 6 eq.). La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps, es filtra l'excés de reactius, es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i es comprova l'acoblament amb el test de De Clercq (veure apartat *Test colorimètrics*). A continuació, es tracta la resina amb una solució de TFA al 2 % en DCM (2 ml, 3 x 2 minuts) per escindir el compost de la resina. Es filtra la resina i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. El sòlid obtingut es dissol en una mescla acetonitril:H₂O (1:1) i es liofilitza per obtenir 581 mg de Fmoc-Peg-Pro-OH pur (HPLC, > 98 %). Rendiment quantitatiu. HPLC-ESI RT = 10,4 min. (M+H⁺ *m/z* 585,6; *m/z* esperada de C₃₁H₄₀N₂O₉ + H⁺ = 585,3).

7.1.3 Síntesi de fosfonats

Síntesi de Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂

Síntesi del trímer de 1-pirrolidina (8) 12,5 ml de pirrolidina (150 mmol) s'afegeixen en un matràs, prèviament atemperat a 0°C en un bany d'aigua i gel. A continuació, s'afegeixen 12 g de hidròxid de sodi (300 mmol), 35,7 g de peroxodisulfat de sodi (150 mmol) dissolts en 10 mL d'H₂O, i 127 mg de

nitrat de plata (0,75 mmol, catalitzador de la reacció). La mescla es deixa evolucionar en agitació durant 2 hores. Passat aquest temps es realitzen un parell d'extraccions ràpides en DCM i la fase orgànica se seca amb MgSO_4 , es filtra i es rotavapora per ser utilitzada immediatament a la següent reacció sense cap pas addicional de purificació. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 3,09$ ppm (m, 6H), $\delta = 2,40$ ppm (m, 3H).

Síntesi de H-Pro^P(OPh)₂ (9) 28,7 ml de fosfit de difenil (150 mmol) s'addicionen en un matràs que conté 10,35 g de trimer de 1-pirrolina (aprox.) amb atmosfera inerta de $\text{N}_2(g)$. La reacció s'escalfa a 85 °C i es deixa evolucionar durant 1 hora i 30 minuts. El cru de reacció es rotavapora fins a l'aparició d'un oli que es dissol en CHCl_3 (50 ml) i es renta amb $\text{NaCl}_{(sat)}$ (2 x 30 ml). La fase orgànica se seca amb MgSO_4 , es filtra i es rotavapora. Finalment, s'afegeix la mínima quantitat de CHCl_3 a l'oli i es purifica en columna de silica amb un gradient de cloroform i metanol en proporcions de 1:0 a 8:2. Les fraccions d'interès s'ajusten i s'acidifiquen amb una solució 2 M de HCl en éter etílic per obtenir 13,4 g de l'hidroclorur de H-Pro^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 29 %. HPLC-ESI RT* = 12,1 min. ($\text{M}+\text{H}^+$ m/z 304,1; m/z esperada de $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{P} + \text{H}^+ = 304,1$). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 7,35$ – $7,15$ ppm (m, 10H), $\delta = 3,74$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,13$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,03$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,19$ ppm (m, 2H), $\delta = 2,07$ ppm (m, 1H), $\delta = 1,91$ ppm (m, 1H).

Síntesi de Boc-Pro-Pro^P(OPh)₂ (10) 1,50 g de l'hidroclorur de H-Pro^P(OPh)₂ (5 mmol) es dissolen en DCM anhidre (25 ml) amb atmosfera inerta de $\text{N}_2(g)$. A continuació, s'addicionen 0,70 ml de trietilamina (5 mmol) per regenerar el H-Pro^P(OPh)₂. El sistema es refreda a -10 °C amb l'ajuda d'un bany de gel i sal. 1,08 g de Boc-Pro-OH (5 mmol) es dissolen en DCM anhidre i s'addicionen al sistema i la reacció es deixa evolucionar en agitació constant a -10 °C durant 15 minuts. Passat aquest temps, s'afegeixen 1,24 g de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (6 mmol) dissolts en DCM anhidre i la mescla es deixa reaccionar durant 2 hores a -10 °C i 20 hores a temperatura ambient. El cru de reacció es filtra per eliminar la DCU precipitada i es renta amb H_2O (1 x 50 ml), 1M $\text{HCl}_{(aq)}$, $\text{NaHCO}_3_{(sat)}$ (3 x 50 ml) i H_2O (2 x 50 ml). La fase orgànica se seca amb MgSO_4 , es filtra i es rotavapora. Finalment, el producte es purifica en columna de silica amb un gradient d'acetat d'etil i etanol en proporcions de 1:0 a 8:2 per obtenir 918 mg (1,8 mmol) de Boc-Pro-Pro^P(OPh)₂ pur (TLC). Rendiment = 37 %. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 7,35$ – $7,21$ ppm (m, 10H), $\delta = 4,54$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,99$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,80$ – $3,42$ ppm (m, 4H), $\delta = 2,60$ – $1,67$ ppm (m, 8H), $\delta = 1,52$ ppm (m, 9H).

Síntesi de H-Pro-Pro^P(OPh)₂ (11) 918 mg de Boc-Pro-Pro^P(OPh)₂ (1,8 mmol) s'afegeixen en un matràs. El sistema es tanca, s'estableix una atmosfera inerta de N_{2(g)} i es refreda a 0 °C. A continuació, 25,7 ml d'una solució 4 M HCl en 1,4-dioxà s'addicionen lentament i la reacció es deixa evolucionar en agitació i amb un gradient de temperatura de 0 °C a temperatura ambient, durant 30 minuts. Passat aquest temps, s'eliminen els dissolvents per evaporació a pressió reduïda i es precipita el producte amb dietilèter fred per obtenir 560 mg del clorohidrat de H-Pro-Pro^P(OPh)₂ pur (TLC). Rendiment = 71 %. HPLC-ESI (M+H⁺ *m/z* 401,2; *m/z* esperada de C₂₁H₂₅N₂O₄P + H⁺ = 401,2).

Síntesi de Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (12) 500 mg del clorohidrat de H-Pro-Pro^P(OPh)₂ (1,15 mmol) es dissolen en DCM anhidre (25 ml) amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. A continuació, s'addicionen 160 µl de trietilamina (1,15 mmol) per regenerar el H-Pro-Pro^P(OPh)₂. El sistema es refreda a -10 °C amb l'ajuda d'un bany de gel i sal. 127 µl d'àcid 5-hexinoic (1,2 mmol) en DCM anhidre (1ml) s'addicionen al sistema i la reacció es deixa evolucionar en agitació constant a -10 °C durant 15 minuts. Passat aquest temps, s'afegeixen 284 mg de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (1,38 mmol) dissolts en DCM anhidre i la mescla es deixa reaccionar durant 2 hores a -10 °C i 20 hores a temperatura ambient. El cru de reacció es filtra per eliminar la DCU precipitada i es renta amb H₂O (1 x 50 ml), 1M HCl_(aq), NaHCO_{3(sat)} (3 x 50 ml) i H₂O (2 x 50 ml). La fase orgànica se seca amb MgSO₄, es filtra i es rotavapora. Finalment, el producte es purifica en columna de silica amb un gradient d'acetat d'etil i etanol en proporcions de 1:0 a 8:2 per obtenir 190 mg (0,4 mmol) de Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 98%). Rendiment = 33 %. HPLC-ESI RT* = 17,6 min. (M+H⁺ *m/z* 495,2; *m/z* esperada de C₂₇H₃₁N₂O₅P + H⁺ = 495,2). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,35–7,15 ppm (m, 10H), δ = 5,07 ppm (m, 1H), δ = 4,66 ppm (m, 1H), δ = 4,12 ppm (m, 1H), δ = 3,68 ppm (m, 2H), δ = 3,50 ppm (m, 1H), δ = 2,46 ppm (m, 3H), δ = 2,28 ppm (m, 2H), δ = 2,04–1,86 ppm (m, 8H), δ = 1,72 ppm (m, 1H). HRMS (mode positiu) *m/z* = 495,2039 (*m/z* esperada de C₂₇H₃₁N₂O₅P + H⁺ = 495,2043).

Síntesi de Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ (13)

20 mg de Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (0,044 mmol), 41 mg de KF (0,444 mmol) i 1 mg d'èter 18-corona-6 (0,003 mmol) es dissolen en etanol (10 ml) i la mescla es porta a ebullició durant 10 minuts. Posteriorment, es deixa evolucionar durant 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de silica amb un gradient d'acetat d'etil i etanol en proporcions de 1:0 a 8:2 per obtenir 10 mg de Aha-Pro-Pro^P(OEt)₂ pur (HPLC, > 98%). Rendiment = 57 %. HPLC-ESI RT* = 14,1 min. (M+H⁺ *m/z* 399,2; *m/z*

esperada de $C_{19}H_{31}N_2O_5P + H^+ = 399,2$). 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta = 4,73$ ppm (m, 2H), $\delta = 4,21$ ppm (m, 4H), $\delta = 4,00$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,80$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,64$ ppm (m, 2H), $\delta = 2,56$ ppm (m, 2H), $\delta = 2,34$ – $2,03$ ppm (m, 11H), $\delta = 1,93$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,38$ ppm (m, 6H). HRMS (mode positiu) $m/z = 399,2039$ (m/z esperada de $C_{19}H_{31}N_2O_5P + H^+ = 399,2043$).

Síntesi de Aha-Pro-Pro^P(OPh)OH (14)

20 mg de Aha-Pro-Pro^P(OPh)₂ (0,044 mmol) es dissolen en 1,4-dioxà (0,16 ml) en un vial. S'afegeixen 0,16 ml d'una solució aquosa de NaOH 1M i 0,16 ml d'H₂O, i 41,3 mg KF·2H₂O i éter 18-corona-6 la reacció es deixa en agitació durant 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en un HPLC semipreparatiu en un gradient de Solució A:Solució B de les proporcions 70:30 a 30:70 en 40 minuts per obtenir 2,8 mg (0,006 mmol) de Aha-Pro-Pro^P(OPh)OH pur (HPLC, > 98 %). Rendiment = 14 %. HPLC-ESI RT* = 12,7 min. (M+H⁺ m/z 419,2; m/z esperada de $C_{21}H_{27}N_2O_5P + H^+ = 419,2$). 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta = 7,27$ – $7,23$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,19$ – $7,15$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,13$ – $7,07$ ppm (m, 2H), $\delta = 4,92$ – $4,88$ ppm (m, 1H), $\delta = 4,61$ – $4,56$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,91$ – $3,62$ ppm (m, 4H), $\delta = 2,49$ – $2,33$ ppm (m, 4H), $\delta = 2,25$ – $2,07$ ppm (m, 4H), $\delta = 1,97$ – $1,88$ ppm (m, 5H), $\delta = 1,82$ – $1,74$ ppm (m, 2H). HRMS (mode positiu) $m/z = 419,1721$ (m/z esperada de $C_{21}H_{27}N_2O_5P + H^+ = 419,1730$).

Síntesi de Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂

Síntesi de Cbz-Leu^P(OPh)₂ (15) 1,51 g de benzilcarbamat (10,0 mmol) es dissolen en àcid acètic (7,5 ml) en un matràs amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. S'addicionen 1,30 ml de 3-metilbutanal (12,0 mmol) i 2,63 ml de fosfit de trifenil (10,0 mmol) i el sistema es deixa en agitació durant 1 h a temperatura ambient per, posteriorment, escalfar la reacció durant 16 h a 50 °C. Passat aquest temps, es deixa precipitar el producte en metanol a -20 °C durant 16 h per obtenir 3,48 g de Cbz-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 77 %. HPLC-ESI RT* = 18,3 min. (M+H⁺ m/z 454,2; m/z esperada de $C_{25}H_{28}NO_5P + H^+ = 454,2$). MALDI-TOF $m/z = 454,17$ (m/z esperada de $C_{25}H_{28}NO_5P + H^+ = 454,17$). 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta = 7,34$ – $7,23$ ppm (m, 9H), $\delta = 7,18$ – $7,08$ ppm (m, 6H), $\delta = 5,10$ ppm (q, 2H), $\delta = 4,97$ ppm (d, 1H), $\delta = 4,57$ ppm (m, 1H), $\delta = 1,79$ ppm (m, 2H+1H), $\delta = 0,97$ ppm (d, 6H).

Síntesi de H-Leu^P(OPh)₂ (16) 500 mg de Cbz-Leu^P(OPh)₂ (1,10 mmol) es dissolen en una solució de HBr al 33 % en àcid acètic anhidre (15 ml) en un

sistema tancat amb atmosfera inerta de $N_2(g)$. La reacció es deixa en agitació 1 h a temperatura ambient i passat aquest temps s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. Es purifica el producte d'interès per precipitació en dietilèter fred del producte i posterior filtrat. S'obté 404,1 mg de bromohidrat de H-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 92 %. HPLC-ESI RT* = 10,5 min. (M+H⁺ *m/z* 320,0; *m/z* esperada de C₁₇H₂₂NO₃P + H⁺ = 320,1). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,32 ppm (m, 2H), δ = 7,23–7,09 ppm (m, 8H), δ = 3,96 ppm (m, 1H), δ = 2,17 ppm (m, 2H), δ = 1,92 ppm (m, 1H), δ = 0,89 ppm (m, 6H).

Síntesi de Boc-Ala-Leu^P(OPh)₂ (17) 380 mg d'HATU (1 mmol), 330 μl de DIEA (2 mmol) i 189 mg de Boc-Ala-OH (1 mmol) es dissolen en DMF anhidre (15 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de $N_2(g)$. A continuació, s'afegeixen 400 mg de bromohidrat de H-Leu^P(OPh)₂ (1 mmol) neutralitzat amb 330 μl de DIEA (2 mmol) i dissolts en DMF anhidre (2 ml). La reacció es deixa en agitació 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:1 per obtenir 485 mg d'un oli groc pàlid corresponent a Boc-Ala-Leu^P(OPh)₂ pur (TLC). Rendiment = 99 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,29 ppm (m, 4H), δ = 7,15 ppm (m, 6H), δ = 4,86 ppm (m, 1H), δ = 4,06 ppm (m, 1H), δ = 1,77 ppm (m, 2H), δ = 1,71 ppm (s, 1H), δ = 1,43 ppm (s, 9H), δ = 1,26 ppm (m, 3H), δ = 0,93 ppm (m, 6H).

Síntesi de H-Ala-Leu^P(OPh)₂ 485 mg de Boc-Ala-Leu^P(OPh)₂ (0,99 mmol) es dissolen en una solució de HCl 4 M en 1,4-dioxà (5 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de $N_2(g)$. La reacció es deixa en agitació 30 minuts a temperatura ambient i passat aquest temps s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. Es purifica el producte d'interès per precipitació en dietilèter fred del producte i posterior filtrat. S'obté 400 mg (0,95 mmol) de clorohidrat de H-Ala-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 96 %. ¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ = 7,36 ppm (m, 4H), δ = 7,21 ppm (m, 6H), δ = 4,82 ppm (m, 1H), δ = 4,08 ppm (m, 1H), δ = 1,76 ppm (m, 2H), δ = 1,49 ppm (s, 3H), δ = 1,01 ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ (18) 361 mg d'HATU (1 mmol), 314 μl de DIEA (1,9 mmol) i 105 μl d'àcid-5 hexinoic (0,95 mmol) es dissolen en DMF anhidre (15 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de $N_2(g)$. A continuació, s'afegeixen 400 mg de clorohidrat de H-Ala-Leu^P(OPh)₂ (0,95 mmol) neutralitzat amb 314 μl de DIEA (2 mmol) i dissolts en DMF anhidre (2 ml). La reacció es deixa en agitació 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat

d'etil en proporcions de 2:8 per obtenir 313,5 mg (0,65 mmol) de Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 98 %). Rendiment = 68 %. HPLC-ESI RT* = 15,9 min. (M+H⁺ *m/z* 485,2; *m/z* esperada de C₂₆H₃₃N₂O₅P + H⁺ = 485,2). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,37 ppm (m, 4H), δ = 7,23 ppm (m, 6H), δ = 4,95 ppm (m, 1H), δ = 4,60 ppm (m, 1H), δ = 2,41 ppm (m, 1H), δ = 2,32 ppm (m, 2H), δ = 2,27 ppm (m, 1H), δ = 2,05 ppm (m, 1H), δ = 1,93 ppm (m, 4H), δ = 1,87 ppm (m, 2H), δ = 1,76 ppm (s, 1H), δ = 1,40 ppm (d, 1H), δ = 1,34 ppm (m, 3H), δ = 1,00 ppm (m, 6H). HRMS (mode positiu) *m/z* = 485,2195 (*m/z* esperada de C₂₆H₃₃N₂O₅P + H⁺ = 485.2127).

Síntesi de Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂

Síntesi de Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ (19) 100 mg de Aha-Ala-Leu^P(OPh)₂ (0,21 mmol), 197,6 mg de KF (2,1 mmol) i 2 mg d'éter 18-corona-6 (0,005 mmol) es dissolen en etanol (10 ml) i la mescla es porta a ebullició durant 10 minuts. Posteriorment, es deixa evolucionar durant 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de sílica amb un gradient d'acetat d'etil i etanol en proporcions de 1:0 a 8:2 per obtenir 54 mg de Aha-Ala-Leu^P(OEt)₂ pur (HPLC, > 95%). Rendiment = 66 %. HPLC-ESI* RT = 12,3 min. (M+H⁺ *m/z* 389,2; *m/z* esperada de C₁₈H₃₃N₂O₅P + H⁺ = 389,2). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 4,58 ppm (m, 1H), δ = 4,41 ppm (m, 1H), δ = 4,08 ppm (m, 4H), δ = 2,31 ppm (m, 2H), δ = 2,21 ppm (m, 2H), δ = 1,95 ppm (q, 1H), δ = 1,82 ppm (p, 1H), δ = 1,64-1,49 ppm (m, 1H+2H), δ = 1,36-1,23 ppm (m, 3H+6H), δ = 0,87 ppm (m, 6H). HRMS (mode positiu) *m/z* = 389,2183 (*m/z* esperada de C₁₈H₃₃N₂O₅P + H⁺ = 389,2126).

Síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂

Síntesi de Aha-Arg(Pbf)-OH (27) La síntesi de Aha-Arg(Pbf)-OH es fa per síntesi en fase sòlida (estratègia Fmoc/tBu) sobre resina 2-clorotritil (f = 1,5 mmol/g) a una escala de 400 μmol. Per al primer acoblament, 259 mg de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (400 μmol) i 680 μl de DIEA es dissolen en DCM (1 ml) i es mesclen amb 516 mg de resina 2-clorotritil. La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps es desactiven les posicions lliures de la resina amb metanol (413 μl, 10 minuts), es filtra l'excés de reactius i es renta la resina amb DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i DMF (3 ml, 3 x 2 minuts). A continuació, es procedeix a la desprotecció del grup Fmoc de l'extrem N_{ter} amb una solució de piperidina al 20 % en DMF (3ml, 2 x 10 minuts), es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i s'inicia el següent acoblament. 184 μl d'àcid 5-hexinoic (1,6 mmol, 4 eq.), 833 mg de PyBOP (1,6 mmol, 4 eq.), 658 mg de HOBt (4,8 mmol, 12 eq.)

i 795 μl de DIEA (4,8 mmol, 12 eq.) es mesclen amb la resina 2-clorotritil i s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps, es filtra l'excés de reactius, es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i es comprova l'acoblament amb el test de Kaiser (veure apartat *Test colorimètrics*). A continuació, es tracta la resina amb una solució de TFA al 2 % en DCM (2 ml, 3 x 2 minuts) per escindir el compost de la resina. Es filtra la resina i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. Finalment, s'afegeix una mescla d' H_2O i acetonitril (2:1) i es liofilitza per obtenir 183 mg (0,351 mmol) de Aha-Arg(Pbf)-OH pur (HPLC, > 90 %). Rendiment = 88 %. HPLC-ESI RT = 10,1 min. ($\text{M}+\text{H}^+$ m/z 521,1; m/z esperada de $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6\text{S} + \text{H}^+$ = 521,2). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 4,48 ppm (m, 1H), δ = 3,43 ppm (m, 1H), δ = 3,30 ppm (m, 1H), δ = 2,50 ppm (s, 3H), δ = 2,46 ppm (s, 3H), δ = 2,42 ppm (m, 2H), δ = 2,22 ppm (m, 2H), δ = 2,11 ppm (s, 3H), δ = 1,97–1,94 ppm (m, 2H), δ = 1,85–1,68 ppm (m, 1H+2H+2H+2H), δ = 1,49 ppm (s, 6H).

Síntesi de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ (26) 104 mg de Aha-Arg(Pbf)-OH (200 μmol , 1 eq.) es dissolen en DMF en un matràs amb 316 mg de *N,N'*-diclohexilcarbodiimida en suport sòlid (600 μmol , 3 eq., f = 1,9 mmol/g, Novabiochem). Es tanca el sistema, s'estableix una atmosfera inerta de $\text{N}_2(g)$ i s'afegeixen 71 mg de clorohidrat de H-Leu^P(OPh)₂ (200 μmol) prèviament neutralitzats amb 33 μl de DIEA (200 μmol , 1 eq.). La reacció es deixa en agitació 20 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de sílica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:3 a 0:1 per obtenir 51 mg (0,062 mmol) de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ purs (HPLC, > 98 %). Rendiment = 30 %. HPLC-ESI RT = 11,1 min. ($\text{M}+\text{H}^+$ m/z 821,7; m/z esperada de $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_8\text{PS} + \text{H}^+$ = 822,4). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 7,36–7,03 ppm (m, 10H), δ = 4,83 ppm (m, 1H), δ = 4,53 ppm (m, 1H), δ = 3,70 ppm (m, 1H), δ = 3,30 ppm (m, 1H), δ = 2,52 ppm (s, 3H), δ = 2,47 ppm (s, 3H), δ = 2,37–2,25 ppm (m, 3H), δ = 2,17 ppm (m, 1H), δ = 2,09 ppm (s, 3H), δ = 1,99–1,68 ppm (m, 12H), δ = 1,46 ppm (s, 6H), δ = 0,93 ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ (23) 51 mg de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ (0,062 mmol) es dissolen en 5 ml d'una solució TFA: H_2O (95:5) en un vial de vidre i es deixa en agitació 1 h i 30 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda i es precipita el producte en èter fred per eliminar el grup protector Pbf i per obtenir 6,8 mg (0,012 mmol) de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 98 %). Rendiment = 19 %. HPLC-ESI RT = 6,3 min. ($\text{M}+\text{H}^+$ m/z 570,0; m/z esperada de $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_5\text{P} + \text{H}^+$ = 570,3). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 7,28 ppm (m, 4H), δ = 7,14 ppm (m, 6H), δ = 4,84 ppm (m, 1H), δ =

4,45 ppm (m, 1H), $\delta = 3,17\text{--}2,89$ ppm (m, 2H), $\delta = 2,35$ ppm (m, 2H), $\delta = 2,13$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,98$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,73$ ppm (m, 8H), $\delta = 1,49$ ppm (m, 2H), $\delta = 0,93$ ppm (s, 6H). HRMS (mode positiu) $m/z = 570,2853$ (m/z esperada de $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_5\text{P} + \text{H}^+ = 570,2767$).

Síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ a partir de Boc-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂

Síntesi de Boc-Arg(diCbz)Leu^P(OPh)₂ (20) 399 mg d'HATU (1,05 mmol), 347 μl de DIEA (2,1 mmol) i 569 mg de Boc-Arg(diCbz)-OH (1,05 mmol) es dissolen en DMF anhidre (15 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de $\text{N}_{2(g)}$. A continuació, s'afegeixen 430 mg del bromohidrat de H-Leu^P(OPh)₂ (1,05 mmol) neutralitzat amb 347 μl de DIEA (2,1 mmol) i dissolts en DMF anhidre (2 ml). La reacció es deixa en agitació 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en columna de sílica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:1 per obtenir 801 mg (0,95 mmol) de Boc-Arg(diCbz)Leu^P(OPh)₂ pur (TLC). Rendiment = 90 %. ¹H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 7,38\text{--}7,11$ ppm (m, 20H), $\delta = 5,82$ ppm (m, 4H), $\delta = 4,86$ ppm (m, 1H), $\delta = 4,21$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,96$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,87$ ppm (m, 1H), $\delta = 1,64$ ppm (m, 6H), $\delta = 1,41$ ppm (m, 9H), $\delta = 0,87$ ppm (m, 6H).

Síntesi de H-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂ (21) 801 mg de Boc-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂ (0,95 mmol) es dissolen en una solució de HCl 4 M en dioxà (20 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de $\text{N}_{2(g)}$. La reacció es deixa en agitació 30 minuts a temperatura ambient i passat aquest temps s'evapora el dissolvent a pressió reduïda. Es purifica el producte d'interès per precipitació en dietilèter fred del producte i posterior filtrat. S'obté 702 mg (0,90 mmol) de clorohidrat de H-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 95 %. ¹H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 7,44\text{--}7,14$ ppm (m, 20H), $\delta = 5,32\text{--}5,21$ ppm (m, 4H), $\delta = 4,86$ ppm (m, 1H), $\delta = 4,21$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,96$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,80$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,05\text{--}1,78$ ppm (m, 6H), $\delta = 1,00\text{--}0,88$ ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂ (22) 338 mg d'HATU (0,90 mmol), 294 μl de DIEA (1,80 mmol) i 78 μl d'àcid 5-hexinoic (0,90 mmol) es dissolen en DMF anhidre (15 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de $\text{N}_{2(g)}$. A continuació, s'afegeixen 702 mg de clorohidrat de H-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂ (0,90 mmol) neutralitzat amb 294 μl de DIEA (1,80 mmol) i dissolts en DMF anhidre (2 ml). La reacció es deixa en agitació 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en columna de sílica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 2:8 per obtenir

648 mg (0,77 mmol) de Aha-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 98 %). Rendiment = 86 %. HPLC-ESI* RT = 19,8 min. (M+H⁺ *m/z* 838,4; *m/z* esperada de C₄₅H₅₂N₅O₉P + H⁺ = 837,3). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,33–7,04 ppm (m, 20H), δ = 5,16 ppm (m, 4H), δ = 4,88 ppm (m, 1H), δ = 4,64 ppm (m, 1H), δ = 2,17–2,01 ppm (m, 2H+2H+2H), δ = 1,91 ppm (s, 1H), δ = 1,64 ppm (m, 3H+6H), δ = 0,85 ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Arg(diCbz)-Leu^P(OEt)₂ 100 mg de Aha-Arg(diCbz)-Leu^P(OPh)₂ (0,12 mmol), 112,5 mg de KF (1,2 mmol) i 2 mg d'èter 18-corona-6 (0,005 mmol) es dissolen en etanol (10 ml) i la mescla es porta a ebullició durant 10 minuts. Posteriorment, es deixa evolucionar durant 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 2:8 per obtenir 58,9 mg (0,079 mmol) de Aha-Arg(diCbz)-Leu^P(OEt)₂ pur (HPLC, > 95%). Rendiment = 66 %. HPLC-ESI* RT = 18,1 min. (M+H⁺ *m/z* 742,3; *m/z* esperada de C₃₇H₅₂N₅O₉P + H⁺ = 742,3).

Síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OPh)₂ a partir de Fmoc-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂

Síntesi de Fmoc-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ (24) 209 mg d'HATU (0,55 mmol), 182 μl de DIEA (1,10 mmol) i 356 mg de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0,55 mmol) es dissolen en DMF anhidre (10 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. A continuació, s'afegeixen 220 mg del bromohidrat de H-Leu^P(OPh)₂ (0,90 mmol) neutralitzat amb 182 μl de DIEA (1,10 mmol) i dissolts en DMF anhidre (2 ml). La reacció es deixa en agitació 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:1 per obtenir 406 mg (0,44 mmol) de Fmoc-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 80 %. HPLC-ESI RT = 12,8 min. (M+H⁺ *m/z* 950,8; *m/z* esperada de C₅₁H₆₀N₅O₉PS + H⁺ = 950,4). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,71 ppm (m, 2H), δ = 7,51 ppm (m, 2H), δ = 7,32–7,01 ppm (m, 12H), δ = 4,87 ppm (m, 1H), δ = 4,48 ppm (m, 1H), δ = 4,25 ppm (m, 2H), δ = 4,04 ppm (m, 1H), δ = 2,85 ppm (s, 2H), δ = 2,55 ppm (s, 3H), δ = 2,48 ppm (s, 3H), δ = 2,03 ppm (s, 3H), δ = 1,96–1,48 ppm (m, 7H), δ = 1,38 ppm (s, 6H), δ = 1,25 ppm (m, 2H), δ = 0,84 ppm (m, 6H).

Síntesi de H-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ (25) 406 mg (0,44 mmol) de Fmoc-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ es dissolen en DMF anhidre (15 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. El sistema es refreda a 0 °C i s'afegeixen 750 μl de dietilamina gota a gota. La reacció es deixa agitant-se a temperatura ambient durant 3 h. Passat aquest temps s'elimina el dissolvent

per evaporació a pressió reduïda i es tracta el cru amb una solució de TFA al 3 % en DCM per protonar el H-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ que es precipita amb dietilèter fred per obtenir 27 mg (0,037 mmol) de H-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ (HPLC). Rendiment = 8,5 %. HPLC-ESI RT = 8,2 min (M+H⁺ *m/z* 728,5; *m/z* esperada de C₃₆H₅₀N₅O₇PS + H⁺ = 728,3).

Síntesi de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ (26) 14 mg d'HATU (0,037 mmol), 12,2 μl de DIEA (0,074 mmol) i 4,1 μl d'àcid 5-hexinoic (0,037 mmol) es dissolen en DMF anhidre (5 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. A continuació, s'afegeixen 27 mg de H-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ (0,037 mmol) neutralitzat amb 12,2 μl de DIEA (0,074 mmol) i dissolts en DMF anhidre (2 ml). La reacció es deixa en agitació 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:1 per obtenir 26 mg (0,031 mmol) de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC). Rendiment = 85 %. HPLC-ESI RT = 11,1 min. (M+H⁺ *m/z* 821,7; *m/z* esperada de C₄₂H₄₆N₅O₈PS + H⁺ = 822,4). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,36–7,03 ppm (m, 10H), δ = 4,83 ppm (m, 1H), δ = 4,53 ppm (m, 1H), δ = 3,70 ppm (m, 1H), δ = 3,30 ppm (m, 1H), δ = 2,52 ppm (s, 3H), δ = 2,47 ppm (s, 3H), δ = 2,37–2,25 ppm (m, 3H), δ = 2,17 ppm (m, 1H), δ = 2,09 ppm (s, 3H), δ = 1,99–1,68 ppm (m, 12H), δ = 1,46 ppm (s, 6H), δ = 0,93 ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂

Síntesi de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OEt)₂ 51 mg de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OPh)₂ (0,062 mmol), 36 mg de KF (0,620 mmol) i 1 mg d'éter 18-corona-6 (0,003 mmol) es dissolen en etanol (10 ml) i la mescla es porta a ebullició durant 10 minuts. Posteriorment, es deixa evolucionar durant 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de silica amb un gradient d'acetat d'etil i etanol en proporcions de 1:0 a 8:2 per obtenir 22 mg (0,030 mmol) de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OEt)₂ pur (HPLC). Rendiment = 49 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 4,52 ppm (m, 2H), δ = 4,11 ppm (m, 4H), δ = 3,86–3,27 ppm (m, 2H), δ = 2,59 ppm (s, 3H), δ = 2,53 ppm (s, 3H), δ = 2,40 ppm (m, 2H), δ = 2,22 ppm (m, 2H), δ = 2,09 ppm (s, 3H), δ = 1,98–1,51 ppm (m, 12H), δ = 1,46 ppm (m, 6H), δ = 1,31 ppm (m, 6H), δ = 0,90 ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ (28) 22 mg de Aha-Arg(Pbf)-Leu^P(OEt)₂ (0,030 mmol) es dissolen en 5 ml d'una solució TFA:H₂O (95:5) en un vial de vidre i es deixa en agitació 1 h i 30 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda i es precipita el producte en éter fred per eliminar el grup protector Pbf i per

obtenir 5,5 mg (0,012 mmol) de Aha-Arg-Leu^P(OEt)₂ pur (HPLC). Rendiment = 40 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 4,51 ppm (m, 2H), δ = 4,12 ppm (m, 4H), δ = 3,80–3,26 ppm (m, 2H), δ = 2,42 ppm (m, 2H), δ = 2,24 ppm (m, 2H), δ = 2,00–1,58 ppm (m, 12H), δ = 1,31 ppm (m, 6H), δ = 0,91 ppm (m, 6H). HRMS (mode positiu) m/z = 474,2843 (m/z esperada de C₂₁H₄₀N₅O₅P + H⁺ = 473.2767).

Síntesi de Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂

Síntesi de Aha-Glu(tBu)-OH (33) La síntesi de Aha-Glu(tBu)-OH es fa per síntesi en fase sòlida (estratègia Fmoc/tBu) sobre resina 2-clorotritil ($f = 1,5$ mmol/g) a una escala de 400 μ mol. Per al primer acoblament, 170 mg de Fmoc-Glu(tBu)-OH (400 μ mol) i 680 μ l de DIEA es dissolen en DCM (1 ml) i es mesclen amb 516 mg de resina 2-clorotritil. La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps es desactiven les posicions lliures de la resina amb metanol (413 μ l, 10 minuts), es filtra l'excés de reactius i es renta la resina amb DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i DMF (3 ml, 3 x 2 minuts). A continuació, es procedeix a la desprotecció del grup Fmoc de l'extrem N_{ter} amb una solució de piperidina al 20 % en DMF (3ml, 2 x 10 minuts), es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i s'inicia el següent acoblament. 184 μ l d'àcid 5-hexinoic (1,6 mmol, 4 eq.), 833 mg de PyBOP (1,6 mmol, 4 eq.), 658 mg de HOBt (4,8 mmol, 12 eq.) i 795 μ l de DIEA (4,8 mmol, 12 eq.) es mesclen amb la resina 2-clorotritil i s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps, es filtra l'excés de reactius, es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i es comprova l'acoblament amb el test de Kaiser (veure apartat *Tests colorimètrics*). A continuació, es tracta la resina amb una solució de TFA al 2 % en DCM (2 ml, 3 x 2 minuts) per escindir el compost de la resina. Es filtra la resina i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. Finalment, s'afegeix una mescla d'H₂O i acetonitril (2:1) i es liofilitza per obtenir 109 mg (0,367 mmol) de Aha-Glu(tBu)-OH pur (HPLC, > 90 %). Rendiment = 92 %. HPLC-ESI RT = 9,1 min. (M+H⁺ m/z 298,9; m/z esperada de C₁₅H₂₃NO₅ + H⁺ = 298,2). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 4,53 ppm (m, 1H), δ = 2,55–2,34 ppm (m, 4H), δ = 2,27 ppm (m, 2H), δ = 2,18 ppm (m, 1H), δ = 2,05 ppm (m, 1H), δ = 1,99 ppm (m, 1H), δ = 1,87 ppm (m, 2H), δ = 1,46 ppm (s, 9H).

Síntesi de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ 60 mg de Aha-Glu(tBu)-OH (200 μ mol, 1 eq.) es dissolen en DMF en un matràs amb 316 mg de *N,N'*-diclohexilcarbodiimida en suport sòlid (600 μ mol, 3 eq., $f = 1,9$ mmol/g, Novabiochem). Es tanca el sistema, s'estableix una atmosfera inerta de N_{2(g)} i s'afegeixen 80 mg de bromhidrat de diphenyl 1-amino-3-methylbutylphosphonate (200 μ mol) prèviament neutralitzats amb 33,1 μ l

de DIEA (200 μmol , 1 eq.). La reacció es deixa en agitació 20 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:3 a 0:1 per obtenir 62 mg de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ purs (HPLC, > 98 %). Rendiment = 52 %. HPLC-ESI RT = 10,7 min. (M+H⁺ m/z 598,8; m/z esperada de C₃₂H₄₃N₂O₇P + H⁺ = 599,3). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,29 ppm (m, 4H), δ = 7,14 ppm (m, 6H), δ = 4,88 ppm (m, 1H), δ = 4,47 ppm (m, 1H), δ = 2,49–2,17 ppm (m, 6H), δ = 2,09–1,17 ppm (m, 8H), δ = 1,42 ppm (s, 9H), δ = 0,94 ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ (32) 8 mg de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ (0,013 mmol) es dissolen en 5 ml d'una solució TFA:H₂O (95:5) en un vial de vidre i es deixa en agitació 1 h i 30 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'elimina el dissolvent i per evaporació a pressió reduïda per obtenir 7,2 mg (0,013 mmol) de Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 98 %). Rendiment = 98 %. HPLC-ESI RT = 8,0 min. (M+H⁺ m/z 543,1; m/z esperada de C₂₈H₃₅N₂O₇P + H⁺ = 543,2). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,29 ppm (m, 4H), δ = 7,17 ppm (m, 6H), δ = 4,91 ppm (m, 1H), δ = 4,69 ppm (m, 1H), δ = 2,42–2,10 ppm (m, 6H), δ = 1,96–1,74 ppm (m, 8H), δ = 0,90 ppm (m, 6H). HRMS (mode positiu) m/z = 543,2255 (m/z esperada de C₂₈H₃₅N₂O₇P + H⁺ = 543,2181).

Síntesi de Aha-Glu-Leu^P(OPh)₂ a partir de Fmoc-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂

Síntesi de Fmoc-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ (29) 426 mg d'HATU (1,40 mmol), 370 μl de DIEA (2,80 mmol) i 477 mg de Fmoc-Glu(tBu)-OH (1,40 mmol) es dissolen en DMF anhidre (20 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. A continuació, s'afegeixen 500 mg de bromhidrat de diphenyl 1-amino-3-methylbutylphosphonate (1,40 mmol) neutralitzat amb 370 μl de DIEA (2,80 mmol) i dissolts en DMF anhidre (2 ml). La reacció es deixa en agitació 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:1 per obtenir 812 mg (1,12 mmol) de Fmoc-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 95%). Rendiment = 80 %. HPLC-ESI RT = 12,6 min. (M+H⁺ m/z 727,5; m/z esperada de C₄₁H₄₇N₂O₈P + H⁺ = 727,3). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,74 ppm (m, 2H), δ = 7,54 ppm (m, 2H), δ = 7,38 ppm (m, 2H), δ = 7,25 ppm (m, 4H), δ = 7,19–7,07 ppm (m, 8H), δ = 4,90 ppm (m, 1H), δ = 4,36 ppm (m, 2H), δ = 4,01 ppm (m, 2H), δ = 2,33 ppm (m, 2H), δ = 2,10–1,66 ppm (m, 5H), δ = 1,41 ppm (s, 9H), δ = 0,92 ppm (m, 6H).

Síntesi de H-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ (30) 812 mg de Fmoc-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ (1,12 mmol) es dissolen en DMF anhidre (15 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. El sistema es refreda a 0 °C i s'afegeixen 750 µl de dietilamina gota a gota. La reacció es deixa agitant-se a temperatura ambient durant 3 h. Passat aquest temps s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda i es tracta el cru amb una solució de TFA al 3 % en DCM per protonar el H-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ que es precipita amb dietilèter fred per obtenir 61 mg (0,113 mmol) de clorhidrat de H-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ (HPLC). Rendiment = 10 %. HPLC-ESI RT = 8,4 min. (M+H⁺ *m/z* 505,8; *m/z* esperada de C₂₆H₃₇N₂O₆P + H⁺ = 505,2).

Síntesi de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ (31) 43 mg d'HATU (0,113 mmol), 37 µl de DIEA (0,226 mmol) i 12,5 µl d'àcid 5-hexinoic (0,113 mmol) es dissolen en DMF anhidre (15 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. A continuació, s'afegeixen 61 mg de clorhidrat de H-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ (0,113 mmol) neutralitzat amb 37 µl de DIEA (0,226 mmol) i dissolts en DMF anhidre (2 ml). La reacció es deixa en agitació 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 3:1 a 1:1 per obtenir 50 mg (0,084 mmol) de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ pur (TLC). Rendiment = 69 %. HPLC-ESI RT = 10,7 min. (M+H⁺ *m/z* 598,8; *m/z* esperada de C₃₂H₄₃N₂O₇P + H⁺ = 599,3). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,29 ppm (m, 4H), δ = 7,14 ppm (m, 6H), δ = 4,88 ppm (m, 1H), δ = 4,47 ppm (m, 1H), δ = 2,49–2,17 ppm (m, 6H), δ = 2,09–1,17 ppm (m, 8H), δ = 1,42 ppm (s, 9H), δ = 0,94 ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂

Síntesi de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OEt)₂ 62 mg de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OPh)₂ (0,103 mmol), 58 mg de KF (1,030 mmol) i 1 mg d'èter 18-corona-6 (0,003 mmol) es dissolen en etanol (10 ml) i la mescla es porta a ebullició durant 10 minuts. Posteriorment, es deixa evolucionar durant 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de silica amb un gradient d'acetat d'etil i etanol en proporcions de 1:0 a 8:2 per obtenir 23 mg (0,046 mmol) de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OEt)₂ pur (HPLC). Rendiment = 44 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 4,46 ppm (m, 2H), δ = 4,13 ppm (m, 4H), δ = 2,47 ppm (m, 1H), δ = 2,36–2,25 ppm (m, 5H), δ = 2,09–1,83 ppm (m, 6H), δ = 1,62 ppm (m, 2H), δ = 1,45 ppm (s, 9H), δ = 1,31 ppm (m, 6H), δ = 0,90 ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ (34) 23 mg de Aha-Glu(tBu)-Leu^P(OEt)₂ (0,046 mmol) es dissolen en 5 ml d'una solució TFA:H₂O (95:5) en un vial de vidre i es deixa en agitació 1 h i 30 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda per obtenir 20,4 mg (0,045 mmol) de Aha-Glu-Leu^P(OEt)₂ pur (HPLC). Rendiment = 99 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 4,67 ppm (m, 1H), δ = 4,48 ppm (m, 1H), δ = 4,14 ppm (m, 4H), δ = 2,48–2,39 ppm (m, 4H), δ = 2,23 ppm (m, 2H), δ = 2,11 ppm (m, 1H), δ = 1,97 ppm (m, 2H), δ = 1,83 ppm (m, 2H), δ = 1,64 ppm (m, 2H), δ = 1,50 ppm (m, 1H), δ = 1,34 ppm (m, 6H), δ = 0,92 ppm (m, 6H). HRMS (mode positiu) *m/z* = 447,2252 (*m/z* esperada de C₂₀H₃₅N₂O₇P + H⁺ = 447.2181).

Síntesi de Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂

Síntesi del fosfit d'etil i difenil 188,2 g de fenol (39 mmol) i 5,71 ml de trietilamina (41 mmol) es dissolen en toluè (40 ml) en un matràs amb atmosfera inerta de N_{2(g)} i constant agitació. El sistema es refreda a 0 °C i s'hi afegeixen 2,28 ml de diclorofosfit d'etil (20 mmol) en dietilèter (10 ml) poc a poc, controlant que la temperatura no augmenti per sobre dels 5 °C. La reacció es manté a 0 °C durant 30 minuts i posteriorment es deixa atemperar a temperatura ambient durant 3 h. A continuació, es filtren les sals del cru de reacció i es renten amb toluè per recuperar la màxima quantitat de producte. La fase orgànica es renta amb NaCl_(sat) (2 x 30 ml), se seca amb MgSO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda per obtenir 4,86 g de fosfit d'etil i difenil pur en forma d'oli de color groc pàlid (TLC). Rendiment = 93 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,40–7,20 ppm (m, 4H), δ = 7,20–7,00 ppm (m, 6H), δ = 4,22 ppm (m, 2H), δ = 1,34 ppm (m, 3H).

Síntesi de Pht-Gly^P(OPh)₂ (38) 4,60 g de 2-(bromomethyl)isoindoline-1,3-dione (19,2 mmols) s'afegeixen, juntament amb 4,68 g de fosfit d'etil i difenil (19,2 mmol), en un matràs amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. Els reactius es dissolen amb xilè (150 ml) i la reacció es manté a reflux (150-160 °C) durant 5 dies. Passat aquest temps s'evapora el xilè a pressió reduïda i el cru de reacció es purifica en columna de sílica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:0 a 1:1 per obtenir 2,60 g de Pht-Gly^P(OPh)₂ pur (TLC). Rendiment = 35 %. HPLC-ESI RT = 12,0 min. (M+H⁺ *m/z* 393,5; *m/z* esperada de C₂₁H₁₆NO₅P + H⁺ = 394,08). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,89–7,76 ppm (m, 2H+2H), δ = 7,31–7,21 (m, 10H), δ = 4,48–4,45 ppm (d, 2H).

Síntesi de H-Gly^P(OPh)₂ (39) 2,77 g de Pht-Gly^P(OPh)₂ (7,6 mmol) es dissolen en THF anhidre (20 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta

de $N_{2(g)}$ i s'hi afegeixen 0,94 ml d'hidrazina (30,4 mmol). El sistema s'escalfa a reflux i es deixa reaccionar 72 h a 70 °C. Passat aquest temps, el cru de reacció es filtra per eliminar la 2,3-dihidroftalazin-1,4-diona precipitada i s'elimina el dissolvent del filtrat a pressió reduïda per obtenir, sense cap altre pas de purificació, 1,36 g de H-Gly^P(OPh)₂ pur (TLC). Rendiment = 74 %. HPLC-ESI RT = 8,9 min. (M+H⁺ *m/z* 264,5; *m/z* esperada de C₁₃H₁₄NO₃P + H⁺ = 264,07). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,40–7,15 (m, 6H), δ = 6,95–6,75 (m, 4H), δ = 3,40 (d, 2H).

Síntesi de (difenilmetilenamino)metilfosfonat de difenil (40) 1,36 g de H-Gly^P(OPh)₂ (5,6 mmol) i 1,12 g de benzofenona (6,2 mmol) es dissolen en toluè (20 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de $N_{2(g)}$ dotat d'un *Dean Stark*. La reacció s'escalfa a reflux i es deixa evolucionar durant 12 h a 120 °C. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 3:1 per obtenir 1,05 g de (difenilmetilenamino)metilfosfonat de difenil pur (TLC). Rendiment = 44 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,62 ppm (m, 2H), δ = 7,43 ppm (m, 4H), δ = 7,32 ppm (m, 6H), δ = 7,25 ppm (m, 4H), δ = 4,24 ppm (d, 2H). MALDI-TOF *m/z* = 428,10 (*m/z* esperada de C₂₆H₂₂NO₃P + H⁺ = 428,13).

Síntesi de 3-(2-(difenoxifosforil)-2-(difenilmetilenamino)etil)indole-1-carboxilat de *tert*-butil (41) 850 mg de (difenilmetilenamino)metilfosfonat de difenil (2 mmol) es dissolen en THF anhidre (10 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de $N_{2(g)}$. El sistema es refreda a -78 °C i s'afegeixen gota a gota 2,1 ml de HMPA (12 mmol) i 10 ml de KHMDS (5 mmol). La mescla es deixa reaccionar durant 30 minuts a -78 °C. Passat aquest temps, s'afegeixen 1,24 g de 3-bromometilindole-1-carboxilat de *tert*-butil (4 mmol, Fluorochem) dissolts en THF anhidre i la reacció es manté en agitació durant 4 h addicionals a -78 °C. La reacció s'atura per addició de 2 ml de NH₄Cl_(aq) a -78 °C. El cru de reacció s'extreu amb DCM (3 x 10 ml) i la fase orgànica es renta amb NaCl_(sat) (3 x 10 ml), se seca amb MgSO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda per obtenir 358 mg de 3-(2-(difenoxifosforil)-2-(difenilmetilenamino)etil)indole-1-carboxilat de *tert*-butil pur (TLC). Rendiment = 27 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,56 ppm (m, 2H), δ = 7,37 ppm (m, 2H), δ = 7,28 ppm (m, 8H), δ = 7,23–7,12 ppm (m, 10H), δ = 7,01–6,99 ppm (m, 2H+1H), δ = 4,50 ppm (m, 1H), δ = 3,53 ppm (m, 2H), δ = 1,58 ppm (s, 9H). MALDI-TOF *m/z* = 657,28 (*m/z* esperada de C₄₀H₃₇N₂O₅P + H⁺ = 657,24).

Síntesi de H-Trp(Boc)^P(OPh)₂ (42) 25 mg de 3-(2-(difenoxifosforil)-2-(difenilmetilenamino)etil)indole-1-carboxilat de *tert*-butil (0,038 mmol) es dissolen en DCM amb un 3 % de TFA i un 1% d'H₂O. La mescla es dei-

xa reaccionar 1 h a 25 °C per obtenir H-Trp(Boc)^P(OPh)₂ i benzofenona. Aquests productes s'utilitzen a la següent reacció sense cap pas de purificació addicional.

Síntesi de Aha-Asp(tBu)-OH (43) La síntesi de Aha-Asp(tBu)-OH es fa per síntesi en fase sòlida (estratègia Fmoc/tBu) sobre resina 2-clorotritil ($f = 1,5$ mmol/g) a una escala de 400 μ mol. Per al primer acoblament, 165 mg de Fmoc-Asp(tBu)-OH (400 μ mol) i 680 μ l de DIEA es dissolen en DCM (1 ml) i es mesclen amb 516 mg de resina 2-clorotritil. La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps es desactiven les posicions lliures de la resina amb metanol (413 μ l, 10 minuts), es filtra l'excés de reactius i es renta la resina amb DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i DMF (3 ml, 3 x 2 minuts). A continuació, es procedeix a la desprotecció del grup Fmoc de l'extrem N_{ter} amb una solució de piperidina al 20 % en DMF (3ml, 2 x 10 minuts), es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i s'inicia el següent acoblament. 184 μ l d'àcid 5-hexinoic (1,6 mmol, 4 eq.), 833 mg de PyBOP (1,6 mmol, 4 eq.), 658 mg de HOBt (4,8 mmol, 12 eq.) i 795 μ l de DIEA (4,8 mmol, 12 eq.) es mesclen amb la resina 2-clorotritil i s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps, es filtra l'excés de reactius, es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i es comprova l'acoblament amb el test de Kaiser (veure apartat *Tests colorimètrics*). A continuació, es tracta la resina amb una solució de TFA al 2 % en DCM (2 ml, 3 x 2 minuts) per escindir el compost de la resina. Es filtra la resina i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda. Finalment, s'afegeix una mescla d'H₂O i acetonitril (2:1) i es liofilitza per obtenir 93 mg (0,329 mmol) de Aha-Asp(tBu)-OH pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 82 %. HPLC RT = 9,6 min. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) $\delta = 4,84$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,93$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,77$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,46$ ppm (t, 2H), $\delta = 2,27$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,98$ ppm (t, 1H), $\delta = 1,87$ ppm (p, 2H), $\delta = 1,45$ ppm (s, 9H).

Síntesi de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc)^P(OPh)₂ (44) 10,7 mg de Aha-Asp(tBu)-OH (0,038mmol, 1 eq.) es dissolen en DMF en un matràs amb 60 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida en suport sòlid (0,114 mmol, 3 eq., $f = 1,9$ mmol/g, Novabiochem). Es tanca el sistema tancat, s'estableix una atmosfera inerta de N_{2(g)} i s'afegeix el cru de reacció anterior prèviament neutralitza amb 19 μ l de DIEA (1,37 mmol, 3eq.). La reacció es deixa en agitació 20 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 3:1 a 1:1 per obtenir 7,2 mg de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc)^P(OPh)₂ pur (TLC). Rendiment total dues últimes reaccions = 25 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) $\delta = 7,54$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,29$ ppm (m, 8H), $\delta = 7,15$ ppm (m, 5H), $\delta = 5,10$ ppm (m, 1H), $\delta = 4,66$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,46$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,19$

ppm (m, 1H), $\delta = 2,74$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,42$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,29$ – $2,08$ ppm (m, 4H), $\delta = 1,95$ ppm (m, 1H), $\delta = 1,71$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,64$ ppm (s, 9H), $\delta = 1,37$ ppm (s, 9H).

Síntesi de Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ (45) 7,2 mg de Aha-Asp(*t*Bu)-Trp-(Boc)^P(OPh)₂ (0,009 mmol) es dissolen en una mescla TFA i DCM (1:1) en agitació durant 1 h a temperatura ambient. Finalitzada la reacció s'evaporen a pressió reduïda els dissolvents i els grups protectors per obtenir 5,6 mg de Aha-Asp-Trp^P(OPh)₂ pur (HPLC, > 95 %). Rendiment = 98 %. HPLC-ESI RT = 11,20 min. (M+H⁺ *m/z* 602,6; *m/z* esperada de C₃₂H₃₁N₃O₇P + H⁺ = 602,2). ¹H RMN (DMSO, 400 MHz) $\delta = 7,35$ ppm (m, 6H), $\delta = 7,20$ ppm (m, 4H), $\delta = 7,13$ ppm (m, 7H), $\delta = 4,83$ ppm (m, 1H), $\delta = 4,59$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,99$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,88$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,65$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,44$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,30$ – $2,08$ ppm (m, 2H+2H+1H), $\delta = 1,49$ ppm (m, 2H). HRMS (mode negatiu) *m/z* = 600,1891 (*m/z* esperada de C₃₂H₃₁N₃O₇P - H⁺ = 600,1894).

Síntesi de N-(*tert*-butoxicarbonil)-3-cianometilindole (36) 1,90 g de 3-cianometilindole (8,2 mmol), 2,66 g de dicarbonat de di-*tert*-butil (12,2 mmol) i 1,48 g de 4-dimetilaminopiridina (12,2 mmol) es dissolen en DCM (40 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)}. A continuació, s'afegeixen 1,72 ml de trietilamina (12,2 mmol) i la reacció es deixa evolucionar en agitació durant 2 h a 25 °C. Passat aquest temps, el cru de reacció es renta amb NaCl_(sat) (3 x 10 ml), se seca amb MgSO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 3:1 per obtenir 820 mg de N-(*tert*-butoxicarbonil)-3-cianometilindole pur (TLC). Rendiment = 39 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) $\delta = 8,16$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,64$ ppm (s, 1H), $\delta = 7,51$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,38$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,30$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,77$ ppm (d, 2H), $\delta = 1,68$ ppm (s, 9H).

Síntesi de N-(*tert*-butoxicarbonil)-3-acetaldehidindole (37) 0,82 g de N-(*tert*-butoxicarbonil)-3-cianometilindole (3,2 mmol) es dissolen en DCM (25 ml) en un sistema tancat amb atmosfera inerta de N_{2(g)} que es refreda a -78 °C. A continuació, s'afegeix, gota a gota, 3,5 ml d'una solució de DIBAL 1M en THF (3,5 mmol) i la reacció es deixa 45 minuts en agitació a -78 °C i 5 h a 25 °C. Passat aquest temps, la reacció s'atura amb NH₄Cl_(sat) amb precaució. El cru de reacció es renta amb NH₄Cl_(sat) (3 x 10 ml), se seca amb MgSO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El cru de reacció es purifica en columna de silica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 3:1 a 1:1 per obtenir 384 mg de N-(*tert*-butoxicarbonil)-3-acetaldehidindole pur (TLC). Rendiment = 61 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400

MHz) $\delta = 9,79$ ppm (t, 1H), $\delta = 8,17$ ppm (d, 1H), $\delta = 7,58$ ppm (s, 1H), $\delta = 7,45$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,36$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,28$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,77$ ppm (d, 2H), $\delta = 1,68$ ppm (s, 9H).

Síntesi de Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂

Síntesi de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc)^P(OEt)₂ 94 mg de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc)^P(OPh)₂, 72,6 mg de KF (1,25 mmol) i 1 mg d'eter 18-corona-6 (0,003 mmol) es dissolen en etanol (10 ml) i la mescla es porta a ebullició durant 10 minuts. Posteriorment, es deixa evolucionar durant 16 h a temperatura ambient. El cru de reacció es purifica en una columna de sílica amb un gradient d'hexà i acetat d'etil en proporcions de 1:1 a 0:1 per obtenir 51 mg de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc)^P(OEt)₂ pur (TLC). Rendiment = 62 %. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) $\delta = 7,60$ – $7,47$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,25$ ppm (m, 2H), $\delta = 6,88$ ppm (m, 1H), $\delta = 4,68$ ppm (m, 2H), $\delta = 4,14$ ppm (m, 4H), $\delta = 3,30$ ppm (m, 1H), $\delta = 3,02$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,75$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,49$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,35$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,25$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,18$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,97$ ppm (m, 1H), $\delta = 1,85$ ppm (m, 1H), $\delta = 1,73$ ppm (m, 1H), $\delta = 1,66$ ppm (s, 9H), $\delta = 1,40$ ppm (s, 9H), $\delta = 1,29$ ppm (m, 6H).

Síntesi de Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ (46) 51 mg de Aha-Asp(tBu)-Trp(Boc)^P(OEt)₂ (0,077 mmol) es dissolen en una mescla TFA i DCM (1:1) en agitació durant 1 h a temperatura ambient. Finalitzada la reacció s'evaporen a pressió reduïda els dissolvents i els grups protectors per obtenir 38,5 mg de Aha-Asp-Trp^P(OEt)₂ pur (HPLC, > 98 %). Rendiment = 98 %. ¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz) $\delta = 7,55$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,30$ ppm (m, 1H), $\delta = 7,08$ ppm (m, 2H), $\delta = 7,00$ ppm (m, 1H), $\delta = 4,67$ ppm (m, 2H), $\delta = 4,11$ ppm (m, 4H), $\delta = 3,08$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,70$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,53$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,28$ ppm (m, 2H), $\delta = 2,23$ ppm (m, 1H), $\delta = 2,15$ ppm (m, 2H+1H), $\delta = 1,70$ ppm (m, 2H), $\delta = 1,29$ ppm (m, 6H). HPLC-ESI RT = 8,70 min. (M+H⁺ m/z 506,88; m/z esperada de C₂₄H₃₂N₃O₇P + H⁺ = 506,2. HRMS (mode negatiu) m/z = 504,1979 (m/z esperada de C₂₄H₃₂N₃O₇P - H⁺ = 504,1978).

7.1.4 Síntesi de substrats

Síntesi de H-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe(*p*-CF₃)-Asn-OH

La síntesi de H-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe(CF₃)-Asn-OH es fa per síntesi en fase sòlida sobre resina 2-clorotritil amb una funcionalització de 0,7 mmol/g

($f_{inicial} = 1,4$ mmol/g) i a una escala de 250 μ mol. Per al primer acoblament, 165 mg de Fmoc-Asn(Trt)-OH (250 μ mol, 0,5 eq) i 470 μ l de DIEA (2,5 mmol, 5 eq) es dissolen en DCM (2 ml) i es mesclen amb 357 mg de resina 2-clororitol. La mescla s'agita amb suavitat a temperatura ambient durant 1 h. Passat aquest temps es desactiven les posicions lliures de la resina amb metanol (1,2 ml, 10 minuts), es filtra l'excés de reactius i es renta la resina amb DCM (3 ml, 3 x 2 minuts) i DMF (3 ml, 3 x 2 minuts). A continuació, es procedeix a la desprotecció del grup Fmoc de l'extrem N_{ter} amb una solució de piperidina al 20 % en DMF (3ml, 2 x 10 minuts) i es renta la resina amb DMF (3 ml, 3 x 2 minuts). Els següents acoblaments de Fmoc-Phe(CF₃)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Leu-OH es realitzen amb 12 eq de DIEA, 12 eq d'HOBt, 4 eq de PyBOP i 4 eq de l'aminoàcid corresponent. La desprotecció del grup Fmoc es realitza amb l'addició de piperidina al 20 % en DMF (2 x 5 ml) durant 10 minuts a 25 °C després de cada acoblament. Per a l'escissió del pèptid de la resina s'addiciona una mescla de TFA al 2 % en DCM (2 min, 3 x 5 ml). Posteriorment, es recull la solució i es renta bé la resina amb DCM (3 x 5 ml). Solució i rentats s'ajunten i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda per obtenir 85 mg de H-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe(*p*-CF₃)-Asn-OH pur (HPLC, > 99 %). Rendiment = 49 %. HPLC-ESI RT = 6,9 min. (M+H⁺ m/z 704,0; m/z esperada de C₃₁H₄₆F₃N₇O₈ + H⁺ =702,8).

Síntesi de CH₃CO-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe-Asn-NH₂

La síntesi de CH₃CO-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe(CF₃)-Asn-NH₂ es fa per síntesi en fase sòlida sobre resina Rink Amide ($f_{inicial} = 0,6$ mmol/g) a una escala de 400 μ mol. Inicialment, es renta la resina amb DCM (3 ml, 3 x 2 minuts), DMF (3 ml, 3 x 2 minuts) i DCM (3 ml, 3 x 2 minuts). Els successius acoblaments de Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Phe(CF₃)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Leu-OH es realitzen amb 8 eq de DIEA, 4 eq de TBTU i 4 eq de l'aminoàcid corresponent. La desprotecció del grup Fmoc es realitza amb l'addició de piperidina al 20 % en DMF (2 x 5 ml) durant 10 minuts a 25 °C després de cada acoblament. Un cop incorporats tots els aminoàcids, es procedeix a l'acetilació de l'extrem N_{ter} amb 0,56 ml d'anhidre acètic (6 mmol) i 1,05 ml de DIEA (6 mmol) en una reacció de 30 minuts a 25 °C. Per a l'escissió del pèptid de la resina s'addiciona una mescla de TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5) i s'agita la solució 1 h a 25 °C. Posteriorment, es recull la solució i es renta bé la resina amb DCM (3 x 5 ml). Solució i rentats s'ajunten i s'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda per obtenir 155 mg de CH₃CO-Leu-Gly-Ala-Leu-Phe(CF₃)-Asn-NH₂ pur (HPLC, > 99 %). Rendiment = 57 %. HPLC-ESI RT = 8,2 min. (M+H⁺ m/z 675,3; m/z esperada de C₃₂H₅₀N₈O₈ + H⁺ =675,8).

7.1.5 Síntesi d'etiquetes de revelat

Síntesi de l'etiqueta trifuncional TriN₃

La síntesi de l'etiqueta TriN₃ [385, 386, 387, 388, 389] es realitza en una resina amida de Sieber (Novabiochem) utilitzant l'estratègia de síntesi en fase sòlida Fmoc/tBu. 80 mg de resina Amida de Sieber (0,035 mmol, 1 eq.) protegida amb Fmoc es desprotegeix amb una solució 20 % piperidina en NMP (2 x 3 ml, 10 minuts) i es renta amb NMP (3 x 4 ml) i DCM (3 x 4 ml) i NMP (3 x 4 ml) per inflar-la i eliminar l'excés de reactius. A continuació, 104 mg de Fmoc-Lys(Biotina)-OH (Novabiochem, 0,175 mmol, 5 eq.) s'acoblen a la resina (2,5 h) utilitzant 65 mg d'HBTU (0,175 mmol, 5eq.), 27 mg d'HOBt (0,175 mmol) i 49 µl de DIEA (0,28 mmol, 8 eq.) en NMP (0,6 ml). La resina es renta i es desprotegeix, i s'acoblen 69 mg de Fmoc-Lys(N₃)-OH (0,175 mmol, 5 eq.) tal com s'ha fet per al primer aminoàcid. Després dels rentats i la desprotecció d'aquest segon aminoàcid, la rodamina s'uneix a l'amina lliure mitjançant un acoblament de 12 h de 25 mg de 5-(6)-carboxitetrametilrodamina succinimidil éster (0,047 mmol, 1,35 eq.) amb 30 µl de trietilamina (0,21 mmol, 6eq.) en NMP (1 ml). La resina es renta exhaustivament amb NMP, DCM, metanol i una mescla DCM i metanol (1:1) fins que els rentats siguin incoloros. L'escissió del compost de la resina es realitza amb 2 % de TFA en DCM (5 x 3 ml, 10 minuts). Finalment, s'afegeix toluè a la solució (20 ml) i s'evaporen els dissolvents a pressió reduïda per obtenir un sòlid de color vermell fosc (6,2 mg, rendiment = 19 %, puresa = 85 %). MALDI-TOF $m/z = 938,41$ (m/z esperada de C₄₇H₅₉N₁₁O₈S + H⁺ = 938,43). HPLC RT = 8,25 minuts.

Síntesi de l'azida trifluorometanosulfònica 2,6 g de NaN₃ (40 mmol) es dissolen en 5,2 ml d'H₂O i s'afegeixen a 6,5 ml de DCM a 0 °C [386]. A continuació, s'afegeixen 2,25 g d'àcid trifluorometanosulfònic anhidre (8 mmol) i la mescla es deixa reaccionar en agitació constant durant 2 h a 0 °C. Passat aquest període de temps, es realitzen extraccions amb DCM (3 x 10 ml) i de la fase orgànica se n'elimina parcialment el dissolvent a pressió reduïda (Volum final = ~ 6,5 ml . ATENCIÓ: L'azida trifluorometanosulfònica és explosiva quan se seca de manera que cal anar amb compte de no eliminar tot el dissolvent.

Síntesi de Fmoc-Lys(N₃)-OH 737 mg de Fmoc-Lys-OH (2 mmol) es resuspenen en 6,5 ml d'H₂O en constant agitació. A aquesta resuspensió s'afegeixen 2,7 mg de ZnCl₂, 843 µl de trietilamina (6 mmol), i 21 ml de metanol gota a gota. A continuació, una solució de trifluorometanesulfonyl azide en DCM (6,5 ml) preparada al moment s'afegeix a la reacció, i la mescla es deixa evolucionar durant 1 h i 20 minuts. Els dissolvents s'evaporen a

pressió reduïda i el cru de reacció es purifica en una columna de silica amb un gradient de DCM i metanol en proporcions de 1:0 a 95:5 per obtenir 440 mg de Fmoc-Lys(N₃)-OH pura en forma d'oli grogós (rendiment = 55 %). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ = 7,77 ppm (d, 2H), δ = 7,59 ppm (m, 2H), δ = 7,40 ppm (t, 2H), δ = 7,31 ppm (t, 2H), δ = 5,32 ppm (d, 1H), δ = 4,45 (d, 2H), δ = 4,53 ppm (m, 1H), δ = 4,22 ppm (m, 1H), δ = 3,27 ppm (t, 2H), δ = 1,91 ppm (m, 1H), δ = 1,74 ppm (m, 1H), δ = 1,62 ppm (m, 2H), δ = 1,48 ppm (m, 2H). MALDI-TOF *m/z* = 417,12 (*m/z* esperada de C₂₁H₂₂N₄O₄+ Na⁺ = 417,15).

7.2 Assajos d'activitat, inhibició i detecció de hr-POP

7.2.1 Assajos d'inhibició amb inhibidors lliures i inhibidors immobilitzats en suport sòlid

3 μl de hrPOP pura (25 μg/ml) o 15 μl d'extracte de cervell (3 mg/ml) es barregen amb 6 μl d'inhibidor lliure (1 nM – 500 μM) i s'ajusta el volum amb tampó fosfat 100 mM, pH 8,0 a 150 μl. Les mostres s'incuben 15 minuts a 37 °C i, a continuació, s'afegeix 10 μl del substrat Z-Gly-Pro-AMC (3 mM). L'assaig s'incuba 1 h a 37 °C i s'atura amb 150 μl d'acetat de sodi 1M, pH 4,0. La lectura de l'activitat es realitza en un fluorímetre de plaques amb λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 485 nm. Es realitza un control positiu d'activitat amb el dissolvent dels inhibidors (acetonitril) i un control negatiu sense POP. El càlcul de la IC₅₀ s'ha fet amb un ajust sigmoïdal de tipus dosi-resposta amb l'ajut del programari estadístic *GraphPad*.

En els assajos amb inhibidors immobilitzats les mostres de hrPOP i extracte de cervell es barregen amb 6,25 nmols d'inhibidor immobilitzat en partícules magnètiques o resina PEGA. En aquests assajos, es treballa amb les mateixes concentracions finals de hrPOP, extracte de cervell i substrat, però amb un volum final de 600 μl.

7.2.2 Immobilització d'inhibidors en suport sòlid

Immobilització d'inhibidors en partícules magnètiques 100 μl de partícules magnètiques Dynabeads M-270 Carboxylic Acid per mostra es renten amb NaOH_(aq) 0,01 M (2 x 10 min) i amb H₂O (3 x 10 min). A continuació, s'afegeixen 50 μl d'una solució 50 mg/ml d'hidroclorur de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) en tampó MES 25 mM, pH 5 i 50 μl d'una solució 50 mg/ml de N-hidroxisuccinimida (NHS) en tampó MES 25 mM, pH 5, i la mescla es deixa en agitació durant 30 minuts a 25

°C. Passat aquest temps, s'elimina el sobrenedant amb l'ajuda d'un imant i les partícules magnètiques es renten amb tampó MES 25 mM, pH 5 (2 x 5 min). S'addicionen 50 μ l de tampó MES 50 mM, pH 5 i 50 μ l d'una solució 125 μ M de l'inhibidor lliure a immobilitzar dissolt en una solució aquosa amb la mínima quantitat d'acetonitril necessària per a la seva solubilització. La reacció d'immobilització es deixa progressar 2 h a 25 °C, es renta amb tampó MES 25 mM, pH 5 (2 x 5 min) i s'afegeix una solució 0,05 M d'etanolamina en PBS pH 8 per desactivar tots els grups funcionals activats que no han reaccionat (60 min, 25 °C). Finalment, les partícules magnètiques es renten amb PBST (3 x 5 min) i després d'un tractament amb una solució de BSA al 1 % en PBST (60 min, 25 °C) les partícules estan a punt per a ser utilitzades.

Immobilització d'inhibidors en resina PEGA 300 mg (60 μ mol) de resina PEGA (funcionalització 0,2 mmol/g) es renten amb metanol (10 x 5 ml) i DCM (10 x 5 ml) i es tracten amb una mescla TFA:DCM (1:1) durant 15 minuts a 25 °C. A continuació, la resina es renta amb DCM (10 x 5 ml) i DMF (10 x 5 ml) i s'acobla un espaiador de tipus anhídric succínic (4,5 eq) amb DIEA (9 eq) durant 1 h a 25 °C en agitació suau. Passat aquest temps es renta la resina amb DMF (10 x 5 ml) i DCM (10 x 5 ml) i s'acondiciona per a poder treballar en medi aquós mitjançant rentats amb mescles DMF:H₂O (7:3) (10 x 5 ml), DMF:H₂O (1:1) (10 x 5 ml), DMF:H₂O (3:7) (10 x 5 ml) i H₂O (10 x 5 ml). La immobilització d'inhibidors sobre aquesta resina es realitza igual que la immobilització d'inhibidors en partícules magnètiques però amb la particularitat que els 300 mg (60 μ mol) de resina inicials es resuspenen en 3 ml d'aigua dels quals s'utilitzen 25 μ l (500 nmol) per a cada mostra. S'han utilitzat filtres de 0,45 μ m de diàmetre de porus (GHP Nanosep MF, Pall) per al filtrat de la resina.

7.2.3 Aïllament de hrPOP per immobilització en partícules magnètiques i resina PEGA amb inhibidor ancorat

125 μ g de hrPOP (100 μ l) s'addicionen a una mostra de partícules magnètiques o de resina PEGA amb inhibidor ancorat (veure l'apartat *Immobilització d'inhibidors en suport sòlid*). La mescla es deixa en incubació durant 1 h a 25 °C i, passat aquest temps, s'elimina el sobrenedant, es renta el suport sòlid amb PBST (3 x 10 min) i PBS (3 x 5 min) i es procedeix a l'elució de la proteïna immobilitzada. L'elució per a l'anàlisi amb tècniques d'immunodetecció es realitza amb l'addició de S17092 (300 μ M, 1 h a 25 °C) o d'àcid cítric (0,1 M, pH 3, 16 h a 25 °C); aquest últim només s'utilitza en el cas de les partícules magnètiques. En canvi, l'elució per a l'anàlisi per espectrometria de masses es realitza mitjançant un protocol estàndard de digestió trípica aplicat directament sobre el suport sòlid.

7.2.4 Assajos de marcatge directe de la proteïna prolil oligopeptidasa amb l'inhibidor biotinilat

10 μ l de l'inhibidor biotinilat Biotina-Met-Ahx₃-Arg-Ahx₂-Pro-Pro-H (0,3 μ M, H₂O:ACN) o 10 μ l aigua (control) s'afegeixen a 40 μ l de hrPOP (500 μ g/ml) o 40 μ l d'extracte de cervell (3,25 mg/ml). La mescla es deixa en agitació 1 h a 25 °C i passat aquest temps s'analitza per electroforesi desnaturant i transferència de Western amb l'anticòs α -POP i Streptavidin-POD (Roche).

Per eliminar les proteïnes de l'extracte que reaccionen inespecíficament amb l'estreptavidina, 1 ml d'extracte de cervell (3,25 mg/ml) o hrPOP pura (500 μ g/ml) s'ha incubat (30 min, 25 °C) en una columna amb estreptavidina immobilitzada (AffinityPack Immobilized Columns 1 ml, Pierce) equilibrada amb PBS o PBS + 0,1% SDS, segons el cas. La mostra s'ha eluït amb 1 ml de PBS o PBS + 0,1% SDS i 40 μ l de la mostra eluïda s'utilitzen per a l'assaig de marcatge directe amb l'inhibidor biotinilat.

7.2.5 Assajos de marcatge de la proteïna prolil oligopeptidasa i aïllament del complex proteïna – inhibidor biotinilat amb estreptavidina immobilitzada

Segons les especificacions de cada experiment, diferents quantitats de hrPOP pura i inhibidor biotinilat Biotina-Met-Ahx₃-Arg-Ahx₂-Pro-Pro-H es barregen i es mantenen en agitació durant 1 h a 25 °C. Passat aquest temps, les mostres es bullen (5 min, 95 °C) en presència de SDS a la concentració especificada en cada cas i s'addicionen a un lot de partícules magnètiques recobertes d'estreptavidina (Dynabeads MyOne Streptavidin, Invitrogen). La immobilització del complex proteïna – inhibidor biotinilat en les partícules magnètiques es deixa evolucionar durant 1 h a 25 °C. Finalment, s'elimina el sobrenedant i les partícules magnètiques es renten amb PBST (3 x 10 min) i PBS (3 x 10 min). S'afegeix TM 2X i es bullen les mostres (5 min, 95 °C) per desnaturar les proteïnes i trencar la interacció estreptavidina – biotina. Les proteïnes immobilitzades s'analitzen per electroforesi desnaturant i transferència de Western amb l'anticòs α -POP.

7.3 Anàlisi del proteoma per marcatge directe i gels de fluorescència

7.3.1 Homogenització de teixits

5 cervells i 40 pituitàries de ratolins mascles de 8 setmanes BalbC (Institut de Reserca Biomèdica) o Swiss Webster mice (*The Scripps Research Institute*) se sotmeten a un cicle de congelació i descongelació i es trossegen amb l'ajuda d'un bisturí. A continuació, s'addicionen 8 ml de tampó PBS i el teixit s'homogenitza amb un èmbol de vidre (Tight Douncer Homogenizer, Wheaton). Finalment, l'homogenat se centrifuga a 2.000 rpm (5 min a 4 °C) i a 100.000 g (1 h a 4 °C). La valoració de proteïnes es realitza amb el mètode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

7.3.2 Assajos d'inhibició amb gels fluorescents

A 20 ng de hrPOP s'afegeix Z-Pro-Pro-H (5 μ M, 25 μ M, 100 μ M, concentració final) o sonda (5 μ M, 25 μ M, 100 μ M, concentració final) o DMSO (control) i s'ajusta el volum amb tampó PBS fins a un volum total de 49 μ l. A continuació, s'afegeix 1 μ M de FP-rodamina, s'agiten les mostres, i s'incuben a 25 °C durant 1 hora. Passat aquest temps, s'afegeix 50 μ l de Tampó de mostra 2X, s'escalfen les mostres 5 minuts a 95 °C i es carreguen 10 μ l de mostra en gels de poliacrilamida al 10 % (10 x 10 cm, 0,75 mm, MiniProtean II, BioRad) per dur a terme l'electroforesi desnaturalitzant (120 V, 1 h). La visualització dels gels es realitza en un escàner de fluorescència (Typhoon 8600, GE Healthcare) amb una λ_{ex} =532 nm i una λ_{em} =580 nm.

7.3.3 Marcatge del proteoma per a l'anàlisi per electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida

A 49 μ l d'homogenat de cervell (1 mg/ml, PBS) o glàndula pituitària (0,3 - 0,5 mg/ml, PBS) s'afegeix 1 μ l d'una sonda de tipus 1-aminoalcanofosfonat amb un triple enllaç a C_t (50 μ M - 5 mM, DMSO). La mescla s'agita i es deixa reaccionar 1 h a 25 °C. S'afegeix 1 μ l de l'etiqueta fluorescent TriN₃ (5 mM, DMSO), s'agita i a continuació, s'afegeix 1 μ l de tris(2-carboxietil)-fosfina (50 mM, H₂O) preparat recentment i 3 μ l de tris(triazolil)amina (1,7 mM, DMSO:tert-butanol 1:4). La mescla s'agita i s'afegeix 1 μ l de CuSO₄ (50 mM, H₂O) que catalitza la reacció de cicloaddició [2+3] de Huisgen. Les reaccions s'agiten i s'incuben a 25 °C durant 1 - 1,5 h. Passat aquest temps, s'afegeix 50 μ l de Tampó de mostra 2X, s'escalfen les mostres 5 minuts a 95 °C i es carreguen 30 - 50 μ l de mostra en gels de poliacrilamida al 10 % (20 x 20 cm, 1,5 mm, Dual Gel P10DS-1 Emperor Penguin, Owl Scientific)

per dur a terme l'electroforesi desnaturalitzant (250 V, 2,5 h) en un sistema refrigerat. La visualització dels gels es realitza en un escàner de fluorescència (Typhoon 8600, GE Healthcare) amb una λ_{ex} =532 nm i una λ_{em} =580 nm.

En el cas d'utilitzar sondes amb una etiqueta ja incorporada, com el fluorofosfonat de rodamina, no cal realitzar l'etapa de la reacció de cicloaddició de Huisgen. D'aquesta manera, a 49 μ l d'homogenat de cervell (1 mg/ml, PBS) o glàndula pituitària (0,3 - 0,5 mg/ml, PBS) s'afegeix 1 μ l de fluorofosfonat de rodamina (50 μ M, DMSO). La mescla s'agita i es deixa reaccionar 1 h a 25 °C i directament s'afegeix 50 μ l de Tampó de mostra 2X per a l'anàlisi per electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida.

7.3.4 Escissió de bandes del gel i digestió trípica per a l'anàlisi per espectrometria de masses

Es retalla la banda del gel de poliacrilamida d'interès i es fragmenta en trossos d'1 mm³ que es submergeixen en 200 μ l d'una mescla metanol:H₂O:àcid acètic (10:10:1) (16 h, 25 °C). Passat aquest temps, s'elimina el dissolvent i es repeteix la incubació anterior dels fragments de poliacrilamida amb 200 μ l addicionals de la mateixa solució (4 h, 25 °C). A continuació, s'elimina el dissolvent romanent de l'etapa anterior i els trossos de poliacrilamida es deshidraten amb 200 μ l d'acetonitril (5 minuts, 25 °C). S'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda i es redueix la mostra amb 30 μ l d'una solució aquosa amb DTT 10 mM i hidrogen carbonat d'amoni 100 mM (30 minuts, 25 °C). A continuació, s'elimina el dissolvent i es realitza un tractament d'alquilació a les fosques amb 30 μ l d'una solució aquosa amb iodoacetamida 100 mM i hidrogen carbonat d'amoni 100 mM (30 minuts, 25 °C). Finalitzades les etapes de reducció i alquilació, s'elimina el dissolvent i es fa un rentat amb 200 μ l d'acetonitril (5 minuts, 25 °C), seguit d'una rehidratació amb 200 μ l d'una solució aquosa d'hidrogen carbonat d'amoni 100 mM (10 minuts, 25 °C). Es repeteixen els dos passos anteriors per completar el rentat dels reactius i l'intercanvi de solucions tampó. S'elimina el dissolvent per evaporació a pressió reduïda i la mostra es refreda a 0 °C per afegir-hi 30 μ l d'una solució aquosa d'hidrogen carbonat d'amoni 50 mM i tripsina (20 ng/ μ l, *Sequence Grade Trypsin*, Promega). Es deixa rehidratar els fragments de poliacrilamida mantenint les mostres en fred (10 minuts, 0 °C) i es procedeix a la digestió trípica (16 h, 37 °C). Posteriorment, els pèptids digerits es recuperen amb una extracció amb 30 μ l d'una solució aquosa d'hidrogen carbonat d'amoni 50 mM (10 minuts, 25 °C), seguida de dues extraccions amb 30 μ l d'una solució Acetonitril:H₂O:Àcid fòrmic (10:10:1) (2 x 10 minuts, 25 °C). Finalment, es redueix el volum de la mostra per evaporació a pressió reduïda fins a uns 20 μ l i s'afegeix un 5 % d'àcid fòrmic. Les mostres s'analitzen per espectrometria de masses LC-MS/MS.

7.4 Anàlisi del proteoma per espectrometria de masses

7.4.1 Experiments de 2D LC-MS/MS (MudPIT)

Preparació de mostres per a MudPIT

Etiquetat del proteoma Inicialment, per a la preparació de mostres per a MudPIT, s'etiqueten 500 μl del proteoma d'interès (2 mg/ml) amb una sonda basada en activitat (10 μM –100 μM) durant 1 h a 25 °C. A continuació, es realitza una columna d'exclusió molecular (Disposable PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare) per eliminar la sonda en excés i s'incorpora una etiqueta biotinilada (TriN_3 , 100 μM) mitjançant una reacció de cicloaddició [2+3] de Huisgen equivalent a la utilitzada per el marcatge fluorescent (tris(2-carboxietil)fosfina 1mM, tris(triazolil)amina 100 μM , CuSO_4 1 mM). Les mostres es deixen reaccionar en agitació durant 1–1,5 h a 25 °C.

Eliminació dels reactius en excés Passat aquest temps, s'eliminen els reactius en excés mitjançant una centrifugació (4 min, 25 °C, 2000 g) i un parell de rentats amb metanol fred que consisteixen en l'addició de 500 μl de metanol fred a cada mostra, una sonicació de 4–5 segons (0,5 Hz, 50 % intensitat) i una centrifugació (4 min, 4 °C, 2000 g) seguida de l'eliminació del sobrenedant. Un cop realitzats els rentats s'addiciona 1 ml de SDS al 1,2 % en tampó PBS, es sonica la mostra i s'escalfa durant 5 minuts a 95 °C.

Enriquiment amb avidina immobilitzada Les mostres es dilueixen amb 5 ml de PBS i s'hi afegeixen 50 μl d'avidina immobilitzada (Avidin–Agarose from egg white, Sigma-Aldrich) prèviament equilibrada amb tampó PBS (3 x 1 min). La mescla s'agita per moviment orbital durant 1,5 h a 25 °C. Passat aquest temps, es fan rentats amb SDS al 0,2 % en tampó PBS (1 x 3 min, 10 ml), tampó PBS (3 x 1 min, 10 ml) i H_2O (3 x 1 min, 10 ml). L'eliminació del sobrenedant en cada rentat es fa per centrifugació durant 3 minuts a 1400 g (4 °C).

Desnaturalització, reducció i alquilació Es transfereixen les boletes d'agarosa a tubs de 1,5 ml i s'addicionen 500 μl d'urea 6 M en PBS i 25 μl de tris(2-carboxyethyl)phosphine 200 mM (30 min, 25 °C). A continuació, s'afegeixen 25 μl de iodoacetamida 400 mM en H_2O (GE Healthcare), s'agiten les mostres a la foscor (30 min, 25 °C) i, finalment, es renten amb PBS (3 x 1 min, 1 ml).

Tripsinització Les boletes d'agarosa amb avidina immobilitzada es ressuspenen en 200 μl d'urea 2 M en PBS i es digereixen amb tripsina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en agitació durant 16 h a 37 °C. Passat aquest temps les boletes es renten amb PBS (2 x 3 min, 50 μl) recollint el sobrenedant en un tub net. El sobrenedant, que conté els pèptids a analitzar, s'acidifica amb àcid fòrmic a una concentració final del 15 % i es congelen a -80 °C a l'espera de ser analitzades per espectrometria de masses.

Anàlisi de les mostres tripsinitzades per 2D LC-MS/MS (MudPIT)

Els experiments de 2D LC-MS/MS (MudPIT) es realitzen en un espectròmetre de masses LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific) amb una font de ionització de tipus nanoESI. Les condicions d'espectrometria de masses utilitzades són: Voltatge del Capilar: 25 V; Temperatura del capilar: 200 °C; Voltatge de les lents: 90V; i Voltatge de l'espai iònic: 2 kV.

Les mostres es carreguen a una precolumna NanoEase (C_{18} , Symmetry 300, 5 μm ; Waters) a un flux de 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ mitjançant una bomba de càrrega (Harvard Apparatus, USA) i una xeringa de 250 μl (Hamilton). A continuació, les mostres es resolen en una columna cromatogràfica bifàsica PicoFrit (SCX/PP2 300, 5 μm , 75 μm x 10 cm; New Objective) per aplicació consecutiva dels mètodes cromatogràfics 1–5 amb l'ajuda d'una bomba quaternària (Model Surveyor MS, Thermo Electron Corporation).

Les mostres s'introdueixen a l'espectròmetre de masses per acoblament en línia de la cromatografia nanoLC i s'analitzen amb un assaig MS de tipus FTMS (res=100000, m/z 450-2000) i un posterior anàlisi MS/MS de tipus ITMS dels 10 ions més intensos (CID; energia de col·lisió: 35 V).

Eluents: Solució A: 95% d' H_2O , 5% d'acetonitril i 0,1% d'àcid fòrmic. Solució B: 20% d' H_2O , 80% d'acetonitril i 0.1% d'àcid fòrmic. Solució C: 95% d' H_2O , 5% d'acetonitril, 0,1% d'àcid fòrmic i 500 mM d'acetat d'amoni.

Mètode 1 (0 % de sals)

Temps	% Sol. A	% Sol. B	% Sol. C	Flux ($\mu\text{l}/\text{min}$)
0,00	100,0	0,0	0,0	100,0
5,00	100,0	0,0	0,0	100,0
60,00	55,0	45,0	0,0	100,0
70,00	0,0	100,0	0,0	100,0
80,00	0,0	100,0	0,0	100,0
90,00	0,0	100,0	0,0	100,0

Mètode 2 (25 % de sals)

Temps	% Sol. A	% Sol. B	% Sol. C	Flux ($\mu\text{l}/\text{min}$)
0,00	100,0	0,0	0,0	100,0
3,00	100,0	0,0	0,0	100,0
3,10	70,0	5,0	25,0	100,0
5,00	70,0	5,0	25,0	100,0
5,10	95,0	5,0	0,0	100,0
15,00	85,0	15,0	0,0	100,0
60,00	75,0	25,0	0,0	100,0
112,00	45,0	55,0	0,0	100,0

Mètode 3 (50 % de sals)

Temps	% Sol. A	% Sol. B	% Sol. C	Flux ($\mu\text{l}/\text{min}$)
0,00	100,0	0,0	0,0	100,0
3,00	100,0	0,0	0,0	100,0
3,10	45,0	5,0	50,0	100,0
5,00	45,0	5,0	50,0	100,0
5,10	95,0	5,0	0,0	100,0
15,00	85,0	15,0	0,0	100,0
60,00	75,0	25,0	0,0	100,0
112,00	45,0	55,0	0,0	100,0

Mètode 4 (80 % de sals)

Temps	% Sol. A	% Sol. B	% Sol. C	Flux ($\mu\text{l}/\text{min}$)
0,00	100,0	0,0	0,0	100,0
3,00	100,0	0,0	0,0	100,0
3,10	15,0	5,0	80,0	100,0
5,00	15,0	5,0	80,0	100,0
5,10	95,0	5,0	0,0	100,0
15,00	85,0	15,0	0,0	100,0
60,00	75,0	25,0	0,0	100,0
112,00	45,0	55,0	0,0	100,0

Mètode 5 (100 % de sals)

Temps	% Sol. A	% Sol. B	% Sol. C	Flux ($\mu\text{l}/\text{min}$)
0,00	100,0	0,0	0,0	100,0
2,00	100,0	0,0	0,0	100,0
2,10	0,0	0,0	100,0	100,0
5,00	0,0	0,0	100,0	100,0
5,10	93,0	7,0	0,0	100,0
15,00	85,0	15,0	0,0	100,0
60,00	70,0	30,0	0,0	100,0
112,00	35,0	65,0	0,0	100,0

Anàlisi de les dades obtingudes per 2D LC-MS/MS (MudPIT)

Les dades s'obtenen amb el programari Xcalibur (v2.07, Thermo Finnigan) i la cerca a les bases de dades es realitza amb el programari Bioworks (v3.3.1, Thermo Finnigan) que inclou l'algorisme de cerca SEQUEST (v28.13). Per a les anàlisis de les dades de MudPIT s'utilitza la base de dades *International Protein Index* (v3.40, EMBL-EBI) digerida *in silico* amb tripsina i unida a una versió reordenada a l'atzar. El percentatge de falsos positius es manté per sota de l'1 % amb els paràmetres $\Delta C_n = 0,08$ i $X_{\text{corr}} > 1,8$ per a ions de càrrega +1, $X_{\text{corr}} > 2,5$ per a ions de càrrega +2 i $X_{\text{corr}} > 3,5$ per a ions de càrrega +3 utilitzant el programari DTASelect (v1.9, *The Scripps Research Institute* [390]).

L'anàlisi dels resultats per validació estadística es realitza amb el programari PeptideProphet i ProteinProphet (Seattle Proteome Center [317]) mantenint, en aquest cas, el percentatge de falsos positius per sota de l'1 %.

7.4.2 Experiments de LC-MS/MS

Les mostres a analitzar per LC-MS/MS es carreguen a una precolumna NanoEase (Symmetry 300, C_{18} , 5 μm , Waters) amb l'ajuda d'un injector automàtic (Autosampler Model Micro AS, Thermo Electron Corporation) i es resolen en una columna cromatogràfica PepMap (C_{18} 100, 3 μm , 75 $\mu\text{m} \times 15$ cm, Dionex) amb un gradient del 15% al 70% de Solució B en 96 minuts (veure mètode adjunt). Solució A: 100 % H_2O i 0,1% d'àcid fòrmic. Solució B: Acetonitril i 0,1% àcid fòrmic. Els aparells, les condicions d'ionització i fragmentació i l'anàlisi de dades es realitzen de forma equivalent als utilitzats per a la tècnica 2D LC-MS/MS (MudPIT).

Mètode LC-MS/MS				
Temps	% Sol. A	% Sol. B	% Sol. C	Flux ($\mu\text{l}/\text{min}$)
0,00	100,0	0,0	0,0	15,0
10,00	100,0	0,0	0,0	15,0
20,00	85,0	15,0	0,0	140,0
116,00	30,0	70,0	0,0	140,0
120,00	0,0	100,0	0,0	140,0
140,00	0,0	100,0	0,0	140,0
141,00	100,0	0,0	0,0	140,0
155,00	100,0	0,0	0,0	140,0
165,00	100,0	0,0	0,0	15,0

7.5 Clonació, expressió i purificació de la proteïna hrPOP i del precursor N de la carboxilesterasa de fetge de ratolí

7.5.1 Clonació del gen *es1* que codifica el precursor N de la carboxilesterasa de fetge de ratolí

Reacció en cadena de la polimerasa

Per a l'amplificació de l'ADN complementari del gen *es1* s'ha emprat la reacció en cadena de la polimerasa amb l'encebador 5' LOC38-FW ($T_m = 62,6$ °C) 5'-GGG AAT TCC ATA TGT GGC TCC ATG CTC TGG TCT GGG-3' i l'encebador 3' LOC38-RV ($T_m = 63,1$ °C) 5'-CGG AAT TCT CAT CAT TTG TGT TCT CTG TGC TCA GTA GGG TCT G-3'. Com a material de partida s'ha emprat el clon 10324326 (ATCC) i una mescla comercial d'ADNc de glàndula pituïtària de ratolí (Zyagen). S'utilitzen les següents condicions de PCR: 5 min a 94 °C, 35 cicles de 30 s a 94 °C, 1 min a 55 °C i 4 min a 72 °C; i 10 min a 72 °C.

Reactius per a la PCR

dNTP 10 mM (Roche)	5 μl
encebador 3'	5 μl
encebador 5'	5 μl
Tampó 10X (Roche)	5 μl
ADN polimerasa <i>Taq</i> (5 U/ μl , Roche)	1 μl

Purificació i extracció de plasmidis i productes amplificats

Els fragments amplificats per la reacció en cadena de la polimerasa o resolts en gel d'agarosa es purifiquen amb el conjunt d'eines comercials Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), mentre que l'extracció i purificació de plasmidis a partir de cultius cel·lulars d'*E. coli* (1,5–3 ml) es realitza amb les eines comercials GFX Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare).

Digestió de nucleòtids mitjançant enzims de restricció

La digestió dels fragments amplificats i del plasmidi pET-28A es realitza simultàniament amb els enzims de restricció *EcoRI* (30 U, Roche) i *NdeI* (20 U, Roche) en tampó H 10X (5 μ l, Roche) en un volum final de reacció de 50 μ l (2 h, 37 °C).

Reacció de lligació

Digerit el plasmidi pET-28A i el fragment d'interès amb els enzims de restricció *EcoRI* i *NdeI* es quantifiquen amb un gel d'agarosa per a la realització de la lligació. La lligació entre el fragment d'interès i el vector pET-28A es realitza amb DNA lligasa T4 (2 U, Roche) i tampó d'activitat T4 10X (3 μ l, Roche), en un volum final de reacció de 30 μ l. La quantitat d'insert i vector pot ser variable, però cal mantenir aproximadament la relació indicada per la equació 7.1. Si és necessari, es poden concentrar les mostres per eliminació del dissolvent a pressió reduïda. La reacció de lligació es duu a terme a 16 °C durant 16 h.

$$\frac{\text{Quantitat Vector}}{PM \text{ Vector}} \times 3 = \frac{\text{Quantitat Insert}}{PM \text{ Insert}} \quad (7.1)$$

Reacció de seqüenciació

La seqüenciació dels fragments d'interès es realitza amb les eines comercials *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

7.5.2 Clonació del gen que codifica la proteïna prolil oligopeptidasa humana

En el cas de la proteïna prolil oligopeptidasa humana s'ha treballat amb una construcció del plasmidi pETM10 amb el gen que codifica aquesta proteïna descrita anteriorment per Tarragó *et al.* [225] i disponible al laboratori.

7.5.3 Expressió de la proteïna hrPOP i del precursor N de la carboxilesterasa de fetge de ratolí

Preparació de cèl·lules *E. coli* BL21 (DE) competents

Una mostra de cèl·lules *E. coli* BL21 (DE) se sembra en una placa de Petri amb medi LB i es fan créixer les cèl·lules a 37 °C durant 16 h en posició invertida. A partir d'una colònia de la placa anterior, s'inocula medi LB (25 ml) i es deixa créixer durant 16 h a 37 °C en agitació (250 rpm). Posteriorment, s'inocula medi LB fresc (500 ml) amb el cultiu anterior (25 ml) i es deixa créixer a 37 °C en agitació (250 rpm) fins a assolir una DO ($\lambda = 595$ nm) de 0,4 UA. A continuació, es refreda el cultiu (30 min, 0 °C), se centrifuga (10 min, 4 °C, 4000 rpm, Rotor JA-10 Beckman Coulter) i s'elimina el sobrenedant per decantació. El sediment es resuspèn en 150 ml de Solució A, es manté a 0 °C durant 10 minuts i es torna a centrifugar (10 min, 4 °C, 5000 rpm, Rotor JA-10 Beckman Coulter). Finalment, s'elimina el sobrenedant per decantació, es resuspèn el sediment en 20 ml de Solució B i es fracciona en volums petits (200 μ l/mostra) i es congelen les cèl·lules en nitrogen líquid. Solució A: NaCH₃COO 30 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, RbCl 100 mM i glicerol al 15 %. Solució B: MOPS 1M, CaCl₂ 75 mM, RbCl 10 mM i glicerol al 15 %.

Transformació de cèl·lules *E. coli* BL21 (DE) competents

Entre 250 i 500 ng del plasmidi pET-28A o pETM10 amb el fragment d'interès insertat es barregen per agitació suau amb 200 μ l de cèl·lules *E. coli* BL21 (DE) competents. Després de 15 minuts a 0 °C, les mostres se sotmeten a un xoc tèrmic (45 segons, 42 °C) i es retornen a 0 °C durant 5 minuts. A continuació, s'afegeix 1 ml de medi LB a cada mostra i es deixen 1 h a 37 °C en agitació (250 rpm). Finalment, les mostres se sembren en plaques de Petri amb medi LB-Agar i l'antibiòtic corresponent i es fan créixer les cèl·lules a 37 °C durant 16 h en posició invertida.

En els casos en els quals es coexpressa el gen *es1* amb les xaperones GroEL i GroES, es realitza una cotransformació del plasmidi pET-28A amb el plasmidi pGro7 (plaques amb 20 μ g/ml de Cm) de *Chaperone Plasmid Set* (Takara) en cèl·lules *E. coli* Origami competents seguint un protocol de transformació equivalent.

Cultius i creixement bacterià

Els cultius de creixement bacterià per a l'expressió de proteïnes es realitzen amb 500 ml de medi LB o medi d'autoinducció esterilitzat, segons convingui, en erlenmeyers de 2 l. Els medis de cultiu es complementen amb els

antibiòtics necessaris per a cadascun dels vectors utilitzats: kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per als vectors pET-28A i pETM10, i cloramfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per al vector pGro7. Els cultius s'inoculen amb 10 ml d'un precultiu preparat el dia anterior i es fan créixer en agitació (220 rpm). En el cas de la POP, el creixement del cultiu es realitza en medi LB a 37 °C fins assolir una DO_{595} pròxima a 1,2 i, a continuació, s'indueix l'expressió amb IPTG (1 mM), mantenint el cultiu en agitació a 25 °C durant 16 h. En canvi, en el cas del gen *es1*, l'expressió es realitza tant en medi LB com en medi d'autoinducció amb incubacions de 16 a 48 h i temperatures que oscil·len entre els 16 i 37 °C segons el protocol (veure taula 6.1). En cas de ser necessària, la inducció de l'expressió del gen *es1* s'inicia per l'addició d'IPTG (1 mM), mentre que l'expressió dels gens *groES* i *groEL* s'inicia amb L-Arabinosa (1 mg/ml).

Els cultius bacterians en medis sòlids es realitzen en plaques de Petri amb medi LB-Agar i antibiòtics i s'inoculen amb 100–200 μl d'un cultiu anterior per sembra en escocès. Els bacteris inoculats en plaques de Petri es fan créixer a 37 °C durant 16 h en posició invertida.

Els precultius (10 ml) i els cultius per a l'obtenció de plasmidis (3 ml) es preparen amb medi LB complementat amb l'antibiòtic pertinent i s'inoculen a partir de colònies aïllades en plaques de Petri amb medi LB-Agar i antibiòtic.

7.5.4 Purificació de la proteïna hrPOP i del precursor N de la carboxilesterasa de fetge de ratolí

Obtenció de la fracció soluble de l'extracte bacterià

L'obtenció de la fracció soluble de l'extracte bacterià d'un cultiu d'expressió de proteïna recombinant es realitza per congelació i sonicació. Inicialment, se centrifuga el cultiu bacterià (15 min, 4.500 g, 4 °C), s'elimina el sobrenedant per decantació i es congela el sediment amb nitrogen líquid. A continuació, es resuspèn el sediment en 50 ml de solució de resuspensió (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM i imidazola 5 mM) i es soniquen les cèl·lules mantenint la mostra a 0 °C (Intensitat 50 %, polsos de 0,5 segons). Finalment, l'extracte se centrifuga (30 min, 40.000 g, 4 °C) i es recull el sobrenedant que, un cop filtrat (diàmetre = 0,22 μm), estarà a punt per ser purificat.

Purificació de proteïnes per cromatografia d'afinitat

La purificació de proteïnes per cromatografia d'afinitat es realitza en un aparell automàtic de FPLC (AKTA Explorer, GE Healthcare) amb columnes HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) de 1 ml per al precursor N de la

proteïna carboxilesterasa de fetge i 5 ml per a la prolil oligopeptidasa. Inicialment, la col·lumna cromatogràfica es renta amb aigua (25 ml), es carrega amb NiSO_4 50 mM (25 ml) i s'equilibra amb 25 ml de *solució de resuspensió* (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM i imidazola 5 mM). La mostra s'injecta automàticament a un flux de 1 ml/min, i un cop injectada, la columna es renta amb *solució de resuspensió* fins que l'absorbància ($\lambda = 280$ nm) retorna als nivells basals. A continuació, es renta la columna amb 25 ml de *solució de rentat* (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM i imidazola 50 mM) i s'elueix la proteïna d'interès amb la *solució d'elució* (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM i imidazola 500 mM). Per recuperar la columna per a futures purificacions cal rentar-la amb una solució d'EDTA 100 mM (25 ml), aigua (25 ml), i etanol al 20 % (25 ml). Finalment, s'eliminen les sals i la imidazola de l'extracte purificat mitjançant una columna d'exclusió molecular (PD-10, GE Healthcare) equilibrada amb Tris-HCl 50 mM pH 8,0 o PBS segons convingui. La proteïna eluïda es divideix en petits volums (100–200 μl) i es guarda congelada a -80 °C.

7.6 Assajos d'activitat

7.6.1 Assaig per a la detecció de l'activitat esterasa

L'activitat esterasa del producte recombinant purificat del gen *es1* s'ha determinat per conversió d'acetat de *p*-nitrofenil en *p*-nitrofenol. 1, 5 o 10 μl de proteïna recombinant purificada o d'extracte control (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PBS) es barregen amb 3 μl d'acetat de *p*-nitrofenil (125 mM, DMSO) i s'ajusta el volum amb tampó d'activitat i PBS a 150 μl . L'assaig es deixa 1 h a 37 °C a les fosques i s'atura amb 150 μl d'àcid acètic 0,2 M. La lectura de l'activitat es realitza en un espectrofotòmetre de plaques a $\lambda = 405$ nm. Els corresponents controls negatius s'han realitzat de forma equivalent substituint la proteïna recombinant per tampó PBS. Solució d'activitat: 0,5 % de Tritó X-100 i 0,5 % d'acetona en Tris-HCl 50 mM, pH 7,0.

7.6.2 Assaig per a la detecció de l'activitat proteasa

50 ng, 250 ng i 500 ng d'extracte recombinant purificat es barregen amb 3 μl de substrat (5 mM, DMSO) i tampó d'activitat A o B en un volum final de reacció de 150 μl . La reacció es duu a terme a 37 °C durant 1 o 5 h i s'atura amb 10 μl de HCl al 37 %. Tampó d'activitat A: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 0,5 % tritó X-100 i 0,5 % d'acetona. Tampó d'activitat B: Acetat de sodi 50 mM pH 5,5 i 5 mM CaCl_2 . Substrats utilitzats: Z-Ala-Ala-Leu-pNA (Bachem), Boc-Gly-Gly-Leu-pNA (Bachem), Boc-Gly-Gly-Leu-AMC (Bachem), $\text{CH}_3\text{CO-LGALFN-NH}_2$ i H-LGALF(*p*- CF_3)N-OH.

Les mostres amb els substrats Z-Ala-Ala-Leu-pNA i Boc-Gly-Gly-Leu-pNA s'analitzen per espectrofotometria ($\lambda = 405$ nm) mentre que el processament de Boc-Gly-Gly-Leu-AMC s'analitza per fluorescència ($\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 485$ nm) en un fluorímetre de plaques Bio-Tek FL600 (Bio-Tek Instruments). Els substrats $\text{CH}_3\text{CO-LGALFN-NH}_2$ i $\text{H-LGALF}(p\text{-CF}_3)\text{N-OH}$ es filtren i s'analitzen per HPLC ($\lambda = 220$ nm i 254 nm).

Els assajos de ^{19}F RMN es realitzen amb el substrat $\text{H-LGALF}(p\text{-CF}_3)\text{N-OH}$ de forma equivalent als assajos anteriors, mantenint les mateixes concentracions finals, però amb un volum final de reacció de 700 μl . El tampó d'activitat s'ha substituït per Tris-HCl 50 mM pH 8,0 $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$ (1:1). El processament del substrat es mesura per RMN de ^{19}F amb un espectròmetre Varian de 400 MHz.

7.7 Tècniques bàsiques de bioquímica i biologia molecular

7.7.1 Gels desnaturalitzants de poliacrilamida

Els gels desnaturalitzants de poliacrilamida s'elaboren segons el mètode descrit per Laemmli [391] amb percentatges d'acrilamida al gel separador entre el 7,5 % i el 15 %. Els gels de 20x20 cm^2 i de 1,5 mm de gruix s'han polimeritzat amb l'ajuda d'un aparell P10DS Emperor Penguin Dual Gel Vertical Electrophoresis System (Owl Scientific), mentre que els gels de 10 x 5 cm^2 i 1,5 mm de gruix s'han polimeritzat en un sistema *Mini Protean* (BioRad). Tampó d'electroforesi (1,92 M Glicina, 0,25 M Tris-HCl, 10% SDS, pH entre 8,3 i 8,8). Tampó de mostra 2X (125 mM Tris-HCl, 20 % glicerol, 4 % SDS, 0,04 % blau de bromofenol i 10 % β -mercaptoetanol). Solució A: Tampó del gel concentrador (0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,5). Solució B: Tampó del gel separador (1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8).

Gel concentrador

Acril.:Bisacril. (37,5:1)	0,5 ml
Solució A	1 ml
H_2O	2,25 ml
TEMED	6 μl
APS 15 % (p/V)	40 μl

Gel separador	15 %	12,5 %	10 %	7,5 %
Acril.:Bisacril. (37,5:1)	3,7 ml	3,1 ml	2,5 ml	1,9 ml
Solució B	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	3,7 ml	4,4 ml	5,00 ml	5,6 ml
TEMED	2,5 ml	2,5 ml	2,50 ml	2,5 ml
APS 15 % (p/V)	40 μ l	40 μ l	40 μ l	40 μ l

7.7.2 Transferència de Western

Transferència

Les proteïnes resoltes en gels de poliacrilamida es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa (0,45 μ m, Whatman) mitjançant un sistema de transferència de Western (Ecogen). La transferència es realitza a 300 mA, 60 minuts a temperatura ambient, en tampó de transferència (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol). Prèviament a la transferència, cal equilibrar el gel de poliacrilamida durant 15 minuts amb el tampó de transferència (25mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol).

Immunodetecció

La immunodetecció es realitza per incubació de la membrana amb els anticossos primari i secundari pertinents, seguida del revelat amb un substrat quimioluminiscent. La immunodetecció s'inicia amb el bloqueig de la membrana amb la solució de bloqueig (llet descremada al 5 % en PBST) durant 60 minuts. A continuació, es renta la membrana amb solució de rentat (PBST, 3 x 2 minuts) i s'incuba amb l'anticòs primari durant 60 minuts. Es torna a rentar la membrana (PBST, 3 x 10 minuts) i es procedeix a la incubació amb l'anticòs secundari durant 60 minuts. Finalment, la membrana, prèviament rentada (PBST, 3 x 10 minuts), es revela amb ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) (1 minut). La quimioluminiscència s'ha detectat amb films de radiografia Super RX (Fujifilm Corporation). Tot el procés té lloc a temperatura ambient.

En cas necessari, l'eliminació dels anticossos units a la membrana de nitrocel·lulosa es realitza amb un tractament de la membrana amb una solució de Tris-HCl 62,5 mM, pH 8,0 amb un 2 % de SDS i β -mercaptoetanol 100 mM (30 min, 70 °C), seguit de rentats exhaustius amb PBST (5 x 5 min) [392].

Anticossos primaris S'han utilitzat els anticossos policlonals de conill α -CPE/H (Abcam), dilució 1/1000; α -PC1/3 (Abcam), dilució 1/2000; i

α -POP, dilució 1/2000; així com una estreptavidina-POD (Roche), dilució 1/2000, per a la detecció de biotina.

Anticossos secundaris Segons l'origen de l'anticòs primari utilitzat en cada cas, s'han utilitzat els següents anticossos secundaris: i) anticòs policlonal d'ovella *anti-ratolí* unit a HRP (Amersham Bioscience), dilució 1/10.000, i ii) anticòs policlonal d'ase *anti-conill* unit a HRP (Amersham Bioscience), dilució 1/10.000.

7.7.3 Gels d'agarosa per a l'anàlisi d'ADN

Els plasmidis i els fragments d'ADN amplificats, s'analitzen en gels d'agarosa al 1 %, preparats a partir de 0,5 g d'agarosa en 10 ml de TAE i 2 μ l de bromur d'etidi (10 mg/ml). Les electroforesi es realitzen en un aparell d'electroforesi horitzontal (Ecogen) a un potencial constant de 80 V durant 30 minuts i els gels es visualitzen en un transil·luminador de llum ultraviolada ($\lambda = 254$ nm). S'utilitza el marcador de pes molecular DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche).

7.7.4 Solucions tampó

Tampó PBS 1X

NaPO ₄ ·H ₂ O	1,6 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	8,4 mM
NaCl	0,15 M

Ajustar pH a 7,4

Tampó PBST 1X

NaPO ₄ ·H ₂ O	1,6 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	8,4 mM
NaCl	0,15 M
Tween	0,1%

Ajustar pH a 7,4

Tampó TAE 1X

Tris-Acetat	0,04 M
EDTA 0,5M pH 8	2 mM

7.7.5 Medis de cultiu**Medi LB**

Triptona	10,0 g/l
Extracte de llevat	5,0 g/l
NaCl	5.0 g/l

Medi LB amb agar

Triptona	10,0 g/l
Extracte de llevat	5,0 g/l
NaCl	5.0 g/l
Agar	1.5 %

Medi d'autoinducció

Triptona	5 g
Extracte de llevat	2,5 g
Aigua	475 ml
(Esterilitzar per calor)	

MgSO ₄ 1M	1 ml
Solució Q	1 ml
Solució 5052 50X	10 ml
Solució M 50X	10 ml
Antibiòtics	

Solució 5052 50X

Glicerol	25 % (p/V)
α -Glucosa	2,5 % (p/V)
α -Lactosa	10 % (p/V)

Solució M 50X

Na_2HPO_4	1,25 M
KH_2PO_4	1,25 M
NH_4Cl	2,5 M
Na_2SO_4	0,25 M

Solució Q

FeCl_3	50 mM
CaCl_2	20 mM
MnCl_2	10 mM
ZnSO_4	10 mM
CoCl_2	2 mM
CuCl_2	2 mM
NiCl_2	2 mM
Na_2MoO_4	2 mM
H_3BO_3	2 mM
Na_2SeO_3	2 mM
HCl	60 mM

Bibliografia

- [1] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. Holt, *et al.*, “The sequence of the human genome,” *Science*, vol. 291, no. 5507, pp. 1304–1351, 2001.
- [2] R. H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, *et al.*, “Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome,” *Nature*, vol. 420, no. 6915, pp. 520–562, 2002.
- [3] E. Birney, J. A. Stamatoyannopoulos, A. Dutta, R. Guigó, T. R. Gingeras, E. H. Margulies, Z. Weng, M. Snyder, E. T. Dermitzakis, J. A. Stamatoyannopoulos, *et al.*, “Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project,” *Nature*, vol. 447, no. 7146, pp. 799–816, 2007.
- [4] E. A. Feingold, P. J. Good, M. S. Guyer, S. Kamholz, L. Liefer, K. Wetterstrand, F. S. Collins, T. R. Gingeras, D. Kampa, E. A. Sekinger, *et al.*, “The ENCODE (ENCYclopedia Of DNA Elements) project,” *Science*, vol. 306, no. 5696, pp. 636–40, 2004.
- [5] M. B. Eisen, P. T. Spellman, P. O. Brown, and D. Botstein, “Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 95, no. 25, p. 14863, 1998.
- [6] L. Anderson and J. Seilhamer, “A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver,” *Electrophoresis*, vol. 18, no. 3-4, pp. 533–537, 1997.
- [7] S. P. Gygi, Y. Rochon, B. R. Franza, and R. Aebersold, “Correlation between protein and mRNA abundance in yeast,” *Mol Cell Biol*, vol. 19, no. 3, pp. 1720–1730, 1999.
- [8] R. Aebersold and D. R. Goodlett, “Mass Spectrometry in Proteomics,” *Chem Rev*, vol. 101, no. 2, pp. 269–295, 2001.

- [9] W. J. Henzel, T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, and C. Watanabe, "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 90, no. 11, pp. 5011–5015, 1993.
- [10] P. Schmitt-Kopplin and M. Frommberger, "Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications," *Electrophoresis*, vol. 24, no. 22-23, pp. 3837–67, 2003.
- [11] W. M. A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. CRC Press, 2006.
- [12] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold, "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags," *Nat Biotechnol*, vol. 17, no. 10, pp. 994–999, 1999.
- [13] S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann, "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics," *Mol Cell Proteomics*, vol. 1, no. 5, pp. 376–386, 2002.
- [14] D. S. Kirkpatrick, S. A. Gerber, and S. P. Gygi, "The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications," *Methods*, vol. 35, no. 3, pp. 265–273, 2005.
- [15] S. Wiese, K. A. Reidegeld, H. E. Meyer, and B. Warscheid, "Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research," *Proteomics*, vol. 7, no. 3, pp. 340–350, 2007.
- [16] S. P. Gygi, G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon, and R. Aebersold, "Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 97, no. 17, pp. 9390–9395, 2000.
- [17] G. L. Corthals, V. C. Wasinger, D. F. Hochstrasser, and J. C. Sanchez, "The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research," *Electrophoresis*, vol. 21, no. 6, pp. 1104–1115, 2000.
- [18] G. C. Adam, E. J. Sorensen, and B. F. Cravatt, "Chemical strategies for functional proteomics," *Mol Cell Proteomics*, vol. 1, no. 10, pp. 781–790, 2002.
- [19] A. B. Berger, P. M. Vitorino, and M. Bogoy, "Activity-based protein profiling: applications to biomarker discovery, in vivo imaging and

- drug discovery,” *Am J Pharmacogenomics*, vol. 4, no. 6, pp. 371–381, 2004.
- [20] B. F. Cravatt and E. J. Sorensen, “Chemical strategies for the global analysis of protein function,” *Curr Opin Chem Biol*, vol. 4, no. 6, pp. 663–668, 2000.
- [21] N. Jessani and B. Cravatt, “The development and application of methods for activity-based protein profiling,” *Curr Opin Chem Biol*, vol. 8, no. 1, pp. 54–59, 2004.
- [22] J. W. Kozarich, “Activity-based proteomics: enzyme chemistry redux,” *Curr Opin Chem Biol*, vol. 7, no. 1, pp. 78–83, 2003.
- [23] A. E. Speers and B. F. Cravatt, “Chemical strategies for activity-based proteomics,” *Chembiochem*, vol. 5, no. 1, pp. 41–47, 2004.
- [24] M. J. Evans and B. F. Cravatt, “Mechanism-based profiling of enzyme families,” *Chem Rev*, vol. 106, no. 8, pp. 3279–3301, 2006.
- [25] N. Jessani, Y. Liu, M. Humphrey, and B. Cravatt, “Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 99, no. 16, p. 10335, 2002.
- [26] N. Jessani, M. Humphrey, W. McDonald, S. Niessen, K. Masuda, B. Gangadharan, J. Yates III, B. Mueller, and B. Cravatt, “Carcinoma and stromal enzyme activity profiles associated with breast tumor growth in vivo,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101, no. 38, p. 13756, 2004.
- [27] D. Leung, C. Hardouin, D. Boger, and B. Cravatt, “Discovering potent and selective reversible inhibitors of enzymes in complex proteomes,” *Nat Biotech*, vol. 21, no. 6, pp. 687–691, 2003.
- [28] W. Li, J. L. Blankman, and B. F. Cravatt, “A functional proteomic strategy to discover inhibitors for uncharacterized hydrolases,” *J Am Chem Soc*, vol. 129, no. 31, pp. 9594–9595, 2007.
- [29] M. Dennehy, K. Richards, G. Wernke, Y. Shyr, and D. Liebler, “Cytosolic and nuclear protein targets of thiol-reactive electrophiles,” *Chem Res Toxicol*, vol. 19, no. 1, pp. 20–29, 2006.
- [30] J. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F. Tsai, D. Greenbaum, J. Hager, M. Bogyo, and D. Hanahan, “Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis,” *Cancer Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 443–453, 2004.

- [31] M. Evans, A. Saghatelian, E. Sorensen, and B. Cravatt, "Target discovery in small-molecule cell-based screens by in situ proteome reactivity profiling," *Nat Biotechnol*, vol. 23, pp. 1303–1307, 2005.
- [32] M. Bogyo, "Screening for selective small molecule inhibitors of the proteasome using activity-based probes," *Methods Enzymol*, vol. 399, pp. 609–622, 2005.
- [33] D. Kidd, Y. Liu, and B. F. Cravatt, "Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes," *Biochemistry*, vol. 40, no. 13, pp. 4005–4015, 2001.
- [34] Y. Liu, M. P. Patricelli, and B. F. Cravatt, "Activity-based protein profiling: the serine hydrolases," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96, no. 26, pp. 14694–14699, 1999.
- [35] D. Greenbaum, K. F. Medzihradzky, A. Burlingame, and M. Bogyo, "Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools," *Chem Biol*, vol. 7, no. 8, pp. 569–581, 2000.
- [36] M. Bogyo, S. Verhelst, V. Bellingard-Dubouchaud, S. Toba, and D. Greenbaum, "Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs," *Chem Biol*, vol. 7, no. 1, pp. 27–38, 2000.
- [37] M. Bogyo, J. S. McMaster, M. Gaczynska, D. Tortorella, A. L. Goldberg, and H. Ploegh, "Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 13, pp. 6629–6634, 1997.
- [38] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, and B. F. Cravatt, "Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101, no. 27, pp. 10000–10005, 2004.
- [39] G. C. Adam, E. J. Sorensen, and B. F. Cravatt, "Proteomic profiling of mechanistically distinct enzyme classes using a common chemotype," *Nat Biotechnol*, vol. 20, no. 8, pp. 805–809, 2002.
- [40] G. Adam, J. Burbaum, J. Kozarich, M. Patricelli, and B. Cravatt, "Mapping enzyme active sites in complex proteomes," *J Am Chem Soc*, vol. 126, p. 1363, 2004.
- [41] D. J. Vocadlo and C. R. Bertozzi, "A strategy for functional proteomic analysis of glycosidase activity from cell lysates," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 43, no. 40, pp. 5338–5342, 2004.

- [42] C. Drahl, B. F. Cravatt, and E. J. Sorensen, "Protein-reactive natural products," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 44, no. 36, pp. 5788–5809, 2005.
- [43] K. Barglow and B. Cravatt, "Discovering disease-associated enzymes by proteome reactivity profiling," *Chem Biol*, vol. 11, no. 11, pp. 1523–1531, 2004.
- [44] D. Jeffery and M. Bogyo, "Chemical proteomics and its application to drug discovery," *Curr Opin Biotechnol*, vol. 14, no. 1, pp. 87–95, 2003.
- [45] S. H. L. Verhelst and M. Bogyo, "Chemical proteomics applied to target identification and drug discovery," *Biotechniques*, vol. 38, no. 2, pp. 175–177, 2005.
- [46] D. Kato, S. H. L. Verhelst, K. B. Sexton, and M. Bogyo, "A general solid phase method for the preparation of diverse azapeptide probes directed against cysteine proteases," *Org Lett*, vol. 7, no. 25, pp. 5649–5652, 2005.
- [47] D. Kato, K. M. Boatright, A. B. Berger, T. Nazif, G. Blum, C. Ryan, K. A. H. Chehade, G. S. Salvesen, and M. Bogyo, "Activity-based probes that target diverse cysteine protease families," *Nat Chem Biol*, vol. 1, no. 1, pp. 33–38, 2005.
- [48] M. Liao, R. Panicker, and S. Yao, "Design and synthesis of an affinity probe that targets caspases in proteomic experiments," *Tetrahedron Lett*, vol. 44, no. 5, pp. 1043–1046, 2003.
- [49] O. Hekmat, Y.-W. Kim, S. J. Williams, S. He, and S. G. Withers, "Active-site peptide "fingerprinting" of glycosidases in complex mixtures by mass spectrometry. Discovery of a novel retaining beta-1,4-glycanase in *Cellulomonas fimi*," *J Biol Chem*, vol. 280, no. 42, pp. 35126–35135, 2005.
- [50] S. Kumar, B. Zhou, F. Liang, W. Wang, Z. Huang, and Z. Zhang, "Activity-based probes for protein tyrosine phosphatases," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101, no. 21, p. 7943, 2004.
- [51] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, and B. F. Cravatt, "Proteomic profiling of metalloprotease activities with cocktails of active-site probes," *Nat Chem Biol*, vol. 2, no. 5, pp. 274–281, 2006.
- [52] M. S. Shearman, D. Beher, E. E. Clarke, H. D. Lewis, T. Harrison, P. Hunt, A. Nadin, A. L. Smith, G. Stevenson, and J. L. Castro, "L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity," *Biochemistry*, vol. 39, no. 30, pp. 8698–8704, 2000.

- [53] G. C. Adam, B. F. Cravatt, and E. J. Sorensen, "Profiling the specific reactivity of the proteome with non-directed activity-based probes," *Chem Biol*, vol. 8, no. 1, pp. 81–95, 2001.
- [54] I. Schechter and A. Berger, "On the size of the active site in proteases. I. Papain," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 27, no. 2, pp. 157–62, 1967.
- [55] I. Schechter and A. Berger, "On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 32, no. 5, pp. 898–902, 1968.
- [56] S. A. Sieber and B. F. Cravatt, "Analytical platforms for activity-based protein profiling—exploiting the versatility of chemistry for functional proteomics," *Chem Commun (Camb)*, no. 22, pp. 2311–2319, 2006.
- [57] N. Schaschke, I. Assfalg-Machleidt, T. Laßleben, C. Sommerhoff, L. Moroder, and W. Machleidt, "Eoxysuccinyl peptide-derived affinity labels for cathepsin B," *FEBS Letters*, vol. 482, no. 1-2, pp. 91–96, 2000.
- [58] H. Watanabe, G. D. Green, and E. Shaw, "A comparison of the behavior of chymotrypsin and cathepsin B towards peptidyl diazomethyl ketones," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 89, no. 4, pp. 1354–1360, 1979.
- [59] R. Mason, L. Bartholomew, and B. Hardwick, "The use of benzyloxy-carbonyl [125I] iodotyrosylalanyldiazomethane as a probe for active cysteine proteinases in human tissues," *Biochem J*, vol. 263, no. 3, p. 945, 1989.
- [60] A. Borodovsky, B. Kessler, R. Casagrande, H. Overkleeft, K. Wilkinson, and H. Ploegh, "A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14," *The EMBO Journal*, vol. 20, pp. 5187–5196, 2001.
- [61] A. Borodovsky, H. Ovaa, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K. Wilkinson, H. Ploegh, and B. Kessler, "Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family," *Chem Biol*, vol. 9, no. 10, pp. 1149–1159, 2002.
- [62] A. M. Sadaghiani, S. H. Verhelst, and M. Bogoy, "Tagging and detection strategies for activity-based proteomics," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 11, no. 1, pp. 20–28, 2007.
- [63] G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, and S. L. Schreiber, "Inhibition of proteasome activities and subunit-

specific amino-terminal threonine modification by lactacystin,” *Science*, vol. 268, no. 5211, pp. 726–731, 1995.

- [64] J.-P. Falgoutret, W. C. Black, W. Cromlish, S. Desmarais, S. Lamontagne, C. Mellon, D. Riendeau, S. Rodan, P. Tawa, G. Wesolowski, K. E. Bass, S. Venkatraman, and M. D. Percival, “An activity-based probe for the determination of cysteine cathepsin protease activities in whole cells,” *Anal Biochem*, vol. 335, no. 2, pp. 218–227, 2004.
- [65] B. M. Kessler, D. Tortorella, M. Altun, A. F. Kisselev, E. Fiebiger, B. G. Hekking, H. L. Ploegh, and H. S. Overkleeft, “Extended peptide-based inhibitors efficiently target the proteasome and reveal overlapping specificities of the catalytic beta-subunits,” *Chem Biol*, vol. 8, no. 9, pp. 913–929, 2001.
- [66] N. Methot, J. P. Vaillancourt, J. Huang, J. Colucci, Y. Han, S. Menard, R. Zamboni, S. Toulmond, D. W. Nicholson, and S. Roy, “A caspase active site probe reveals high fractional inhibition needed to block DNA fragmentation,” *J Biol Chem*, vol. 279, no. 27, pp. 27905–27914, 2004.
- [67] P. F. van Swieten, R. Maehr, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, B. M. Kessler, M. Reich, C.-S. Wong, H. Kalbacher, M. A. Leeuwenburgh, C. Driessen, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, and H. S. Overkleeft, “Development of an isotope-coded activity-based probe for the quantitative profiling of cysteine proteases,” *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 14, no. 12, pp. 3131–3134, 2004.
- [68] M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, and J. J. Burbaum, “Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes,” *Proteomics*, vol. 1, no. 9, pp. 1067–1071, 2001.
- [69] C. R. Berkers, M. Verdoes, E. Lichtman, E. Fiebiger, B. M. Kessler, K. C. Anderson, H. L. Ploegh, H. Ovaa, and P. J. Galardy, “Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib,” *Nat Methods*, vol. 2, no. 5, pp. 357–362, 2005.
- [70] H. Schmidinger, R. Birner-Gruenberger, G. Riesenhuber, R. Saf, H. Susani-Etzerodt, and A. Hermetter, “Novel fluorescent phosphonic acid esters for discrimination of lipases and esterases,” *Chembiochem*, vol. 6, no. 10, pp. 1776–1781, 2005.
- [71] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. Medzihradszky, and M. Bogyo, “Chemical approaches for functionally probing the proteome,” *Mol Cell Proteomics*, vol. 1, no. 1, pp. 60–68, 2002.

- [72] E. W. S. Chan, S. Chattopadhyaya, R. C. Panicker, X. Huang, and S. Q. Yao, "Developing photoactive affinity probes for proteomic profiling: hydroxamate-based probes for metalloproteases," *J Am Chem Soc*, vol. 126, no. 44, pp. 14435–14446, 2004.
- [73] J. Chen, C.-H. Tung, J. R. Allport, S. Chen, R. Weissleder, and P. L. Huang, "Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction," *Circulation*, vol. 111, no. 14, pp. 1800–1805, 2005.
- [74] R. Weissleder, C. H. Tung, U. Mahmood, and A. J. Bogdanov, "In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes," *Nat Biotechnol*, vol. 17, no. 4, pp. 375–378, 1999.
- [75] A. Wunder, C.-H. Tung, U. Muller-Ladner, R. Weissleder, and U. Mahmood, "In vivo imaging of protease activity in arthritis: a novel approach for monitoring treatment response," *Arthritis Rheum*, vol. 50, no. 8, pp. 2459–2465, 2004.
- [76] G. Blum, S. R. Mullins, K. Keren, M. Fonovic, C. Jedeszko, M. J. Rice, B. F. Sloane, and M. Bogyo, "Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes," *Nat Chem Biol*, vol. 1, no. 4, pp. 203–209, 2005.
- [77] J. Hemelaar, A. Borodovsky, B. M. Kessler, D. Reverter, J. Cook, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K. D. Wilkinson, G. Gill, C. D. Lima, H. L. Ploegh, and H. Ovaa, "Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins," *Mol Cell Biol*, vol. 24, no. 1, pp. 84–95, 2004.
- [78] D. Heseck, M. Toth, S. O. Meroueh, S. Brown, H. Zhao, W. Sakr, R. Fridman, and S. Mobashery, "Design and characterization of a metalloproteinase inhibitor-tethered resin for the detection of active MMPs in biological samples," *Chem Biol*, vol. 13, no. 4, pp. 379–386, 2006.
- [79] D. Heseck, M. Toth, V. Krchnak, R. Fridman, and S. Mobashery, "Synthesis of an inhibitor-tethered resin for detection of active matrix metalloproteinases involved in disease," *J Org Chem*, vol. 71, no. 16, pp. 5848–5854, 2006.
- [80] S. Ono, M. Umezaki, H. Nabari, R. Nakayama, K. Hasegawa, S. Sako, T. Fujii, I. Yamazaki, and T. Yoshimura, "Selective removal of chymotrypsin using diphenyl α -aminoalkylphosphonate immobilized on Sepharose gel," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 66, no. 5, pp. 1111–1115, 2002.

- [81] K. Godl, J. Wissing, A. Kurtenbach, P. Habenberger, S. Blencke, H. Gutbrod, K. Salassidis, M. Stein-Gerlach, A. Missio, M. Cotten, and H. Daub, "An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 100, no. 26, pp. 15434–15439, 2003.
- [82] Y. Ashani and I. Wilson, "A covalent affinity column for the purification of acetylcholinesterase," *Biochim Biophys Acta*, vol. 276, no. 1, pp. 317–22, 1972.
- [83] E. Saxon and C. R. Bertozzi, "Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction," *Science*, vol. 287, no. 5460, pp. 2007–2010, 2000.
- [84] H. Ovaas, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebiger, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, and H. S. Overkleeft, "Chemistry in living cells: detection of active proteasomes by a two-step labeling strategy," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 42, no. 31, pp. 3626–3629, 2003.
- [85] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, "A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes," *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 41, no. 14, pp. 2596–2599, 2002.
- [86] C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, "Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides," *J Org Chem*, vol. 67, no. 9, pp. 3057–3064, 2002.
- [87] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, and M. G. Finn, "Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition," *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 11, pp. 3192–3193, 2003.
- [88] A. E. Speers, G. C. Adam, and B. F. Cravatt, "Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition," *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 16, pp. 4686–4687, 2003.
- [89] F. L. Strand, "Neuropeptides: general characteristics and neuropharmaceutical potential in treating CNS disorders," *Prog Drug Res*, vol. 61, pp. 1–37, 2003.
- [90] N. Ling, R. Burgus, and R. Guillemin, "Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 73, no. 11, pp. 3942–3946, 1976.

- [91] H. Yang, W. Fratta, E. Majane, and E. Costa, "Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 82, no. 22, pp. 7757–7761, 1985.
- [92] G. W. Bennett, T. M. Ballard, C. D. Watson, and K. C. Fone, "Effect of neuropeptides on cognitive function," *Exp Gerontol*, vol. 32, no. 4-5, pp. 451–469, 1997.
- [93] F. L. Strand, *Neuropeptides: regulators of physiological processes*. Cellular and molecular neuroscience, Cambridge, Mass.: MIT Press, 1999.
- [94] V. Hook, L. Funkelstein, D. Lu, S. Bark, J. Wegrzyn, and S.-R. Hwang, "Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones," *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 48, pp. 393–423, 2008.
- [95] T. Hokfelt, C. Broberger, Z. Xu, V. Sergeev, R. Ubink, and M. Diez, "Neuropeptides — an overview," *Neuropharmacology*, vol. 39, no. 8, pp. 1337–1356, 2000.
- [96] V. Y. Hook, A. V. Azaryan, S. R. Hwang, and N. Tezapsidis, "Proteases and the emerging role of protease inhibitors in prohormone processing," *FASEB J*, vol. 8, no. 15, pp. 1269–1278, 1994.
- [97] V. Hook, ed., *Proteolytic and cellular mechanism in prohormone and proprotein processing*. Landes Company, 1998.
- [98] D. F. Steiner, S. P. Smekens, S. Ohagi, and S. J. Chan, "The new enzymology of precursor processing endoproteases," *J Biol Chem*, vol. 267, no. 33, pp. 23435–23438, 1992.
- [99] A. Zhou, G. Webb, X. Zhu, and D. F. Steiner, "Proteolytic processing in the secretory pathway," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 30, pp. 20745–20748, 1999.
- [100] A. R. Khan and M. N. James, "Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes," *Protein Sci*, vol. 7, no. 4, pp. 815–836, 1998.
- [101] Y. P. Loh and H. Gainer, "The role of glycosylation on the biosynthesis, degradation, and secretion of the ACTH- β -lipotropin common precursor and its peptide products," *FEBS Lett*, vol. 96, no. 2, pp. 269–272, 1978.
- [102] B. A. Eipper, D. A. Stoffers, and R. E. Mains, "The biosynthesis of neuropeptides: peptide α -amidation," *Annu Rev Neurosci*, vol. 15, pp. 57–85, 1992.

- [103] C. Dass and P. Mahalakshmi, "Amino acid sequence determination of phosphoenkephalins using liquid secondary ionization mass spectrometry," *Rapid Commun Mass Spectrom*, vol. 9, no. 12, pp. 1148–1154, 1995.
- [104] F. Vargas, O. Frerot, F. Brion, M. D. Trung Tuong, A. Lafitte, and C. Gulat-Marnay, "3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate biosynthesis and the sulfation of cholecystokinin by the tyrosylprotein-sulfotransferase in rat brain tissue," *Chem Biol Interact*, vol. 92, no. 1-3, pp. 281–291, 1994.
- [105] C. W. Wilkinson, "Roles of acetylation and other post-translational modifications in melanocortin function and interactions with endorphins," *Peptides*, vol. 27, no. 2, pp. 453–471, 2006.
- [106] H. Higuchi, H. Yang, and S. Sabol, "Rat neuropeptide Y precursor gene expression. mRNA structure, tissue distribution, and regulation by glucocorticoids, cyclic AMP, and phorbol ester," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 13, pp. 6288–6295, 1988.
- [107] B. Robinson, L. D'Angio Jr, K. Pasioka, and J. Majzoub, "Prepro-corticotropin releasing hormone: cDNA sequence and in vitro processing," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 61, no. 2, pp. 175–80, 1989.
- [108] A. Rökaeus and M. Brownstein, "Construction of a porcine adrenal medullary cDNA library and nucleotide sequence analysis of two clones encoding a galanin precursor," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 83, no. 17, p. 6287, 1986.
- [109] M. Comb, H. Rosen, P. Seeburg, J. Adelman, and E. Herbert, "Primary structure of the human proenkephalin gene," *DNA*, vol. 2, no. 3, pp. 213–29, 1983.
- [110] K. Yoshikawa, C. Williams, and S. Sabol, "Rat brain preproenkephalin mRNA. cDNA cloning, primary structure, and distribution in the central nervous system," *J Biol Chem*, vol. 259, no. 22, pp. 14301–14308, 1984.
- [111] J. Roberts, P. Seeburg, J. Shine, E. Herbert, J. Baxter, and H. Goodman, "Corticotropin and beta-endorphin: construction and analysis of recombinant DNA complementary to mRNA for the common precursor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 76, pp. 2153–2157, 1979.
- [112] H. Takahashi, Y. Teranishi, S. Nakanishi, and S. Numa, "Isolation and structural organization of the human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene," *FEBS Lett*, vol. 135, no. 1, pp. 97–102, 1981.

- [113] D. de Wied, "Behavioral pharmacology of neuropeptides related to melanocortins and the neurohypophyseal hormones," *Eur J Pharmacol*, vol. 375, no. 1-3, pp. 1-11, 1999.
- [114] N. G. Seidah, R. Day, M. Marcinkiewicz, and M. Chretien, "Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins," *Ann NY Acad Sci*, vol. 839, pp. 9-24, 1998.
- [115] Y. Rouille, S. J. Duguay, K. Lund, M. Furuta, Q. Gong, G. Lipkind, A. A. J. Oliva, S. J. Chan, and D. F. Steiner, "Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases," *Front Neuroendocrinol*, vol. 16, no. 4, pp. 322-361, 1995.
- [116] J. Korner, J. Chun, D. Harter, and R. Axel, "Isolation and functional expression of a mammalian prohormone processing enzyme, murine prohormone convertase 1," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 88, no. 15, pp. 6834-6838, 1991.
- [117] Y. Zhou and I. Lindberg, "Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3)," *J Biol Chem*, vol. 268, no. 8, pp. 5615-5623, 1993.
- [118] R. S. Fuller, A. Brake, and J. Thorner, "Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, no. 5, pp. 1434-1438, 1989.
- [119] D. B. Constam, M. Calfon, and E. J. Robertson, "SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis," *J Cell Biol*, vol. 134, no. 1, pp. 181-191, 1996.
- [120] D. Steiner, "The proprotein convertases," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 2, no. 1, pp. 31-39, 1998.
- [121] K. Nakayama, "Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins," *Biochem. J*, vol. 327, no. 3, p. 625, 1997.
- [122] G. Thomas, "Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, no. 10, pp. 753-766, 2002.
- [123] R. J. Siezen and J. A. Leunissen, "Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases," *Protein Sci*, vol. 6, no. 3, pp. 501-523, 1997.

- [124] M. Fugere and R. Day, "Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition," *Trends Pharmacol Sci*, vol. 26, no. 6, pp. 294–301, 2005.
- [125] J. W. Creemers, R. S. Jackson, and J. C. Hutton, "Molecular and cellular regulation of prohormone processing," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 9, no. 1, pp. 3–10, 1998.
- [126] S. Benjannet, J. Lusson, J. Hamelin, D. Savaria, M. Chretien, and N. G. Seidah, "Structure-function studies on the biosynthesis and bioactivity of the precursor convertase PC2 and the formation of the PC2/7B2 complex," *FEBS Lett*, vol. 362, no. 2, pp. 151–155, 1995.
- [127] A. Zhou, L. Paquet, and R. E. Mains, "Structural elements that direct specific processing of different mammalian subtilisin-like prohormone convertases," *J Biol Chem*, vol. 270, no. 37, pp. 21509–21516, 1995.
- [128] S. P. Smeekens, A. S. Avruch, J. LaMendola, S. J. Chan, and D. F. Steiner, "Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 88, no. 2, pp. 340–344, 1991.
- [129] R. Day, M. Schafer, S. Watson, M. Chretien, and N. Seidah, "Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary," *Mol Endocrinol*, vol. 6, no. 3, pp. 485–497, 1992.
- [130] N. G. Seidah, L. Gaspar, P. Mion, M. Marcinkiewicz, M. Mbikay, and M. Chretien, "cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases," *DNA Cell Biol*, vol. 9, no. 6, pp. 415–424, 1990.
- [131] A. V. Azaryan, T. J. Krieger, and V. Y. Hook, "Purification and characteristics of the candidate prohormone processing proteases PC2 and PC1/3 from bovine adrenal medulla chromaffin granules," *J Biol Chem*, vol. 270, no. 14, pp. 8201–8208, 1995.
- [132] S. Smeekens, A. Montag, G. Thomas, C. Albiges-Rizo, R. Carroll, M. Benig, L. Phillips, S. Martin, S. Ohagi, P. Gardner, *et al.*, "Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 89, no. 18, p. 8822, 1992.
- [133] S. Benjannet, N. Rondeau, R. Day, M. Chretien, and N. Seidah, "PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 88, no. 9, pp. 3564–3568, 1991.

- [134] A. Zhou and R. E. Mains, "Endoproteolytic processing of proopiomelanocortin and prohormone convertases 1 and 2 in neuroendocrine cells overexpressing prohormone convertases 1 or 2," *J Biol Chem*, vol. 269, no. 26, pp. 17440–17447, 1994.
- [135] K. Johanning, M. Juliano, L. Juliano, C. Lazure, N. Lamango, D. Steiner, and I. Lindberg, "Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates," *J Biol Chem*, vol. 273, no. 35, pp. 22672–22680, 1998.
- [136] P. Villeneuve, L. Lafortune, N. Seidah, P. Kitabgi, and A. Beaudet, "Immunohistochemical evidence for the involvement of protein convertases 5A and 2 in the processing of pro-neurotensin in rat brain," *J Comp Neurol*, vol. 424, no. 3, pp. 461–75, 2000.
- [137] A. Dupuy, I. Lindberg, Y. Zhou, H. Akil, C. Lazure, M. Chretien, N. Seidah, and R. Day, "Processing of prodynorphin by the prohormone convertase PC1 results in high molecular weight intermediate forms: Cleavage at a single arginine residue," *FEBS Letters*, vol. 337, no. 1, pp. 60–65, 1994.
- [138] S. Dhanvantari, "Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon," *Mol Endocrinol*, vol. 10, no. 4, pp. 342–355, 1996.
- [139] A. Viale, C. Ortola, G. Hervieu, M. Furuta, P. Barbero, D. Steiner, N. Seidah, and J. Nahon, "Cellular localization and role of prohormone convertases in the processing of pro-melanin concentrating hormone in mammals," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 10, pp. 6536–6545, 1999.
- [140] A. Dey, X. Xhu, R. Carroll, C. W. Turck, J. Stein, and D. F. Steiner, "Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 17, pp. 15007–15014, 2003.
- [141] C. M. Dubois, M. H. Laprise, F. Blanchette, L. E. Gentry, and R. Leduc, "Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase," *J Biol Chem*, vol. 270, no. 18, pp. 10618–10624, 1995.
- [142] G. de Llengua Catalana, ed., *Vocabulari de fisiologia animal*. Universitat Autònoma de Barcelona, 2002.
- [143] M. R. Schiller, L. Mende-Mueller, K. Moran, M. Meng, K. W. Miller, and V. Y. Hook, "Prohormone thiol protease (PTP) processing of recombinant proenkephalin," *Biochemistry*, vol. 34, no. 25, pp. 7988–7995, 1995.

- [144] S. Yasothornsrikul, W. Aaron, T. Toneff, and V. Y. Hook, "Evidence for the proenkephalin processing enzyme prohormone thiol protease (PTP) as a multicatalytic cysteine protease complex: activation by glutathione localized to secretory vesicles," *Biochemistry*, vol. 38, no. 23, pp. 7421–7430, 1999.
- [145] S. Yasothornsrikul, D. Greenbaum, K. F. Medzihradzsky, T. Toneff, R. Bunday, R. Miller, B. Schilling, I. Petermann, J. Dehnert, A. Logvinova, P. Goldsmith, J. M. Neveu, W. S. Lane, B. Gibson, T. Reinheckel, C. Peters, M. Bogyo, and V. Hook, "Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 100, no. 16, pp. 9590–9595, 2003.
- [146] V. Hook, S. Yasothornsrikul, D. Greenbaum, K. F. Medzihradzsky, K. Troutner, T. Toneff, R. Bunday, A. Logvinova, T. Reinheckel, C. Peters, and M. Bogyo, "Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones," *Biol Chem*, vol. 385, no. 6, pp. 473–480, 2004.
- [147] L. D. Fricker, "Neuropeptide-processing enzymes: applications for drug discovery," *AAPS J*, vol. 7, no. 2, pp. E449–55, 2005.
- [148] S. K. Gupta, T. Hassel, and J. P. Singh, "A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 92, no. 17, pp. 7799–7803, 1995.
- [149] J. P. Burbach, N. G. Seidah, and M. Chretien, "Isolation and primary structure of novel neurointermediate pituitary peptides derived from the C-terminal of the rat vasopressin-neurophysin precursor (propressophysin)," *Eur J Biochem*, vol. 156, no. 1, pp. 137–142, 1986.
- [150] M. S. Rosendahl, S. C. Ko, D. L. Long, M. T. Brewer, B. Rosenzweig, E. Hedl, L. Anderson, S. M. Pyle, J. Moreland, M. A. Meyers, T. Kohno, D. Lyons, and H. S. Lichenstein, "Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor- α -processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases," *J Biol Chem*, vol. 272, no. 39, pp. 24588–24593, 1997.
- [151] F. Checler, "Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease," *J Neurochem*, vol. 65, no. 4, pp. 1431–1444, 1995.

- [152] D. Cheng, P. J. Espenshade, C. A. Slaughter, J. C. Jaen, M. S. Brown, and J. L. Goldstein, "Secreted site-1 protease cleaves peptides corresponding to luminal loop of sterol regulatory element-binding proteins," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 32, pp. 22805–22812, 1999.
- [153] E. A. Duncan, M. S. Brown, J. L. Goldstein, and J. Sakai, "Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a Leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2," *J Biol Chem*, vol. 272, no. 19, pp. 12778–12785, 1997.
- [154] E. A. Duncan, U. P. Dave, J. Sakai, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, "Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning," *J Biol Chem*, vol. 273, no. 28, pp. 17801–17809, 1998.
- [155] J. Sakai, R. B. Rawson, P. J. Espenshade, D. Cheng, A. C. Seegmiller, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, "Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells," *Mol Cell*, vol. 2, no. 4, pp. 505–514, 1998.
- [156] N. G. Seidah, S. J. Mowla, J. Hamelin, A. M. Mamarbachi, S. Benjannet, B. B. Toure, A. Basak, J. S. Munzer, J. Marcinkiewicz, M. Zhong, J. C. Barale, C. Lazure, R. A. Murphy, M. Chretien, and M. Marcinkiewicz, "Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96, no. 4, pp. 1321–1326, 1999.
- [157] B. B. Toure, J. S. Munzer, A. Basak, S. Benjannet, J. Rochemont, C. Lazure, M. Chretien, and N. G. Seidah, "Biosynthesis and enzymatic characterization of human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment," *J Biol Chem*, vol. 275, no. 4, pp. 2349–2358, 2000.
- [158] J. Ye, R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Dave, R. Prywes, M. S. Brown, and J. L. Goldstein, "ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs," *Mol Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 1355–1364, 2000.
- [159] N. G. Seidah, S. Benjannet, L. Wickham, J. Marcinkiewicz, S. B. Jamin, S. Stifani, A. Basak, A. Prat, and M. Chretien, "The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 100, no. 3, pp. 928–933, 2003.

- [160] N. Emoto and M. Yanagisawa, "Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum," *J Biol Chem*, vol. 270, no. 25, pp. 15262–15268, 1995.
- [161] D. Xu, N. Emoto, A. Giaid, C. Slaughter, S. Kaw, D. deWit, and M. Yanagisawa, "ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1," *Cell*, vol. 78, no. 3, pp. 473–485, 1994.
- [162] G. D. Johnson, T. Stevenson, and K. Ahn, "Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin," *J Biol Chem*, vol. 274, no. 7, pp. 4053–4058, 1999.
- [163] N. Mzhavia, H. Pan, F.-Y. Che, L. D. Fricker, and L. A. Devi, "Characterization of endothelin-converting enzyme-2. Implication for a role in the nonclassical processing of regulatory peptides," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 17, pp. 14704–14711, 2003.
- [164] A. Drabik, A. Bierczynska-Krzysik, A. Bodzon-Kulakowska, P. Suder, J. Kotlinska, and J. Silberring, "Proteomics in neurosciences," *Mass Spectrom Rev*, vol. 26, no. 3, pp. 432–450, 2007.
- [165] G. J. Feistner, P. Hojrup, C. J. Evans, D. F. Barofsky, K. F. Faull, and P. Roepstorff, "Mass spectrometric charting of bovine posterior/intermediate pituitary peptides," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 86, no. 16, pp. 6013–6017, 1989.
- [166] A. Hummon, J. Sweedler, and R. Corbin, "Discovering new neuropeptides using single-cell mass spectrometry," *Trends Anal Chem*, vol. 22, no. 9, pp. 515–521, 2003.
- [167] K. Skold, M. Svensson, A. Kaplan, L. Bjorkesten, J. Astrom, and P. Andren, "A neuroproteomic approach to targeting neuropeptides in the brain," *Proteomics*, vol. 2, pp. 447–454, 2002.
- [168] M. Svensson, K. Skold, P. Svenningsson, and P. E. Andren, "Peptidomics-based discovery of novel neuropeptides," *J Proteome Res*, vol. 2, no. 2, pp. 213–219, 2003.
- [169] F.-Y. Che and L. D. Fricker, "Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry," *Anal Chem*, vol. 74, no. 13, pp. 3190–3198, 2002.
- [170] F.-Y. Che and L. D. Fricker, "Quantitative peptidomics of mouse pituitary: comparison of different stable isotopic tags," *J Mass Spectrom*, vol. 40, no. 2, pp. 238–249, 2005.

- [171] F.-Y. Che, R. Biswas, and L. D. Fricker, "Relative quantitation of peptides in wild-type and Cpe(fat/fat) mouse pituitary using stable isotopic tags and mass spectrometry," *J Mass Spectrom*, vol. 40, no. 2, pp. 227–237, 2005.
- [172] F. Y. Che, L. Yan, H. Li, N. Mzhavia, L. A. Devi, and L. D. Fricker, "Identification of peptides from brain and pituitary of Cpe(fat)/Cpe(fat) mice," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 98, no. 17, pp. 9971–9976, 2001.
- [173] S. Kroesen, J. Marksteiner, B. Leitner, R. Hogue-Angeletti, R. Fischer-Colbrie, and H. Winkler, "Rat brain: distribution of immunoreactivity of PE-11, a peptide derived from chromogranin B," *Eur J Neurosci*, vol. 8, no. 12, pp. 2679–2689, 1996.
- [174] J. Y. Li, B. Leitner, H. Winkler, and A. Dahlstrom, "Distribution of chromogranins A and B and secretogranin II (secretoneurin) in rat pelvic neurons and vas deferens," *Neuroscience*, vol. 84, no. 1, pp. 281–294, 1998.
- [175] J. Marksteiner, R. Bauer, W. A. Kaufmann, E. Weiss, U. Barnas, and H. Maier, "PE-11, a peptide derived from chromogranin B, in the human brain," *Neuroscience*, vol. 91, no. 3, pp. 1155–1170, 1999.
- [176] J. Sigafoos, W. G. Chestnut, B. M. Merrill, L. C. Taylor, E. J. J. Diliberto, and O. H. Viveros, "Novel peptides from adrenomedullary chromaffin vesicles," *J Anat*, vol. 183 (Pt 2), pp. 253–264, 1993.
- [177] J. M. Strub, P. Garcia-Sablone, K. Lonning, L. Taupenot, P. Hubert, A. Van Dorsselaer, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue, "Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla. Identification of secretolytin, the endogenous C-terminal fragment of residues 614-626 with antibacterial activity," *Eur J Biochem*, vol. 229, no. 2, pp. 356–368, 1995.
- [178] K. F. D Randall, W Burggren, *Fisiologia Animal: Mecanismos y adaptaciones*. McGraw-Hill Interamericana, 4th ed., 1998.
- [179] H. Rang, *Farmacología*. Elsevier, 4th ed., 2000.
- [180] P. Kitabgi, "Inactivation of neurotensin and neuromedin N by Zn metallopeptidases," *Peptides*, vol. 27, no. 10, pp. 2515–2522, 2006.
- [181] V. Fulop, Z. Bocskei, and L. Polgar, "Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis," *Cell*, vol. 94, no. 2, pp. 161–170, 1998.

- [182] J. Gass and C. Khosla, "Prolyl endopeptidases," *Cell Mol Life Sci*, vol. 64, no. 3, pp. 345–355, 2007.
- [183] L. Polgar, "The prolyl oligopeptidase family," *Cell Mol Life Sci*, vol. 59, no. 2, pp. 349–362, 2002.
- [184] M. Maes, S. Scharpe, I. De Meester, P. Goossens, A. Wauters, H. Neels, R. Verkerk, F. De Meyer, P. D'Hondt, and D. Peeters, "Components of biological variation in prolyl endopeptidase and dipeptidyl-peptidase IV activity in plasma of healthy subjects," *Clin Chem*, vol. 40, no. 9, pp. 1686–1691, 1994.
- [185] J. A. Garcia-Horsman, P. T. Mannisto, and J. I. Venalainen, "On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease," *Neuropeptides*, vol. 41, no. 1, pp. 1–24, 2007.
- [186] K. Toide, K. Okamiya, Y. Iwamoto, and T. Kato, "Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on prolyl endopeptidase activity and substance P- and arginine-vasopressin-like immunoreactivity in the brains of aged rats," *J Neurochem*, vol. 65, no. 1, pp. 234–240, 1995.
- [187] K. Toide, T. Fujiwara, Y. Iwamoto, M. Shinoda, K. Okamiya, and T. Kato, "Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on neuropeptide metabolism in the rat brain," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, vol. 353, no. 3, pp. 355–362, 1996.
- [188] G. Bellemere, H. Vaudry, P. Morain, and S. Jegou, "Effect of prolyl endopeptidase inhibition on arginine-vasopressin and thyrotrophin-releasing hormone catabolism in the rat brain," *J Neuroendocrinol*, vol. 17, no. 5, pp. 306–313, 2005.
- [189] K. Toide, M. Shinoda, T. Fujiwara, and Y. Iwamoto, "Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats," *Pharmacol Biochem Behav*, vol. 56, no. 3, pp. 427–434, 1997.
- [190] I. Schulz, B. Gerhartz, A. Neubauer, A. Holloschi, U. Heiser, M. Hafner, and H.-U. Demuth, "Modulation of inositol 1,4,5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition," *Eur J Biochem*, vol. 269, no. 23, pp. 5813–5820, 2002.
- [191] R. S. Williams, M. Eames, W. J. Ryves, J. Viggars, and A. J. Harwood, "Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate," *EMBO J*, vol. 18, no. 10, pp. 2734–2745, 1999.

- [192] A. V. Bakker, S. Jung, R. W. Spencer, F. J. Vinick, and W. S. Faraci, "Slow tight-binding inhibition of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal," *Biochem J*, vol. 271, no. 2, pp. 559–562, 1990.
- [193] K. Toide, Y. Iwamoto, T. Fujiwara, and H. Abe, "JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 274, no. 3, pp. 1370–1378, 1995.
- [194] H. Barelli, A. Petit, E. Hirsch, S. Wilk, G. De Nanteuil, P. Morain, and F. Checler, "S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 257, no. 3, pp. 657–661, 1999.
- [195] P. Morain, P. Lestage, G. De Nanteuil, R. Jochemsen, J.-L. Robin, D. Guez, and P.-A. Boyer, "S 17092: a prolyl endopeptidase inhibitor as a potential therapeutic drug for memory impairment. Preclinical and clinical studies," *CNS Drug Rev*, vol. 8, no. 1, pp. 31–52, 2002.
- [196] N. Scamuffa, F. Calvo, M. Chretien, N. G. Seidah, and A.-M. Khatib, "Proprotein convertases: lessons from knockouts," *FASEB J*, vol. 20, no. 12, pp. 1954–1963, 2006.
- [197] M. Furuta, H. Yano, A. Zhou, Y. Rouille, J. J. Holst, R. Carroll, M. Ravazzola, L. Orci, H. Furuta, and D. F. Steiner, "Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 94, no. 13, pp. 6646–6651, 1997.
- [198] J. F. Rehfeld, I. Lindberg, and L. Friis-Hansen, "Increased synthesis but decreased processing of neuronal proCCK in prohormone convertase 2 and 7B2 knockout animals," *J Neurochem*, vol. 83, no. 6, pp. 1329–1337, 2002.
- [199] P. Villeneuve, S. Feliciangeli, G. Croissandeau, N. G. Seidah, M. Mbikay, P. Kitabgi, and A. Beaudet, "Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study," *J Neurochem*, vol. 82, no. 4, pp. 783–793, 2002.
- [200] Y. Berman, N. Mzhavia, A. Polonskaia, M. Furuta, D. F. Steiner, J. E. Pintar, and L. A. Devi, "Defective prodynorphin processing in mice lacking prohormone convertase PC2," *J Neurochem*, vol. 75, no. 4, pp. 1763–1770, 2000.
- [201] R. G. Allen, B. Peng, M. J. Pellegrino, E. D. Miller, D. K. Grandy, J. R. Lundblad, C. L. Washburn, and J. E. Pintar, "Altered processing

of pro-orphanin FQ/nociceptin and pro-opiomelanocortin-derived peptides in the brains of mice expressing defective prohormone convertase 2," *J Neurosci*, vol. 21, no. 16, pp. 5864–5870, 2001.

- [202] H. Pan, D. Nanno, F.-Y. Che, X. Zhu, S. R. Salton, D. F. Steiner, L. D. Fricker, and L. A. Devi, "Neuropeptide processing profile in mice lacking prohormone convertase-1," *Biochemistry*, vol. 44, no. 12, pp. 4939–4948, 2005.
- [203] X. Zhu, L. Orci, R. Carroll, C. Norrbom, M. Ravazzola, and D. F. Steiner, "Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lacking prohormone convertase 1/3.," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 99, no. 16, pp. 10299–10304, 2002.
- [204] X. Zhu, A. Zhou, A. Dey, C. Norrbom, R. Carroll, C. Zhang, V. Laurent, I. Lindberg, R. Ugleholdt, J. J. Holst, and D. F. Steiner, "Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 99, no. 16, pp. 10293–10298, 2002.
- [205] R. S. Jackson, J. W. Creemers, S. Ohagi, M. L. Raffin-Sanson, L. Sanders, C. T. Montague, J. C. Hutton, and S. O'Rahilly, "Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene," *Nat Genet*, vol. 16, no. 3, pp. 303–306, 1997.
- [206] R. S. Jackson, J. W. M. Creemers, I. S. Farooqi, M.-L. Raffin-Sanson, A. Varro, G. J. Dockray, J. J. Holst, P. L. Brubaker, P. Corvol, K. S. Polonsky, D. Ostrega, K. L. Becker, X. Bertagna, J. C. Hutton, A. White, M. T. Dattani, K. Hussain, S. J. Middleton, T. M. Nicole, P. J. Milla, K. J. Lindley, and S. O'Rahilly, "Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency," *J Clin Invest*, vol. 112, no. 10, pp. 1550–1560, 2003.
- [207] N. Wierup and F. Sundler, "CART is a novel islet regulatory peptide," *Peptides*, vol. 27, no. 8, pp. 2031–2036, 2006.
- [208] M. Singh, F. Eleftheriou, and G. Karsenty, "CART may regulate bone remodeling as a circulating molecule," *Endocrinology*, 2008.
- [209] A. Vaarmann and A. Kask, "Cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide (CART(62-76))-induced changes in regional monoamine levels in rat brain," *Neuropeptides*, vol. 35, no. 5-6, pp. 292–296, 2001.

- [210] M. J. Kuhar, L. D. Adams, R. G. Hunter, S. D. Vechia, and Y. Smith, "CART peptides," *Regul Pept*, vol. 89, no. 1-3, pp. 1-6, 2000.
- [211] M. J. Kuhar and S. E. Dall Vechia, "CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides," *Trends Neurosci*, vol. 22, no. 7, pp. 316-320, 1999.
- [212] J. Stein, D. F. Steiner, and A. Dey, "Processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor proteins by prohormone convertases (PCs) and its implications," *Peptides*, vol. 27, no. 8, pp. 1919-1925, 2006.
- [213] M. Abifadel, M. Varret, J.-P. Rabes, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erlich, A. Derre, L. Villegier, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J.-M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Prat, M. Krempf, C. Junien, N. G. Seidah, and C. Boileau, "Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia," *Nat Genet*, vol. 34, no. 2, pp. 154-156, 2003.
- [214] A.-M. Khatib, G. Siegfried, M. Chretien, P. Metrakos, and N. G. Seidah, "Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy," *Am J Pathol*, vol. 160, no. 6, pp. 1921-1935, 2002.
- [215] G. Siegfried, A. Basak, J. A. Cromlish, S. Benjannet, J. Marcinkiewicz, M. Chretien, N. G. Seidah, and A.-M. Khatib, "The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis," *J Clin Invest*, vol. 111, no. 11, pp. 1723-1732, 2003.
- [216] A. Basak, M. Zhong, J. S. Munzer, M. Chretien, and N. G. Seidah, "Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides," *Biochem J*, vol. 353, no. Pt 3, pp. 537-545, 2001.
- [217] E. Bergeron, M. J. Vincent, L. Wickham, J. Hamelin, A. Basak, S. T. Nichol, M. Chretien, and N. G. Seidah, "Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 326, no. 3, pp. 554-563, 2005.
- [218] M. Moulard, S. Hallenberger, W. Garten, and H. D. Klenk, "Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface," *Virus Res*, vol. 60, no. 1, pp. 55-65, 1999.

- [219] M. J. Vincent, A. J. Sanchez, B. R. Erickson, A. Basak, M. Chretien, N. G. Seidah, and S. T. Nichol, "Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1," *J Virol*, vol. 77, no. 16, pp. 8640–8649, 2003.
- [220] M. Maes, F. Goossens, S. Scharpe, J. Calabrese, R. Desnyder, and H. Y. Meltzer, "Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs," *Psychiatry Res*, vol. 58, no. 3, pp. 217–225, 1995.
- [221] M. Maes, P. Monteleone, R. Bencivenga, F. Goossens, M. Maj, D. van West, E. Bosmans, and S. Scharpe, "Lower serum activity of prolyl endopeptidase in anorexia and bulimia nervosa," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 26, no. 1, pp. 17–26, 2001.
- [222] M. Maes, F. Goossens, A. Lin, I. De Meester, A. Van Gastel, and S. Scharpe, "Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity in humans: higher serum prolyl endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 23, no. 5, pp. 485–495, 1998.
- [223] M. Maes, A. H. Lin, S. Bonaccorso, F. Goossens, A. Van Gastel, R. Pioli, L. Delmeire, and S. Scharpe, "Higher serum prolyl endopeptidase activity in patients with post-traumatic stress disorder," *J Affect Disord*, vol. 53, no. 1, pp. 27–34, 1999.
- [224] I. Belda, S. Madurga, X. Llorca, M. Martinell, T. Tarrago, M. Piqueras, E. Nicolas, and E. Giralt, "ENPDA: an evolutionary structure-based de novo peptide design algorithm," *J Comput Aided Mol Des*, vol. 19, no. 8, pp. 585–601, 2005.
- [225] T. Tarrago, S. Frutos, R. A. Rodriguez-Mias, and E. Giralt, "Identification by ^{19}F NMR of traditional Chinese medicinal plants possessing prolyl oligopeptidase inhibitory activity," *ChemBioChem*, vol. 7, no. 5, pp. 827–833, 2006.
- [226] T. Tarrago, N. Kichik, J. Seguí, and E. Giralt, "The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor," *ChemMedChem*, vol. 2, no. 3, pp. 354–359, 2007.
- [227] T. Tarrago, J. Martín-Benito, E. Sabidó, B. Claasen, S. Madurga, M. Gairí, J. M. Valpuesta, and E. Giralt, "Conformational plasticity and presence of a large side opening on prolyl oligopeptidase revealed by a combined electron microscopy/NMR approach," *Proc Natl Acad Sci USA (Submitted)*, 2008.

- [228] T. Tarrago, E. Sabido, M. J. Kogan, E. de Oliveira, and E. Giralt, "Primary structure, recombinant expression and homology modelling of human brain prolyl oligopeptidase, an important therapeutic target in the treatment of neuropsychiatric diseases," *J Pept Sci*, vol. 11, no. 5, pp. 283–287, 2005.
- [229] D. Leung, G. Abbenante, and D. P. Fairlie, "Protease inhibitors: current status and future prospects," *J Med Chem*, vol. 43, no. 3, pp. 305–341, 2000.
- [230] A. Basak, F. Jean, N. G. Seidah, and C. Lazure, "Design and synthesis of novel inhibitors of prohormone convertases," *Int J Pept Protein Res*, vol. 44, no. 3, pp. 253–261, 1994.
- [231] R. Krishnan, E. Zhang, K. Hakansson, R. K. Arni, A. Tulinsky, M. S. Lim-Wilby, O. E. Levy, J. E. Semple, and T. K. Brunck, "Highly selective mechanism-based thrombin inhibitors: structures of thrombin and trypsin inhibited with rigid peptidyl aldehydes," *Biochemistry*, vol. 37, no. 35, pp. 12094–12103, 1998.
- [232] H. Otto and T. Schirmeister, "Cysteine proteases and their inhibitors," *Chem Rev*, vol. 97, no. 1, pp. 133–172, 1997.
- [233] R. M. McConnell, J. L. York, D. Frizzell, and C. Ezell, "Inhibition studies of some serine and thiol proteinases by new leupeptin analogues," *J Med Chem*, vol. 36, no. 8, pp. 1084–1089, 1993.
- [234] T. Yasuma, S. Oi, N. Choh, T. Nomura, N. Furuyama, A. Nishimura, Y. Fujisawa, and T. Sohda, "Synthesis of peptide aldehyde derivatives as selective inhibitors of human cathepsin L and their inhibitory effect on bone resorption," *J Med Chem*, vol. 41, no. 22, pp. 4301–4308, 1998.
- [235] J. Woo, S. Sigeizumi, K. Yamaguchi, K. Sugimoto, T. Kobori, T. Tsuji, and K. Kondo, "Peptidyl aldehyde derivatives as potent and selective inhibitors of cathepsin L," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 5, no. 14, pp. 1501–1504, 1995.
- [236] I. O. Donkor, R. Korukonda, T. L. Huang, and L. J. LeCour, "Peptidyl aldehyde inhibitors of calpain incorporating P2-proline mimetics," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 13, no. 5, pp. 783–784, 2003.
- [237] T. Sasaki, M. Kishi, M. Saito, T. Tanaka, N. Higuchi, E. Kominami, N. Katunuma, and T. Murachi, "Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins," *J Enzyme Inhib*, vol. 3, no. 3, pp. 195–201, 1990.
- [238] J. O. Westerik and R. Wolfenden, "Aldehydes as inhibitors of papain," *J Biol Chem*, vol. 247, no. 24, pp. 8195–8197, 1972.

- [239] T. Aoyagi, T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, and S. Kondo, "Leupeptins, new protease inhibitors from Actinomycetes," *J Antibiot (Tokyo)*, vol. 22, no. 6, pp. 283–286, 1969.
- [240] D. Durand, B. Gordon Green, J. O'Connell, and S. Grant, "Peptide aldehyde inhibitors of bacterial peptide deformylases," *Arch Biochem Biophys*, vol. 367, no. 2, pp. 297–302, 1999.
- [241] E. Sarubbi, P. Seneci, M. Angelastro, N. Peet, M. Denaro, and K. Islam, "Peptide aldehydes as inhibitors of HIV protease," *FEBS Lett*, vol. 319, no. 3, pp. 253–6, 1993.
- [242] J. A. Fehrentz, A. Heitz, B. Castro, C. Cazaubon, and D. Nisato, "Aldehydic peptides inhibiting renin," *FEBS Lett*, vol. 167, no. 2, pp. 273–276, 1984.
- [243] H. Fu, J. Park, and D. Pei, "Peptidyl aldehydes as reversible covalent inhibitors of protein tyrosine phosphatases," *Biochemistry*, vol. 41, no. 34, pp. 10700–10709, 2002.
- [244] J. Park, H. Fu, and D. Pei, "Peptidyl aldehydes as slow-binding inhibitors of dual-specificity phosphatases," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 14, no. 3, pp. 685–687, 2004.
- [245] J. Park, H. Fu, and D. Pei, "Peptidyl aldehydes as reversible covalent inhibitors of SRC homology 2 domains," *Biochemistry*, vol. 42, no. 17, pp. 5159–5167, 2003.
- [246] C. A. J. Lewis and R. Wolfenden, "Antiproteolytic aldehydes and ketones: substituent and secondary deuterium isotope effects on equilibrium addition of water and other nucleophiles," *Biochemistry*, vol. 16, no. 22, pp. 4886–4890, 1977.
- [247] M. Gamcsik, J. Malthouse, W. Primrose, N. Mackenzie, A. Boyd, R. Russell, and A. Scott, "Structure and stereochemistry of tetrahedral inhibitor complexes of papain by direct NMR observation," *J Am Chem Soc*, vol. 105, no. 20, pp. 6324–6325, 1983.
- [248] N. Mackenzie, J. Malthouse, and A. Scott, "Studying enzyme mechanism by ^{13}C nuclear magnetic resonance," *Science*, vol. 225, no. 4665, pp. 883–9, 1984.
- [249] N. Mackenzie, S. Grant, A. Scott, and J. Malthouse, "Carbon-13 NMR study of the stereospecificity of the thiohemiacetals formed on inhibition of papain by specific enantiomeric aldehydes," *Biochemistry*, vol. 25, no. 8, pp. 2293–2298, 1986.

- [250] S. Bajusz, E. Szell, D. Bagdy, E. Barabas, G. Horvath, M. Dioszegi, Z. Fittler, G. Szabo, A. Juhasz, and E. Tomori, "Highly active and selective anticoagulants: D-Phe-Pro-Arg-H, a free tripeptide aldehyde prone to spontaneous inactivation, and its stable N-methyl derivative, D-MePhe-Pro-Arg-H," *J Med Chem*, vol. 33, no. 6, pp. 1729–1735, 1990.
- [251] J. T. Woo, K. Yamaguchi, T. Hayama, T. Kobori, S. Sigeizumi, K. Sugimoto, K. Kondo, T. Tsuji, Y. Ohba, K. Tagami, and K. Sumitani, "Suppressive effect of N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-tyrosinal on bone resorption in vitro and in vivo," *Eur J Pharmacol*, vol. 300, no. 1-2, pp. 131–135, 1996.
- [252] S. I. Al-Gharabli, S. T. A. Shah, S. Weik, M. F. Schmidt, J. R. Mesters, D. Kuhn, G. Klebe, R. Hilgenfeld, and J. Rademann, "An efficient method for the synthesis of peptide aldehyde libraries employed in the discovery of reversible SARS coronavirus main protease (SARS-CoV Mpro) inhibitors," *Chembiochem*, vol. 7, no. 7, pp. 1048–1055, 2006.
- [253] C. Ganneau, A. Moulin, L. Demange, J. Martinez, and J.-A. Fehrentz, "The epimerization of peptide aldehydes—a systematic study," *J Pept Sci*, vol. 12, no. 7, pp. 497–501, 2006.
- [254] J. Alsina and F. Albericio, "Solid-phase synthesis of C-terminal modified peptides," *Biopolymers*, vol. 71, pp. 454–477, 2003.
- [255] A. Moulin, J. Martinez, and J.-A. Fehrentz, "Synthesis of peptide aldehydes," *J Pept Sci*, vol. 13, no. 1, pp. 1–15, 2007.
- [256] T. L. Voyushina, J. V. Potetinova, E. I. Milgotina, and V. M. Stepanov, "Synthesis of peptide aldehydes via enzymatic acylation of amino aldehyde derivatives," *Bioorg Med Chem*, vol. 7, no. 12, pp. 2953–2959, 1999.
- [257] X. Tong and A. Hong, "Solid phase synthesis of aspartyl peptide aldehydes," *Tetrahedron Lett*, vol. 41, pp. 8857–8860, 2000.
- [258] J. Patterson and R. Ramage, "Solid phase synthesis of peptide C-terminal semicarbazones and aldehydes," *Tetrahedron Lett*, vol. 40, pp. 6121–6124, 1999.
- [259] F. Guillaumie, J. Kappel, N. Kelly, G. Barany, and K. Jensen, "Solid-phase synthesis of C-terminal peptide aldehydes from amino acetals anchored to a backbone amide linker (BAL) handle," *Tetrahedron Lett*, vol. 41, pp. 6131–6135, 2000.

- [260] D. H. Rich, M. A. Brown, and A. J. Barrett, "Purification of cathepsin B by a new form of affinity chromatography," *Biochem J*, vol. 235, no. 3, pp. 731–734, 1986.
- [261] R. Merrifield, "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 85, no. 14, pp. 2149–2154, 1963.
- [262] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, and E. Giralt, *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. Boca Raton: CRC Press, 1997.
- [263] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, and G. Stavropoulos, "2-Chlorotriptyl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage," *Int J Pept Protein Res*, vol. 37, no. 6, pp. 513–520, 1991.
- [264] D. V. Siev and J. E. Semple, "Novel hydrazino-carbonyl-amino-methylated polystyrene (HCAM) resin methodology for the synthesis of P1-aldehyde protease inhibitor candidates," *Org Lett*, vol. 2, no. 1, pp. 19–22, 2000.
- [265] J. Vázquez and F. Albericio, "A convenient semicarbazide resin for the solid-phase synthesis of peptide ketones and aldehydes," *Tetrahedron Lett*, vol. 47, no. 10, pp. 1657–1661, 2006.
- [266] J. Fehrentz, M. Paris, A. Heitz, J. Velek, C. Liu, F. Winternitz, and J. Martinez, "Improved solid-phase synthesis of C-terminal peptide aldehydes," *Tetrahedron Lett*, vol. 36, pp. 7871–7874, 1995.
- [267] J. Fehrentz, M. Paris, A. Heitz, J. Velek, F. Winternitz, and J. Martinez, "Solid phase synthesis of C-terminal peptide aldehydes," *J Org Chem*, vol. 62, pp. 6792–6796, 1997.
- [268] D. Dess and J. Martin, "A useful 12-I-5 triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin periodinane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5 species," *J Am Chem Soc*, vol. 113, no. 19, pp. 7277–7287, 1991.
- [269] G. Sorg, B. Thern, O. Mader, J. Rademann, and G. Jung, "Progress in the preparation of peptide aldehydes via polymer supported IBX oxidation and scavenging by thionyl resin," *J Pept Sci*, vol. 11, no. 3, pp. 142–152, 2005.
- [270] S. Berensmeier, "Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 73, no. 3, pp. 495–504, 2006.
- [271] M. Franzreb, M. Siemann-Herzberg, T. Hopley, and O. Thomas, "Protein purification using magnetic adsorbent particles," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 70, no. 5, pp. 505–516, 2006.

- [272] D. Sehgal and I. Vijay, "A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation," *Anal Biochem*, vol. 218, no. 1, pp. 87–91, 1994.
- [273] M. Meldal, "PEGA: a flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis," *Tetrahedron Lett*, vol. 33, no. 21, pp. 3077–3080, 1992.
- [274] J. C. Powers, J. L. Asgian, O. D. Ekici, and K. E. James, "Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases.," *Chem Rev*, vol. 102, no. 12, pp. 4639–4750, 2002.
- [275] B. Walker and J. F. Lynas, "Strategies for the inhibition of serine proteases.," *Cell Mol Life Sci*, vol. 58, no. 4, pp. 596–624, 2001.
- [276] A. Abuelyaman, D. Hudig, S. Woodard, and J. Powers, "Fluorescent derivatives of diphenyl [1-(N-peptidylamino) alkyl] phosphonate esters: synthesis and use in the inhibition and cellular localization of serine proteases," *Bioconjug Chem*, vol. 5, no. 5, pp. 400–405, 1994.
- [277] A. Belyaev, X. Zhang, K. Augustyns, A. Lambeir, I. De Meester, I. Vedernikova, S. Scharpe, and A. Haemers, "Structure–activity relationship of diaryl phosphonate esters as potent irreversible dipeptidyl peptidase IV inhibitors," *J Med Chem*, vol. 42, no. 6, pp. 1041–1052, 1999.
- [278] J. Bertrand, J. Oleksyszyn, C. Kam, B. Boduszek, S. Presnell, R. Plaskon, F. Suddath, J. Powers, and L. Williams, "Inhibition of trypsin and thrombin by amino (4-amidinophenyl) methanephosphonate diphenyl ester derivatives: X-ray structures and molecular models," *Biochemistry*, vol. 35, no. 10, pp. 3147–3155, 1996.
- [279] J. Fastrez, L. Jaspers, D. Lison, M. Renard, and E. Sonveaux, "Synthesis of new phosphonate inhibitors of serine proteases," *Tetrahedron Lett*, vol. 30, no. 49, pp. 6861–6864, 1989.
- [280] R. Hamilton, B. Walker, and B. Walker, "A convenient synthesis of N-protected diphenyl phosphonate ester analogues of ornithine, lysine and homolysine," *Tetrahedron Lett*, vol. 34, no. 17, pp. 2847–2850, 1993.
- [281] R. Hamilton, G. Kay, R. Shute, J. Travers, B. Walker, and B. Walker, "The synthesis of phosphonate analogues of amino acids and peptides," *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem*, vol. 76, no. 1, pp. 127–130, 1993.
- [282] D. Jackson, S. Fraser, L. Ni, C. Kam, U. Winkler, D. Johnson, C. Froelich, D. Hudig, and J. Powers, "Synthesis and evaluation of diphenyl phosphonate esters as inhibitors of the trypsin-like granzymes A and K and mast cell tryptase," *J. Med. Chem*, vol. 41, pp. 2289–2301, 1998.

- [283] L. Lamden and P. Bartlett, "Aminoalkylphosphonofluoridate derivatives: rapid and potentially selective inactivators of serine peptidases," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 112, no. 3, pp. 1085–90, 1983.
- [284] J. Oleksyszyn, B. Boduszek, C. Kam, and J. Powers, "Novel amidine-containing peptidyl phosphonates as irreversible inhibitors for blood coagulation and related serine proteases," *J Med Chem*, vol. 37, no. 2, pp. 226–231, 1994.
- [285] J. Oleksyszyn and J. Powers, "Irreversible inhibition of serine proteases by peptide derivatives of (alpha-aminoalkyl) phosphonate diphenyl esters," *Biochemistry*, vol. 30, no. 2, pp. 485–493, 1991.
- [286] S. Woodard, "Chymase-directed serine protease inhibitor that reacts with a single 30-kDa granzyme and blocks NK-mediated cytotoxicity," *J Immunol*, vol. 153, no. 11, pp. 5016–5025, 1994.
- [287] C. Wang, T. Taylor, A. Mical, S. Splitz, and T. Reilly, "Synthesis of phosphonopeptides as thrombin inhibitors," *Tetrahedron Lett*, vol. 33, no. 50, pp. 7667–7670, 1992.
- [288] R. Hamilton, B. Walker, and B. Walker, "Synthesis and proteinase inhibitory properties of diphenyl phosphonate analogues of aspartic and glutamic acids," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 8, no. 13, pp. 1655–1660, 1998.
- [289] I. De Meester, A. Belyaev, A. Lambeir, G. De Meyer, N. Van Osse-laer, A. Haemers, and S. Scharpé, "In vivo inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by pro-pro-diphenyl-phosphonate (prodipine)," *Biochemical Pharmacology*, vol. 54, no. 1, pp. 173–179, 1997.
- [290] B. Boduszek, J. Oleksyszyn, C. Kam, J. Selzler, R. Smith, and J. Powers, "Dipeptide phosphonates as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV," *J Med Chem*, vol. 37, no. 23, pp. 3969–3976, 1994.
- [291] B. Gilmore, P. Harriott, and B. Walker, "The inactivation of bovine cathepsin B by novel N-chloro-acetyl-dipeptides: Application of the Houghten 'tea bag' methodology to inhibitor synthesis," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 333, no. 4, pp. 1284–1288, 2005.
- [292] B. Gilmore, J. Lynas, C. Scott, C. McGoohan, L. Martin, and B. Walker, "Dipeptide proline diphenyl phosphonates are potent, irreversible inhibitors of seprase (FAP α)," *Biochem Biophys Res Commun*, 2006.
- [293] B. Gilmore, L. Carson, L. McShane, D. Quinn, W. Coulter, and B. Walker, "Synthesis, kinetic evaluation, and utilization of a biotinylated dipeptide proline diphenyl phosphonate for the disclosure of

- dipeptidyl peptidase IV-like serine proteases," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 347, no. 1, pp. 373–379, 2006.
- [294] S. Hawthorne, R. Hamilton, B. Walker, and B. Walker, "Utilization of biotinylated diphenyl phosphonates for disclosure of serine proteases," *Anal Biochem*, vol. 326, no. 2, pp. 273–275, 2004.
- [295] Y. Nomura, K. Ogawa, Y. Takeuchi, and S. Tomoda, "One-step synthesis and structural confirmation 1-pyrroline trimer," *Chem Lett*, vol. 6, no. 6, pp. 693–696, 1977.
- [296] J. Szewczyk, B. Lejczak, and P. Kafarski, "Transesterification of diphenyl phosphonates using the potassium fluoride/crown ether/alcohol system; Part 1. Transesterification of diphenyl 1-(benzyloxycarbonylamino)-alkanephosphonates," *Synthesis*, vol. 1982, no. 5, pp. 409–412, 1982.
- [297] Y. Nishiyama, H. Taguchi, J. Luo, Y. Zhou, G. Burr, S. Karle, and S. Paul, "Covalent reactivity of phosphonate monophenyl esters with serine proteinases: an overlooked feature of presumed transition state analogs," *Arch Biochem Biophys*, vol. 402, no. 2, pp. 281–288, 2002.
- [298] S. Paul, A. Tramontano, G. Gololobov, Y. Zhou, H. Taguchi, S. Karle, Y. Nishiyama, S. Planque, and S. George, "Phosphonate ester probes for proteolytic antibodies," *J Biol Chem*, vol. 276, no. 30, pp. 28314–28320, 2001.
- [299] L. Ni and J. Powers, "Synthesis and kinetic studies of an amidine-containing phosphonofluoridate: a novel potent inhibitor of trypsin-like enzymes," *Bioorg Med Chem*, vol. 6, no. 10, pp. 1767–1773, 1998.
- [300] M. Kinter and N. Sherman, *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*. John Wiley New York, 2000.
- [301] C. Evans and J. Jorgenson, "Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 378, no. 8, pp. 1952–1961, 2004.
- [302] A. J. Link, J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, and J. R. Yates, "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry," *Nat Biotechnol*, vol. 17, no. 7, pp. 676–682, 1999.
- [303] M. P. Washburn, D. Wolters, and J. R. Yates, "Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology," *Nat Biotechnol*, vol. 19, no. 3, pp. 242–247, 2001.

- [304] M. P. Washburn, "Utilisation of proteomics datasets generated via multidimensional protein identification technology (MudPIT)," *Brief Funct Genomic Proteomic*, vol. 3, no. 3, pp. 280–286, 2004.
- [305] D. A. Wolters, M. P. Washburn, and J. R. Yates, "An automated multi-dimensional protein identification technology for shotgun proteomics," *Anal Chem*, vol. 73, no. 23, pp. 5683–5690, 2001.
- [306] N. Jessani, S. Niessen, B. Wei, M. Nicolau, M. Humphrey, Y. Ji, W. Han, D. Noh, J. Yates III, S. Jeffrey, *et al.*, "A streamlined platform for high-content functional proteomics of primary human specimens," *Nat Methods*, vol. 2, no. 9, pp. 691–697, 2005.
- [307] A. Paoletti, T. Parmely, C. Tomomori-Sato, S. Sato, D. Zhu, R. Conaway, J. Conaway, L. Florens, and M. Washburn, "Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 103, no. 50, p. 18928, 2006.
- [308] J. Pang, N. Ginanni, A. Dongre, S. Hefta, and G. Opitek, "Biomarker discovery in urine by proteomics," *J Proteome Res*, vol. 1, no. 2, pp. 161–9, 2002.
- [309] E. Larrainzar, S. Wienkoop, W. Weckwerth, R. Ladrera, C. Arrese-Igor, and E. Gonzalez, "Medicago truncatula root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress," *Plant Physiology*, vol. 144, no. 3, p. 1495, 2007.
- [310] J. E. Elias, W. Haas, B. K. Faherty, and S. P. Gygi, "Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations," *Nat Methods*, vol. 2, no. 9, pp. 667–675, 2005.
- [311] J. Eng, A. McCormack, and J. Yates, "An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database," *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 5, no. 11, pp. 976–989, 1994.
- [312] J. R. Yates, J. Eng, A. McCormack, and D. Schieltz, "Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database," *Anal Chem*, vol. 67, no. 8, pp. 1426–1436, 1995.
- [313] H. Liu, R. G. Sadygov, and J. R. Yates, "A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics," *Anal Chem*, vol. 76, no. 14, pp. 4193–4201, 2004.

- [314] R. Higdon, J. M. Hogan, G. Van Belle, and E. Kolker, "Randomized sequence databases for tandem mass spectrometry peptide and protein identification," *OMICS*, vol. 9, no. 4, pp. 364–379, 2005.
- [315] R. Matthiesen, *Mass spectrometry data analysis in proteomics*, vol. 367 of *Methods in molecular biology*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2007.
- [316] A. Keller, A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold, "Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search," *Anal Chem*, vol. 74, no. 20, pp. 5383–5392, 2002.
- [317] A. I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, and R. Aebersold, "A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry," *Anal Chem*, vol. 75, no. 17, pp. 4646–4658, 2003.
- [318] A. I. Nesvizhskii and R. Aebersold, "Analysis, statistical validation and dissemination of large-scale proteomics datasets generated by tandem MS," *Drug Discov Today*, vol. 9, no. 4, pp. 173–181, 2004.
- [319] M. Whittaker, C. Floyd, P. Brown, and A. Gearing, "Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors," *Chem Rev*, vol. 99, no. 9, pp. 2735–2776, 1999.
- [320] Y. Li, M. Xu, M. Lai, Q. Huang, J. Castro, J. DiMuzio-Mower, T. Harrison, C. Lellis, A. Nadin, J. Neduvélil, *et al.*, "Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1," *Nature*, vol. 405, no. 6787, pp. 689–694, 2000.
- [321] C. M. Salisbury and B. F. Cravatt, "Activity-based probes for proteomic profiling of histone deacetylase complexes," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 104, no. 4, pp. 1171–1176, 2007.
- [322] K. Boonen, B. Landuyt, G. Baggerman, S. J. Husson, J. Huybrechts, and L. Schoofs, "Peptidomics: the integrated approach of MS, hyphenated techniques and bioinformatics for neuropeptide analysis," *J Sep Sci*, vol. 31, no. 3, pp. 427–445, 2008.
- [323] K. Boonen, G. Baggerman, W. D'Hertog, S. J. Husson, L. Overbergh, C. Mathieu, and L. Schoofs, "Neuropeptides of the islets of Langerhans: a peptidomics study," *Gen Comp Endocrinol*, vol. 152, no. 2-3, pp. 231–241, 2007.
- [324] A. Doblinger, A. Becker, N. G. Seidah, and A. Laslop, "Proteolytic processing of chromogranin A by the prohormone convertase PC2," *Regul Pept*, vol. 111, no. 1-3, pp. 111–116, 2003.

- [325] N. L. Eskeland, A. Zhou, T. Q. Dinh, H. Wu, R. J. Parmer, R. E. Mains, and D. T. O'Connor, "Chromogranin A processing and secretion: specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway," *J Clin Invest*, vol. 98, no. 1, pp. 148–156, 1996.
- [326] R. Kirchmair, R. Hogue-Angeletti, J. Gutierrez, R. Fischer-Colbrie, and H. Winkler, "Secretoneurin—a neuropeptide generated in brain, adrenal medulla and other endocrine tissues by proteolytic processing of secretogranin II (chromogranin C)," *Neuroscience*, vol. 53, no. 2, pp. 359–365, 1993.
- [327] J. Hoffehner, U. Eder, A. Laslop, N. G. Seidah, R. Fischer-Colbrie, and H. Winkler, "Processing of secretogranin II by prohormone convertases: importance of PC1 in generation of secretoneurin," *FEBS Lett*, vol. 360, no. 3, pp. 294–298, 1995.
- [328] J. Marksteiner, R. Kirchmair, S. K. Mahata, M. Mahata, R. Fischer-Colbrie, R. Hogue-Angeletti, A. Saria, and H. Winkler, "Distribution of secretoneurin, a peptide derived from secretogranin II, in rat brain: an immunocytochemical and radioimmunological study," *Neuroscience*, vol. 54, no. 4, pp. 923–944, 1993.
- [329] E. Brandt, F. Petersen, A. Ludwig, J. E. Ehlert, L. Bock, and H. D. Flad, "The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation," *J Leukoc Biol*, vol. 67, no. 4, pp. 471–478, 2000.
- [330] F. S. Vilim, A. A. Aarnisalo, M. L. Nieminen, M. Lintunen, K. Karlstedt, V. K. Kontinen, E. Kalso, B. States, P. Panula, and E. Ziff, "Gene for pain modulatory neuropeptide NPPF: induction in spinal cord by noxious stimuli," *Mol Pharmacol*, vol. 55, no. 5, pp. 804–811, 1999.
- [331] P. Rosa and H. H. Gerdes, "The granin protein family: markers for neuroendocrine cells and tools for the diagnosis of neuroendocrine tumors," *J Endocrinol Invest*, vol. 17, no. 3, pp. 207–225, 1994.
- [332] H. Winkler and R. Fischer-Colbrie, "The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives," *Neuroscience*, vol. 49, no. 3, pp. 497–528, 1992.
- [333] T. Flanagan, L. Taylor, L. Poulter, O. H. Viveros, and E. J. J. Diliberto, "A novel 1745-dalton pyroglutamyl peptide derived from chromogranin B is in the bovine adrenomedullary chromaffin vesicle," *Cell Mol Neurobiol*, vol. 10, no. 4, pp. 507–523, 1990.

- [334] T. Lassmann and E. L. L. Sonnhammer, "Kalign—an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm," *BMC Bioinformatics*, vol. 6, p. 298, 2005.
- [335] J. Oleksyszyn, L. Subotkowska, and P. Mastalerz, "Diphenyl 1-aminoalkanephosphonates," *Synthesis*, no. 12, pp. 985–986, 1979.
- [336] C. Bergin, R. Hamilton, B. Walker, and B. Walker, "Synthesis of diphenyl phosphonate analogues of tyrosine and tryptophan and derived peptides as chymotrypsin inhibitors," *Chem Commun*, no. 10, pp. 1155–1156, 1996.
- [337] G. Han, M. Tamaki, and V. Hruby, "Fast, efficient and selective deprotection of the tert-butoxycarbonyl(Boc) group using HCl/dioxane(4 M)," *J Pept Res*, vol. 58, no. 4, pp. 338–341, 2001.
- [338] A. Miyazaki, Y. Fujisawa, K. Shiotani, Y. Fujita, T. Li, Y. Tsuda, T. Yokoi, S. Bryant, L. Lazarus, and Y. Okada, "Studies on the mechanism of 1, 2-dihydropyrazin-2-one ring formation from dipeptidyl chloromethyl ketone and its chemical properties: immediate deamination during catalytic hydrogenation," *Chem Pharm Bull*, vol. 53, no. 9, pp. 1152–1158, 2005.
- [339] K. Senten, L. Daniels, P. Van der Veken, I. De Meester, A. Lambeir, S. Scharpé, A. Haemers, and K. Augustyns, "Rapid parallel synthesis of dipeptide diphenyl phosphonate esters as inhibitors of dipeptidyl peptidases," *J Comb Chem*, vol. 5, no. 3, pp. 336–344, 2003.
- [340] M. Agamennone, C. Campestre, S. Preziuso, V. Consalvi, M. Crucianelli, F. Mazza, V. Politi, R. Ragno, P. Tortorella, and C. Gallina, "Synthesis and evaluation of new tripeptide phosphonate inhibitors of MMP-8 and MMP-2," *Eur J Med Chem*, vol. 40, no. 3, pp. 271–279, 2005.
- [341] J. Joossens, P. Van der Veken, A. Lambeir, K. Augustyns, and A. Haemers, "Development of irreversible diphenyl phosphonate inhibitors for urokinase plasminogen activator," *J Med Chem*, vol. 47, no. 10, pp. 2411–2413, 2004.
- [342] J. Joossens, P. Van der Veken, G. Surpateanu, A. Lambeir, I. El-Sayed, O. Ali, K. Augustyns, and A. Haemers, "Diphenyl phosphonate inhibitors for the urokinase-type plasminogen activator: optimization of the P4 position," *J Med Chem*, vol. 49, no. 19, pp. 5785–5793, 2006.
- [343] S. Martin and S. Liras, "Novel applications of vinylogous Mannich reactions. Total synthesis of rugulovasines A and B," *J Am Chem Soc*, vol. 115, no. 22, pp. 10450–10451, 1993.

- [344] F. Touchard, "Phosphonate modification for a highly(Z)-selective synthesis of unsaturated esters by Horner-Wadsworth-Emmons olefination," *Eur J Org Chem*, vol. 2005, no. 9, pp. 1790–1794, 2005.
- [345] J. Steere, P. Sampson, and J. Honek, "Synthesis of an α -aminophosphonate nucleoside as an inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 12, no. 3, pp. 457–460, 2002.
- [346] S. Hannour, M. Roumestant, P. Viallefont, C. Riche, J. Martinez, A. El Hallaoui, and F. Ouazzani, "Asymmetric synthesis of (2S, 3R, 4R)-ethoxycarbonylcyclopropyl phosphonoglycine," *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 9, no. 13, pp. 2329–2332, 1998.
- [347] T. Yamagishi, T. Haruki, and T. Yokomatsu, "Diastereoselective alkylation of iminomethylenephosphinates possessing an asymmetric center at the phosphorus atom," *Tetrahedron*, vol. 62, pp. 9210–9217, 2006.
- [348] B. Cox and A. Emili, "Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics," *Nat Protoc*, vol. 1, no. 4, pp. 1872–1878, 2006.
- [349] G. Ha, S. Lee, D. Kang, N. Ha, S. Kim, J. Kim, J. Bae, J. Kim, and C. Lee, "Proteome analysis of human stomach tissue: separation of soluble proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and identification by mass spectrometry," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 15, pp. 2513–24, 2002.
- [350] V. May, E. I. Cullen, K. M. Braas, and B. A. Eipper, "Membrane-associated forms of peptidylglycine α -amidating monooxygenase activity in rat pituitary. Tissue specificity," *J Biol Chem*, vol. 263, no. 16, pp. 7550–7554, 1988.
- [351] P. A. Sykes, S. J. Watson, J. S. Temple, and R. C. J. Bateman, "Evidence for tissue-specific forms of glutaminyl cyclase," *FEBS Lett*, vol. 455, no. 1-2, pp. 159–161, 1999.
- [352] L. Waxman and A. Goldberg, "Protease La, the lon gene product, cleaves specific fluorogenic peptides in an ATP-dependent reaction," *J Biol Chem*, vol. 260, no. 22, pp. 12022–12028, 1985.
- [353] I. Ohkubo, Y. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P. Du, and K. Nishi, "Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: purification, molecular cloning and immunohistochemical localization," *Biol Chem*, vol. 380, no. 12, pp. 1421–1430, 1999.

- [354] B. Vincent, J. Jiracek, F. Noble, M. Loog, B. Roques, V. Dive, J. Vincent, and F. Checler, "Effect of a novel selective and potent phosphinic peptide inhibitor of endopeptidase 3.4.24.16 on neurotensin-induced analgesia and neuronal inactivation," *British Journal of Pharmacology*, vol. 121, no. 4, p. 705, 1997.
- [355] X. Hu, X. Liu, Y. Deng, S. Lin, L. Wu, J. Zhang, L. Wang, X. Wang, X. Li, L. Shen, *et al.*, "Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues," *Cell and Tissue Research*, vol. 325, no. 1, pp. 67–76, 2006.
- [356] C. Mitchelmore, S. Büchmann-Møller, L. Rask, M. West, J. Troncoso, and N. Jensen, "NDRG2: a novel Alzheimer's disease associated protein," *Neurobiology of Disease*, vol. 16, no. 1, pp. 48–58, 2004.
- [357] T. Imai, "Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design," *Drug Metab Pharmacokinet*, vol. 21, no. 3, pp. 173–185, 2006.
- [358] M. Jones and M. Page, "An esterase with -lactamase activity," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, vol. 2, pp. 316–317, 1991.
- [359] T. Satoh and M. Hosokawa, "The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions," *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 38, pp. 257–288, 1998.
- [360] M. Song, Y. Lim, and Y. Ahn, "Unexpected carbon-nitrogen bond hydrolysis of terminal amides catalyzed by porcine liver esterase," *Bull Korean Chem Soc*, vol. 19, no. 12, pp. 1375–1376, 1998.
- [361] J. Thompson, D. Higgins, T. Gibson, *et al.*, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice," *Nucleic Acids Res*, vol. 22, no. 22, pp. 4673–4680, 1994.
- [362] M. Hosokawa, "Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs," *Molecules*, vol. 13, no. 2, pp. 412–431, 2008.
- [363] T. Satoh and M. Hosokawa, "Structure, function and regulation of carboxylesterases," *Chem Biol Interact*, vol. 162, no. 3, pp. 195–211, 2006.
- [364] A. Gunther, R. Schmidt, A. Feustel, U. Meier, C. Pucker, M. Ermert, and W. Seeger, "Surfactant subtype conversion is related to loss of surfactant apoprotein B and surface activity in large surfactant aggregates. Experimental and clinical studies," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 159, no. 1, pp. 244–251, 1999.

- [365] S. Krishnasamy, N. Gross, A. Teng, R. Schultz, and R. Dhand, "Lung surfactant convertase is a member of the carboxylesterase family," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 235, no. 1, pp. 180–184, 1997.
- [366] S. Krishnasamy, A. Teng, R. Dhand, R. Schultz, and N. Gross, "Molecular cloning, characterization, and differential expression pattern of mouse lung surfactant convertase," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 275, no. 5, pp. 969–975, 1998.
- [367] C. Ruppert, A. Bagheri, P. Markart, R. Schmidt, W. Seeger, and A. Gunther, "Liver carboxylesterase cleaves surfactant protein (SP-) B and promotes surfactant subtype conversion," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 348, no. 4, pp. 1449–1454, 2006.
- [368] R. A. Veldhuizen, K. Inchley, S. A. Hearn, J. F. Lewis, and F. Possmayer, "Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates," *Biochem J*, vol. 295 (Pt 1), pp. 141–147, 1993.
- [369] C. Ruppert, C. Pucker, P. Markart, R. Schmidt, F. Grimminger, W. Seeger, J. Sturzebecher, and A. Gunther, "Selective inhibition of large-to-small surfactant aggregate conversion by serine protease inhibitors of the bis-benzamidine type," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 28, no. 1, pp. 95–102, 2003.
- [370] H. Lith, M. Bieman, and B. Zutphen, "Purification and molecular properties of rabbit liver esterase ES-1A," *Eur J Biochem*, vol. 184, no. 3, pp. 545–551, 1989.
- [371] P. G. Blommel, K. J. Becker, P. Duvnjak, and B. G. Fox, "Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition," *Biotechnol Prog*, vol. 23, no. 3, pp. 585–598, 2007.
- [372] F. W. Studier, "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures," *Protein Expr Purif*, vol. 41, no. 1, pp. 207–234, 2005.
- [373] R. C. Tyler, H. K. Sreenath, S. Singh, D. J. Aceti, C. A. Bingman, J. L. Markley, and B. G. Fox, "Auto-induction medium for the production of [U-15N]- and [U-13C, U-15N]-labeled proteins for NMR screening and structure determination," *Protein Expr Purif*, vol. 40, no. 2, pp. 268–278, 2005.
- [374] S. G. Consortium, "Protein production and purification," *Nature Methods*, vol. 5, pp. 135–146, 2008.

- [375] H. Van Lith, G. Meijer, L. Van Zutphen, and A. Beynen, "Plasma esterase-1 (ES-1) activity is increased in rats fed high-fat diets," *Lipids*, vol. 24, no. 1, pp. 86–88, 1989.
- [376] A. Vera, N. Gonzalez-Montalban, A. Aris, and A. Villaverde, "The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures," *Biotechnol Bioeng*, vol. 96, no. 6, pp. 1101–1106, 2007.
- [377] K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, and T. Yura, "Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 64, no. 5, pp. 1694–1699, 1998.
- [378] E. Brusehaber, D. Bottcher, A. Musidlowska-Persson, D. Albrecht, M. Hecker, K. Doderer, and U. T. Bornscheuer, "Identification of pig liver esterase variants by tandem mass spectroscopy analysis and their characterization," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 76, no. 4, pp. 853–859, 2007.
- [379] C. Dalvit, E. Ardini, M. Flocco, G. P. Fogliatto, N. Mongelli, and M. Veronesi, "A general NMR method for rapid, efficient, and reliable biochemical screening," *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 47, pp. 14620–14625, 2003.
- [380] S. Frutos, T. Tarrago, and E. Giralt, "A fast and robust ¹⁹F NMR-based method for finding new HIV-1 protease inhibitors," *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 16, no. 10, pp. 2677–2681, 2006.
- [381] H. Van Lith, M. Haller, B. Van Zutphen, and A. Beynen, "Substrate specificity of purified rabbit liver esterase ES-1," *Eur J Biochem*, vol. 206, no. 2, pp. 527–35, 1992.
- [382] E. Kaiser, R. Colescott, C. Bossinger, and P. Cook, "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides," *Analytical Biochemistry*, vol. 34, no. 2, pp. 595–598, 1970.
- [383] T. Christensen, "A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil," *Acta Chem Scan*, vol. 33, pp. 760–766, 1979.
- [384] A. Madder, N. Farcy, N. Hosten, H. De Muynck, P. De Clercq, J. Barry, and A. Davis, "A novel sensitive colorimetric assay for visual detection of solid-phase bound amines," *Eur J Org Chem*, vol. 2787, p. 2791, 1999.

- [385] A. E. Speers and B. F. Cravatt, "Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods," *Chem Biol*, vol. 11, no. 4, pp. 535–546, 2004.
- [386] P. T. Nyffeler, C.-H. Liang, K. M. Koeller, and C.-H. Wong, "The chemistry of amine-azide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction," *J Am Chem Soc*, vol. 124, no. 36, pp. 10773–10778, 2002.
- [387] B. Carboni, A. Benalil, and M. Vaultier, "Aliphatic amino azides as key building blocks for efficient polyamine syntheses," *J Org Chem*, vol. 58, no. 14, pp. 3736–3741, 1993.
- [388] G. C. Adam, E. J. Sorensen, and B. F. Cravatt, "Trifunctional chemical probes for the consolidated detection and identification of enzyme activities from complex proteomes," *Mol Cell Proteomics*, vol. 1, no. 10, pp. 828–835, 2002.
- [389] C. Cavender and V. Shiner Jr, "Trifluoromethanesulfonyl azide. Its reaction with alkyl amines to form alkyl azides," *J Org Chem*, vol. 37, no. 22, pp. 3567–3569, 1972.
- [390] D. L. Tabb, W. H. McDonald, and J. R. Yates, "DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics," *J Proteome Res*, vol. 1, no. 1, pp. 21–26, 2002.
- [391] U. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [392] N. Anzai, Y. Lee, B. Youn, S. Fukuda, Y. Kim, C. Mantel, M. Akashi, and H. Broxmeyer, "C-kit associated with the transmembrane 4 superfamily proteins constitutes a functionally distinct subunit in human hematopoietic progenitors," *Blood*, vol. 99, no. 12, pp. 4413–21, 2002.