DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE CIÈNCIES
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

PROCARBOXIPEPTIDASA A PORCINA: PROCÉS D'ACTIVACIÓ I ESTRUCTURA PRIMÀRIA DEL SEGMENT ALLIBERAT DURANT LA CONVERSIÓ DEL ZIMÒGEN EN ENZIM ACTIU.

DESENVOLUPAMENT DE MÈTODES ANALÍTICS COMPLEMENTARIS

Tesi presentada per adquirir el grau de Doctor en Ciències Químiques per JOSEP VENDRELL i ROCA, llicenciat en Ciències Químiques.

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

Josep Vendrell i Roca

Dr. Francesc X. Avilés i Puigvert

Bellaterra, 3 d'abril de 1987

Tina: You never been married?
Danny: I was once engaged with a dancer...
Tina: What happened?
Danny: She ran away with a piano player,
and I broke off with her

Woody Allen (*Broadway Danny Rose*)

There will be time, there will be time
To prepare a face to meet the faces that you meet;
...
And time for all the works and days of hands
That lift and drop a question on your plate;
Time for you and time for me,
And time yet for a hundred indecisions,
And for a hundred visions and revisions,
Before the taking of a toast and tea.

T.S. Eliot (*The Love Song of J. Alfred Prufrock*)

En començar aquesta darrera pàgina tinc la sensació que em deixaré molts noms al tinter. Es per això que, abans que tot, vull agrair l'amistat i la bonhomia que he trobat en tots aquells amb qui he coincidit al llarg d'aquests anys

En particular, vull expressar el meu agraïment a les següents persones:

En primer lloc, al Dr. Francesc X. Avilés, per la seva direcció i la seva dedicació al llarg del treball, així com per la correcció i discussió de la present memòria.

Al Dr. Claudi M. Cuchillo, per la meva admissió com a membre del Departament de la seva direcció i per la seva ajuda i col.laboració durant la realització del treball.

A la Dra. Maria Vilanova i a Paco Burgos, companys del grup de recerca amb qui he compartit lloc, temps i experiències, per la seva ajuda i la seva amistat. El mateix vull dir d'aquells que han format part del grup anteriorment, Dres. M. Carmen Martínez i Blanca San Segundo, Teresa Lòpez, Anna Munoz i Esteva Genescà, així com d'aquells que s'hi han incorporat més recentment, Miquel Angel Serra, Roger Pascual i Miquel Salvà. Tots ells, i també els companys del Departament de Bioquímica, han fet especialment agradable el treball.

Al Dr. Enrique Mèndez, per l'ajuda que en tot moment em va proporcionar durant la meva estada al Servicio de Endocrinologia del centre Ramón y Cajal. Agraïment que faig extensiu a tot el seu equip, en especial a Fernando Soriano, per haver-me acollit com un més i per haver fet tan agradable la meva estança a Madrid.

Al Prof. Colyn Crane-Robinson del Biophysics Laboratory, Portsmouth Polytechnic, Anglaterra, per facilitar l'execució dels experiments de ressonància magnètica nuclear de protó, i a Peter Cary i Chris Turner pel seu treball i per la seva amistat.

El treball presentat en aquesta memòria ha estat majoritàriament finançat pels ajuts 0338/81 i 0385/84 de la CAYCIT.

També vull agrair a la European Molecular Biology Organization i a la CIRIT la concessió de sengles ajuts per desplaçaments de curta durada als centres esmentats.

D'una manera molt especial, vull agrair a la meva família l'ajuda, la comprenssió i el recolçament que sempre he rebut. A ells dedico aquest treball, que és també el resultat del seu esforç.

I a la Roser, per estar sempre present.

ÍNDEX

Pàgina

I. INTRODUCCIÓ 1

I.1. ENZIMS PROTEOLÍTICS I ELS SEUS ZIMÒGENS..... 3

I.1.1. Tipus de proteases i les seves funcions..... 4

I.1.2. Evolució dels enzims proteolítics i aparició de zimògens..... 8

I.2. PAPER DELS ZIMÒGENS I ENZIMS PROTEOLÍTICS A LA REGULACIÓ FISIOLÒGICA..... 12

I.2.1. Activació de zimògens per proteòlisi llimitada..... 12

I.2.2. Cascades d'activació de zimògens..... 16

I.3. PÈPTIDS D'ACTIVACIÓ..... 21

I.4. PROCESSOS D'ACTIVACIÓ DE PROPROTEASES..... 27

I.4.1. Quimotripsinògen..... 27

I.4.2. Tripsinògen..... 31

I.4.3. Pepsinògen: precursor d'una proteïnasa àcida..... 34

I.4.4. Dues sulfidril-proteïnases: papaïna i proteïnasa estreptococal..... 37

I.5. ZIMÒGENS PANCREÀTICS DE PROTEASES DIGESTIVES..... 39

I.5.1. Procés de secreció a les cèl.lules exocrines del pàncreas.. 40

I.5.2. Carboxipeptidases i procarboxipeptidases..... 45

I.5.3. Carboxipeptidasa A de pàncreas de bou: estructura i mecanisme d'acció 47

I.5.4. Procarboxipeptidasa A de pàncreas de bou: estructura i mecanisme d'activació..... 53

I.6. CARBOXIPEPTIDASES A I PROCARBOXIPEPTIDASES A DE PÀNCREAS DE PORC..... 57

I.6.1. Carboxipeptidasa A porcina..... 57

I.6.2. Procarboxipeptidasa A porcina..... 58

I.6.3. Segment d'activació de la procarboxipeptidasa A porcina.... 63

I.7. OBJECTIUS D'AQUESTA TESI..... 66

II. MATERIALS I MÈTODES 68

II.1. AÏLLAMENT DE LES PROCARBOXIPEPTIDASES PORCINES I DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ..... 69

II.1.1. Aïllament, a partir de pols de pàncreas, de les dues formes de la procarboxipeptidasa A 69

II.1.2. Separació dels dos protòmers formadors del complex binari. 75

II.1.3. Aïllament del segment d'activació per cromatografia de bescanvi iònic en urea 7M..... 78

II.2. MÈTODES ESPECTROSCÒPICS..... 82

II.2.1. Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat..... 82

II.2.1.a. Determinació de la concentració de proteines... 82

II.2.1.b. Mesura d'activitats enzimàtiques..... 83

II.2.2. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear..... 86

II.3. DIGESTIONS ENZIMÀTIQUES I TRENCAMENTS QUÍMICS..... 88

II.3.1. Reducció i carboximetil.lació de proteïnes..... 88

II.3.2. Digestió amb tripsina..... 89

II.3.3. Digestió amb proteïnasa V-8 de *Staphylococcus Aureus*..... 90

II.3.4. Digestió amb pepsina..... 91

II.3.5. Trencaments químics..... 92

II.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA PRESSIÓ (HPLC)..... 94

II.4.1. Equipament. Consideracions generals..... 94
II.4.1.a. Tractament dels dissolvents..... 96
II.4.1.b. Condicions d'entrada de les mostres..... 97
II.4.2. HPLC de pèptids..... 98
II.4.2.a. Tipus de columnes utilitzades..... 101
II.4.2.b. Mapes peptídics per HPLC..... 101
II.4.2.c. Purificació de pèptids no homogenis..... 102
II.4.3. HPLC de proteïnes..... 105
II.4.3.a. Tipus de columnes utilitzades..... 107
II.4.3.b. Separació analítica de proteïnes..... 108
II.4.3.c. Aïllament preparatiu del segment d'activació... 110
II.4.3.d. Purificació de tripsina comercial..... 111
II.4.4. Apèndix: Regeneració de columnes de HPLC deteriorades.... 113

II.5. MAPES PEPTIDICS EN CAPA FINA..... 116

II.5.1. Cromatografia monodimensional..... 116
II.5.2. Mapes peptídics bidimensionals..... 117
II.5.3. Tinció amb fluorescamina..... 118
II.5.4. Tincions de residus específics..... 118

II.6. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS PER DERIVATITZACIÓ AMB CLORUR DE DABSIL I HPLC..... 120

II.6.1. Materials i instrumentació..... 121

II.6.2. Tractament químic de les mostres..... 122
II.6.2.a. Derivats d'aminoàcid proteïnogènics..... 122
II.6.2.b. Tractament amb BTI..... 122
II.6.3. Hidròlisi àcida de proteïnes i pèptids..... 123
II.6.4. Tría de les condicions de dabsilació..... 124
II.6.5. Procediment de dabsilació estàndard..... 124
II.6.6. Separació cromatogràfica de Dabsil-AA..... 125
II.6.7. Programa de càlcul d'anàlisis d'aminoàcids i

localització de seqüències..... 127

II.7. SEQUENCIACIÓ DE PÈPTIDS I PROTEÏNES..... 129

II.7.1. La degradació d'Edman..... 129
II.7.2. Seqüenciació automàtica..... 132
II.7.3. Conversió ATZ-PTH..... 134
II.7.4. Identificació de PTH's..... 134
II.7.4.a. Identificació per capa fina i retrohidròlisi... 134
II.7.4.b. Identificació per HPLC..... 135
II.7.5. Seqüenciació manual..... 136

II.8. TÈCNIQUES ELECTROFORÈTIQUES..... 137

II.8.1. Materials..... 137
II.8.2. Electroforesi discontínua de SDS..... 137
II.8.3. Electroforesi en urea-SDS..... 140
II.8.4. Electroforesi en urea 7 M..... 143
II.8.5. Electroforesi en gradient d'urea transversal..... 144
II.8.6. Tinció dels gels..... 146

II.9. SEGUIMENT DEL PROCÉS D'ACTIVACIÓ DE LES PROCARBOXIPEPTIDASES A... 147

II.9.1. Condicions d'activació..... 147
II.9.1.a. Tampons utilitzats..... 148
II.9.1.b. Tipus de tripsina utilitzats..... 148
II.9.1.c. Relacions proteïna/tripsina..... 148
II.9.2. Seguiment de la generació d'activitat CPA..... 149
II.9.3. Seguiment de l'activació per electroforesi..... 149
II.9.4. Seguiment de l'activació per HPLC..... 151
II.9.5. Estudis d'inhibició de les carboxipeptidases A..... 151

III. RESULTATS I DISCUSSIÓ 153

III.1. HPLC DE PROTEÏNES I PÈPTIDS..... 155

III.1.1. Estudi de condicions cromatogràfiques per a proteïnes.. 156

III.1.1.a. H_2O + TFA 0,1% / acetonitril 80% + TFA 0,1%. 157

III.1.1.b. H_2O + TFA 0,1% / isopropanol + TFA 0,1%..... 159

III.1.1.c. TEAP 0,25 o 0,1 M, pH 2,5 / idem en acetonitril
TEAP 25 mM, pH 6,5 / idem en acetonitril.... 160

III.1.1.d. Piperazina 10 mM, pH 6,5, ajustat amb TFA;
/ idem en * acetonitril 60%
* isopropanol 50%..... 160

III.1.2. Factors que condicionen la recuperació cromatogràfica
de proteïnes..... 166

III.1.2.a. Relació temps de retenció - recuperació..... 166

III.1.2.b. Relació quantitat aplicada - recuperació.... 168

III.1.2.c. Relació concentració de sals - recuperació.. 168

III.1.3. Separació cromatogràfica de proteïnes..... 173

III.1.3.a. Separació analítica de PCPAs i CPA..... 173

III.1.3.b. Aïllament preparatiu del segment d'activació
de la procarboxipeptidasa A monomèrica..... 177

III.1.4. Metodologia per a mapes peptídics..... 180

III.1.5. Purificació de pèptids per recromatografia..... 180

III.1.6. Anàlisi de la generació de fragments del segment
d'activació per acció tríptica..... 184

III.2. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS PER DABSILACIÓ-HPLC..... 187

III.2.1. Millora de l'eficiència i homogeneïtat de
la derivatització.....

III.2.1.a Segons els àcids utilitzats..... 190

III.2.1.b. Segons el tipus de dissolució amortidora,
la força iònica i el dissolvent orgànic
utilitzats..... 192

III.2.1.c. Segons la concentració de clorur de dabsil.. 193
III.2.1.d. Segons la relació dissolvent aquós:orgànic.. 196
III.2.1.e. Segons el pH de derivatització..... 197
III.2.2. Estabilitat i emmagatzemament dels dabsil-aminoàcids... 199
III.2.3. Cromatografia ràpida i cromatografia d'alta resolució.. 201
III.2.4. Anàlisi de residus àcid-làbils..... 205
III.2.5. Anàlisi d'aminoàcids modificats..... 206
III.2.6. Sensibilitat de mètode..... 208
III.2.7. Reproduïbilitat del mètode..... 208

III.3. IDENTITAT DE LES DUES FORMES DE PROCARBOXIPEPTIDASA A..... 211

III.3.1. Mapes peptídics comparatius..... 213
III.3.1.a. Per cromatografia en capa fina..... 213
III.3.1.b. Per HPLC..... 213
III.3.1.c. Detecció de residus específics als mapes de HPLC..... 216
III.3.2. Identitat dels segments d'activació..... 217
III.3.3. Activació de les formes monomèriques..... 219
III.3.4. Activació dels complexes binaris..... 222
III.3.5. Disminució de l'activitat intrínseca per addició de proproteïnasa E..... 224
III.3.6. Característiques de la interacció PPE-PCPA..... 226

III.4. SEQÜENCIACIÓ DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ..... 231

III.4.1. Seqüenciació N-terminal de la PCPA..... 231
III.4.2. Digestions tríptiques..... 232
III.4.2.a. Mapes peptídics del segment d'activació per HPLC..... 232
III.4.2.b. Anàlisi per capa fina. Detecció de residus específics..... 236
III.4.2.c. Anàlisi d'aminoàcids dels pèptids obtinguts. 237
III.4.2.d. Mapes tríptics de la PCPA i la CPA. Aïllament de pèptids diferencials..... 239
III.4.2.e. Anàlisi d'aminoàcids de pèptids tríptics

de PCPA..... 241
III.4.2.f. Seqüenciació de pèptids tríptics..... 242
III.4.3. Digestió amb proteïnasa V-8 de *Staphylococcus Aureus*... 246
III.4.3.a. Mapes peptídics del segment d'activació digerit amb V-8..... 246
III.4.3.b. Anàlisi d'aminoàcids dels pèptids de V-8.... 249
III.4.3.c. Seqüenciació automàtica de pèptids de V-8... 251
III.4.4. Digestió del segment d'activació amb pepsina..... 253
III.4.4.a. Seqüenciació automàtica de pèptids pepsínics 256
III.4.4. Trencaments químics del segment d'activació..... 257
III.4.6. Estructura primària del segment d'activació..... 259
III.4.7. Homologia amb la seqüència corresponent a pàncreas de rata..... 262
III.4.8. Estudis conformacionals inicials..... 264
III.4.8.a. Predició d'estructura secundària..... 264
III.4.8.b. Estudis de ressonància magnètica nuclear.... 267
III.4.9. Apèndix: programa de càlcul i localització de les dades d'anàlisi d'aminoàcids..... 271

III.5. PROCES D'ACTIVACIÓ DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A MONOMÈRICA COMPARACIÓ AMB EL COMPLEX BINARI..... 275

III.5.1. Generació d'activitat CPA..... 277
III.5.2. Seguiment de l'activació per electroforesi homogènia... 283
III.5.2.a. Electroforesi en urea 7M - SDS..... 284
III.5.2.b. Electroforesi en urea 7 M..... 287
III.5.3. Comparació entre les dues formes de PCPA..... 292
III.5.4. Seguiment de l'activació de la PCPA II per HPLC analítica..... 293
III.5.5. Aïllament per HPLC dels pèptids generats..... 297
III.5.6. Caracterització N-terminal dels pèptids generats..... 300
III.5.7. Anàlisi de la capacitat inhibidora dels pèptids generats durant l'activació..... 302
III.5.8. Seguiment de l'activació de la PCPA monomèrica per electroforesi en gradient d'urea transversal..... 305
III.5.9. Model proposat pel procés d'activació de la PCPA

monomèrica..... 308

IV. DISCUSSIÓ GENERAL 315

V. CONCLUSIONS 333

VI. BIBLIOGRAFIA 339

ABREVIACIONS D'ÚS MES FREQUENT

-A: Absorbància

-ATZ: Anilinotiazolinona

-Bisacrilamida: N,N' metilendiacrilamida

-BGP: Benzoïlglicil-L-Fenilalanina

-BPTI: Inhibidor de tripsina de pàncreas bovi

-BTI: Bis(I,I-trifluoroacetoxi)iodo benzè

-CA: Carbònic anhidrasa

-Cl-Dabsil: Clorur de dimetilaminoazobenzèsulfonil

-CPA: Carboxipeptidasa A

-CPB: Carboxipeptidasa B

-DABA: Acid diaminobutíric

-DAPA: Acid diaminopropiònic

-DEAE Sepharose: Dietilaminoetil-Sepharose

-DiFP: Diisopropilfluorofosfat

-EDTA: Acid etilendiaminotetraacètic

-FID: *Free induction decay*

-HPLC: Cromatografia líquida d'alta pressió

-Liz: Lisozima

-MS: Acid metansulfònic

-M_r: Pes molecular aparent

-nm: Nanòmetres

-OPA: o-ftalaldehid

-Ovo: Ovoalbúmina

-PCPA: Procarboxipeptidasa A

-PCPA-I: Procarboxipeptidasa A complex binari

-PCPA-II: Procarboxipeptidasa A monomèrica

-PCPB: Procarboxipeptidasa B

-PE: Proteïnasa E

-PPE: Proproteïnasa E

-PMSF: Fluorur de p-toluèsulfonil

-PTC: Feniltiocarbamil

-PTH: Feniltiohidantoïna

-PTS: Acid p-toluensulfònic

-P : Probabilitat de formació d'hèlix

-P : Probabilitat de formació de gir

-QT: Quimotripsina

-QTg: Quimotripsinògen

-RMN: Ressonància magnètica nuclear

-RNasa A: Ribonucleasa A

-RCS: *Ring current shifts*

-saA: Segment d'activació de la procarboxipeptidasa A

-STI: inhibidor de tripsina de soja

-TEMED: N,N,N',N', tetrametiletilendiamina

-TFA: àcid trifluoroacètic

-TPCK: N-tosil-L-fenilalanil-clorometil cetona

-Tris: Tris-(hidroximetilaminometà)

-UAEC: Unitats d'absorció a escala completa

-UV: Ultraviolat

- λ: Longitud d'ona

- δ: Desplaçament químic

I. INTRODUCCIÓ

Es coneix com a segment d'activació de la procarboxipeptidasa A al fragment proteic situat a l'extrem N-terminal de la molècula que és separat de l'enzim actiu durant l'activació del zimògen per proteòlisi limitada. Aquest treball té el seu fonament en l'estudi de l'estructura i del procés de degradació d'aquest segment d'activació.

El conjunt de coneixements actuals sobre els segments o pèptids d'activació de diferents zimògens és força escàs, i només era esquemàtic pel que fa al que és objecte del nostre estudi en el moment que el nostre grup va interessar-se per aquest tema. D'antuvi, la seva llargada, aproximadament 100 residus, li conferia ja un interés intrínsec al seu estudi estructural. Successives experiències ens demostraren la validesa de l'interés inicial: es va comprovar que el segment d'activació de la procarboxipeptidasa A presenta una resistència molt marcada a la degradació tríptica, que en estat aïllat és un potent inhibidor de l'activitat carboxipeptidasa A de l'enzim i que posseeix una estructura globular prou compacta com per a deduir-ne que constitueix un domini estructural dins del zimògen.

El segment o pèptid d'activació és el que diferencia, a nivell d'estructura primària, a les proteïnes actives dels seus zimògens. En el cas que ens ocupa, aquestes proteïnes actives són proteases. La introducció d'aquest treball, partint d'aquests conceptes, vol donar una visió general sobre l'estructura d'aquestes biomolècules, sobre la seva activació i sobre els mecanismes de control que la regulen, enfocant l'interés en la família de zimògens pancreàtics i particularment en els que són objecte d'aquest estudi.

I.1. ENZIMS PROTEOLÍTICS I ELS SEUS ZIMÒGENS

Els enzims proteolítics o proteases catalitzen la hidròlisi d'enllaços peptídics en altres proteïnes. Les proteases es compten entre els primers enzims en ésser reconeguts, purificats i cristal.litzats. Gràcies als estudis amb ells duts a terme es va poder establir alguns dels moderns conceptes d'especificitat enzimàtica i definir el paper de residus aminoàcids específics en els mecanismes de catàlisi. Des del descobriment de la tripsina per part de Kühne (1876) s'ha recollit un cabdal d'informació suficient com per afirmar que les proteases són un dels tipus d'enzims més ben estudiats.

Els zimògens són els precursors inactius de proteïnes fisiològicament actives. Inicialment, el terme fou aplicat només als precursors d'enzims proteolítics digestives com tripsinògen, quimotripsinògen o procarboxipeptidasa. Fa ja temps que és evident que molts altres processos biològics impliquen la conversió d'una forma inactiva d'una proteïna en la seva forma activa. Entre aquests processos es pot anomenar la coagulació de la sang (Davie i Fujikawa, 1975), l'activació del complement (Müller-Eberhard, 1975), la producció d'hormones (Steiner et al., 1975), l'engalzament d'estructures supramoleculars (Laemmli, 1975), i d'altres. El pas d'una forma a l'altra es produeix per hidròlisi enzimàtica selectiva d'enllaços peptídics a càrrec d'una proteasa, però el producte no és sempre una proteïna amb activitat enzimàtica. Aquest és el cas d'alguns dels exemples abans esmentats o també, per exemple, el de la ovoalbúmina al passar a placalbúmina, procés que va motivar la introducció del terme "proteòlisi limitada" (Lang i Ottessen, 1949). El concepte de zimògen és per tant més ample que el de precursor d'enzim proteolític i el concepte de forma activa d'una proteïna més ample que el de proteïna amb activitat enzimàtica.

I.1.1. TIPUS DE PROTEASES I LES SEVES FUNCIONS

Les proteases es classifiquen en base als seus mecanismes enzimàtics, posats de relleu mitjançant la seva susceptibilitat a diferents inhibidors. Aquesta peculiar classificació, no basada en origen o funció fisiològica, fa que dins d'una mateixa família de proteases pugui haver-hi representades diverses funcions fisiològiques. A la taula I.1 pot veure's la classificació de les proteases segons

TAULA I.1

CLASSIFICACIÓ DE PROTEASES SEGONS MECANISMES CATALÍTICS

	Identificació			
Tipus	Característica	Inhibidors	Exemple	Funció
Serina-proteïnases I	Serina "activa"	Fluorofosfats	Tripsina	Digestió
			Trombina	Coagulació
			Plasmina	Lisi del coàgul
Serina-proteïnases II			Subtilisina	Digestió
Metal.loexopeptidasa	Zn^{2+}	o-fenantrolina	Carboxipeptidasa	Digestió
Sulfidril-proteïnasa	CySH	iodoacetat	Papaïna	Digestió
			Catepsina B	Digestió intracel.lular
Proteïnasa àcida	pH òptim àcid	diazocetones	pepsina	Atac denaturalitzador
			quimosina	Coagulació de la llet
Metal.loendopeptidasa	Zn^{2+}, Ca^{2+}	o-fenantrolina	termolisina	Digestió

Hartley (1960) i Neurath (1984). Convé a la vegada esmentar una classificació complementària que classifica les proteases segons el lloc on actúen sobre la proteïna substracte: són exopeptidases o peptidases les que hidrolitzen els enllaços dels extrems de la cadena polipeptídica, mentre que es coneix com endopeptidases o proteïnases

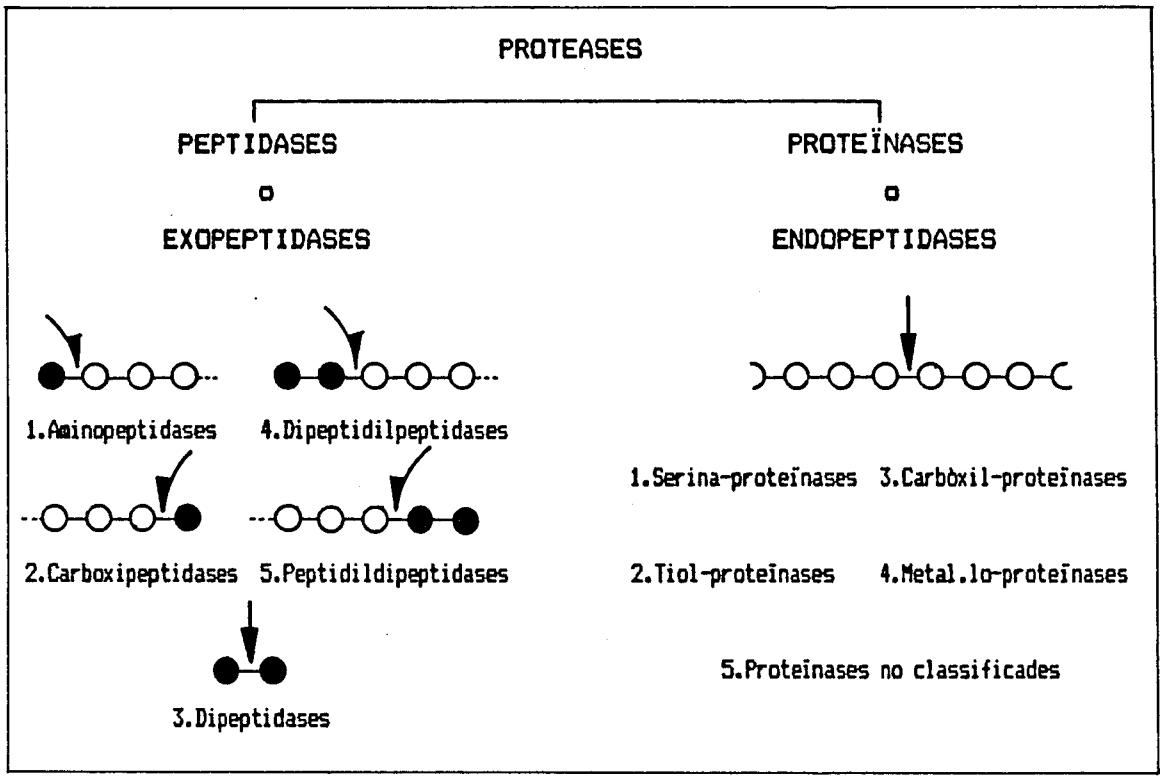


FIGURA I.1. Els dos grups generals de proteases

les que hidrolitzen enllaços de l'interior de la proteïna. A la Figura I.1 es pot veure un diagrama transcrit de Barrett (1980) amb aquesta classificació. Pot comprovar-se que dintre de les endopeptidases hi ha totes les famílies de la Taula I.1 excepte, òbviament, les metal.loexopeptidases.

Tornant a la classificació feta segons mecanismes catalítics, es comprova que podem definir un mínim de cinc famílies de proteases, d'entre les que les serina-proteïnases són les més estudiades i les millor caracteritzades. Dintre d'aquest grup d'enzims proteolítics es troben els enzims digestius tripsina i quimotripsina, les proteïnases originades durant el procés de coagulació de la sang, la plasmina, responsable de la digestió del coàgul de fibrina, l'acrosina, essencial a la fertilització, i molts altres enzims relacionats amb el control biològic. Les serina-proteïnases presenten grans similituds entre les

seves estructures tridimensionals i conserven el mateix mecanisme catalític per hidrolitzar enllaços peptídics (Stroud et. al., 1975). Aquest mecanisme, conegut com "charge relay" (relé de càrrega) o "proton shuttle" (llançadera de protó) implica la participació, en tots els casos estudiats, de tres tipus de residus específics presents al centre actiu: histidina, aspàrtic i serina, que capten un protó seqüencialment. La catàlisi només és efectiva quan l'aspàrtic està carregat negativament. Les diferències de funció entre les serina-proteïnases es relacionen fonamentalment amb diferències en la seva capacitat per a reconèixer i fixar selectivament un determinat tipus de substrat.

Dintre del grup de les metal.loexopeptidases es troba la carboxipeptidasa A, enzim alliberat després de l'activació de la procarboxipeptidasa A. Les característiques tant del zimògen com de l'enzim actiu seran àmpliament comentades més endavant.

Les metal.loendopeptidases constitueixen el grup menys conegut de proteïnases, amb característiques seqüencials i conformacionals ben diferents de les dels altres grups. Exemples dins d'aquest grup són la termolisina, la proteïnasa neutra de *B. subtilis* o la colagenasa. En el cas concret de la termolisina i la proteïnasa neutra, el mecanisme catalític sembla tenir resemblances amb el de la carboxipeptidasa A per un cantó i amb el de les serina-proteïnases per l'altre (Pangburn i Walsh, 1975).

La papaïna i les catepsines B, H i L són exemples de sulfidril proteases o tiol-proteases (Barrett, 1980). L'activitat proteolítica depèn en aquest grup del caràcter nucleofílic d'una cisteïna i de la presència d'un residu histidina a la clivella del centre actiu.

El grup de les proteïnases àcides o carbòxil-proteïnases es caracteritza per la dependència de la seva activitat en un medi fortament àcid. La pepsina (digestió) i la quimosina (coagulació de la llet) són exemples de proteïnases àcides.

Al classificar-se les proteases en raó del seu mecanisme catalític, res no s'ha dit encara de les seves funcions fisiològiques. Aquestes són múltiples, com pot comprovar-se a la Taula I.2. Dues són, però, les funcions generals que podem adjudicar a les proteases: nutrició i

control. A més hi ha una tercera funció que té relació amb les altres dues: comunicació intercel.lular (Walsh, 1975). Els enzims que intervenen a la digestió extracel.lular són exemples de proteases relacionades amb la nutrició, mentre que les proteases del procés de coagulació de la sang formen part d'un mecanisme en cascada que és per

TAULA I.2

ALGUNES REACCIONS FISIOLÒGIQUES INDUÏDES PER ENZIMS PROTEOLÍTICS (transcrit de Neurath, 1984)

Resposta fisiològica normal	Resposta a estímuls externs	Resposta programada
Productes vasoactius	Digestió	Desenvolupament
Angiotensina	Pepsinogen	Prococonasa
Precalicreina	Proquimosina	Procol.lagenasa
Quininogen	Tripsinogen	Proacrosina
Hormones	Quimotripsinogen	Fibrinòlisi
Proinsulina	Profosfolipasa	Plasminogen
Proglucagó	Procarboxipeptidases	Toxines
Hormona proparatiroide	Proelastasa	Promelitina
Enzims	Coagulació sanguínea	Autoensamblatge
Protirosinasa	Factors VII, IX, X	Procol.làgena
Profenoloxidasa	Protrombina	Proteïnes de la càpsida dels fags.
Prorrennina	Factor XIII	
	Fibrinogen	
	Sistema complement	
	Factors C_3, C_5	
	Precursor properdina	

ell mateix un factor de control biològic. L'activació del tripsinògen pancreàtic per l'enteroquinasa duodenal és un exemple de comunicació intercel.lular com també ho és la inducció per part de teixits ferits de l'alliberament de zimògens a la sang i de la seva conversió a enzims actius, enzims que més tard activaran la formació dels coàguls de fibrina. El primer dels exemples té relació amb la nutrició, el segon amb el control biològic.

I.1.2. EVOLUCIÓ DELS ENZIMS PROTEOLÍTICS I APARICIÓ DE ZIMÒGENS

Els enzims proteolítics són presents a totes les formes d'organismes vius. Les seves funcions són relativament simples a organismes primitius i més complexes i diversificades a organismes superiors.

Hom creu que els enzims proteolítics van aparèixer a les primeres fases de l'evolució biològica (Neurath, 1984), donat que els organismes més primitius devien haver-los necessitat per a la digestió de les seves pròpies proteïnes. Es pot demostrar que algunes proteases digestives de mamífers comparteixen el mateix origen ancestral amb altres d'origen microbià (James, 1980). Les proteases que originalment tenien només funcions digestives van anar adaptant-se a tasques més complexes i específiques de regulació biològica (Neurath i Walsh, 1976). L'evolució dels enzims proteolítics és per tant, i essencialment, el resultat de la restricció i el refinament del procés d'hidròlisi enzimàtica d'enllaços peptídics. Una d'aquestes restriccions a l'acció hidrolítica és el que es coneix com "proteòlisi limitada" o trencament selectiu d'enllaços peptídics (comentat més endavant), resultat de l'evolució dels requeriments estructurals necessaris per a la interacció proteasa-proteïna substrat.

Com ja s'ha dit anteriorment, les proteases es classifiquen segons el seu mecanisme catalític. En general, aquest es basa en la pol.larització de l'enllaç peptídic per atac nucleofílic sobre l'enllaç carboni-oxigen i la donació paral.lela d'un protó a l'àtom de nitrògen (Figura I.2). En cada una de les famílies de proteases hi ha residus específics que compleixen les funcions de nucleòfils i de donadors de protons. L'analogía entre configuracions del centre actiu i residus catalítics en ell presents, permet deduir que els membres d'una mateixa família han evolucionat a partir d'un mateix ancestre comú (Walsh, 1975). Així, per exemple, succeix amb les serina-proteïnases pancreàtiques tripsina, quimotripsina, elastasa i trombina, que posseeixen els mateixos residus catalítics característics (His, Asp i Ser) en posicions seqüencials equivalents. Per altra banda, moltes de

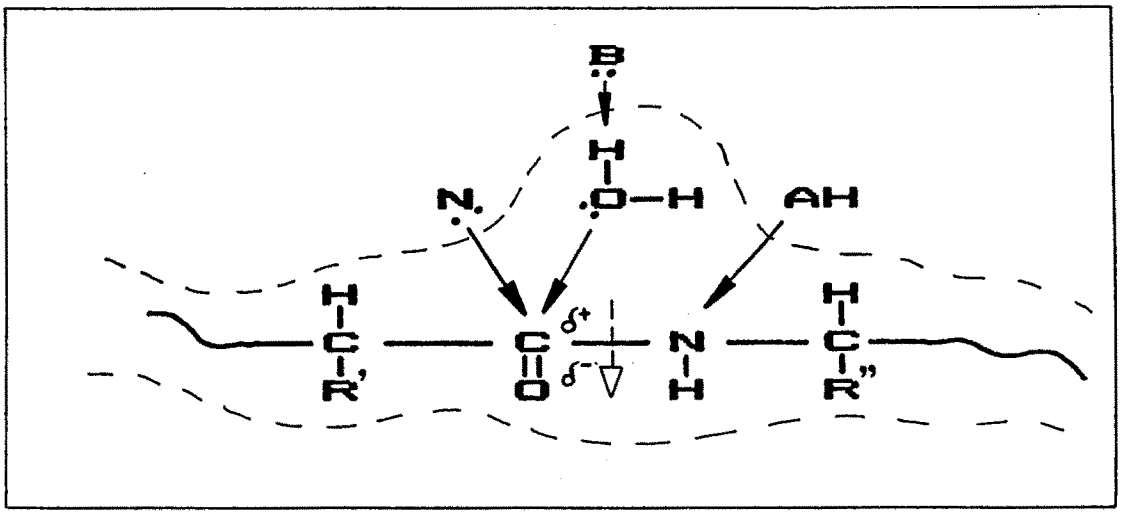


FIGURA I.2. Mecanisme general d'hidròlisi enzimàtica de l'enllaç peptídic. L'atac sobre el carboni del grup carbonil es produeix directament per un grup nucleòfil (N) o per acció d'una base (B) a través d'una molècula d'aigua, i es combina amb la donació d'un protó (per part d' AH) sobre l' àtom de nitrògen.

les proteïnases de la cascada de la coagulació de la sang són serina-proteïnases relacionades amb la tripsina pancreàtica, encara que, com veurem més tard, amb la important diferència de l'addició d'una cadena polipeptídica unida covalentment.

A partir d'un ancestre comú pot produir-se evolució divergent, que implica l'aparició de proteïnes amb funció, centre actiu, seqüència i estructura tridimensional similars o relacionades. Per altra banda, una evolució convergent o independent dóna lloc a proteïnes que presenten funcions, i fins i tot centres actius similars, malgrat que les seves seqüències i estructures tridimensionals siguin diferents (Doolittle, 1981). Les relacions evolutives deduïdes a partir de la comparació d'estructures primàries o tridimensionals tenen bones correlacions amb les que es deriven d'evidències taxonòmiques. Un exemple de relació evolutiva ben establerta el constitueix la tripsina: per comparació de les seqüències de la tripsina d'un organisme microbià (*Streptomices*

griseus), d'una espècie invertebrada (la de l'hepatopàncreas d'*Astacus fluviatilis*) i de la tripsina pancreàtica de bou, s'ha comprovat que tots els residus funcionals de la tripsina bovina són presents a posicions anàlogues als altres dos enzims (Titani et al., 1983). La seqüència d'aminoàcids de l'espècie invertebrada té un 40% d'analogies tant amb la tripsina bovina com amb la d'origen microbià i es pot considerar que la tripsina d'aquest peix representa un nexe d'unió entre les serina-proteïnases procariòtiques i de vertebrats.

L'evolució de funcions enzimàtiques pot produir-se en general per duplicació gènica o per fusió i rearrenglerament de fragments de gens (Neurath, 1984). Productes de duplicació gènica ho són els ja anomenats enzims pancreàtics tripsina, quimotripsina, elastasa i trombina. Les diferències en l'especifitat d'aquests enzims poden adjudicar-se a mutacions produïdes al gen duplicat que introdueixen canvis a certs residus aminoàcids implicats en la fixació de la proteïna substrat (Hartley, 1970), dels que se'n pot veure un diagrama comparatiu a la Figura I.3. Les proteases producte d'una evolució per addició o delecció

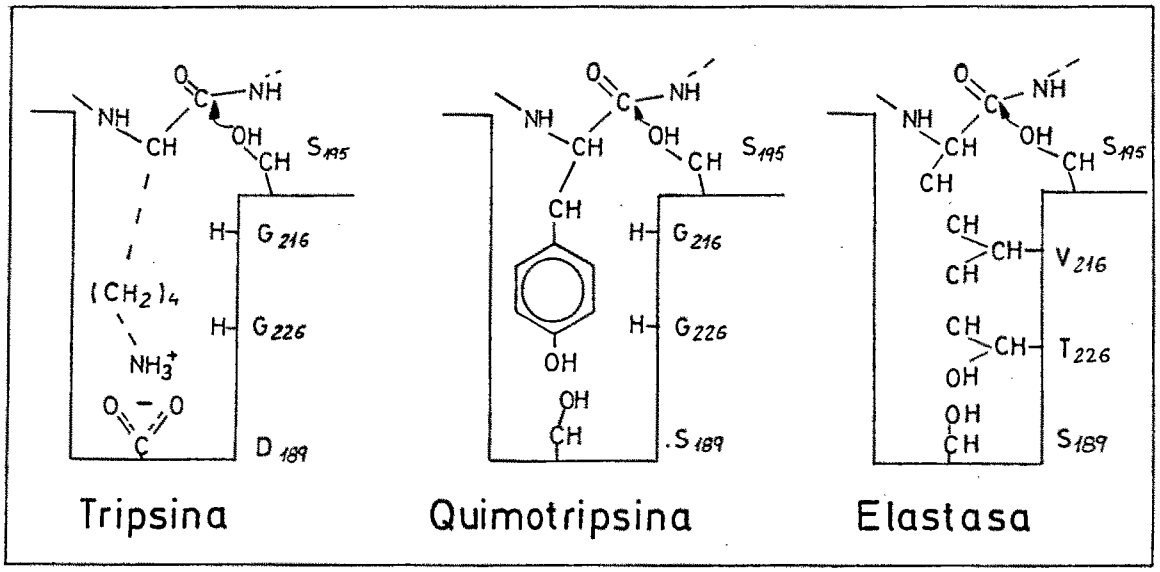


FIGURA I.3. Esquema del centre de fixació de substrats de tres serina-proteïnases digestives. Es pot observar còm petites diferències seqüencials provoquen una gran diferència en la selectivitat de reconeixement de substrats.

de fragments de DNA solen ser aquelles que compleixen funcions reguladores. Per exemple, les serina-proteïnases amb funcions reguladores (e.g., enteroquinasa) solen contenir dues cadenes polipeptídiques, de les que una presenta homologies amb les serina-proteïnases digestives.

La reacció catalitzada pels enzims proteolítics, el trencament d'enllaços peptídics, és un procés essencialment irreversible que requereix d'un control per evitar que no es doni més que allà i quan sigui necessari. En altres paraules, els enzims proteolítics són, a més d'una necessitat fisiològica un perill potencial pels organismes que els sintetitzen. D'aquí vé que al llarg de l'evolució s'han desenvolupat dos mecanismes de regulació d'aquesta activitat: (a) inactivació per interacció amb inhibidors específics i (b) formació de precursors inactius anomenats zimògens. Es força probable que al llarg de l'evolució els zimògens hagin aparegut més tard que els enzims corresponents, donat que s'han trobat relativament pocs zimògens a procariotes o en organismes eucariòtics inferiors. Per altra part, la homologia seqüencial observada dintre d'una mateixa família de proteïnases no s'observa quan es comparen les seqüències dels seus segments d'activació, la qual cosa fa pensar que en primer lloc foren els enzims, als que posteriorment s'hi uniren els fragments peptídics corresponents per a poder formar el zimògen.

I.2. PAPER DELS ZIMÒGENS I ELS ENZIMS PROTEOLÍTICS A LA REGULACIÓ BIOLÒGICA

La síntesi de proteïnes en forma de zimògens o precursors inactius és un mecanisme de control i regulació de la seva activitat fisiològica. Com hem vist en paràgrafs anteriors, els zimògens són presents a un gran nombre de processos biològics de característiques diferents, i en la pràctica totalitat dels casos l'agent activador responsable del pas de zimògen a forma activa és una proteasa. Els zimògens d' enzims proteolítics i les seves formes actives són un model ideal per a l'estudi del procés de transformació dels precursors en formes fisiològicament actives (procés d' activació): el zimògen, subjecte passiu de l'activació, dóna lloc a una proteasa, possible subjecte actiu de processos similars.

I.2.1. ACTIVACIÓ DE ZIMÒGENS PER PROTEÒLISI LIMITADA

L'activació de zimògens comporta sempre el trencament selectiu d'enllaços peptídics. Aquest procés, conegut com proteòlisi limitada, és el resultat de l'especialització dels enzims proteolítics al llarg de l'evolució. L'especificitat de la proteòlisi limitada s'explica en termes d'estructura tridimensional i d'encaix mutu entre la proteïna substrat i la configuració del centre actiu de la proteasa. Com més riguroses siguin les condicions d'interacció, major serà la selectivitat de l'enzima i més petit el nombre d'enllaços que podrà hidrolitzar (Neurath, 1980). Un exemple extrem de l'elevat grau d'especificitat que es comenta el constitueix l'enteroquinasa, una serina-proteïnasa secretada per les cèl.lules de la paret interna del duodè, que té com a única funció la conversió de tripsinògen a tripsina. Aquest procés és tant específic que només un dels 228 enllaços del tripsinògen és atacat; a més, no s'ha descrit cap altre proteïna substrat de l'enteroquinasa (Maroux et al., 1971).

Donada la necessitat d'encaix entre la regió que conté l'enllaç

peptídic susceptible d'hidròlisi i el centre actiu de la proteasa, la proteòlisi limitada es dirigeix normalment sobre regions situades entre dominis estructurals de la cadena polipeptídica (bucles superficials o zones desestructurades) més que sobre dominis interns, hèlices o plegaments β (Neurath i Walsh, 1976).

La proteòlisi limitada és una conseqüència del caràcter globular de la majoria de proteïnes substrat, que limita molt el nombre d'enllaços peptídics que es poden unir al centre actiu de la proteasa. Ara bé, depenent de l'estabilitat de l'estructura proteica, la proteòlisi pot continuar o no. Si la proteïna resultant és resistent en front de la desnaturalització i desplegament i no presenta més enllaços susceptibles d'ésser hidrolitzats, la proteòlisi limitada produirà una

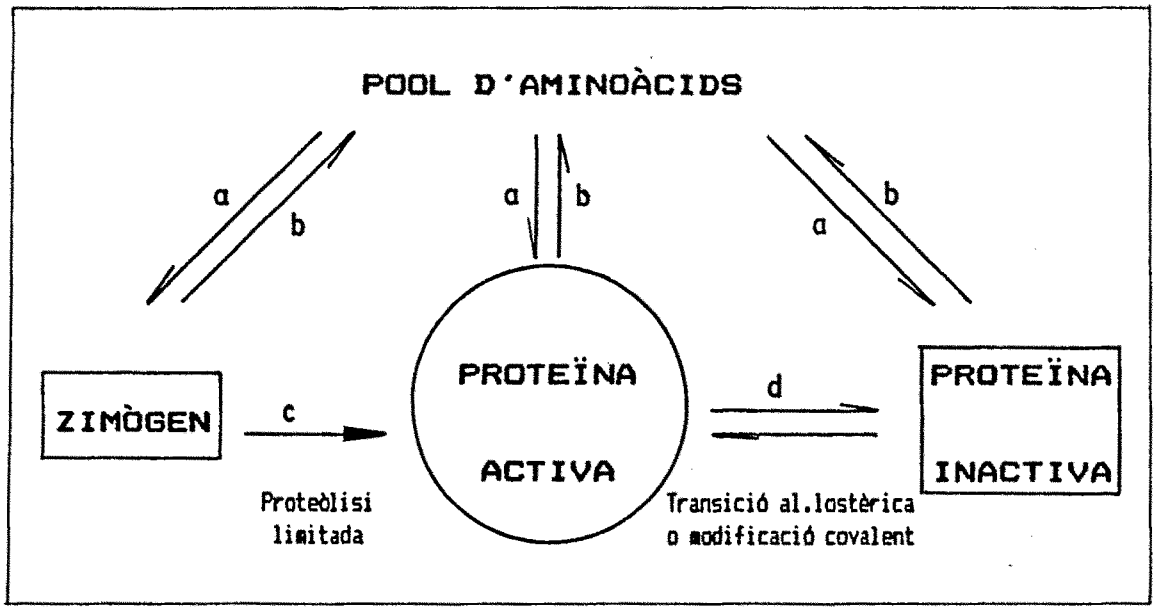


FIGURA I.4. Els zimògens i la seva posició a l'esquema general de control fisiològic. (a) transcripció i traducció regulen la formació de proteïnes a partir de "pools" d'aminoàcids. (b) altres controls regulen la seva degradació. Es pot formar proteïnes actives per modificació irreversible de zimògens (c) o per modificacions conformacionals reversibles (d).

nova proteïna. En l'altre cas, pot succeir que el pas inicial produeixi l'exposició de més enllaços susceptibles i canvis en la conformació que provoquin finalment la digestió total de la proteïna (Ottesen, 1967). La proteòlisi limitada és, per tant, el darrer pas a la síntesi de proteïnes biològicament actives i també el primer pas vers la seva degradació (Schimke i Doyle, 1970).

A la Figura I.4 es pot observar la posició dels zimògens a l'esquema general de la regulació fisiològica. El procés de conversió de zimògens en proteïnes actives és essencialment irreversible, puix que la proteòlisi és una reacció exergònica en condicions fisiològiques normals i no es coneixen mecanismes biològics senzills per a la reparació d'un enllaç peptídic trencat (Neurath i Walsh, 1976). A diferència de la major capacitat moduladora dels sistemes reversibles de control fisiològic (fosforilació, transició al.lostèrica...), l'activació de zimògens produeix canvis unidireccionals i dóna lloc a l'aparició de noves funcions fisiològiques.

L'activació de zimògens per proteòlisi limitada té lloc sobre un enllaç peptídic situat a la vora de la posició N-terminal. Si considerem el procés de biosíntesi de les proteïnes, que va des de l'extrem amino fins a l'extrem carboxi, és fàcil deduir que la formació del zimògen prèvia a la formació de l'enzima és un mecanisme dissenyat per evitar l'expressió prematura de l'activitat fisiològica. Si el pèptid d'activació separat per proteòlisi limitada estés situat a l'extrem carboxi terminal, els enzims actius se sintetitzarien i adoptarien conformacions natives abans que els seus zimògens (Neurath i Walsh, 1976).

El trencament d'un enllaç peptídic situat en posició propera a l'extrem N-terminal no es dóna només a l'activació de zimògens. Les proteases de mamífers i les proteïnes de secreció contenen altres perllongacions N-terminals anomenades "pèptids senyal" o "seqüència líder" que són necessàries pel transport de les proteïnes en procés de síntesi a través de la membrana del retícul endoplàsmic (Blobel i Dobberstein, 1975; Kreil., 1981). Aquest pèptid senyal és eliminat del zimògen per acció d'una proteïnasa de membrana situada a la llum del retícul una vegada la porció de cadena polipeptídica que conté el pèptid

senyal ha ultrapassat la membrana (Lively i Walsh, 1983). Hom creu que aquesta "pre-proteïna" és el primer producte de la traducció del missatger i és fisiològicament inactiva en impedir la presència del pèptid senyal el correcte plegament de la cadena polipeptídica (Scheele i Jacoby, 1983).

Una vegada establert el protagonisme de la proteòlisi limitada com a primer pas indispensable per a l'activació de zimògens, podem preguntar-nos quin és el mecanisme de generació d'activitat enzimàtica. Es a dir, queda per definir quines són les conseqüències del trencament de l'enllaç peptídic que uneix enzim i segment d'activació. La

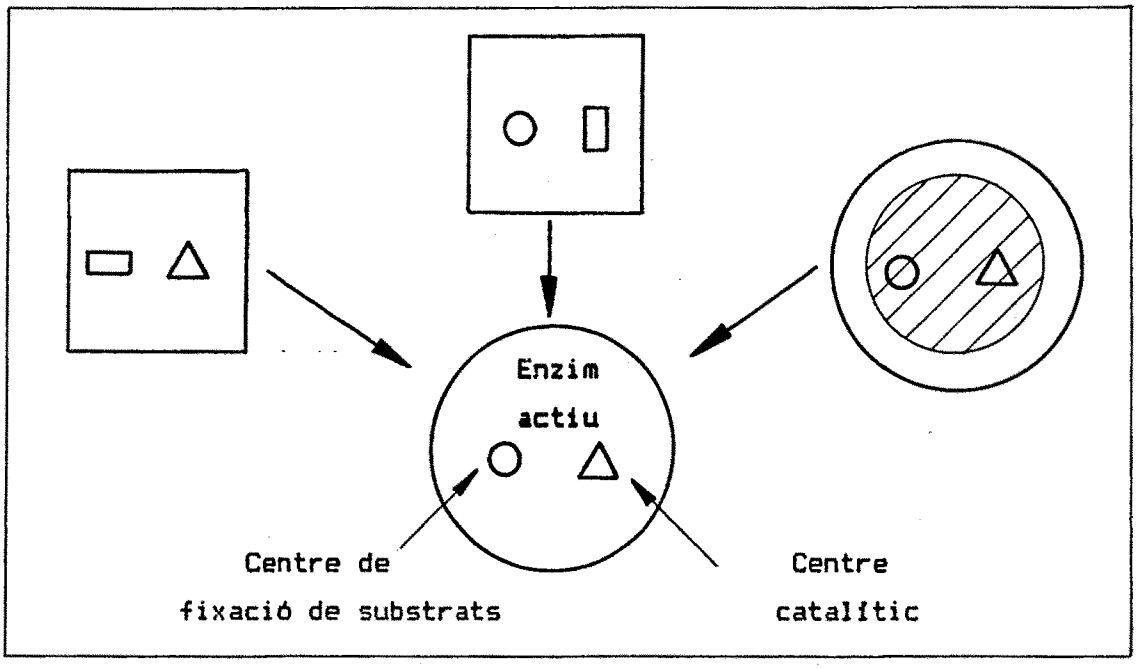


FIGURA I.5. Tres camins possibles d'activació de zimògens. Al camí A un canvi conformacional indueix la formació d'un lloc de fixació de substrats eficient. En el cas B el lloc de fixació ja existeix i el que s'indueix és un centre catalític eficient. Al camí C el segment d'activació "tapa" el centre actiu, que només queda exposat després del trencament de l'enllaç que uneix segment i enzima. (Segons Neurath i Walsh, 1976).

proteòlisi limitada pot simplement eliminar un obstacle (el pèptid d'activació) o bé provocar a més un canvi conformacional que faci a la proteïna activa. Aquest canvi conformacional podria provocar la generació d'un lloc de fixació de substrats o bé induir l'engalzament *de novo* del centre catalític (Neurath i Walsh, 1976). Aquestes tres possibilitats es veuen esquematitzades a la Figura I.5. Els estudis fets amb raigs X no han pogut determinar quin és el mecanisme real pel que es genera activitat enzimàtica (Freer et al., 1970). En canvi, la certesa experimental que els zimògens posseeixen una certa activitat intrínseca (Kassell i Kay, 1973; Martínez, 1980) fa pensar que els zimògens tenen preformat l'aparell catalític i que es diferencien de l'enzim actiu, apart l'obstrucció estructural que suposa el segment d'activació, en que el centre de fixació de substrats està distorsionat. Aquesta deformació del lloc fixador de substrats fa que baixi l'afinitat d'aquests per l'enzim i que l'eficiència catalítica disminueixi a nivell residual.

I.2.2. CASCADES D'ACTIVACIÓ DE ZIMÒGENS

La proteòlisi limitada, al ser el procés determinant del pas de forma inactiva a forma activa és un mecanisme de control de l'activitat fisiològica de les proteïnes sintetitzades en forma de zimògens. No obstant, aquest control pot fer-se més extensiu i ésser més finament regulat mitjançant el que es coneix com a cascada d'activació de zimògens. El terme cascada (Mc Farlane, 1964) va ser introduït per referir-se a les seqüències d'inducció d'activitats enzimàtiques en les que el producte d'una reacció catalitza la següent. Aquest procés necessita d'un inductor inicial per, a continuació, autoregular-se. A les cascades d'activació de zimògens cada un d'ells conté una regió reconeguda específicament per l'enzim anterior i una regió que, després de l'activació, reconeix específicament el zimògen següent (Neurath, 1975).

La complexitat i el nombre de passos implicats en les diferents cascades d'activació conegudes és variable. L'activació dels zimògens

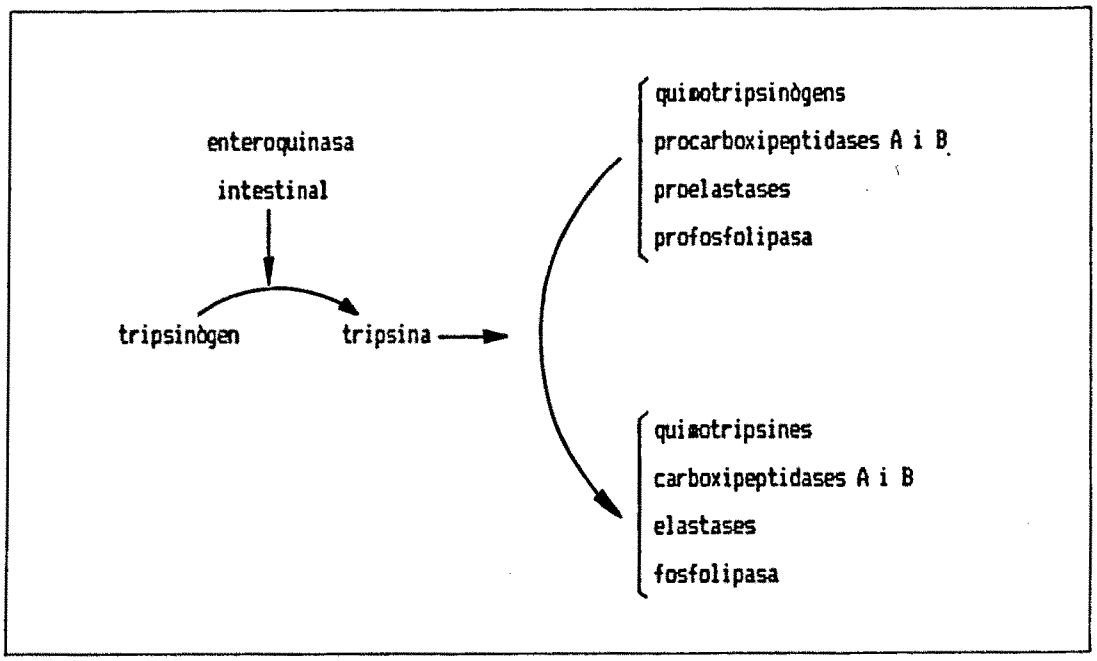


FIGURA I.6. Activació dels zimògens pancreàtics. A la primera fase, l'enteroquinasa activa el tripsinògen, el qual s'encarregarà posteriorment de l'activació de la resta de zimògens (Transcrit de Neurath, 1975).

pancreàtics és un exemple de cascada de dos passos. En aquest cas, l'enteroquinasa duodenal activa el tripsinògen alliberat per les cèl.lules acinars del pàncreas. El producte de l'activació, la tripsina, catalitza la conversió de la resta de zimògens pancreàtics en els seus corresponents enzims (Figura I.6).

Les cascades que involucren més de dos passos són un millor exemple que l'anterior de la funció amplificadora de l'activitat enzimàtica que és característica d'aquests processos. L'exemple més conegut d'una extensa cascada d'activació és el de la coagulació de la sang (Figura I.7). Aquest procés implica l'activació de 11 zimògens a l'anomenada ruta intrínseca i de 4 més a la ruta extrínseca. La reacció s'inicia a

la membrana vascular i finalitza amb la conversió del fibrinògen a fibrina i formació del coàgul. Les proteïnases generades són prou específiques com per ser capaces d'activar el zimògen immediatament posterior de la cascada, però no el següent, de manera que no sigui possible saltar-se passos. D'aquest fet sembla possible deduir que la cascada de coagulació de la sang ha evolucionat a partir dels seus darrers passos, ja que la inserció de cada un dels zimògens addicionals augmenta l'amplificació i afavoreix la bondat de la regulació (Neurath, 1984).

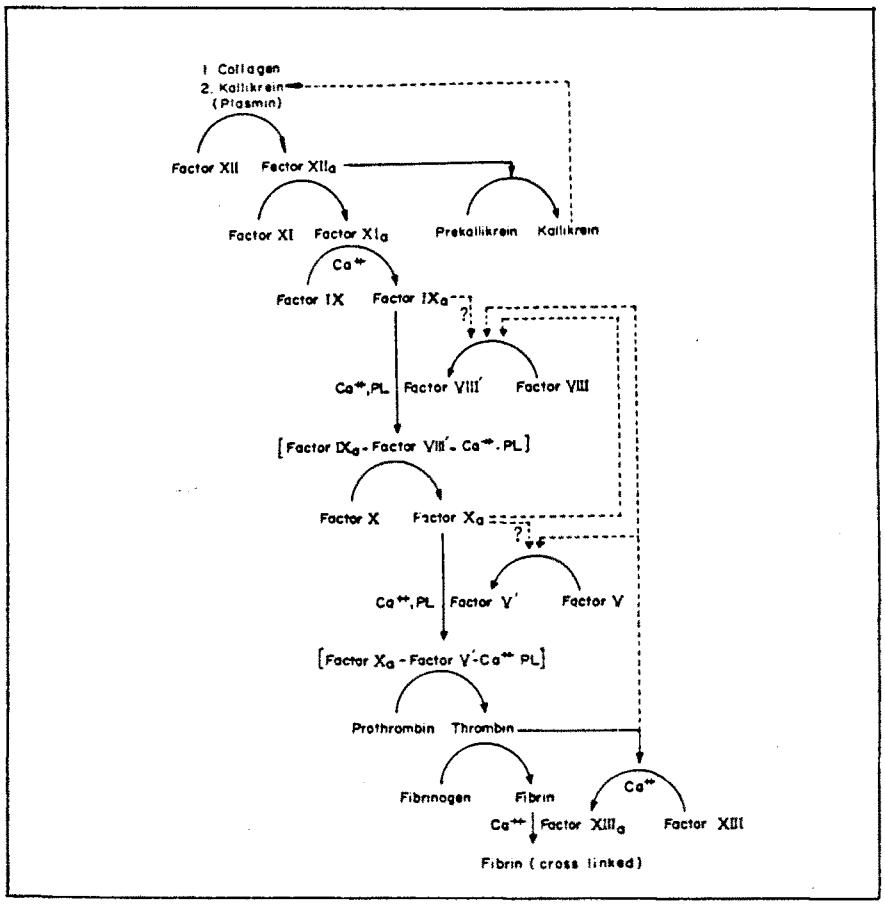


FIGURA I.7. Mecanisme temptatiu per explicar la iniciació de la coagulació de la sang en el sistema intrínsec de plasma de mamífers. La ruta intrínseca i extrínseca convergeixen al factor X, que és el responsable de l'activació de la protrombina (reproduït de Davie i Fujikawa, 1975).

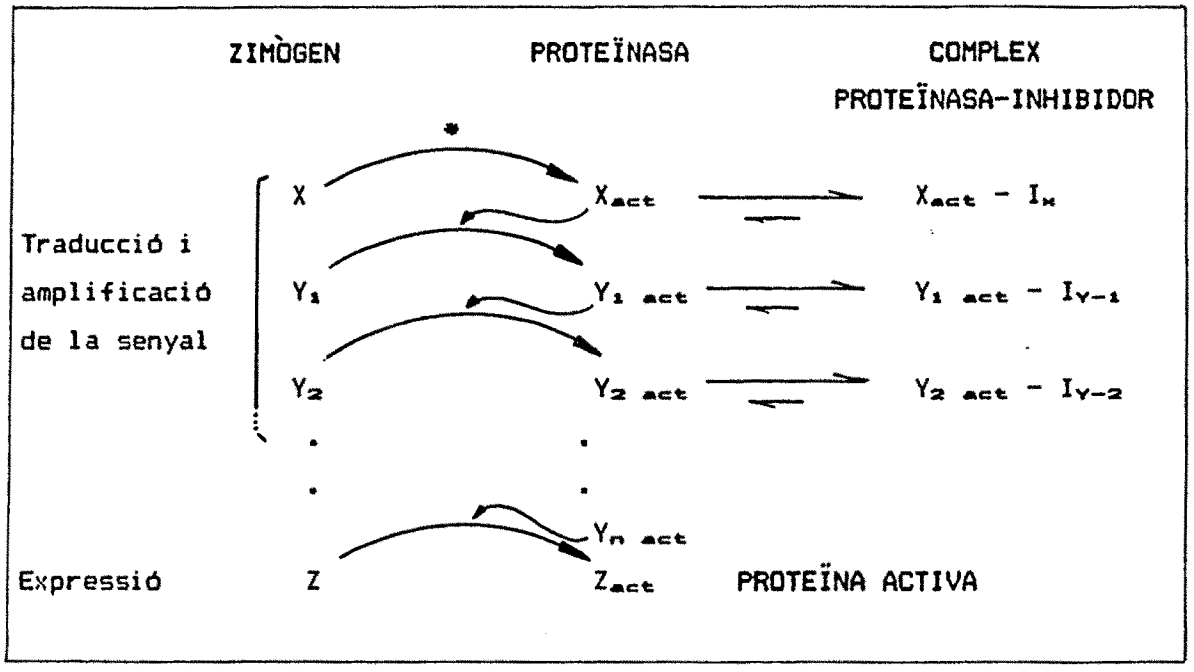


FIGURA I.8. Esquema general dels processos de control regulats per zimògens, proteases i els seus inhibidors. Els zimògens són activats seqüencialment i la seva activitat és controlada per inhibidors específics. El darrer pas de proteòlisi limitada dóna lloc a l'expressió de la funció de la darrera proteïna activa. (*) representa la senyal fisiològica que inicia la cascada (de Neurath i Walsh, 1976)

A més del gran poder modulador que suposa el nombre de passos d'activació, el procés de coagulació de la sang també vé regulat per la presència d'inhibidors específics de cada una de les proteïnases. Aquests inhibidors són els encarregats de posar fi a les reaccions d'activació i restringir la seva acció a l'àrea on és necessària. La regulació per inhibidors no és en absolut exclusiva del procés de coagulació sinó que és una característica comú a molts processos seqüencials. Un possible esquema general està representat a la Figura I.8, on es tenen en compte les tres fases principals d'un procés d'activació de proteases: interpretació de la senyal inductora del procés, amplificació de la primera senyal i efecte final. En general es

pot dir que la durada de cada un dels passos vé controlada per la concentració d'inhibidors, mentre que el grau d'amplificació està determinat pel nombre de passos entre inici i expressió final de l'activitat.

Les cascades d'activació de zimògens no operen necessàriament en estat aïllat, sinó que poden interaccionar les unes amb les altres; aquest és el cas dels sistemes de la coagulació, fibrinòlisi i kallicreïna. La seva interacció afegeix elements de control i modulació addicional als que són intrínsecs de cada sistema.

La proteòlisi limitada, sigui considerada com un procés aïllat o dins d'un procés seqüencial, és, doncs, un important element de control que pot iniciar funcions fisiològiques noves o regular-ne de preexistents. En tot cas és un procés irreversible que destaca per aquesta raó dins la llista de possibles modificacions postranslacionals que poden sofrir les proteïnes. Els zimògens estan doncs dissenyats per respondre a senyals fisiològiques, amplificar-les i activar de forma irreversible una determinada funció.

I.3. PÈPTIDS D'ACTIVACIÓ

Es coneix com a pèptid d'activació a tot fragment peptídic alliberat d'un zimògen durant la seva activació per proteòlisi limitada. Està ben establert que la majoria de processos d'activació de zimògens tenen lloc per trencament enzimàtic d'un o més enllaços peptídics situats en posició N-terminal amb relació al centre actiu de la proteïna. D'aquests conceptes sovint s'en dedueix un esquema general referent a l'estructura de zimògens que resulta erroni: el que considera que un zimògen és una cadena polipeptídica lineal que, després de l'activació, allibera indefectiblement un pèptid més o menys llarg situat al seu extrem N-terminal. L'àmplia gamma d'estructures possibles que poden presentar els zimògens i els diferents tipus de processos d'activació dels mateixos contradiuen la simplicitat d'aquesta idea. Hi ha, per exemple, zimògens formats per diverses cadenes com és el cas del factor XI de la coagulació de la sang (Wuepper, 1972), i d'altres que alliberen un pèptid d'activació intern com li succeeix al factor IX (Katayama et al., 1979). També en alguns casos es manté l'estructura de dues cadenes polipeptídiques després de l'activació com li succeix a la trombina (Magnusson et al., 1975), o s'observa el trencament conjunt d'enllaços situats al sector N-terminal i a l'interior de la molècula durant l'activació, tal com s'ha definit pel plasminògen (Wallén i Wiman, 1975). En els casos més complexes el procés d'activació de zimògens poseeix més d'una de les característiques abans esmentades; hi ha, però, casos en què també s'observa processos d'activació simplificats com amb el tripsinògen, pepsinògen i procarboxipeptidases. En algun cas no es pot parlar ni tant sols de pèptid d'activació, donat que la proteòlisi llimitada no allibera cap segment peptídic sino que es limita a trencar per un sol punt la continuïtat de la seqüència polipetídica, seguint les dues cadenes separades unides per ponts disulfur, com ha estat descrit per la uroquinasa humana (Wun et al., 1981).

Del comentat fins ara s'en dedueix que resulta difícil definir una estructura i una localització generals pels segments d'activació. La

seva diversitat és tant de llargada com de composició i seqüència. Hi ha segments o pèptids d'activació molt curts, com el del tripsinògen (6 residus) (Davie i Neurath, 1955), de 30-50 residus com el de la prokallicreïna (Kizuki et al., 1982) o el del pepsinògen (Stepanov et al., 1973), de quasi 100 residus (procarboxipeptidasa A de pàncreas de rata) (Quinto et al., 1982), i en alguns zimògens el fragment alliberat durant l'activació és fins i tot més llarg que el mateix enzim, com succeix en el cas de la trombina (274 residus en front de 259) (Magnusson et al., 1975).

Les diferències en llargada i composició entre els segments d'activació són també evidents entre aquells que pertanyen a zimògens de proteases de la mateixa família. S'ha dit ja que les famílies de proteases agrupen proteïnes homòlogues que han conservat aquells aminoàcids essencials per a la funció i pel manteniment de la conformació de l'enzim o proteïna activa. Les regions més conservades són aquelles corresponents al centre actiu i la comparació de seqüències permet apreciar generalment un considerable grau d'homologia. En canvi sembla que el grau d'homologia seqüencial és petit entre els pèptids d'activació de zimògens diferents però pertanyents a la mateixa família. Així, s'observa homologia entre els pèptids d'activació de, per exemple, diferents tripsines, però encara apareixen grans diferències entre els segments d'activació de tripsina, quimotripsina, elastasa i trombina (veure Figura I.9). Fins i tot es dóna el cas de dues elastases de rata que presenten un 58% d'identitat seqüencial i que tenen segments d'activació completament diferents (McDonald et al., 1982). Cal però fer esment que en els exemples exposats el lloc concret d'activació presenta una seqüència amb un notable grau de conservació: X - - Y, en la que X és Lys o Arg i Y és Ile o Val.

No obstant les diferències, pot establir-se un cert grau de relació entre els segments d'activació d'algunes proteases. Així per exemple, dins del grup de les serina-proteïnases sembla evidenciar-se la presència de tres classes de pèptids d'activació. Com es mostra a la Figura I. 8, el pèptid d'activació dels tripsinògens són homòlegs amb el que s'allibera durant l'activació de la prococoonasa. També s'observa homologies entre els corresponents a quimotripsinògens i elastases i

GROUP I		
Bovine trypsinogen	Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys	Ile-
Dogfish trypsinogen	Ala-Pro-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys	Ile-
Prucocoonase	(5 residues)---Arg-Thr-Gln-Asp-Asp-Gly-Gly-Lys	Ile-
GROUP II		
Bovine chymotrypsinogen A	(7 res)---Pro-Val-Leu-Ser-Gly-Leu-Ser-Arg	Ile-
Bovine chymotrypsinogen B	(7 res)---Pro-Val-Leu-Ser-Gly-Leu-Ala-Arg	Ile-
Bovine chymotrypsinogen C	(5 res)---Phe-Gln-Pro-Asn-Leu-Ser-Ala-Arg	Val-
Lungfish proelastase A	(3 res)---Pro-Ser-Tyr-Pro-Pro-Thr-Ala-Arg	Val-
GROUP III		
Bovine prothrombin	Ala-Asn-Lys-Gly-Phe-Leu-Gla-Gla------(307 res)---------Phe-Glu-Ser-Tyr-Ile-Glu-Gly-Arg	Ile-
Bovine Factor X	Ala-Asn-Ser- - -Phe-Leu-Gla-Gla -(133 res) (43 res)--Glu-Asp-Gly-Ser-Gln-Val-Val-Arg	Ile-
Bovine Factor IX	Tyr-Asn-Ser-Gly-Lys-Leu-Glx-Glx----(ca. 147 res)----------	Val-
Bovine plasminogen	Glu-Pro-Leu-Asp-Asp-Tyr-Val-Asn----(ca. 550 res)----------Arg	Val-

FIGURA I.9. Homologies seqüencials en les regions d'activació de tres grups de zimògens de serina-proteïnases. La sageta indica el punt on té lloc la proteòlisi limitada (reproduït de Neurath i Walsh, 1976).

entre els alliberats a partir de zimògens de certes proteïnases implicades en la coagulació de la sang, en particular els corresponents a protrombina i factors IX i X. Cal assenyalar que en aquest darrer cas les homologies més importants es troben localitzades en una zona allunyada seqüencialment del punt d'activació i que forma part de una llarga cadena polipeptídica amb posssibles funcions reguladores, el que podría explicar en part la homologia observada.

Si bé la funcionalitat de les formes actives generades després d'una activació per proteòlisi limitada està ben establerta, es coneix ben poc de l'estructura i possible funció secundària del fragment peptídic segregat, que pot ser considerat en ocasions com destinat a

desaparèixer. La considerable llargada d'alguns d'aquests pèptids d'activació i l'aparentment desproporcionada despesa energètica que suposaría sintetitzar-los amb l'única finalitat que fóssin degradats ha fet pensar precissament en hipotètiques funcions per les regions d'activació alliberades. Un primer pas en aquest estudi el constitueix la comparació de seqüències dels segments d'activació de zimògens relacionats, amb la finalitat d'observar si existeix una conservació significativa d'estructures primàries. Un exemple de comparació de seqüències de zimògens homòlegs, és la feta amb els factors de la coagulació esmentats al final del paràgraf anterior; aquest estudi ha permés demostrar la conservació de regions funcionalment importants (Katayama et al., 1979). En aquest treball els autors comparen les seqüències de quatre proteïnes plasmàtiques precursores de serina-proteïnases i de la tripsina (Figura I.10). La comparació de les seqüències corresponents a la zona N-terminal vé facilitada per la definició arbitrària de quatre regions dins la proteïna, feta a partir de la seqüència del factor IX. Així, s'observa per una part una homologia constant entre les regions catalítiques de totes les proteïnes i per l'altra es comprova que el major grau d' homologia dins la regió no catalítica correspon a la zona denominada GLA, que és la que conté els residus carboxiglutàmic, essencials per a la fixació d'ions Ca^{2+} (Fernlund et al., 1978). Els ions Ca^{2+} són indispensables per a la conversió de cada un dels zimògens en les seves formes actives. En canvi, no s'observa un elevat grau d'homologia entre les zones denominades regió del pèptid d'activació, allà on té lloc el trencament proteolític. Dit d'una altra manera, en aquest cas és difícil trobar d'antuvi raons estructurals que puguin justificar una hipotètica funció del segment d'activació una vegada separat de la proteïna, però en canvi sí s'observa funcions fisiològiques en regions no catalítiques.

En el cas d'alguns zimògens de la coagulació de la sang, a més de la ja esmentada interacció amb cofactors per part de les regions que no poseeixen activitat catalítica, s'ha definit algunes altres possibles funcions per alguns pèptids d'activació. Per exemple, se sap que el factor C_3 del complement allibera en activar-se un pèptid fisiològicament actiu anomenat anafilotoxina (Hugli, 1975). El mateix

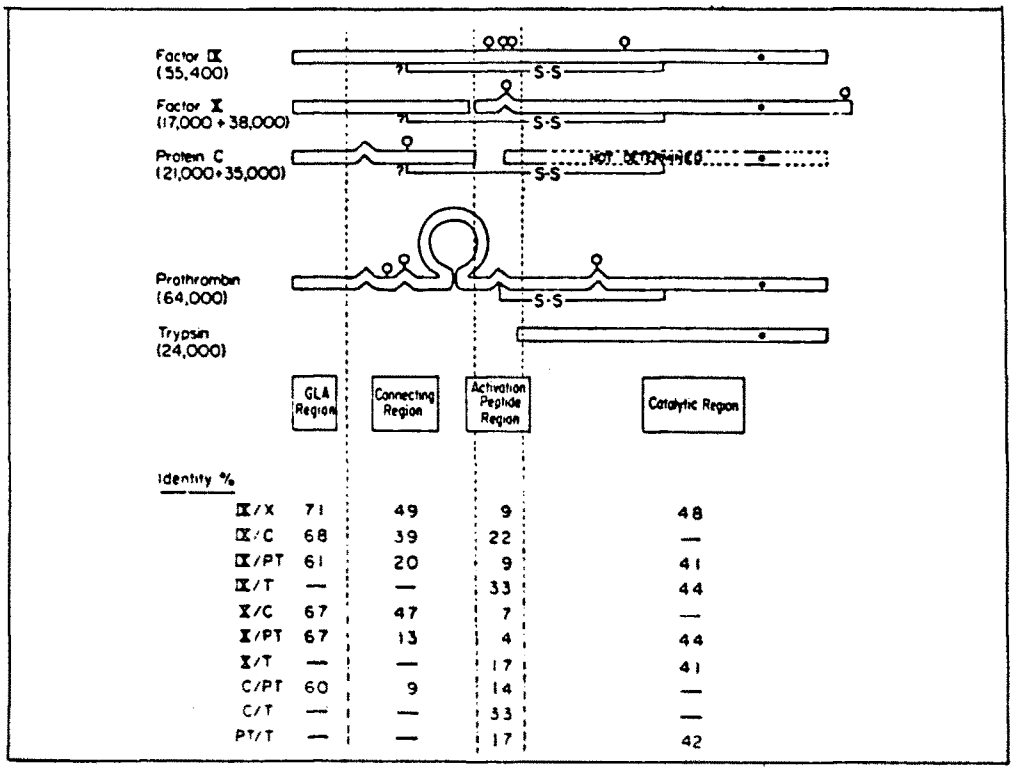


FIGURA I.10. Comparació esquemàtica dels zimògens de cinc serina-proteïnases. Els bucles del dibuix han estat necessaris pel ajust de seqüències. Els cercles indiquen llocs de fixació de carbohidrats. El percentatge d'homologies s'indica per parelles de regions. La separació per regions, indicada per les línees verticals s'ha fet a partir de l'estructura del factor IX (reproduït de Katayama et al., 1979).

succeix amb el factor C_5 i la protrombina, doncs ambdós alliberen un pèptid farmacològicament actiu. També se sap que el pèptid d'activació del tripsinògen podria tenir una acció hormonal en actuar de forma inhibidora sobre els reflexos nerviosos que provoquen la sensació de gana (Abita et al., 1973). Per altra banda, recentment s'ha trobat evidències de que els pèptids alliberats durant el procesament

proteolític del procol.làgen podrien actuar a nivell genòmic inhibint la producció del seu m-RNA i la producció de més proteïna (Wu et al., 1986).

Pel que respecta al segment d'activació objecte d'aquest estudi, el de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc, estudis anteriors han demostrat que en estat aïlat és un potent inhibidor de l'activitat carboxipeptidasa A (San Segundo et al., 1982) i que, al presentar una compacta estructura globular, podria constituir un domini estructural dins de la proteïna (Avilés et al., 1982). Per altra part, hem observat que la homologia seqüencial de la zona N-terminal dels segments corresponents a la PCPA de dues espècies diferents (rata i porc) és prou elevada com per a que la conservació de seqüència pugui ser deguda a la possible existència d'un paper funcional per aquests segments d'activació.

I.4. PROCESSOS D'ACTIVACIÓ DE PROPROTEASES

De la mateixa manera que el grup de les serina-proteïnases és el més ben estudiat dintre dels enzims proteolítics, també els seus zimògens són els més ben coneguts, tant pel que es refereix a la seva estructura com al seu procés d'activació. En aquest capítol farem una revisió dels processos d'activació d'aquests i d'altres zimògens d'enzims proteolítics. Cal dir, però, que no es troba descrit en detall a la literatura cap procés d'activació que sigui equiparable al de la procarboxipeptidasa A, tant pel que respecta a la llargada del pèptid alliberat per proteòlisi limitada com per les característiques que aquest posseeix una vegada hidrolitzat l'enllaç que l'uneix a l'enzim.

I.4.1. QUIMOTRIPSINÒGEN

Es coneixen tres tipus de quimotripsinògens, A, B i C, que han estat aïllats de pàncreas de bou, de porc, o d'ambdós. Els tres zimògens en ser activats donen lloc a quimotripsines de característiques catalítiques molt similars però no idèntiques. Ens limitarem en aquest paràgraf a comentar la forma A tant del zimògen com de l'enzim, puix que aquesta és la forma coneguda normalment com quimotripsinògen-ina. Ambdós van ser aïllats per primera vegada per Kunitz i Northrop (1933), qui van cristal.litzar tant el zimògen com l'enzima activa, coneguda com α-quimotripsina.

Bàsicament, el procés d'activació del quimotripsinògen va ser descrit entre els anys 1952 i 1955 pels grups de Desnuelle i Neurath, encara que aportacions posteriors han permès reafirmar o revisar conceptes. S'han descrit dues vies per a l'activació del quimotripsinògen, les anomenades lenta i ràpida. La primera indicació de que podia haver-hi diverses vies d'activació va venir del reconeixement de diferents formes de l'enzim, que diferien en forma cristal.lina i en solubilitat.

El quimotripsinògen passa a la seva forma activa per un procés de

proteòlisi limitada amb la pèrdua d'un cert nombre de residus aminoàcids. Lògicament, l'estudi del procés d'activació va fonamentar-se en el reconeixement dels residus N-terminals lliures generats, en l'anàlisi dels pèptids alliberats, en la caracterització de les diferents formes d'enzim actiu que anaven apareixent i en la quantitatització de les seves respectives activitats.

Desnuelle (1960) va proposar un esquema per explicar la gènesi de les diferents formes de quimotripsina. A la Figura I.11 es pot veure una versió actualitzada d'aquest esquema, que té en compte les aportacions de Wright et al. (1968) i de Miller et al. (1971) pel que respecta a la totalitat d'intermediaris reconeguts. La **via ràpida**, que és probablement la que té lloc a nivell fisiològic a l' implicar la presència de tripsina en els primers estadis de l'activació (recordem que al duodè la tripsina és l'enzim encarregat d'activar la resta de proteïnases), comença per l'atac tríptic sobre un enllaç Arg_{15}-Ile_{16}. Això dóna lloc a l'aparició d'un intermediari inestable, la π-quimotripsina, que es transforma en δ-quimotripsina per pèrdua del dipèptid Ser_{14}-Arg_{15} com a conseqüència d'un autoatac quimotríptic posterior (Bettelheim i Neurath, 1955). Es pensava que la continuació del procés autocatalític donava lloc a la forma α de la quimotripsina, però la presència majoritària de la forma δ en barreges d'activació ràpida després de 90 min i la definició de la forma γ com a immediat producte de l'alliberament del dipèptid Thr_{147}-Asn_{148} a partir de la forma δ van modificar l'esquema anterior en el sentit que es va passar a considerar la forma α exclusivament com producte de l'activació del neoquimotripsinògen (Wright et al., 1968), com es va comprovar més endavant.

El grup de Desnuelle va demostrar que el quimotripsinògen pot ser atacat per la δ-quimotripsina, però a una velocitat molt inferior que per la tripsina. Aquesta és la denominada **via lenta** d'activació, segons la qual l'atac proteolític de l'enzim actiu dóna lloc a la formació dels neoquimotripsinògens, producte de la hidròlisi de tres enllaços peptídics susceptibles. L'activació dels neoquimotripsinògens es produeix igual que a la via ràpida, per hidròlisi de l'enllaç Arg_{15}-Ile_{16}. Durant l'activació lenta, i degut a que la hidròlisi

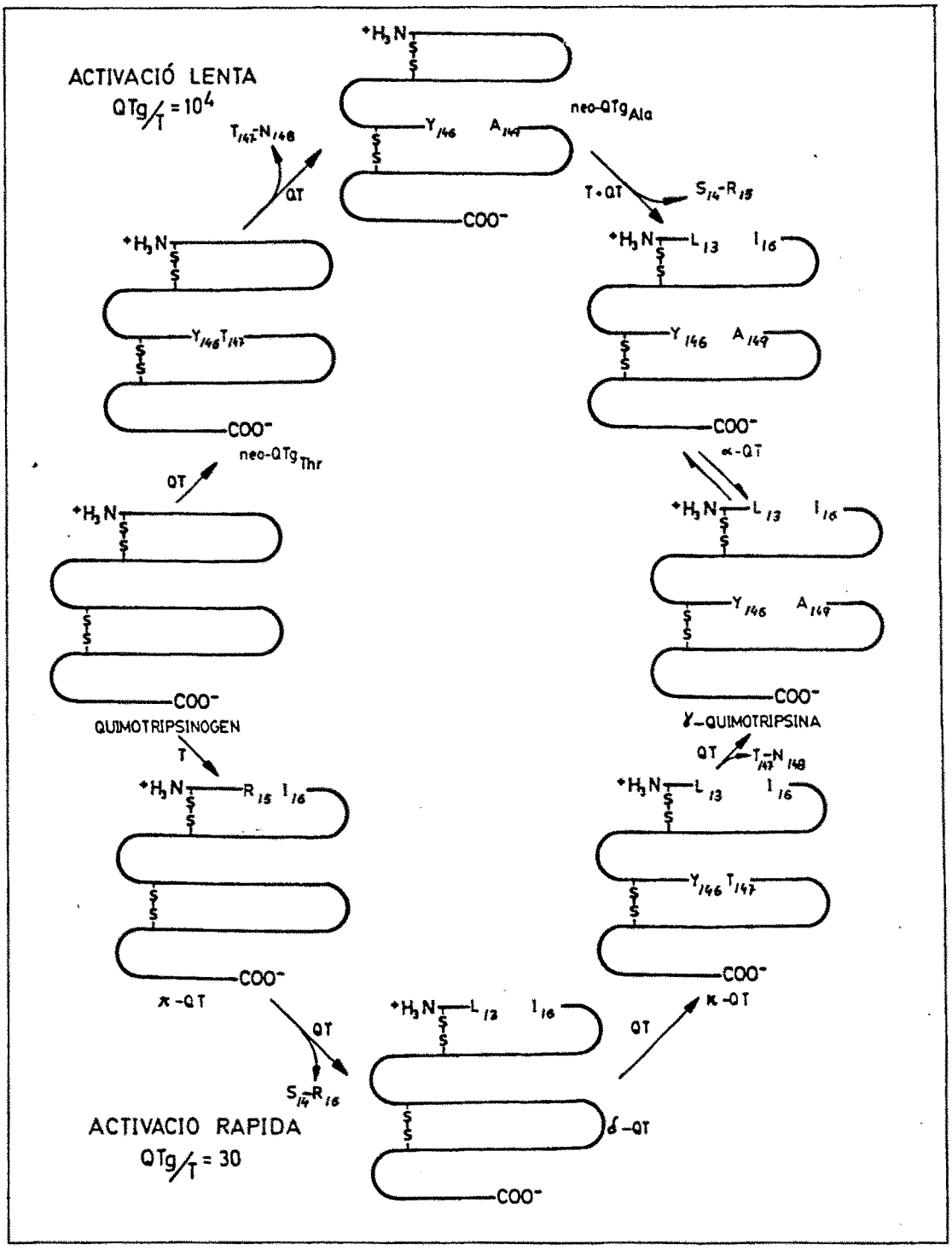


FIGURA I.11. Esquema d'activació del quimotripsinògen. QT: quimotripsina; QTg: quimotripsinògen; T: tripsina. La llargada de les cadenes és aproximadament proporcional a la seva llargada real.

quimotríptica afecta a diferents enllaços sense un ordre prefixat, s'obtenen barreges complexes; això no obstant, el principal producte de l'activació lenta és la α-quimotripsina.

Miller et al. (1971) van completar l'esquema mostrat a la Figura I.11 amb la inclusió de la nova espècie κ-quimotripsina, que es considera ara en realitat el producte més estable de la via ràpida d'activació. També van demostrar que una isomerització interconverteix les dues formes γ i α, i van aportar evidències de que la forma α deriva només de l'activació del neoquimotripsinògen. Per demostrar aquest darrer punt van seguir l'aparició de dímers al llarg de l'activació; donat que la forma α és l'única que presenta la propietat d'autoassociar-se, aquest test va constituir una prova directa de la seva presència.

El reconeixement de les modificacions produïdes a l'estructura primària dels zimògens de proteïnases durant l'activació no és un bagatge suficient per explicar el mecanisme de generació de l'activitat enzimàtica. L'activació, ultra produir canvis en estructura primària produeix, com a conseqüència dels mateixos, canvis conformacionals i canvis en l'accessibilitat de residus que són els darrers responsables de l'aparició d'activitat. Mitjançant estudis de modificació química selectiva (carboximetil.lació, marcatge amb inhibidors químics...), estudis espectrals, cinètics i dades cristal.logràfiques, Kerr et al. (1976) van proposar un mecanisme per explicar els efectes dels processos proteolítics abans comentats. Segons aquests autors, l'activació produeix un augment en l'afinitat per el substrat, gràcies a un canvi en la geometria de la butxaca de fixació, al mateix temps que es provoca una reorientació de la Gly_{193} que facilita l'estabilització de l'estat de transició originat durant la catàlisi enzimàtica.

I.4.2. TRIPSINÒGEN

El tripsinògen és el precursor de la tripsina, una dels enzims proteolítics que exhibeix una més estricta especificitat, juntament amb el seu activador, l'enteroquinasa. El procés d'activació del tripsinògen és més senzill que el comentat a l'apartat anterior, malgrat que també en aquest cas es produeixen diverses formes d'enzim actiu, producte de diferents discontinuïtats a la seqüència d'aminoàcids.

En condicions fisiològiques l'activació del tripsinògen corre a càrrec de l'enteroquinasa duodenal. Una vegada aquest procés ha nodrit de tripsina al medi, aquesta s'encarrega d'activar la resta d'enzims proteolítics. Com en el cas del quimotripsinògen, el procés d'activació de la proenzima ha estat estudiat mitjançant determinacions de residus N-terminals i identificació dels pèptids alliberats durant el procés. Davie i Neurath (1955) van aïllar i caracteritzar l' únic pèptid d'activació alliberat per acció de la proteïnasa activadora, pèptid que conté Asp, Val i Lys en una relació 4:1:1. Coneixent a més la seqüència del proenzim:

Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ile-Val-Gly-Gly--Tyr-... fins 229

lloc de trencament

i sabent que el nou N-terminal generat és Ile, resulta fàcil deduir que l'activació es produeix per eliminació de l'hexapèptid N-terminal Val_1-Lys_6.

Treballs posteriors van demostrar que accions autolítiques posteriors podien hidrolitzar altres enllaços peptídics addicionals. Els possibles trencaments i les diferents formes de tripsina alliberades es resumeixen a la Taula I.3. Les tripsines comercials solen contenir una barreja de les diferents espècies.

Els fragments de la molècula de tripsina obtinguts per activació i autòlisi estan interconnectats per ponts disulfur, de manera que no hi ha cadenes lliures. Com en el cas de la quimotripsina, l'autòlisi

TAULA I.3.
ENLLAÇOS PEPTÍDICS HIDROLITZATS DURANT L'ACTIVACIÓ DEL TRIPSINÒGEN I FORMES DE TRIPSINA QUE ES PRODUEIXEN (reproduït de Blackburn, 1976)

Enllaços hidrolitzats	*Agent*	*Producte*	*Activitat*
Lys_{6}-Ile_{7}	Enteroquinasa	β-tripsina	↑
Lys_{6}-Ile_{7} Lys_{131}-Ser_{132}	Tripsina	α-tripsina	↑
Lys_{6}-Ile_{7} Lys_{131}-Ser_{132} Lys_{176}-Asp_{177}	id.	ψ-tripsina	↓
Lys_{6}-Ile_{7} Arg_{105}-Val_{106}	id.	Enzim actiu	↑
Lys_{6}-Ile_{7} Arg_{105}-Val_{106} Lys_{131}-Ser_{132}	id.	Enzim actiu	↑
Lys_{6}-Ile_{7} Lys_{49}-Ser_{50} Arg_{105}-Val_{106} Lys_{131}-Ser_{132}	id.	Enzim inactiu	—

únicament incrementa el nombre de cadenes, sense fer perdre llargada a l'enzim de manera substancial. Quatre dels sis ponts disulfur són homòlegs amb quatre dels cinc de la quimotripsina. Es pot observar a la

Figura I.12 que l'enllaç peptidic hidrolitzat Lys_{131}-Ser_{132} és gairebé equivalent a l' enllaç Tyr_{146}-Thr_{147}, hidrolitzat durant la conversió a neoquimotripsinògen. Això és indicatiu que pot produir-se hidròlisi a la mateixa regió d'ambdós enzims sense distorsionar el centre actiu i que en aquesta regió existeix probablement una homologia conformacional que permet trencaments altament específics (Blackburn 1976).

S'ha dit ja que el pèptid d'activació del tripsinògen és Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. Resulta interessant remarcar que la seqüència Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, residus 2 al 6 de la proenzima, és present a tots els tripsinògens estudiats fins ara, i que aquesta seqüència és essencial per a que es doni interacció de l'enteroquinasa amb la proteïna substrat. Per exemplificar aquesta especificitat,

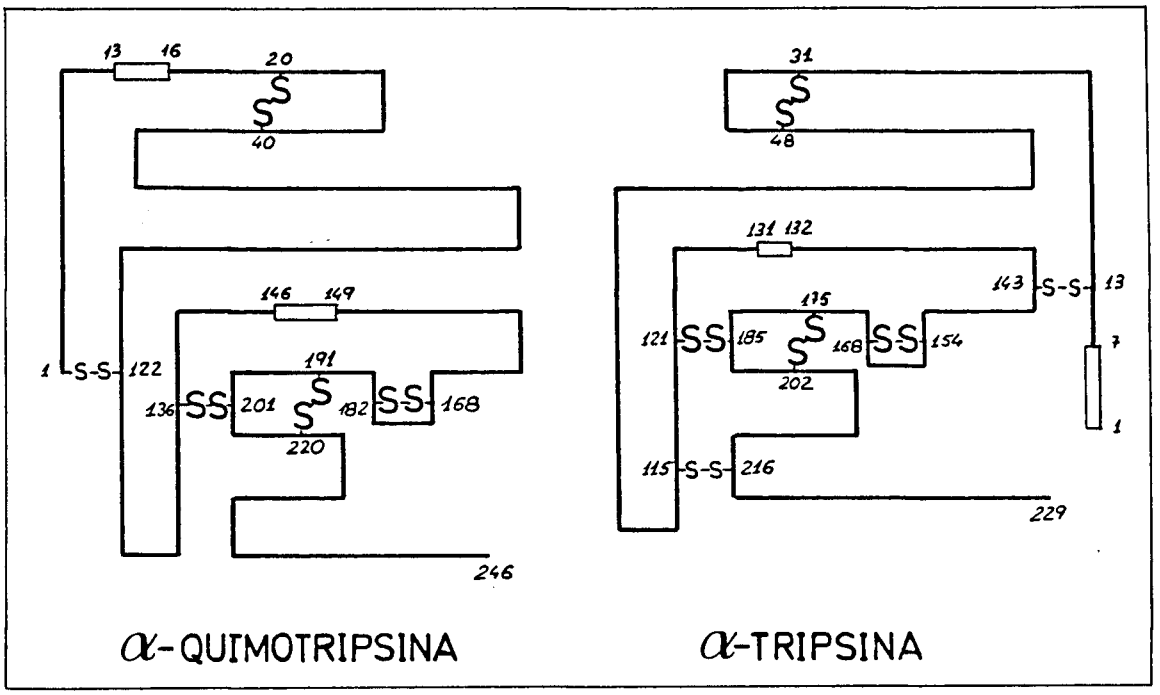


FIGURA I.12. Comparació esquemàtica de les estructures primàries de la quimotripsina (a) i tripsina (b), amb indicació de la posició dels ponts disulfur i dels trencaments produïts en generar-se les dues formes α .

l'enteroquinasa no és capaç d'hidrolitzar el pèptid N-terminal Val-Ala-Ala-Lys-Ile-Val del quimotripsinògen. L'enteroquinasa, per tant, sembla reconèixer no només la cadena alifàtica de la lisina (com fa la tripsina), sino tota l'estructura poliaspàrtic-lisina.

Aquesta extrema especificitat observada en l'activació del tripsinògen sembla indicar dues coses: per un cantó, que el responsable inicial de l'activació és gairebé exclusivament l'enteroquinasa, i que el mecanisme d'autoactivació comprovat *in vitro* té només una importància limitada *in vivo*, i per altra banda que aquesta elevada especificitat d'activació constitueix una mesura d'autoprotecció de l'organisme que evita la presència de tripsina activa a pàncreas o suc pancreàtic, presència que podria ocasionar greus disfuncions.

Amb referència al ja esmentat mecanisme d'autoactivació, sembla comprovat que no és degut a la presència d'una petita quantitat de tripsina contaminant, sinó que el zimògen posseeix una certa activitat catalítica (Kay i Kassell 1971) intrínseca. Tal fet explicaria la lenta formació inicial de tripsina, seguida per una fase d'acceleració de la reacció, corresponent aquesta darrera a l'efecte de la tripsina formada en primer lloc.

I.4.3. PEPSINÒGEN: PRECURSOR D'UNA PROTEÏNASA ÀCIDA

El pepsinògen millor estudiat és el que s'aïlla a partir de mucosa gàstrica de porc i és conegut amb aquest nom o bé com pepsinògen A. L'enzim actiu, la pepsina, és una carbòxil-proteïnasa activa a pH àcid i relacionada estructuralment i funcionalment amb altres carbòxil-proteïnases gàstriques (quimosina i gastricsina), lisosomals de mamífers (catepsines D i E), de plasma sanguini i seminal, i altres (Tang, 1976).

L'activació del pepsinògen es produeix espontàniament a pH baix en absència de proteïnases activadores. Amb l'evidència afegida que el pepsinògen és una entitat molecular de massa superior a la de la pepsina, el que implica la pèrdua d'un segment peptídic durant

l'activació, queden obertes d'antuvi diverses interpretacions al procés d'activació del proenzim. Les possibilitats són: que hi hagi petites traces de pepsina al medi, que el pepsinògen presenti activitat proteolítica i es produeixi un mecanisme autocatalític bimolecular, o bé que el zimògen s'autoactivi mitjançant un mecanisme unimolecular.

En un principi, l'opinió majoritària afavoria el mecanisme d'activació bimolecular, bé a càrrec de pepsina contaminant o del propi zimògen que, gràcies a un canvi conformacional produït a pH baix, adquiriria propietats catalítiques. No obstant això, Bustin i Conway-Jacobs (1971) demostraren que el zimògen lliure de contaminacions d'enzim actiu desenvolupava activitat proteolítica a pH àcid i que l'activació era independent de la seva concentració i fins i tot de l'addició de pepsina, amb el que postularen un mecanisme d'activació intramolecular. En aquest treball s'identificaren els residus N-terminals presents abans i després de l'activació que eren, respectivament, Leu i Ile, el que permeté deduir que Ile és el residu N-terminal de l'enzim actiu.

Els treballs de McPhie (1972) i Al-Janabi i col. (1972) donaren suport a la darrera hipòtesi. En el primer cas, mitjançant mesures d'espectrofotometria de diferència, s'obtenien evidències d'un canvi conformacional a pH 2,85 reversible al neutralitzar i que no era acompanyat de la formació de pepsina; es va interpretar aquest fenòmen com la vía de formació d'un pepsinògen capaç d'autoactivació. En el segon treball, estudis cinètics permetíen deduir que a valors de pH entre 1 i 3, la cinètica d'activació era de primer ordre, el que suposava un mecanisme intramolecular, i que a pH 4 la cinètica era mixta entre primer i segon ordre, el que deixava oberta la porta a una interpretació a la vegada uni i bimolecular del procés.

Kassell i Kay (1973) interpretaren el canvi conformacional observat per McPhie com un pas del zimògen no actiu a zimògen amb activitat proteolítica, hipòtesi que va ser refutada pel mateix McPhie (1974) al demostrar que tota activitat pèptica detectada durant una incubació de pepsinògen pur a pH baix era deguda a pepsina i no a pepsinògen. Per a demostrar-ho, McPhie va mesurar activitats després d'incubacions a pH baix, pH 8,5 o 9,5 i altra vegada a pH baix, fent ús de la propietat de

pepsinògen i pepsina de ser desnaturalitzats irreversiblement a pH 9,5, mentre que només la pepsina ho és a pH 8,5. Si tota l'activitat observada havía de ser adjudicada a la pepsina, el mecanisme d'activació només podía ser intramolecular, el que suposa l'autoconversió del pepsinògen en pepsina.

De manera paralel.la a aquests experiments es determinava la seqüència del segment d'activació del pepsinògen (Stepanov et al., 1974). Aquest era un polipèptid de 44 residus i l'enllaç trencat durant l'activació era el format per Leu_{44}-Ile_{45}.

Mentre que altres treballs abonaven la hipòtesi d'activació intramolecular (Sanny et al., 1975), es començava a estudiar la seqüencialitat del procés, ja apuntada en els primers estudis. Així, Dykes i Kay (1976) demostraren que la conversió del pepsinògen en pepsina no és un procés d'un sol pas, sinó que abans de l'alliberament del pèptid 1-44 es produïa l'alliberament del pèptid 1-16, segons demostraren experiments d'activació en presència d'un inhibidor

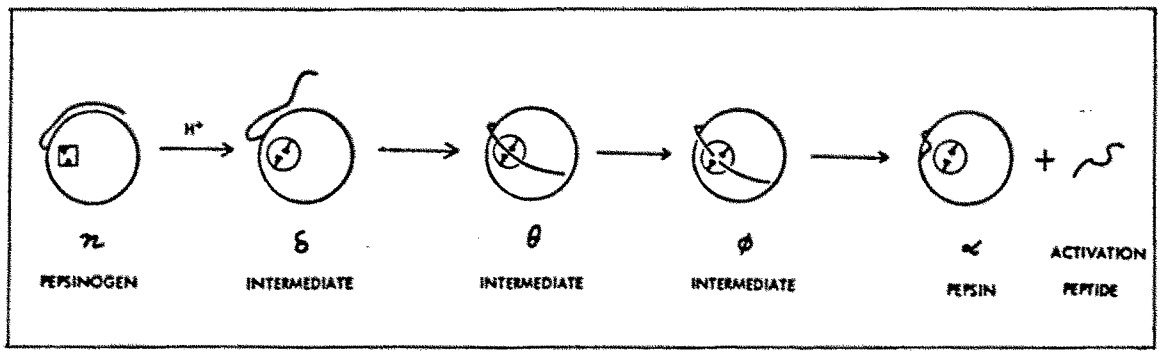


FIGURA I.13. Mecanisme d'activació del pepsinògen. El cercle gran és la molècula proteica sencera. El quadrat i cercle petits són, respectivament, el centre actiu potencial i desenvolupat amb dos grups carboxil. La línea representa el segment d'activació (de Marciniszyn et al., 1976)

(pepstatina). Per la seva banda, Koga i Hayashi (1976) efectuaren simulacions per computador de diferents processos seqüencials, el que els permeté proposar un model teòric.

Com a resultat de totes aquestes aportacions, un possible esquema per al procés d'activació del pepsinògen és el representat a la Figura I.13, proposat per Marciniszyn i col. (1976). Segons aquest esquema, el pepsinògen en medi àcid és convertit en l'intermediari δ . Aquest no és capaç d'activar cap altra molècula de pepsinògen vía un procés intramolecular, i sofreix posteriorment un canvi comformacional que fa que pugui unir el pèptid d'activació i formar un complex intramolecular enzim-substrat (θ). La formació d'aquest segon intermediari és seguida per la hidròlisi intramolecular de l'enllaç 44-45 del pepsinògen (φ) i per la dissociació de la α-pepsina i el pèptid d'activació.

Aquest esquema és, però, massa simplificat en relació amb els coneixements actuals, donat que, segons Dykes i Kay (1976) hi hauría dos intermediaris , el que produeix el trencament de l'enllaç 16-17 i el que produeix el trencament de l'enllaç 44-45. Per altra banda, Auer i Glick (1984) i Glick i col. (1986) han demostrat que el primer aconteixement de l'activació és una protonació que produeix dues formes del zimògen, que sofreixen camins d'activació concurrents. Per tant, aquesta hipòtesi suposaría la introducció de dos possibles "primers" intermediaris (equivalents a δ) que seguirien activació paral.lela.

I.4.4. DUES SULFIDRIL-PROTEÏNASES: PAPAÏNA I PROTEÏNASA ESTREPTOCOCAL

Aquests són dos exemples de proteïnases que, tot i pertànyer a la mateixa família presenten mecanismes d'activació ben diversos en alguns aspectes. Ambdues es sintetitzen en forma de precursors inactius i depenen del grup tiol d'un residu cisteïna per a la seva activitat.

La **PAPAINA** és una proteïnasa obtinguda a partir del làtex i la fruita de plantes superiors. L'obtinguda a partir de *Carica papaya* està formada per una cadena polipeptídica de 212 residus amb tres ponts disulfur intracatenaris i conté un sol grup tiol lliure, la cisteïna 25

(Light et al., 1964). S'ha comprovat que el tractament amb agents reductors confereix activitat proteolítica i esteràsica a la papaïna inactiva, i que aquesta forma d'emmagatzament de la papaïna no activa presenta un pont disulfur mixte papaïna-S-S-Cys. A la vegada s'ha reconegut la presència en certes preparacions d'una fracció de papaïna amb grups tiol lliures, però inactiva (Brocklehurst i Kierstan, 1973). Sembla ser que aquesta fracció correspon a un isòmer de la molècula en el que la Cys_{25} forma un pont disulfur. Aquest isòmer, en el que la substitució del residu 25 lliure pot córrer a càrrec de les dues cisteïnes més properes, la 23 i la 63, és anomenat pels autors propapaïna, i es converteix en l'enzim actiu per intercanvi tiol-disulfur. Si la propapaïna és la forma d'emmagatzament de la papaïna a la planta de papaia, el seu mecanisme d'activació constitueix un exemple ben singular de pas de zimògen a proteïna activa, que no suposa trencament proteolític previ i no és comparable a altres mecanismes coneguts.

La **PROTEÏNASA ESTREPTOCOCAL** és una sulfidril-proteïnasa d'origen bacterià similar a la papaïna en la característica de ser activa en condicions reductores i en especificitat, encara que el nombre d'enllaços peptídics susceptibles de ser atacats per la proteïnasa estreptococal sigui major. A diferència de la papaïna, l'activació de la proteïnasa estreptococal necessita d'una proteòlisi prèvia que transforma el zimògen de 44.000 de pes molecular en l'enzim de 32.000. Liu i Elliot (1965) van estudiar aquest procés i postularen que l'activació té lloc per pèrdua d'un pèptid d'aproximadament 100 residus situat a l'extrem N-terminal. L'atac proteolític, així com la seqüència sobre la que es produeix semblen ser força inespecífics, puix que tant la tripsina com la subtilisina o la pròpia proteïnasa estreptococal donen lloc aproximadament a la mateixa forma d'enzim actiu. En un primer pas, però, la proteòlisi s'inicia amb la pèrdua dels 17 residus N-terminals, el que ja permet l'accés del substrat al centre actiu. En tot cas és necessària una reducció per a que l'activitat es manifesti, punt en el que és similar a la papaïna. Pel que fa al segment d'activació, de llargada semblant al de la PCPA, no es coneixen altres detalls que els mencionats.

I.5. ZIMÒGENS PANCREÀTICS DE PROTEASES DIGESTIVES

El pàncreas és una glàndula encarregada de la síntesi de productes de secreció endocrina i exocrina i que posseeix cèl.lules especialitzades en la producció dels diferents components a exportar. Així, els illots de Langerhans són els encarregats de la producció de les hormones insulina i glucagò, de secreció endocrina, i les cèl.lules acinars són el tipus principal de cèl.lula de secreció externa. La principal funció de les cèl.lules acinars és la producció i secreció de les hidrolases necessàries per a la digestió de les biomacromolècules de la ingesta. Les cèl.lules acinars emmagatzemen les hidrolases

TAULA I.3

CARACTERÍSTIQUES DE LA SECRECIÓ PANCREÀTICA A CONILL D'INDIES (reproduït de Scheele, 1975).

Spot number	Enzyme or zymogen	Mass proportion[a]	Molecular weight b	Molecular weight c	Isoelectric point[d]
1	-	0.2	14,000	13,000	6.4
2	-	0.3	14,000	13,000	7.8
3	Ribonuclease	0.7	14,000	13,000	8.7
4	Ribonuclease	0.4	14,600	13,600	8.8
5	Trypsinogen	33.0	18,750	24,400	8.7
6	-	2.0	21,800	24,900	>9.3
7	Chymotrypsinogen 2	16.4	25,000	25,850	8.7
8	-	0.7	28,200	-	7.8
9	-	0.7	27,500	-	7.6
10	Proelastase 2	8.0	28,700	28,000	7.5
11	Proelastase 1	8.0	28,200	28,000	6.9
12	Chymotrypsinogen 1	1.7	25,000	25,850	4.8
13	Procarboxypeptidase A1	3.5	45,100	45,000	4.6
14	Procarboxypeptidase A2	3.8	45,100	45,000	4.8
15	Procarboxypeptidase B	8.8	46,000	47,700	6.6
16	Lipase 2	3.4	47,600	49,700	8.1
17	Amylase	3.6	51,000	52,000	8.4
18	Amylase	3.6	54,000	53,000	
20	Lipase 1	8.5	64,700	66,000	5.0

digestives en orgànuls especialitzats anomenats **grànuls de zimògens** fins el moment en que, sensibles a un estímul fisiològic, vessen el seu contingut a la llum del conducte pancreàtic que desemboca en el duodè. Per exemple, el producte de secreció conté en el pàncreas del conill d'Indies (potser el cas millor estudiat) aproximadament 20 enzimes i zimògens (Scheele, 1975). Del total de proteïnes caracteritzades per punt isoelèctric i pes molecular, les tretze que s'ha pogut identificar per activitat enzimàtica estan llistades a la Taula I.4. Es coneix també la composició de la secreció pancreàtica d'altres espècies, entre elles la humana (Scheele et al., 1981). Les diferències observades són tant en composició com en proporció de cada un dels components, però es comprova que els components principals (tripsinògens, quimotripsinògens, elastases, amilases, lipases i procarboxipeptidases) estan presents en tots els casos. L' interés de la secreció pancreàtica no resideix tant sols en el **què** se secreta, sino també en **com** ho fa. Concretament, un dels problemes a solucionar per part de les cèl.lules secretores és el de discriminar entre les proteïnes destinades a l'exportació i aquelles destinades a romandre a l'espai intracel.lular. El procés que va des de la síntesi fins a la descàrrega dels zimògens pancreàtics es revisa resumidament a l'apartat següent.

I.5.1. PROCÉS DE SECRECIÓ A LES CÈL.LULES EXOCRINES DEL PÀNCREAS

El procés de secreció a les cèl.lules exocrines del pàncreas es pot dividir, segons Palade (1975) en sis etapes: síntesi, segregació o traslocació, transport i processament, concentració, emmagatzament intracel.lular i descàrrega.

Per experiments de marcatge amb aminoàcids radiactius es va poder postular (Siekevitz i Palade, 1960) que el procés de **síntesi** de les proteïnes de la secreció exocrina es produeix en polissomes associats a la membrana del retícul endoplasmàtic rugós. Aquestes proteïnes posseeixen unes extensions N-terminals de l'existència de les quals en depèn la seva segregació. Com comenta Grossman (1984) els gens de totes

les proteïnes porten codificada a la seva seqüència de DNA la informació que especifica a quin lloc de la cèl.lula han de quedar finalment localitzades. Les cadenes neixents de proteïna que posseeixin una seqüència N-terminal especifica poden traslocar-se a través de la membrana del retícul endoplasmàtic (Blobel i Sabatini, 1971). Les cadenes polipeptídiques neixents que no posseeixin la seqüència senyal romandríen al citoplasma. D'aquesta manera, la **segregació** té lloc cap a l'interior del retícul endoplasmàtic. Entre les primeres evidències experimentals d'aquest fet es compten els experiments de Blobel i Dobberstein (1975a i 1975b) on es demostrava, en un sistema de ribosomes reconstituïts i microssomes, que només les proteïnes destinades a secreció portaven codificada al seu mRNA una seqüència que permetía, després de la seva traducció en polipèptid, la interacció de la cadena neixent amb la membrana microssomal i la subseqüent entrada a les cisternes de l'estructura reticular. Aquestes "seqüències senyal" solen tenir entre 15 i 30 residus aminoàcids i en general són riques en residus hidrofòbics en la seva zona central. Hom pensa que aquesta darrera característica facilitaría la interacció dels polissomes amb la membrana del retícul endoplasmàtic (Shields and Blobel, 1977).

Establert ja que la seqüència N-terminal "senyal" és necessària per a la segregació, queda per veure quin és el mecanisme amb què aquesta es produeix. Passa la seqüència N-terminal senyal a través de conductes intermembranosos del retícul endoplasmàtic arrossegant al darrera la resta del polipèptid o bé té lloc una altra mena de procés? La idea inicial que suposava el pas directe de la senyal a través de la membrana i posterior proteòlisi limitada que la separava del reste del polipèptid s'ha anat completant amb la caracterització del complex SRP (*signal recognition protein*) i d'una proteïna d'anclatge (DP, *docking protein*). El complex SRP, de 11 S (coeficient de sedimentació) i composat de 6 cadenes polipeptídiques i un fragment de RNA de 7 S (Walter et al., 1981; Walter i Blobel, 1982) sembla encarregar-se de (i) inhibir la traducció després de la seva unió a la seqüència senyal i (ii) reconèixer la proteïna d'anclatge situada a la membrana del RE (Meyer et al., 1982). A la Figura I.14 es representa un possible model de mecanisme de segregació que recull aquestes darreres aportacions.

Poc abans o just després de tenir lloc la traslocació es produeix una proteòlisi que elimina la regió N-terminal senyal, probablemenmt per acció d'una proteïnasa específica que hom creu present a la vora de la zona de penetració. S'ha comprobat que aquesta proteòlisi és necessària per al normal desenvolupament de l'activitat biològica de les proteïnes pancreàtiques exocrines (Scheele i Jacoby, 1983). La separació del pèptid senyal fa irreversible el pas de traslocació, minimitzant la interacció de la regió hidrofòbica amb la paret interna de la membrana del RE i impedint així el moviment invers.

Els posteriors processos de **processament i transport** acabaran de fer irreversible el dipòsit de proteïna a l'interior de les cisternes

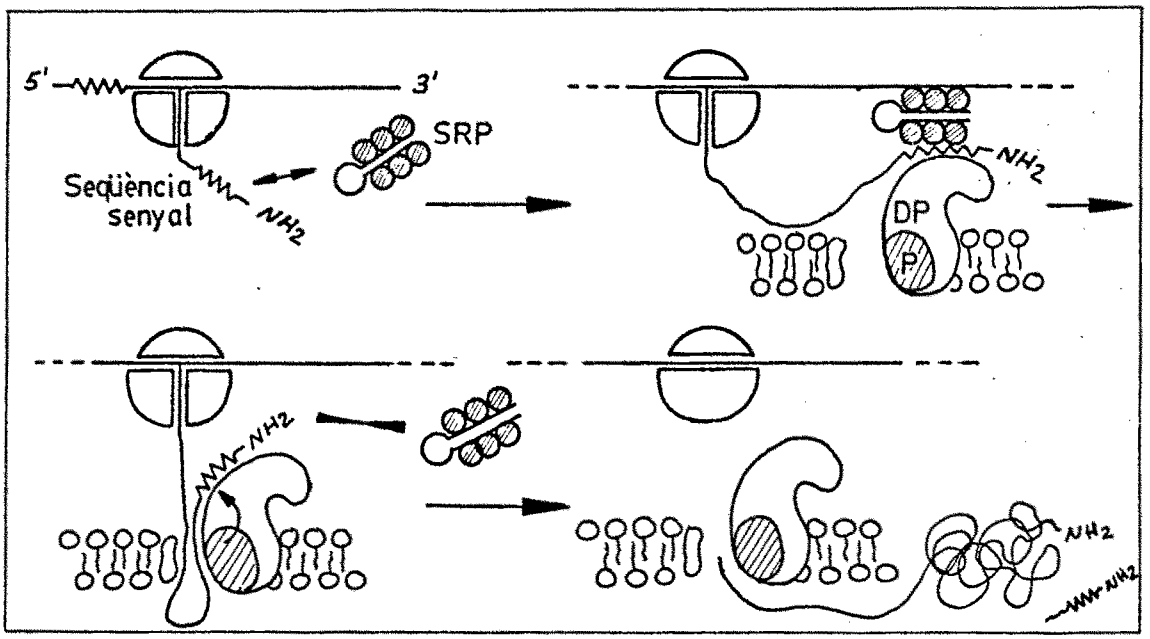


FIGURA I.14. Traducció i traslocació de les proteïnes de secreció. Els codons de la seqüència senyal són els primers en ésser traduïts. Aquest extrem de la cadena interacciona amb el complex SRP, inhibint momentàniament la traducció. A continuació el complex SRP-seqüència senyal és reconegut per una proteïna específica de membrana (DP). La traducció es reemprèn i la cadena neixent és guiada cap a l'interior de les cisternes del RE. Allí és on es produeix la proteòlisi que allibera el pèptid senyal de la resta de la cadena per mitjà d'una proteïnasa associada amb la DP.

del RE. Allí, les proteïnes es converteixen en globulars, adquirint diàmetres massa amples (>20 Å) per a poder passar per la membrana (Tedeschi et al., 1963). Les modificacions sofrides per les proteïnes inclouen formació de ponts disulfur (Anfinsen, 1966), glicosilació (Lodisch et al., 1981), conversió proteolítica en propolipèptids (Steiner et al., 1974), fosforilació (Hasilik i Neufeld, 1980), hidroxilació de residus lisina i prolina (Olsen et al., 1973) i altres modificacions postranscripcionals. Apart d'afectar a la posterior

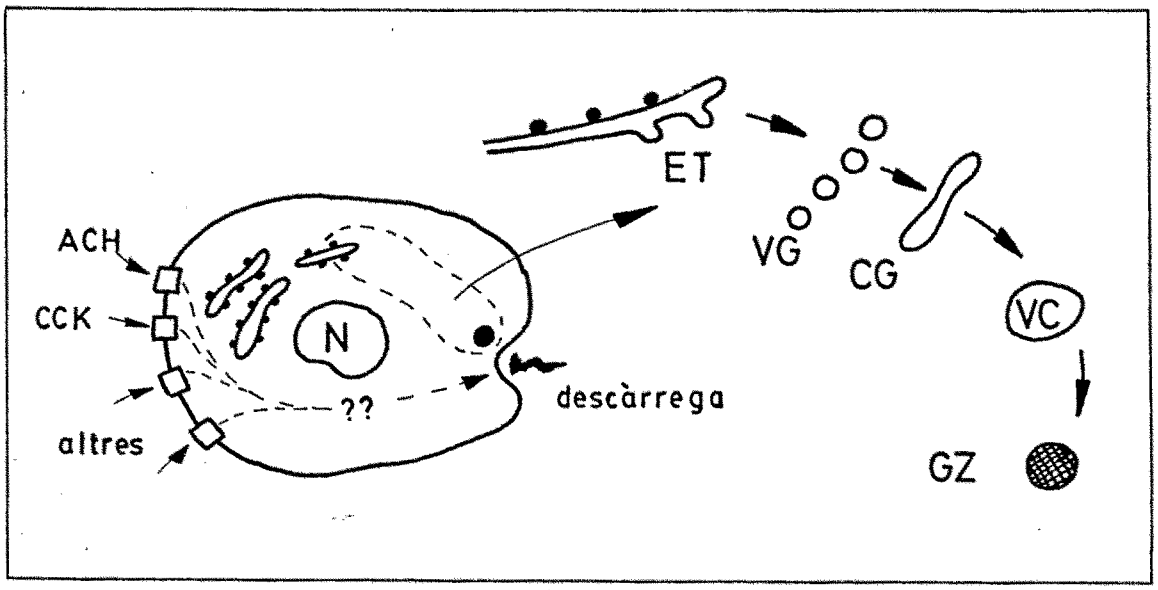


FIGURA I.15. Esquema de les estructures de la cèl.lula acinar relacionades amb la secreció. A la membrana de la cèl.lula hi ha diferents punts de fixació pels estimuladors externs de la secreció, els principals dels quals són aceticolina (ACH) i colecistoquinina (CCK). A l'ampliació superior es representa el procés de transport i concentració, des d'els elements de transició (ET) del RE, fins als grànuls de zimògen, passant per vesícules de Golgi, complex de Golgi i vacuoles condensants. No es coneix a fons el mecanisme pel que l'excitació de la membrana acinar dóna lloc a la fusió del grànul de zimògen amb la membrana cel.lular i posterior descàrrega a la llum del conducte pancreàtic. (Transcrit de Grossman, 1984).

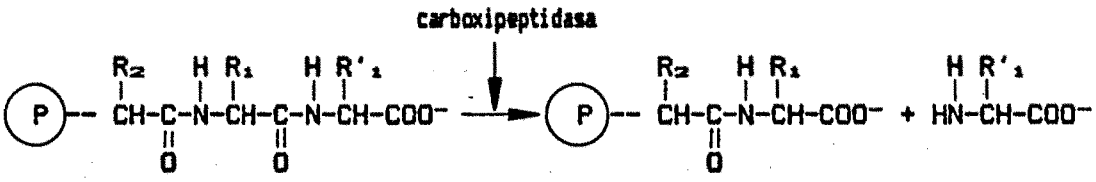
funcionalitat i conformació de la proteïna, aquestes modificacions poden constituir senyals del posterior destí final de les proteïnes als orgànuls adequats.

El transport de les proteïnes recentment sintetitzades té com a finalitat la seva ubicació als orgànuls adequats i la seva concentració. Aquest procés, esquematitzat a la Figura I.15, comença als anomenats elements de transició del retícul endoplasmàtic i acaba als grànuls de zimògen. El procés de transport i concentració necessita energía, com ho manifesta el fet del seu atur per inhibició de la fosforilació oxidativa (Jamieson, 1975); en canvi, la inhibició de la síntesi proteica no afecta el transport.

Una vegada formats, els grànuls de zimògen es mantenen dins la cèl.lula acinar en estat de possible descàrrega immediata per l'acció d'hormones esteroides (Grossman, 1984). La descàrrega és activada per estimulació procedent del nervi parasimpàtic mitjançant l'acetilcolina (Webster et al., 1977) o per acció d'una hormona peptídica, colecistoquinina, secretada per la mucosa intestinal (Case, 1978). Els agents estimuladors de la secreció anomenats són els principals, però no els únics estimuladors de la secreció, que es produeix per exocitosi o fusió de la membrana dels grànuls de zimògen amb la membrana plasmàtica. Estudis fets amb anticossos permeten deduir que els grànuls de zimògen contenen una barreja similar de tots els tipus de proteïnes secretores (Kraehenbuhl et al., 1977).

I.5.2. CARBOXIPEPTIDASES I PROCARBOXIPEPTIDASES

Les carboxipeptidases són enzims que catalitzen la hidròlisi de l'enllaç peptídic carboxi-terminal en cadenes polipeptídiques segons l'esquema:



Walschmidt-Leitz i Purr (1929) van ser els primers en descriure un enzim amb aquesta especificitat. Des de llavors s'han definit diversos tipus de carboxipeptidases. Les principals són les anomenades A, B, Y i C. La carboxipeptidasa A, aïllada en primer lloc per Anson (1935), hidrolitza preferentment enllaços peptídics on l'aminoàcid C-terminal posseeix una cadena lateral aromàtica o alifàtica neutra. La carboxipeptidasa B, aïllada per Folk (1956), presenta més afinitat per cadenes laterals de caràcter bàsic. Les carboxipeptidases Y i C són enzimes aïllades més recentment (Hayashi et al., 1970; Funakoshi et al., 1983), que presenten molt més ample especificitat i una estructura del centre actiu i mecanisme catalític diferents.

Depenent del seu mecanisme catalític, les carboxipeptidases poden classificar-se en metal.locarboxipeptidases i serina-carboxipeptidases. Les carboxipeptidases A i B són metal.loenzims que tenen al seu centre actiu un àtom de Zn^{2+}, indispensable per a la seva activitat catalítica. La carboxipeptidasa Y, en canvi, no posseeix cap àtom de metall i té una serina al centre actiu. Les carboxipeptidases millor estudiades entre les primeres són les d'origen pancreàtic, mentre que les segones s'aïllen de vacuoles de plantes superiors, fongs i lisosomes de cèl.lules animals (Breddam, 1986).

Les carboxipeptidases pancreàtiques se sintetitzen en forma de zimògens. Anson (1935) va ser qui primer va suggerir l'existència del zimògen de la carboxipeptidasa A de pàncreas de bou, el que va ser confirmat posteriorment per Keller et al. (1956, 1958). Tal com succeix amb l'enzim, la procarboxipeptidasa més estudiada és la A de pàncreas de bou. Altres procarboxipeptidases estudiades són la humana (Kim i White, 1971), de porc (Kobayashi et al., 1978), de rata (Quinto et al., 1982), de balena (Yoneda, 1980), pollastre (Zelicson et al., 1971), de *dogfish* (Lacko i Neurath, 1970) i de cabra, ovella i caball (Kerfelec et al., 1985). Algunes d'aquestes procarboxipeptidases es presenten en forma monomèrica; d'altres formen estructures quaternàries amb altres zimògens; i algunes es presenten en les dues formes. S'ha especulat amb que l'absència d'estructura quaternària pot traduir-se en una major velocitat d'activació (Lacko i Neurath, 1970). El nostre grup ha comprovat (Vendrell et al. 1982) en complexes artificials obtinguts a partir de subunitats aïllades de pàncreas de porc que l'estructura quaternària enlenteix el procés d'activació en un principi, fent-lo posteriorment més efectiu.

A l'igual que els zimògens d'altres enzims proteolítics (Kassell i Kay, 1973; Gertler et al., 1974), les procarboxipeptidases A posseeixen activitat intrínseca residual (Lacko i Neurath, 1970; Uren i Neurath, 1972; Martínez et al., 1981). Es considera que aquesta activitat intrínseca és deguda a que el centre catalític de l'enzim ja està preformat en el zimògen, i que la seva baixa afinitat pels substrats és deguda a deficiències en l'estructura del centre de fixació dels mateixos (Neurath i Walsh, 1976).

I.5.3. CARBOXIPEPTIDASA A DE PÀNCREAS DE BOU: ESTRUCTURA I MECANISME D'ACCIÓ

Es coneixen diverses formes de carboxipeptidasa A bovina. La seva heterogeneïtat és deguda a dues raons: (i) el mètode seguit per a l'activació del seu proenzim i (ii) al.lelomorfisme (Blackburn, 1976). Segons el mètode emprat per a l'activació es pot obtenir carboxipeptidasa A_α , A_β i A_γ , que tenen per aminoàcid N-terminal alanina, serina i asparagina, respectivament. Cada una d'aquestes formes pot existir al menys en dues formes al.lelomòrfiques: una que conté Ile, Ala i Val en posicions 179, 228 i 305 i una altra que conté Val, Glu i Leu en les mateixes posicions (Walsh et al., 1966; Petra et al., 1969).

Els diferents mètodes descrits per a l'aïllament de la carboxipeptidasa A donen lloc a l'obtenció de barreges de les diferents espècies. Aquestes barreges adopten el nom del mètode emprat per a la seva obtenció i així es coneix la carboxipeptidasa A (Anson) (Anson, 1937), la carboxipeptidasa A (Cox) (Cox et al., 1964) i la carboxipeptidasa A (Allan) (Allan et al., 1964).

Es coneix l'estructura primària completa de la carboxipeptidasa A bovina (Bradshaw et al., 1971) i la seva estructura tridimensional obtinguda per difracció de raigs X (Lipscomb et al., 1968). De fet, aquest va ser el primer enzim per a la que es va conèixer l'estructura per raigs X, fins i tot abans de deduir la seqüència completa, el que va ajudar a establir el nombre total de residus (307) i la presència de l'únic pont disulfur, permetent a la vegada la identificació d'alguns residus involucrats en la fixació de substrats i en la catàlisi.

El model obtingut per difracció de raigs X, del que se'n presenta un esquema a la Figura I.16, demostra que la carboxipeptidasa A té una forma general d'el.lipsoide compacta de dimensions aproximades 50 x 42 x 38 Å. Al centre de la molècula s'hi troba una estructura en làmina plegada, sobre la que s'empaqueten vuit regions en estructura d'hèlix α, la major part superficials. L'enzim es plega en tres dominis estructurals que es poden delimitar entre els residus 1-125, 126-189 i 190-307 (Litjas et al., 1974; Wodak i Janin, 1981). L'àtom de Zn^{2+} és adjacent a la fulla β , essent els seus tres lligands la His_{196}, que

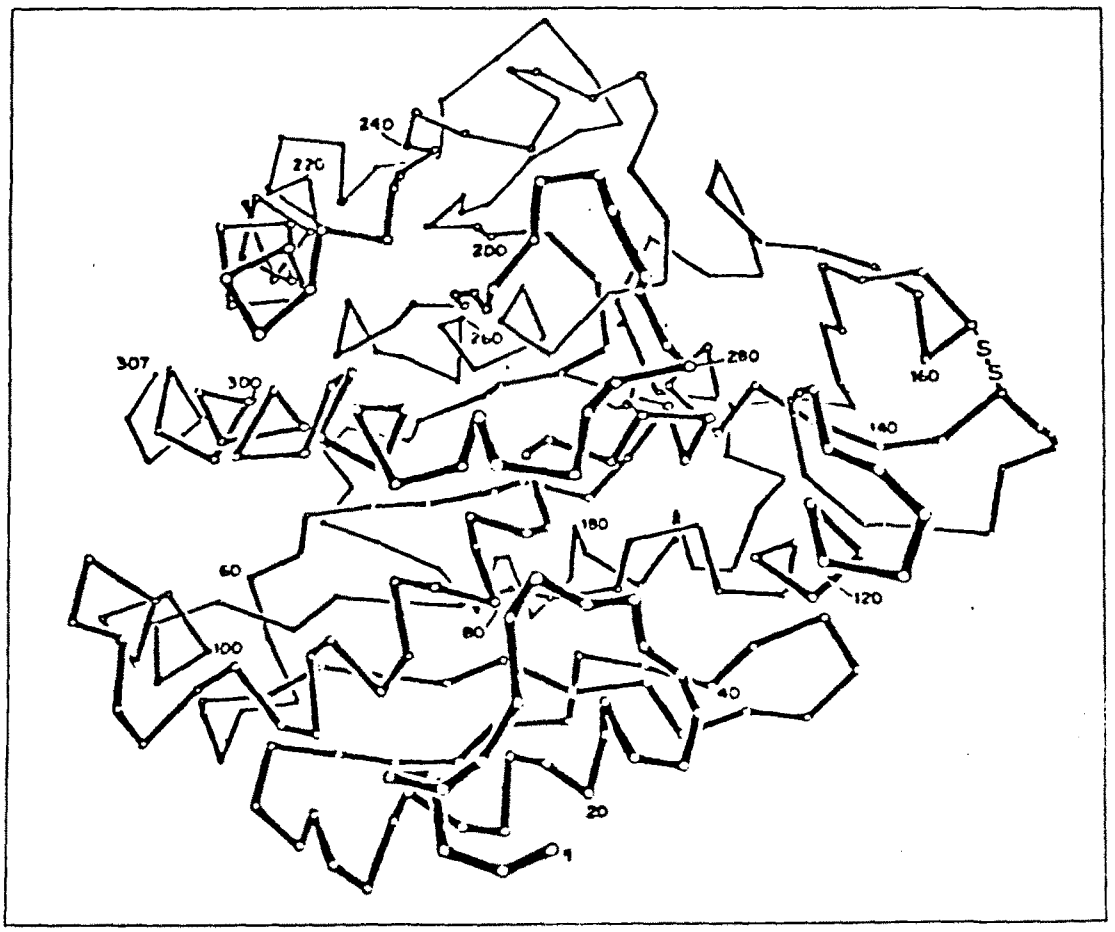


FIGURA I.16. Estructura tridimensional de la carboxipeptidasa A de pàncreas de bou. (Reproduït de Lipscomb et al., 1968).

forma part de la fulla β , la His_{69} i el Glu_{72}. La butxaca de fixació de substrats és capaç d'acomodar les sis restes C-terminals del substrat polipeptídic i acaba en una bossa que acomoda el grup lateral, hidrofòbic o alifàtic voluminós, del reste C-terminal. Es interessant comentar que al comparar les seqüències de les carboxipeptidasa A i B de pàncreas de bou (Titani et al., 1975) s'observa una homologia seqüencial del 49% i que tots excepte un dels residus funcionals identificats en la forma A es troben en el lloc corresponent a la forma B. L'excepció observada, el canvi d'una Ile per un Asp en la posició 255, pot explicar la diferència d'especificitat d'ambdós enzims.

Estudis cinètics fets amb substrats artificials de tipus peptídic i

de tipus ester han permès deduïr una sèrie de propietats en relació amb l'especificitat de la carboxipeptidasa A (Blackburn, 1976):

(i) L'enllaç peptídic a hidrolitzar ha d'estar adjacent al grup C-ter.

(ii) S'obté activitat màxima quan el grup lateral del residu terminal és aromàtic o de cadena alifàtica ramificada. La hidròlisi és pràcticament nul.la quan el residu C-terminal és Pro, Arg o Lys.

(iii) Els dipèptids amb grup amino lliure s'hidrolitzen lentament. La velocitat augmenta al bloquejar el grup amino lliure.

(iv) L'aminoàcid C-terminal ha d'estar en configuració L.

(v) La substitució del H del NH de l'enllaç peptídic a hidrolitzar per un grup metil (sarcosina) o metilè (prolina) redueix molt la velocitat d'hidròlisi.

(vi) El centre de fixació de substrats sembla ser força ampli i contenir diversos sub-setis. Al menys els quatre residus que van a continuació del C-terminal poden influir la K_m i la k_{cat}.

A partir dels estudis fets amb raigs X en presència d'un substrat artificial d'hidròlisi lenta (glicil-L-tirosina), Quiocho i Lipscomb (1971) van proposar un model de fixació de l'enzim amb el dipèptid (Figura I.17), que van ampliar al cas de la interacció amb substrats de major llargada. Segons aquests esquemes, el grup lateral de l'aminoàcid terminal s'inserta en una cavitat apolar que no conté cap grup enllaçant específic. El grup carbòxil lliure interacciona electrostàticament amb la Arg_{145}, mentre que el grup NH del l'enllaç peptídic a hidrolitzar interacciona, a través d'un pont d'hidrògen, amb la cadena lateral de la Tyr_{248}. La polarització del grup carbonil de l'enllaç peptídic a hidrolitzar vé facilitada per la interacció del seu àtom d'oxígen amb el Zn^{2+} del centre actiu. Les interaccions amb la tirosina i l'àtom de zenc redueixen el caràcter d'enllaç doble de l'enllaç peptídic. Per altra banda, el Glu_{270} interacciona amb el grup amino del substrat dipeptídic a través d'una molècula d'aigua, i amb el grup carbonílic de l'enllaç a hidrolitzar en el cas dels substrats llargs, ja sigui a través d'una

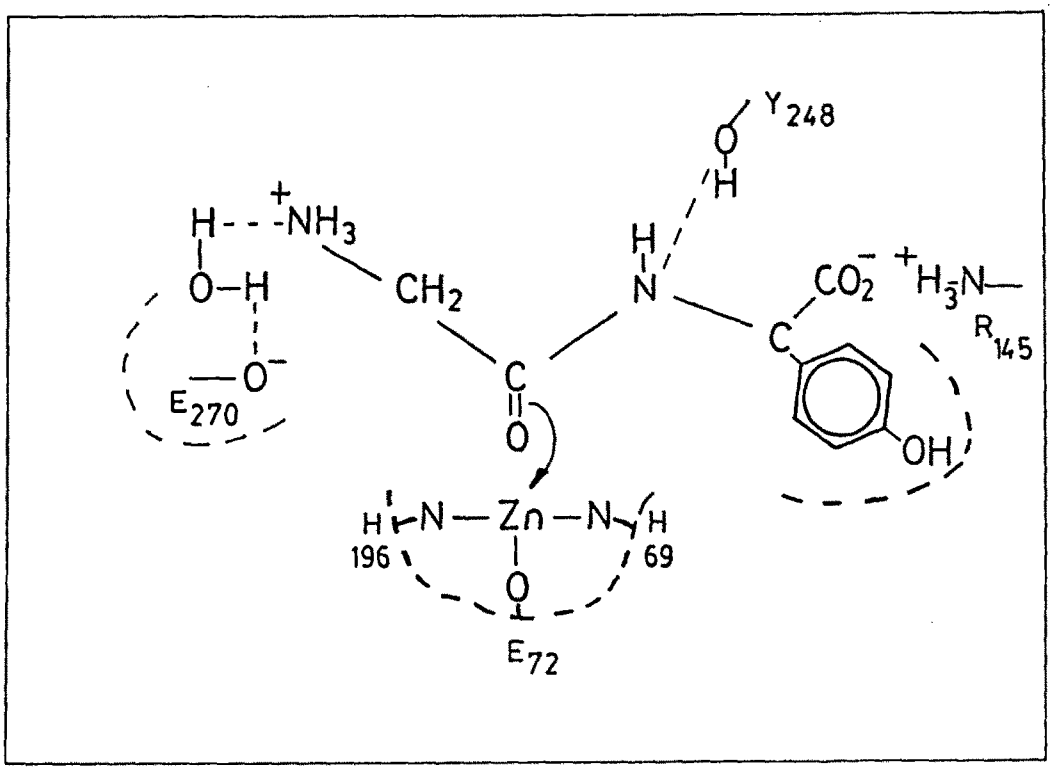


FIGURA I.14. Model de fixació del substrat glicil-L-tirosina al centre actiu de la carboxipeptidasa A.

molècula d'aigua o directament sobre el carboni.

La unió dels substrats indueix una sèrie de canvis conformacionals al centre actiu de l'enzim com són el desplaçament de 2 Å que sofreixen el grup guanidini de l'arginina 145 i el grup carboxílic del glutàmic 270 (Lipscomb et al., 1968). Per la seva part, el grup fenol de la tirosina 248 es desplaça des de la superfície de l'enzim fins a una distància equivalent a la de l'enllaç d'hidrògen amb respecte a l'enllaç a hidrolitzar, efectuant un recorregut total de 12 Å (Rees i Lipscomb, 1981). La unió del grup carbonílic del substrat amb el Zn^{2+} desplaça una molècula d'aigua, i al menys quatre molècules més d'aigua són desplaçades de la cavitat no polar al ser ocupada per l'anell de la tirosina. També s'ha comprobat que els residus Tyr_{198}, Phe_{279} i

Arg_{124} són probablement presents als sub-llocs de fixació de substrats llargs.

En el mecanisme de catàlisi proposat per Lipscomb et al. (1968), establerts el paper fixador de l'arginina 145 i la funció de l'àtom de Zn^{2+} com a polaritzador del grup carbonil de l'enllaç a hidrolitzar, es considera que el grup fenol de la tirosina 248 actúa com a donador de protons al grup NH i que el glutàmic 270 efectúa un atac nucleofílic sobre el carboni del grup carbonil de l'enllaç susceptible. Aquest atac podria tenir lloc mitjançant la formació d'un anhídrid intermedi entre el glutàmic 270 i el substrat o bé mitjançant l'activació per part del residu àcid d'una molècula d'aigua que donaria un grup hidròxil.

Aquest mecanisme de catàlisi, fins ara plenament acceptat, ha estat contestat darrerament per experiments de mutagènesi dirigida sobre la posició 248 de la carboxipeptidasa A de rata (Gardell et al., 1985). La hipòtesi que contemplava el paper donador de protons de la Tyr_{248} sembla va quedar corroborada per estudis de modificació química d'aquest residu que demostraven un decrement en l'activitat peptidàsica i un increment en l'activitat esteràsica (Riordan et al., 1967; Urdea i Legg, 1979). Això estava d'acord amb la necessitat de la cessió d'un protó per a trencar enllaços peptídics i en l'absència d'aquesta necessitat a la hidròli d'esters. No obstant, els experiments de Gardell i col., en els que la tirosina 248 ha estat substituïda per una fenilalanina, demostren que la CPA-Phe 248 presenta uns valors de k_{cat} per a diversos substrats peptídics i esters pràcticament idèntics als obtinguts amb l'enzima no modificada. En canvi, a la carboxipeptidasa A modificada els valors de K_m i de K_i per a substrats peptídics i per a l'inhibidor de carboxipeptidasa de patata augmenten 6 i 70 vegades, respectivament. Això és indicatiu que l'hidròxil fenòlic de la tirosina 248 no actúa com a donador de protons, però sí participa en la fixació de substrats.

Si bé es coneix l'estructura tridimensional de l'enzim actiu, no hi ha informació d'aquesta mena referent a la forma proenzimàtica, i per tant a la interacció de la CPA amb el segment d'activació. Es coneix, però, un sistema en certa manera relacionat, com és el complex format per la carboxipeptidasa A i l'inhibidor aïllat a partir de la patata. Aquest és un polipèptid de 39 residus que s'organitza estructuralment al

voltant d'un nucli de ponts disulfur i que actúa com un inhibidor competitiu. Rees i Lipscomb (1982) van resoldre l'estructura tridimensional del complex per difracció de raigs X i van deduir que els quatre residus C-terminals de l'inhibidor s'uneixen a la butxaca del centre actiu de l'enzim. També van poder definir quatre subsetis de fixació anomenats S'_1, S_1, S_2 i S_3, on hi participen certs residus implicats a la catàlisi i fixació de substractes i d'altres residus propers. Cal recordar que les diferències amb el segment d'activació no són només estructurals, sinó que a més l'inhibidor de patata no és específic de CPA i CPB, mentre que el segment és exclusivament específic de CPA (San Segundo et al., 1982). A la Figura I.18 es pot veure el model proposat per Rees i Lipscomb per aquest complex.

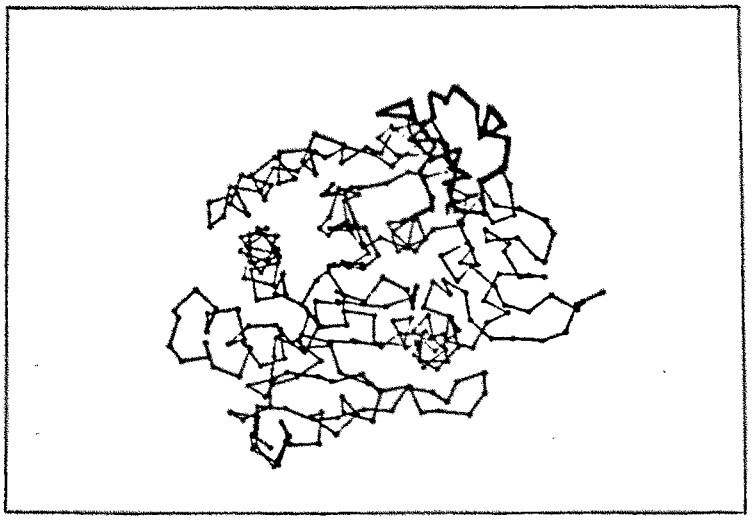


FIGURA I.18. Representació tridimensional del complex format per la carboxipeptidasa A i l'inhibidor de patata (línia gruixuda). (Reproduït de Rees i Lipscomb, 1982)

I.5.4. PROCARBOXIPEPTIDASA A DE PÀNCREAS DE BOU: ESTRUCTURA I PROCÉS D'ACTIVACIÓ

Malgrat que el coneixement de l'existència d'un precursor per a la carboxipeptidasa A de pàncreas de bou data de l'any 1935, la procarboxipeptidasa A va ser aïllada per primera vegada per Keller i col. a l'any 1956 a partir de pols de pàncreas. L'elevat pes molecular observat llavors pel zimògen (96.000 en comparació amb el de 34.000 corresponent a l'enzima ja feia pensar en la possible presència d'estructura quaternària. Efectivament, més endavant es va comprobar que la procarboxipeptidasa A era present en dues formes a pàncreas de bou: formant un complex ternari anomenat PCPA 6S (Brown et al., 1961; Yamasaki et al., 1963; Brown et al., 1963a) i formant un complex binari anomenat PCPA 5S (Brown et al., 1963b). Dins del complex ternari, l'anomenada subunitat I és la precursora immediata de la carboxipeptidasa A, la subunitat II és precursora d'una quimotripsina C, i la subunitat III, present només al complex ternari, és un zimògen molt semblant al quimotripsinògen. Aquesta tercera subunitat ha estat definida com un zimògen no activable (Puigserver i Desnuelle, 1975; Puigserver, 1976; Wicker i Puigserver, 1981) i que podria estar relacionada amb el zimògen E, precursor de la proteïnasa E, d'activitat complementària a la de les quimotripsines (Kobayashi et al., 1981b).

La procarboxipeptidasa A de pàncreas de bou presenta doncs una estructura d'antuvi força complicada; només es coneixen complexes ternaris on hi participa aquest zimògen en espècies remugadores (Kerfelec et al., 1985). L'estructura quaternària suposa un fre considerable a l'estudi de les característiques estructurals i del procés d'activació del zimògen de la carboxipeptidasa A . La disgregació de les subunitats és, a més, força difícil, i no sempre és possible obtenir-les en estat natiu o sense modificacions irreversibles. Un altre factor de complicació el constitueix la llargada tant considerable del seu segment d'activació si el comparem amb els d'altres proteases pancreàtiques digestives: aproximadament 100 residus, en comparació amb els 6 que té, per exemple,el de la tripsina. D'aquí en resulta immediata la sospita d'un possible paper fisiològic secundari per al segment

d'activació aïllat, que no sigui el de ser simplement degradat als seus aminoàcids constitutius.

Han estat descrits procediments per a disgregar els complexos quaternaris formats per la procarboxipeptidasa A. Brown i col. (1963a) van utilitzar urea 5 M o un medi alcalí a pH 10,5, però en ambdós casos es va obtenir el zimògen desnaturalitzat irreversiblement. El procediment de succinil.lació (Freisheim et al., 1967a) rendeix subunitats activables però modifica irreversiblement els residus de lisina (Freisheim et al., 1967b). Més tard, el grup de Marsella (Puigserver i Desnuelle, 1975 i Kerfelec et al., 1984) ha descrit un mètode que permet obtenir subunitats natives i no modificades mitjançant el tractament previ dels complexes amb anhídrid dimetilmaleic. Aquesta acil.lació és reversible a pH neutre i rendeix subunitats en les que és possible estudiar el procés d'activació i la seva reassociació amb els altres zimògens. Per estudis d'aquesta mena es va poder deduir que la subunitat I, precursora de la carboxipeptidasa A, juga un paper central al zimògen, puix que sense la seva presència no és possible la unió de les altres dues subunitats (Puigserver i Desnuelle, 1977).

S'han proposat diverses hipòtesis per explicar el mecanisme d'activació de la procarboxipeptidasa A. Brown i col. (1963a) van proposar un mecanisme per a la PCPA 6S i per a la 5S en dues etapes, segons el que la subunitat II és sempre la primera en ser activada i es produeix finalment una dissociació dels complexes quan la concentració de tripsina és molt elevada. No obstant, el fet que la carboxipeptidasa A pugui associar-se amb les altres dues subunitats (Behnke et al., 1970) i que no s'hagi observat dissociació en una altra espècie estudiada (San Segundo et al., 1982) fa dubtar de la validesa de les anteriors conclusions. Es interessant comentar aquí que el fet que la carboxipeptidasa A pugui associar-se amb les altres subunitats exclou al segment d'activació com a regió de possible unió entre protòmers.

Uren i Neurath (1972) van proposar un mecanisme d'activació del complex binari, que es troba esquematitzat a la Figura I.19. Segons aquests autors, la subunitat II és la primera en ser activada, rendint una quimotripsina. La presència de Ca^{2+} afavoreix la dissociació de les subunitats. . L'addició en aquest punt de tripsina o de quimotripsina

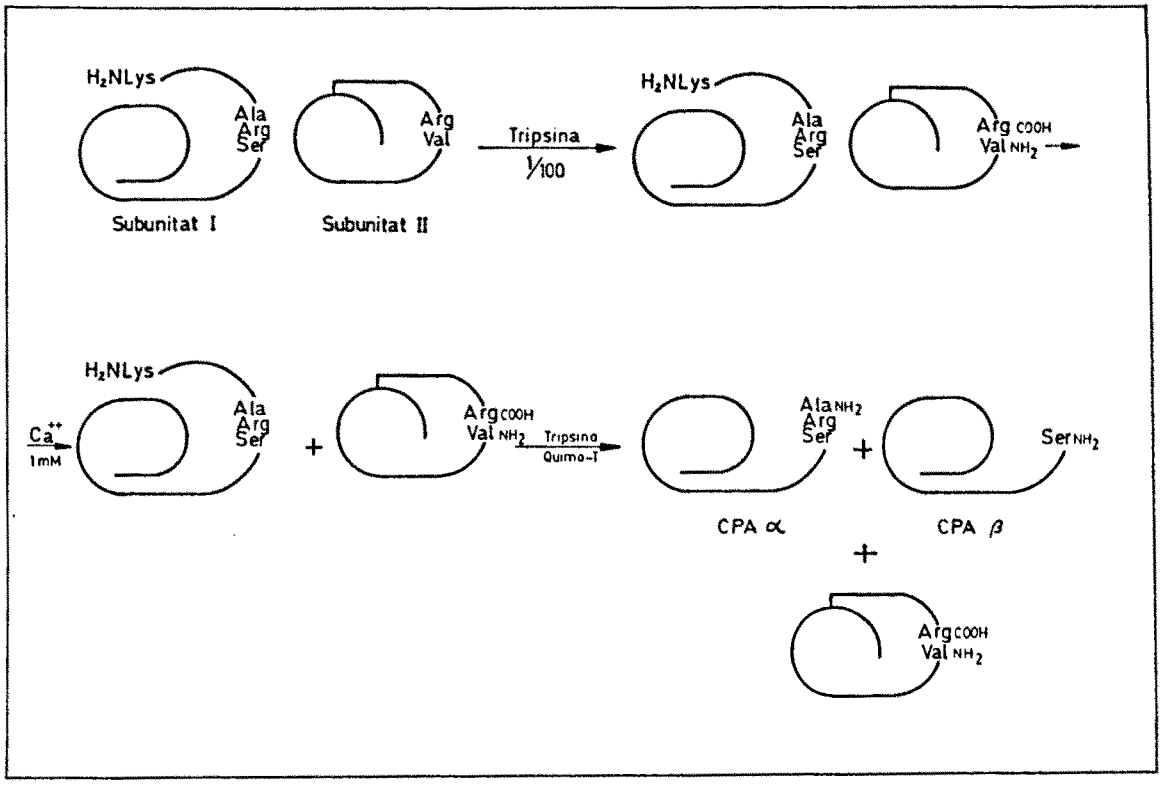


FIGURA I.19. Mecanisme d'activació per al complex binari de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de bou proposat per Uren i Neurath (1972).

donarà lloc a l'aparició de carboxipeptidasa A en forma α i β indistintament en el primer cas, i en forma majoritàriament α en el segon. Veurem més endavant que el coneixement de la seqüència prévia a la Ala N-terminal de l'enzima fan difícil imaginar que l'activació en presència únicament de quimotripsina no fos deguda a contaminacions tríptiques en la preparació.

També s'han fet estudis d'activació de les subunitats aïllades per diversos procediments. Freisheim i col. (1967b) van observar per primera vegada que la subunitat I aïllada s'activava més ràpidament que dins del complex d'on provenia. En aquest treball es criticava l'anterior hipòtesi que definía la subunitat II com un participant obligatori al

mecanisme d'activació. Per la seva part, Puigserver i Desnuelle (1977) han demostrat que l'activació de la subunitat I era enlentida per l'estructura quaternària, mentre que en l'activació de la subunitat II es produïa l'efecte invers.

A l'igual que succeeix amb altres zimògens, la procarboxipeptidasa A presenta una certa activitat intrínseca residual. Compleix en aquest aspecte un dels casos generals, que suposa una preformació del centre catalític i una deformació del centre de fixació de substrats, donat que estudis cinètics han demostrat que els llocs de fixació de substrats peptídics no són iguals al zimògen i a l'enzim (Bazzone i Vallee, 1976).

I.6. CARBOXIPEPTIDASES A I PROCARBOXIPEPTIDASES A DE PÀNCREAS DE PORC

I.6.1. CARBOXIPEPTIDASA A PORCINA

La primera descripció del sistema de carboxipeptidases A de pàncreas de porc va ser fet per Folk i Schirmer (1963). En aquest treball es definien tres formes de l'enzim que es diferenciaven en mobilitat electroforètica, encara que no en propietats enzimàtiques. Els autors anomenaven aquestes tres formes com carboxipeptidases A_1, A_2 i A_3. D'elles va ser possible aïllar i caracteritzar fins un cert punt les dues primeres. Folk (1963) va demostrar que la forma A_2 es deriva de la de la forma A_1 per tractament amb tripsina i mitjançant l'alliberament al medi d'un dipèptid alanilarginina. Així mateix, l'anàlisi dels residus N-terminals de les dues formes de carboxipeptidasa A va evidenciar que aquests eren Ala per a la forma A_1 i Thr per a la forma A_2. Kobayashi et al. (1978) van aïllar la forma β de l'enzim i en seqüenciaren la regió N-terminal, observant que coincidía en aminoàcid N-terminal amb l'anomenada A_2 per Folk i Schirmer (1963). Finalment, el treball de Koide et al. (1981) va permetre acabar de definir la regió N-terminal en aïllar aquests autors la forma anomenada $A\gamma$, que presentava una seqüència perfectament homòloga amb la mateixa forma A de pàncreas de bou. A la Figura I.20 es pot veure la seqüència N-terminal de carboxipeptidasa A de pàncreas de porc on es recull les dades les publicacions esmentades fins aquí en aquest paràgraf. Es comprova que les formes anomenades 1, 2 i 3 per Folk i Schirmer són equivalents a les formes α, β i γ definides en pàncreas de bou, i que la homologia observada entre ambdues zones N-terminals és molt important.

Les propietats físico-químiques i enzimàtiques de la carboxipeptidasa A de pàncreas de porc són molt semblants a les descrites per a l'enzim equivalent en bou. El seu pes molecular és de 34.800 (Folk i Schirmer, 1963) i conté un àtom de Zn^{2+} fortament fixat i un altre dèbilment fixat (Vilanova, 1986). Les resemblances amb

```
            α   β                 γ      (10)                                (20)
CPA de bou  Ala-Arg-Ser-Thr-Asn-Thr-Phe-Asn-Tyr-Ala-Thr-Tyr-His-Thr-Leu-Asp-Glu-Ile-Tyr-Asp-
CPA de porc Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Thr-Phe-Asn-Tyr-Ala-Thr-Tyr-His-Thr-Leu-Glu-Glu-Ile-Tyr-Asp-

                                        (30)
CPA de bou  Phe-Met-Asp-Leu-Leu-Val-Ala-Gln-His-Pro-Glu-Leu
CPA de porc Phe-Met-Asp-Ile-Leu-Val-Ala-Glu-His-Pro-Gln-Leu
```

FIGURA I.20. Seqüències N-terminals de les carboxipeptidases A de pàncreas de bou i de porc, amb indicació de les diferents formes classificades segons aminoàcid N-terminal. (Dades agafades de Folk (1963); Kobayashi et al., (1978) i Koide et al., (1981a).

l'enzim de bou són també extensibles a les seves característiques cinètiques pel que respecta a la hidròlisi de substrats artificials i a la seva especificitat per residus C-terminals aromàtics o alifàtics ramificats.

I.6.2. PROCARBOXIPEPTIDASA A PORCINA

En pàncreas de porc s'ha trobat la procarboxipeptidasa A en dues formes: una monomèrica i una altra en la que es troba formant un complex binari amb el zimògen de la proteïnasa E (Kobayashi et al., 1978). Aquestes dues formes van ser caracteritzades primerament a partir de secreció pancreàtica i la seva existència va ser confirmada més tard al aïllar-les el nostre grup a partir de pols pancreàtics (Martínez et al. 1981). Els estudis sobre el pes molecular de les dues formes de procarboxipeptidasa A permetía observar discrepàncies entre les dades

obtingudes per electroforesi en SDS i per gel-filtració. La determinació de coeficients de sedimentació, coeficients de difusió i volums específics parcials va permetre calcular amb millor precisió les masses relatives i l'asimetria i grau de solvatació de les dues formes proenzimàtiques (Martínez et al., 1983). Es va comprovar que els valors així obtinguts, 71.000 per al complex binari i 46.000 per a la forma monomèrica, estaven d'acord amb els deduits a partir de l'anàlisi electroforètica en presència de SDS, del que es desprèn que els valors més baixos obtinguts en cromatografia en gel-filtració són deguts a una interacció amb la matriu cromatrogràfica, sent l'assimetria dels zimògens massa baixa com per a justificar per ella sola les diferències observades.

La forma activa del monòmer té un pes molecular aproximat de 35.000, i per tant se li pot adjudicar al segment d'activació un pes molecular aproximat de 11.000. Per altra banda, la subunitat que acompanya a la precursora d'activitat carboxipeptidasa A en el complex binari presenta per electroforesi en SDS un pes molecular de 26.000, amb una forma activa d'essencialment el mateix pes molecular. Segons el treball de Kobayashi i col. al 1978 aquest zimògen és el precursor d'una proteïnasa que no és una quimotripsina C com la subunitat II de pàncreas de bou, sino que s'assembla a la proteasa E, una serina-proteïnasa relacionada amb l'elastasa pancreàtica (Mallory i Travis, 1975). Els mateixos autors van caracteritzar més tard l'especificitat de la proteïnasa E (Kobayashi et al., 1981a) i comprovaren que l'enzim té una elevada selectivitat hidrolítica pels extrems carbonil de residus valina, serina, treonina i alanina, especificitat que és complementària a la de les quimotripsines, que hidrolitzen preferentment enllaços peptídics on el grup carbonil és aportat per aminoàcids aromàtics, leucina i metionina. A més, la baixa capacitat de la proteïnasa E per a digerir elastina fa pensar que pertany a la família de les quimotripsines més que no a la de les elastases (Kobayashi et al., 1981a).

Koide i Yoshizawa (1981b) cristal.litzaren i identificaren un complex binari de carboxipeptidasa A i elastasa-I a partir d'extractes activats de pàncreas de porc. La seqüència N-terminal de la subunitat

elastasa no presentava coincidències clares amb la corresponent a la proteïnasa E, donant a entendre la possibilitat d'existència de formes oligomèriques encara no descrites per a la procarboxipeptidasa A en pàncreas de porc.

Fent un incís dins la definició dels zimògens trobats en porc i tornant al sistema bovi, aquesta revisió de Kobayashi et al. respecte a l'assignació de la proteïnasa E a la família de les quimotripsines estableix un nexe d'unió entre els diferents punts de vista mantinguts respecte a la naturalesa de la subunitat III en pàncreas de bou. En efecte, Kobayashi i col. (1981b) trobaren que un precursor de la proteïnasa E formava part en pàncreas bovi d'un complex ternari amb la procarboxipeptidasa A i el quimotripsinògen C. Aquest pot molt bé ser el mateix complex conegut com PCPA S6 (Brown et al., 1961) on, en opinió de Puigserver i Desnuelle (1975), la subunitat III és un zimògen no activable. Si es compara la seqüència dels 31 primers residus del zimògen E de porc (Kobayashi et al., (1978) amb la seqüència obtinguda per a la subunitat III de bou (Venot et al., 1986) es comprova que hi ha

		(10)	(20)
Zimògen E	X -Gly-Arg-Pro-Ser-Tyr-Asn-Pro-Ala-Ala-Arg-Val-Val-Asn-Gly-Glu-Asp-Ala-Val-Pro-		
Subunitat III			Asn-Gly-Glu-Asp-Ala-Val-Pro-

		(30)	
Zimògen E	Tyr-Ser-Trp-Pro-Trp-Glx-Val- X -Leu-Glx-Tyr-		
Subunitat III	Tyr-Ser-Trp-Ser-Trp-Gln-Val-Ser-Leu-Gln-Tyr-		

FIGURA I.21. Comparació entre les seqüències del zimògen E de pàncreas de porc (Kobayashi et al., 1978) i de la subunitat III de pàncreas de bou (Venot et al., 1986). Es comprova que la homologia és molt elevada considerant l'alineació proposada i que l'única diferència comprovada es dóna a la Pro_{24} del zimògen E (Ser a la sub. III).

una homologia del 83% entre els residus 1-18 de la subunitat III i els residus 14-31 del zimògen E de porc (Figura I.21). Això podría molt bé indicar dues coses: (i) es tracta del mateix tipus de proteïna, donat que és difícil esperar una tant elevada resemblança entre proteïnes diferents d'espècies diferents i (ii) és possible que a la subunitat III aïllada per Puigserver i Desnuelle li manquin els primers 13-17 residus, possiblement a causa del procés d'obtenció. Al trobar-se entre aquests els dos residus fortament hidrofòbics (numeració 16 i 17 al quimotripsinògen, possiblement 12 i 13 al zimògen E) importants per a l'estabilització de la butxaca de fixació de substrats (Sigler et al., 1968), s'explicaria la manca d'activitat discutida per Puigserver (1975), així com la manca d'activabilitat, en haver perdut la subunitat III la seva regió d' activació.

Ambdues formes de procarboxipeptidasa A (monòmer i complex binari) són capaces de fixar fortament un àtom de Zn^{2+} i feblement un altre (Vilanova, 1981). La fixació d'aquest àtom addicional de Zn^{2+} sembla afectar tant a l'activitat residual de la proenzima com a la de l'enzima activa. També s'ha descrit la presència d'una petita proporció de sucres (hexoses i galactosamines) a les dues procarboxipeptidases A de pàncreas de porc (Martínez et al., 1981), fet no observat per a cap altra forma fins ara estudiada.

A l'igual que succeix amb altres complexes quaternaris on hi participen les procarboxipeptidases A, el complex binari aïllat de pàncreas de porc és difícilment dissociable en les seves subunitats formadores. Ni tant sols el procediment de dimetilmal.leilació que rendeix subunitats separades i natives e pàncreas de bou (Puigserver i Desnuelle, 1975) és aplicable a la forma binària de porc (Vendrell, 1981). Això ha dificultat la comparació entre les dues subunitats precursores de la carboxipeptidasa A en les dues formes proenzimàtiques. Malgrat les dificultats, però, va ser possible separar les dues subunitats del complex binari en estat natiu (Vendrell et al., 1982), comprovant-se per mapes peptídics obtinguts mitjançant tractament amb àcid iodosobenzoic i bromur de cianògen (San Segundo, 1982) i per anàlisi d'aminoàcids (Martínez et al., 1981) i seqüenciació dels 7 primers residus N-terminals (Kobayashi et al., 1978), que no hi havia

diferències entre les dues PCPAs pel que respecta a aquests punts.

A partir de les subunitats aïllades es van fer estudis de reassociació tant del complex natural com de complexos artificials que van permetre observar diferències en el procés d'activació de la forma monomèrica i del complex binari (Vendrell et al., 1982 i aquesta Tesi). Estudis d'associació seguits per electroforesi en gradients d'urea van permetre observar una forta interacció entre la carboxipeptidasa A i la proproteïnasa E i una interacció de grau inferior, però considerable, entre el segment d'activació i la proproteïnasa E (veure Figura I.22). Aquests resultats suggereixen que, malgrat que la forta associació entre les dues subunitats és deguda a la interacció entre les seves regions enzimàtiques actives, el segment d'activació de la procarboxipeptidasa A participa també en la unió. Aquesta interacció altera probablement la conformació del segment d'activació, la seva accessibilitat a la tripsina o ambdues coses, i podría afectar el procés d'activació tríptic (Vilanova et al., 1985).

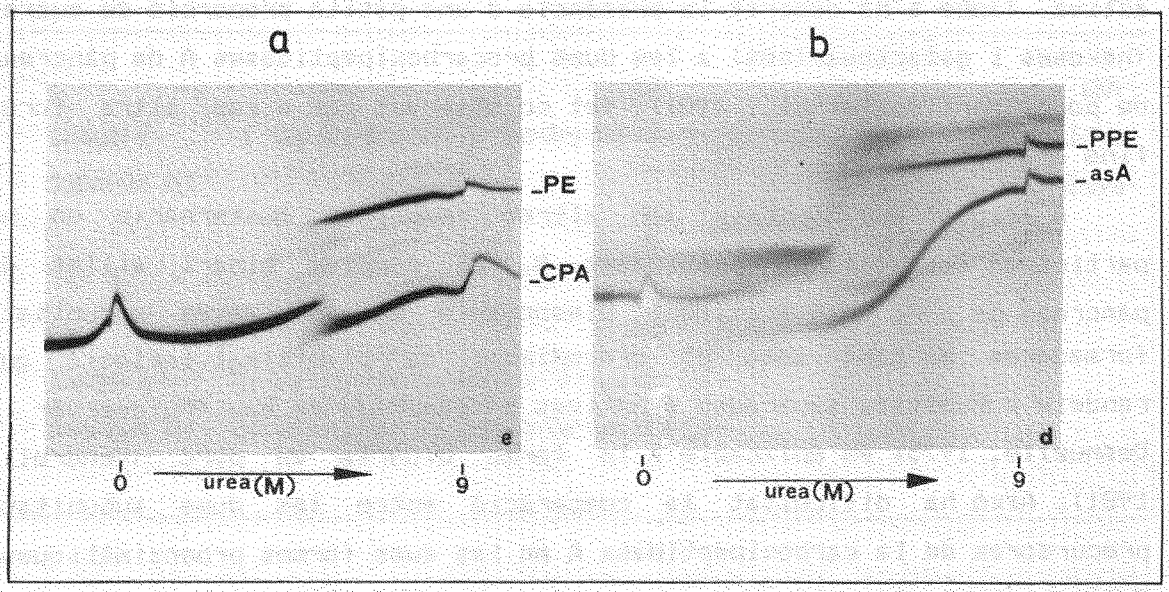


FIGURA I.22. Comportament electroforètic en gels de poliacrilamida en gradient d'urea de (a) complex artificial de proteïnasa E i carboxipeptidasa A a relació equimolar i (b) complex artificial entre el segment d'activació de la PCPA i la proproteïnasa E a relació equimolar. Per detalls veure Vilanova i col. (1985).

I.6.3. SEGMENT D'ACTIVACIÓ DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A PORCINA

De la mateixa manera que succeeix en l'espècie bovina, el segment d'activació de la procarboxipeptidasa A de porc és un fragment polipeptídic de llargada considerable, estimada en uns 100 residus, corresponents a un pes molecular d'aproximadament 11.500, calculat a partir d'electroforesi en poliacrilamida-SDS i per diferència entre el proenzim i la forma activa (San Segundo et al., 1982). Aquest valor no coincideix amb el de 6.800 obtingut per a la PCPA de pàncreas de bou (Freisheim et al, 1967b), però sí acceptablement amb el valor de 10.865 calculat per als 94 residus corresponents al segment d'activació de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de rata (Quinto et al., 1982). Aquesta darrera proenzim és l'única de la que es coneix fins ara la seqüència, obtinguda a partir del corresponent alineament de bases del seu cDNA, que va permetre a més conèixer l'estructura primària de la zona que codifica per al pèptid senyal (la part pre- de la preprocarboxipeptidasa A). A la Figura I.23 es reprodueix la seqüència corresponent a la proteïna de rata.

El segment d'activació s'uneix fortament a l'enzim actiu i pot separar-se d'ella per cromatografia en DEAE-Sepharosa en presència d'urea 7M (San Segundo et al., 1982). Mitjançant estudis d'inhibició fets amb les dues cadenes polipeptídiques aïllades es dedueix que el segment d'activació es comporta com un potent inhibidor competitiu de la carboxipeptidasa A, amb una K_i de 4,5 nM (San Segundo et al., 1982). Aquests estudis d'inhibició van ser fets amb un pèptid producte del tractament del zimògen amb baixes relacions de tripsina i a temps curts, el que, juntament amb el fet que presentés com a residu N-terminal un reste de lisina, el mateix que el proenzim, i que la carboxipeptidasa A obtinguda del procés fos la forma més llarga de l'enzim (la forma α , amb reste N-terminal alanina), permeten pensar que el pèptid aïllat conté la totalitat del segment d'activació i és el producte d'un únic trencament.

L'anàlisi d'aminoàcids del polipèptid indica que aquest és ric en residus hidrofòbics i acídics, i que no conté cisteïnes. Es de remarcar

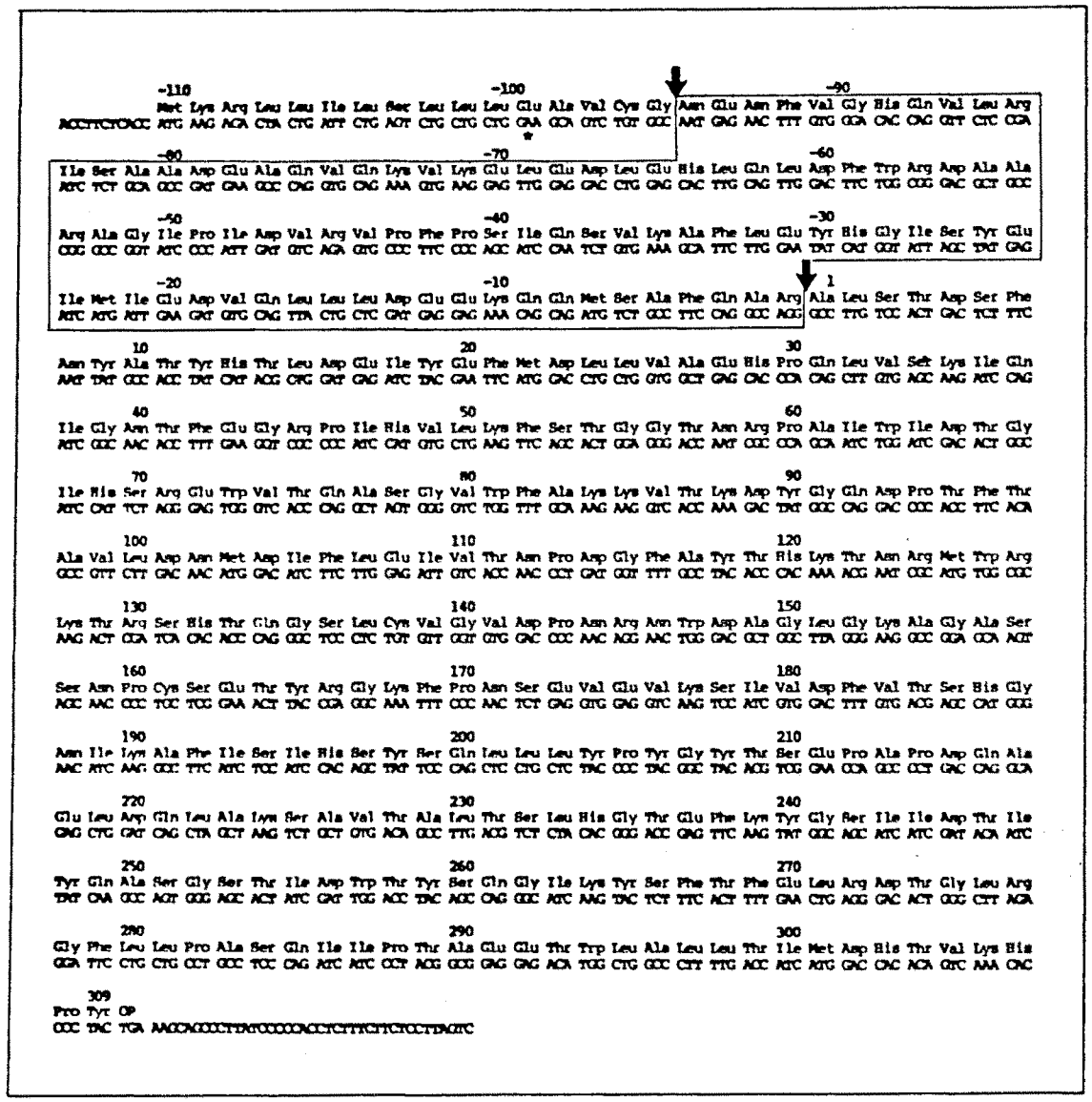


FIGURA I.23. Seqüència de nucleòtids i corresponent seqüència d'aminoàcids de la preprocarboxipeptidasa A de pàncreas de rata segons Quinto et al. (1982). La regió corresponent al pèptid d'activació s'indica enquadrada.

també la forta interacció que es dóna entre el segment i l'enzim actiu: un digerit tríptic de procarboxipeptidasa A no pot ser separat en els seus components ni per cromatografia en gel filtració en Biogel P-100 ni per cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-Sepharosa, indicacions de que el segment es troba fortament unit a l'enzim i coelueix amb ell (San Segundo et al., 1982).

Estudis de ressonància magnètica nuclear (RMN) de protó fets amb el segment d'activació aïllat indiquen que aquest adopta una estructura globular termoestable (Avilés et al., 1982). En aquest mateix treball, estudis de dicroïsme circular indiquen que el segment aïllat posseeix un contingut d'entre el 57 i el 65% en α-hèlix i entre el 8 i el 24% en estructura β . Aquests resultats suggereixen en conjunt que el segment d'activació constitueix un domini estructural plegat dins el proenzim. Aquesta consideració va poder ser comprovada posteriorment en observar per estudis de calorimetria (López et al., 1984) la presència de tres dominis estructurals en el zimògen i de només dos en l'enzim.

Estudis fets posteriorment també amb RMN de protó van permetre reafirmar les anteriors consideracions, aportant a la vegada altres dades: (i) la presència de posicions espectrals diferents per a les histidines presents al segment i l'aparició de *ring-current-shifts* a ressonàncies corresponents a grups metil abonen la consideració del segment com a proteïna globular en estat aïllat; (ii) una, com a mínim, de les tirosines de la molècula es troba al seu interior; (iii) el bescanvi de protons dels grups NH- i dels protons C2- de les histidines és lent, indicatiu d'un fort plegament; (iv) el segment és molt resistent a la desnaturalització per urea, tal i com succeïa amb la desnaturalització tèrmica (Avilés et al., 1984). En conjunt les característiques espectrals eren semblants a les observades en altres proteïnes petites i sense ponts disulfur i permetien deduir que, ultra posseir una conformació globular compacte, el segment d'activació presenta un grau elevat de moviment de cadena lateral durant la desnaturalització.

I.7. OBJECTIUS D'AQUESTA TESI

En la Introducció s'ha discutit ja prèviament que un dels avantatges de treballar amb el sistema de les procarboxipeptidases A de pàncreas de porc rau en que en aquesta espècie el zimògen es troba parcialment en forma monomèrica. Aquest fet permet la seva caracterització estructural i cinètica i l'estudi dels aconteixements que tenen lloc durant l'activació, sense la dificultat afegida que suposa la seva existència en associacions quaternàries amb altres zimògens, com és el cas del sistema més estudiat fins ara, el de pàncreas de bou.

Els treballs que fins el moment de començar aquesta Tesi s'havien dut a terme en el nostre grup havien permès l'aïllament i caracterització estructural i funcional de les dues formes de procarboxipeptidasa A. Quedaven, però, alguns aspectes a resoldre, que van constituir els nostres objectius incials, com són el de la identitat entre la procarboxipeptidasa A monomèrica i la subunitat procarboxipeptidasa A en el complex binari amb la proproteïnasa E, ambdues formes aïllades de pàncreas de porc, i el de l'efecte de la proproteïnasa E sobre les característiques funcionals i sobre el procés d'activació de la procarboxipeptidasa A.

A la vegada que es treballava sobre les formes proenzimàtiques es va iniciar l'estudi de l'estructura i propietats del segment d'activació de la procarboxipeptidasa A, amb la finalitat última d'esbrinar la manera en que té lloc la conversió del zimògen en enzim actiu. L'interés d'aquest estudi rau en el fet que es coneixía molt poc sobre l'estructura i acció biològica del segment d'activació de procarboxipeptidases i pràcticament res sobre el procés d'activació proteolítica d'aquests proenzims. Aquesta manca d'informació contrasta amb el profund coneixement que es té sobre altres proproteïnases, tals com les serina-proproteïnases pancreàtiques. Ara bé, la realització dels estudis proposats sobre el segment d'activació, requeria l'adopció d'una sèrie de nous mètodes analítics, molts d'ells basats en cromatografia líquida d'alta pressió. La baixa quantitat de material de què normalment podíem disposar fou un factor que va influir en el desenvolupament

d'aquests mètodes, sent en tot cas, patent, la necessitat que podessin oferir una elevada sensibilitat.

Aquests temes generals es poden concretar en els següents objectius:

* Estudi de les condicions idònies per a l'anàlisi i aïllament dels pèptids i proteïnes objecte d'aquest estudi, procarboxipeptidases i fragments d'activació, mitjançant la tècnica de cromatografia líquida d'alta pressió en fase reversa. Deducció de condicions generals per al treball amb pèptids i proteïnes.

* Posta a punt d'un mètode d'anàlisi d'aminoàcids sensible, ràpid i repetitiu, que permetés aprofitar la mateixa tecnologia cromatogràfica emprada en la separació de pèptids i proteïnes.

* Profundització en l'estudi de la identitat entre les dues formes protomèriques de procarboxipeptidasa A aïllades de pàncreas porcí: la que es presenta en forma monomèrica i la que ho fa unida a un altre zimògen formant un complex binari.

* Determinació de l'estructura primària del segment d'activació aïllat a partir de la forma monomèrica, com a pas indispensable per a l'estudi de les seves característiques conformacionals, i funcionals i del seu caràcter inhibidor.

* Estudi del procés d'activació de la forma monomèrica a diferents nivells que permetés proposar una hipòtesi general de partida; comparació amb el procés d'activació que presenta el complex binari.

II. MATERIALS I MÈTODES

II.1. AÏLLAMENT DE LES PROCARBOXIPEPTIDASES A PORCINES I DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

En aquest apartat es descriurà el seguit de mètodes emprats per a l'aïllament de les dues formes de procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc i del seu segment d'activació, fent només esment dels mètodes preparatius generals en els que s'utilitza cromatografies en columna a pressió atmosfèrica. Les variants d'obtenció analítica i preparativa (sobretot del segment en aquest darrer cas) de proteïnes per cromatografia líquida d'alta pressió es descriuran a l'apartat corresponent. Malgrat que les metodologies aquí explicades s'han anat desenvolupant al llarg d'aquesta tesi, no constitueixen cap dels objectius de la mateixa, per la qual cosa només se'n farà esment en aquest apartat de Materials i Mètodes.

II.1.1. AÏLLAMENT, A PARTIR DE POLS DE PÀNCREAS, DE LES DUES FORMES DE PROCARBOXIPEPTIDASA A

S'ha utilitzat el mètode de Vilanova et al. (1985) que constitueix a la vegada una millora dels mètodes prèviament publicats de Folk & Schirmer (1965), Kobayashi et al (1978) i Martínez et al (1981). Aquest mètode permet l'obtenció dels dos zimògens en un temps de cinc dies, en comparació amb les dues setmanes normalment necessàries cas de procedir a l'aïllament de les proteïnes pels altres mètodes, i redueix de manera important el nombre de cromatografies a desenvolupar. Aquestes característiques, juntament amb el fet que al llarg del procés es treballi sempre a 4°C i en presència d'inhibidor de tripsina de soja, fan que el rendiment i les condicions de seguretat emprades siguin les més adients. A la Figura II.1 es mostra un esquema del procés general de purificació.

En síntesi, les etapes principals del procés són les següents:

OBTENCIÓ DE POLS DE PÀNCREAS

Aproximadament 15 pàncreas de porc, congelats immediatament després d'ésser extrets de l'animal, són posteriorment descongelats en 2 L d'acetona a 4°C. Mentre es descongelen, s'elimina la major part possible de greix amb l'ajut d'unes tissores. A continuació es procedeix a la primera homogenització, seguida de filtrat a través de gases. Es torna a resuspendre l'homogenat en 2 L d'acetona freda, s'homogenitza i es filtra sobre paper Whatman n° 1 en un embut Buchner connectat al buit. Aquesta darrera operació es repeteix: a) resuspenent en 2 L d'acetona, b) en 2 L d'una barreja acetona:èter 1:1 i c) en 2 L d'èter. Finalment, la pols de pàncreas així dessecada i desengrassada es col.loca en un dessecador connectat al buit durant tota la nit, conservant-se posteriorment en presència de gel de sílice a 4°C. La pols de pàncreas pot conservar-se durant mesos en aquestes condicions.

EXTRACTE AQUÓS I PRECIPITACIÓ FRACCIONADA

Se suspèn 100 g de pols de pàncreas en 1 L d'aigua destil.lada a 4°C que conté inhibidor de tripsina de soja a 5 mg/100 ml i es manté la barreja en agitació intermitent durant 1 hora. Aquest procés permet l'extracció de les proteïnes solubles en aigua, entre les que es troba les procarboxipeptidases A , les quimotripsines i la tripsina. La suspensió se centrifuga a 5000 rpm durant 30 min i el sobrenedant es filtra a través de gases.

A continuació es procedeix a la primera precipitació amb $(NH_4)_2SO_4$ al 21%, afegint la sal lentament al mateix temps que es va ajustant el pH a 7,0. En aquest pas s'elimina algunes proteïnes que no precipiten a aquesta concentració de sulfat amònic. Es deixa reposar el precipitat durant 1 h a 4°C i a continuació se centrifuga a 7000 rpm durant 30 min, redissolent finalment el precipitat en un volum d'aproximadament 500 ml de tampó Tris-HCl 40mM (pH 8,0) que conté inhibidor de tripsina de soja a una concentració de 10 mg/100 ml. La dissolució proteica es dialitza durant tota la nit en front de 20 L del mateix tampó a 4°C.

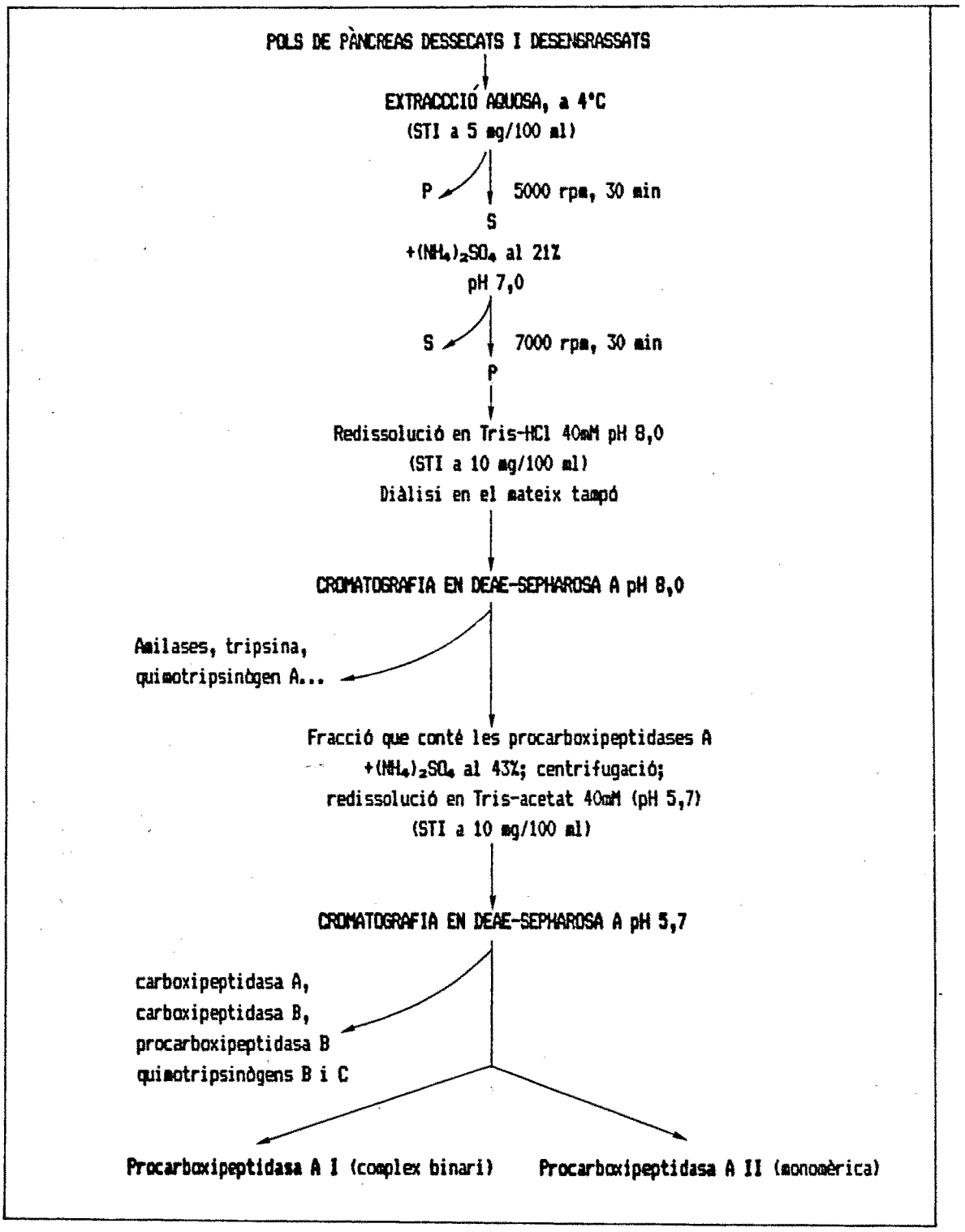


FIGURA II.1. Esquema del procés d'aïllament de les dues formes de procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc.

CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHAROSA A pH 8,0

Diverses proves amb diferents resines de bescanvi iònic van evidenciar que el millor suport per a la separació de proteïnes pancreàtiques el constitueix la DEAE-Sepharosa CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals). En la primera de les cromatografies que aquí es comenta, la mostra prèviament dialitzada és entrada a una columna de DEAE-Sepharosa (3,5 x 50 cm) equilibrada amb el mateix tampó de diàlisi. La cromatografia es desenvolupa mitjançant un gradient entre 0 i 0,45M de NaCl en el mateix tampó. El flux emprat és de 100 ml/h, recollint-se fraccions de 10 ml. A la Figura II.2 es pot veure un exemple del perfil d'absorbàncies i activitats d'una cromatografia a pH 8,0. Les fraccions on es detecta presència d'activitat carboxipeptidasa A s'ajunten i es precipiten amb $(NH_4)_2SO_4$ al 43% i a continuació, després d'una centrifugació a 7000 rpm durant 30 min, el precipitat es redissol i dialitza durant tota la nit en front de tampó Tris-acetat 40mM (pH 5,7) que conté inhibidor de tripsina de soja a 10 mg/100m ml.

CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHAROSA A pH 5,7

La fracció resultant de l'anterior cromatografia conté, a més de les dues formes de procarboxipeptidasa A , una certa quantitat de carboxipeptidasa A i de quimotripsinògen. Segons Gratecós et al. (1969), a pàncreas de porc es troba els quimotripsinògens A, B i C. D'entre ells, la forma A, catiònica, s'eluiex possiblement al rentat inicial de la primera columna. Donat que el comportament dels altres dos quimitripsinògens sembla ser semblant des d'un punt de vista cromatogràfic (Gratecós et al, 1969), sembla raonable pensar que tant la forma B com la C contaminen les procarboxipeptidases A en aquest punt del procés.

Per assolir la separació de les dues formes de procarboxipeptidasa A es cromatografia el producte de la darrera diàlisi en una columna de les mateixes característiques de l'anterior, equilibrada amb tampó Tris-acetat 40mM, NaCl 0,1M (pH 5,7). L'elució de les diverses fraccions es duu a terme mitjançant un gradient entre 0,1 i 0,35M NaCl en el mateix tampó. A la Figura II.3 es pot observar el perfil típic de la segona cromatografia en DEAE-Sepharosa. Les fraccions que van apareixent

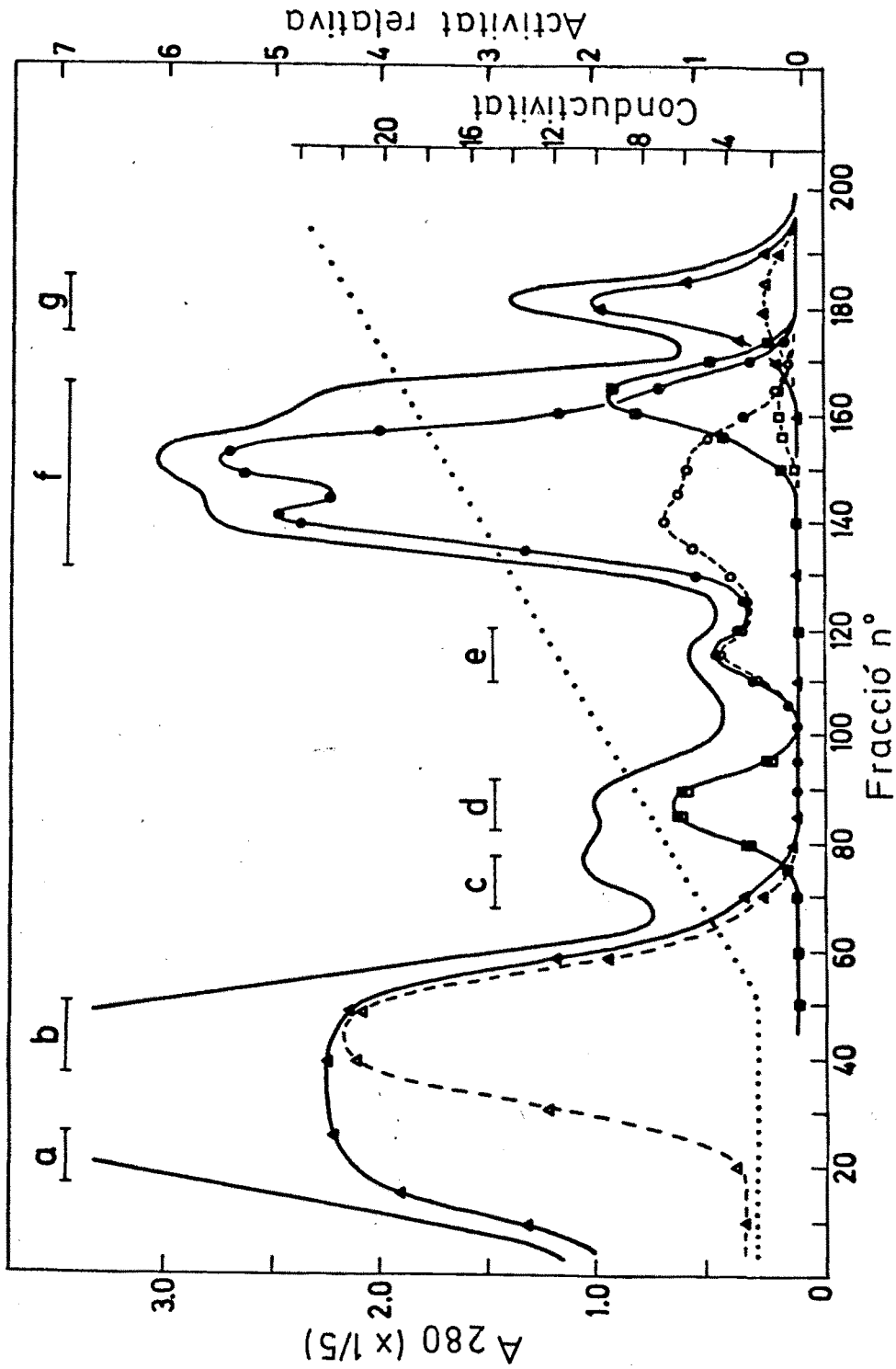


FIGURA II.2. Cromatografia en DEAE-Sepharosa d'un extracte aquós de pols de pàncreas porcí. La columna fou equilibrada amb Tris-HCl 40 mM (pH 8,0) i les mostres eluïdes amb un gradient salí lineal (.....). S'expressen les activitats lliures i totals de procarboxipeptidases A (○ i ●), quimotripsinògens (△ i ▲) i procarboxipeptidasa B (□ i ■).

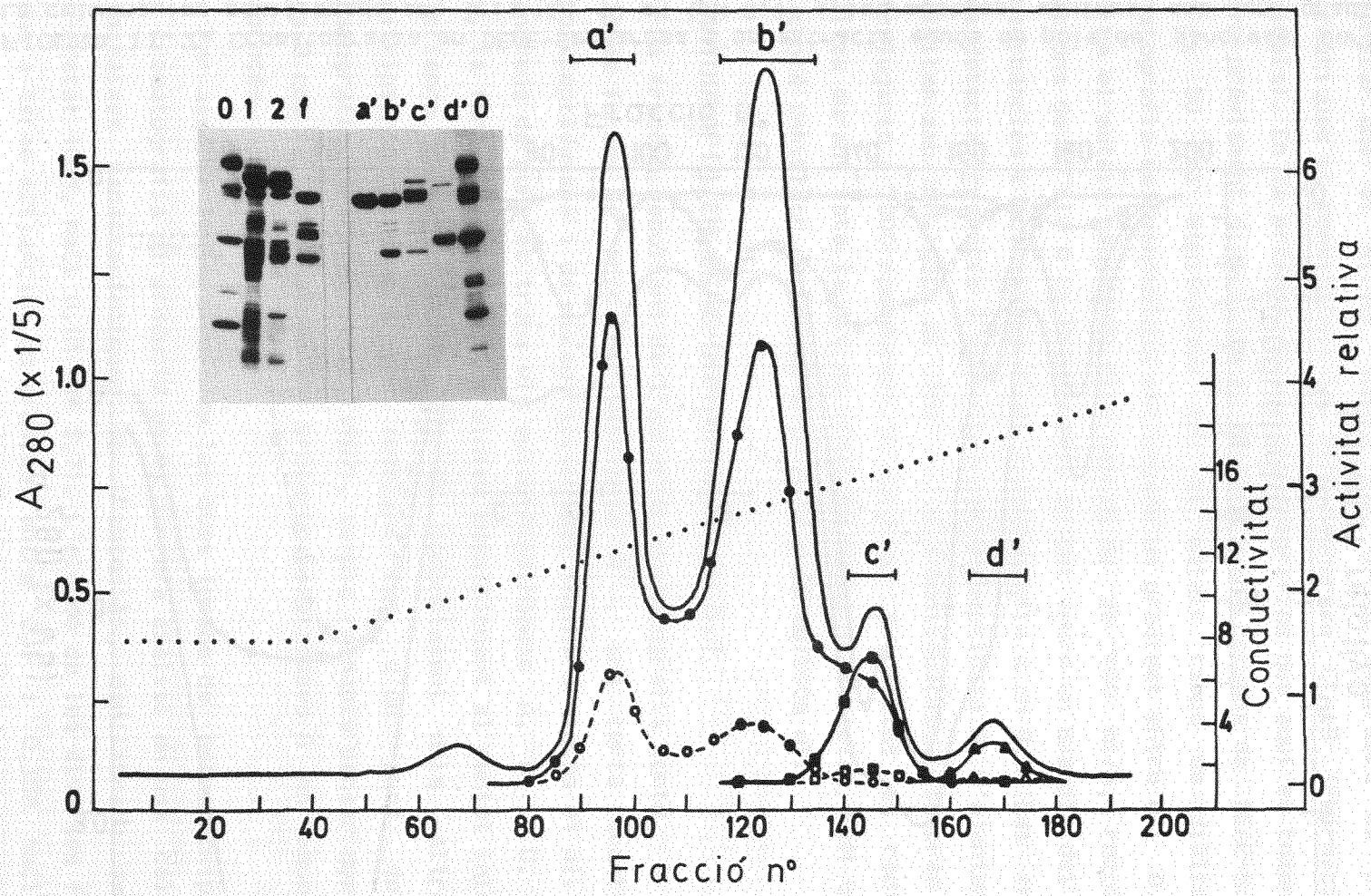


FIGURA II.3. Separació de les dues formes de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc per cromatografia de bescanvi iònic en DEAE-Sepharosa equilibrada amb Tris-acetat 40 mM (pH 5,7). S'utilitza els mateixos símbols que a la Figura II.2. A l'inserit es presenta una anàlisi electroforètica de les fraccions de les figures II.2 i II.3, juntament amb l'anàlisi d'un extracte aquós abans i després de la precipitació amb sulfat amònic (1 i 2 respectivament).

en augmentar la força iònica són: la procarboxipeptidasa A monomèrica, el complex binari de la procarboxipeptidasa A amb la proproteasa E, la procarboxipeptidasa B i un quimotripsinògen. La bona separació dels dos primers pics és fortament depenent del pH del tampó d'elució, fins al punt que un augment d'una o dues dècimes en el pH pot malmetre la separació entre les dues procarboxipeptidases A.

Les diverses fraccions així aïllades es precipiten amb sulfat amònic al 43% i es conserven en aquest estat a 4°C.

II.1.2. SEPARACIÓ DELS DOS PROTÒMERS FORMADORS DEL COMPLEX BINARI

L'aïllament dels dos monòmers que constitueixen el complex binari de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc, anomenat PCPA I es va intentar assolir per diferents mètodes (Vendrell, 1981). No es va intentar el mètode proposat per Kobayashi et al. (1978) donat que aquest només és capaç de produïr proteïnes desnaturalitzades irreversiblement al treballar en presència d'SDS després d'incubar la mostra a 100°C en presència del mateix detergent. Freisheim et al. (1967a) i Puigserver et al. (1972) utilitzaren respectivament anhídrid succínic i dissociació alcalina per a l'aïllament de les subunitats del complex ternari present a pàncreas bovi, però també aquí és present el problema de no recuperació de subunitats natives. En canvi, l'acil.lació del complex ternari de pàncreas bovi amb anhídrid 2,3-dimetilmaleic seguida per cromatografia de gel-filtració (Puigserver i Desnuelle, 1975) permet l'obtenció dels protòmers en condicions natives. Malgrat això, quan vam provar aquest darrer mètode amb el complex binari de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc vam observar que el rendiment del procés era molt baix i insuficient per les nostres necessitats. Per aquestes raons vam desenvolupar un nou mètode basat en cromatografia en DEAE-Sepharosa en presència d'urea 7M que va permetre l'aïllament preparatiu de les subunitats amb elevat rendiment i bona recuperació de la seva activitat intrínseca i potencial.

La cromatografia del complex binari dissociat es va portar a terme

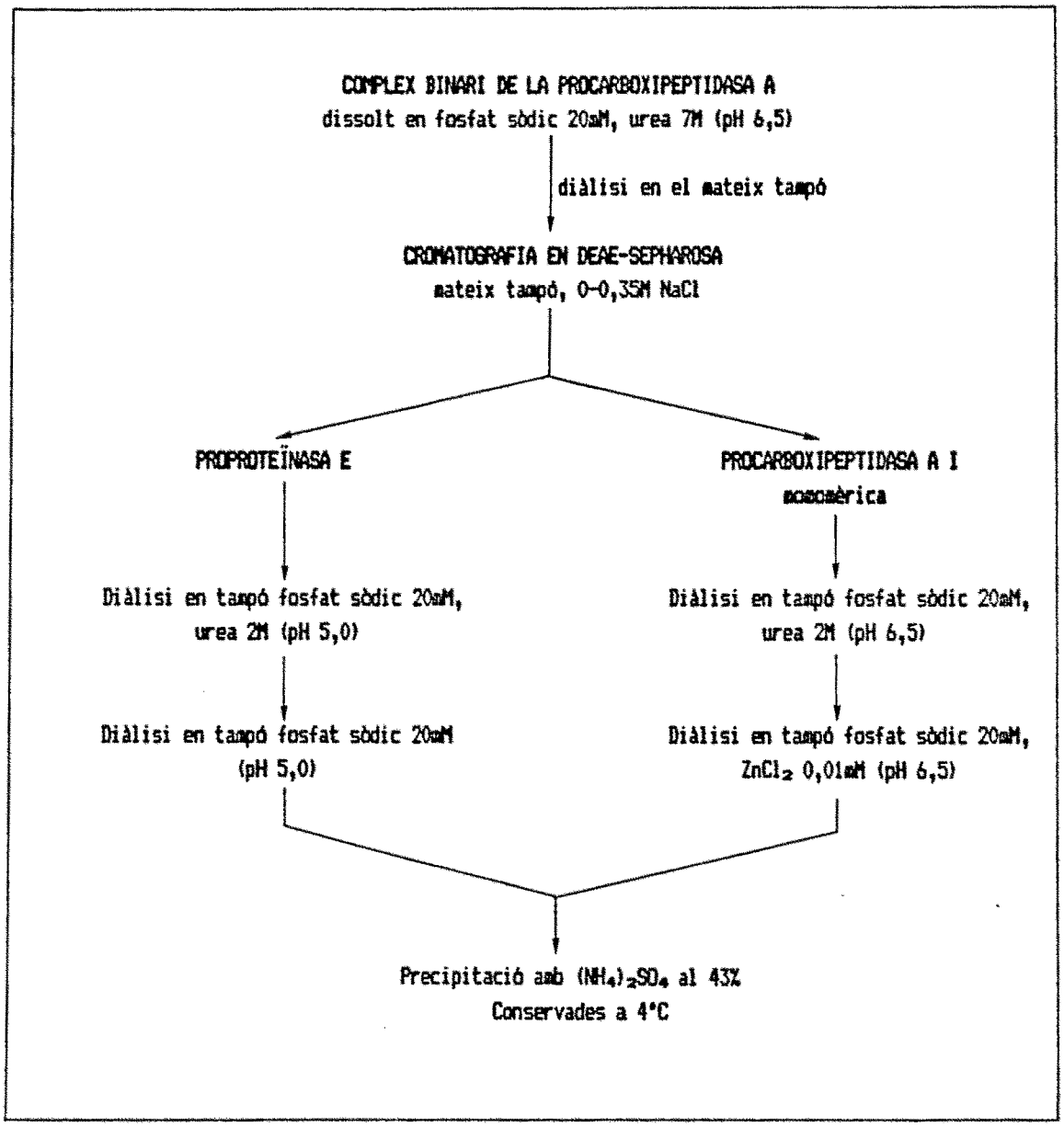


FIGURA II.4. Esquema del procés d'aïllament de les dues subunitats formadores del complex binari de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc.

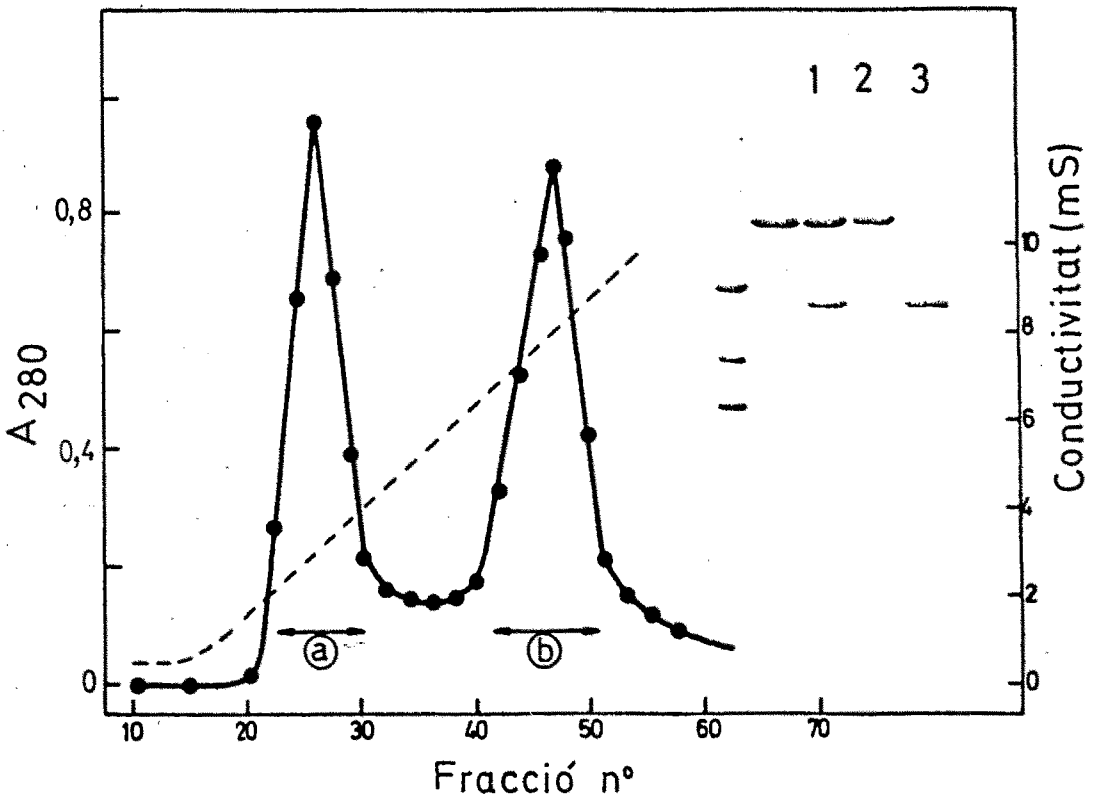


FIGURA II.5. Aïllament de les subunitats procarboxipeptidasa A i proproteïnasa E a partir del complex binari natural. L'inserit mostra l'anàlisi electroforètica de les fraccions: (1) complex binari; (2) fracció b; (3) fracció a.

segons el mètode de Vendrell et al. (1982) en una columna de DEAE-Sepharosa (1 x 50 cm) equilibrada amb 20mM fosfat sòdic, urea 7M (pH 6,5). Seguint aquest mètode, del que es pot veure un esquema a la Figura II.4, el complex binari s'entra a la columna en el mateix tampó d'equilibrat després de dialitzar-lo en aquestes condicions durant tota una nit. Les subunitats s'elueixen mitjançant un gradient des de 0 fins a 0,35M en NaCl en el tampó d'equilibrat (100 + 100 ml). El flux de la columna es manté a 20 ml/h i es recull fraccions de 2 ml. Una vegada ajuntades les fraccions que contenen la mateixa subunitat, es procedeix a la seva diàlisi. En el cas de la proproteïnasa E, la primera diàlisi és en front de 20mM fosfat sòdic, urea 2M (pH 5,0), seguida d'una diàlisi amb el mateix tampó sense urea. En el cas de la procarboxipeptidasa A, el tampó emprat és 20mM fosfat sòdic (pH 6,5), que conté $ZnCl_2$ a una concentració 0,01mM mentre que es manté el mateix procediment per a treure la urea per passos. A la Figura II.5 es pot veure el perfil cromatogràfic de la separació dels protòmers.

Una vegada aïllats, els zimògens es conserven en solució a 4°C, cas d'haver d'utilitzar-los immmediatament, o bé precipitats en sulfat amònic al 43%. Es interessant remarcar que en tots els passos cal utilitzar urea preparada recentment i purificada amb carbó actiu i resina mixta de bescanvi iònic (Bio-Rad AG 501-X8(D)).

II.1.3. AÏLLAMENT DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ PER CROMATOGRAFIA DE BESCANVI IÒNIC EN UREA 7M

Després d'efectuar una proteòlisi limitada amb tripsina sobre la procarboxipeptidasa A monomèrica en determinades condicions, és possible generar carboxipeptidasa A i el seu segment d'activació en estat homogeni (San Segundo, 1982). La separació d'ambdues espècies resulta, però, difícil, donada la forta interacció que presenten entre elles (San Segundo et al., 1982). Així, per exemple, no s'obté cap mena de separació quan la barreja és sotmesa a cromatografia de gel filtració en Biogel P-100 ni quan la cromatografia es fa en DEAE-Sepharosa amb gradient de NaCl. Cal cromatografiar la mostra en DEAE-Sepharosa en

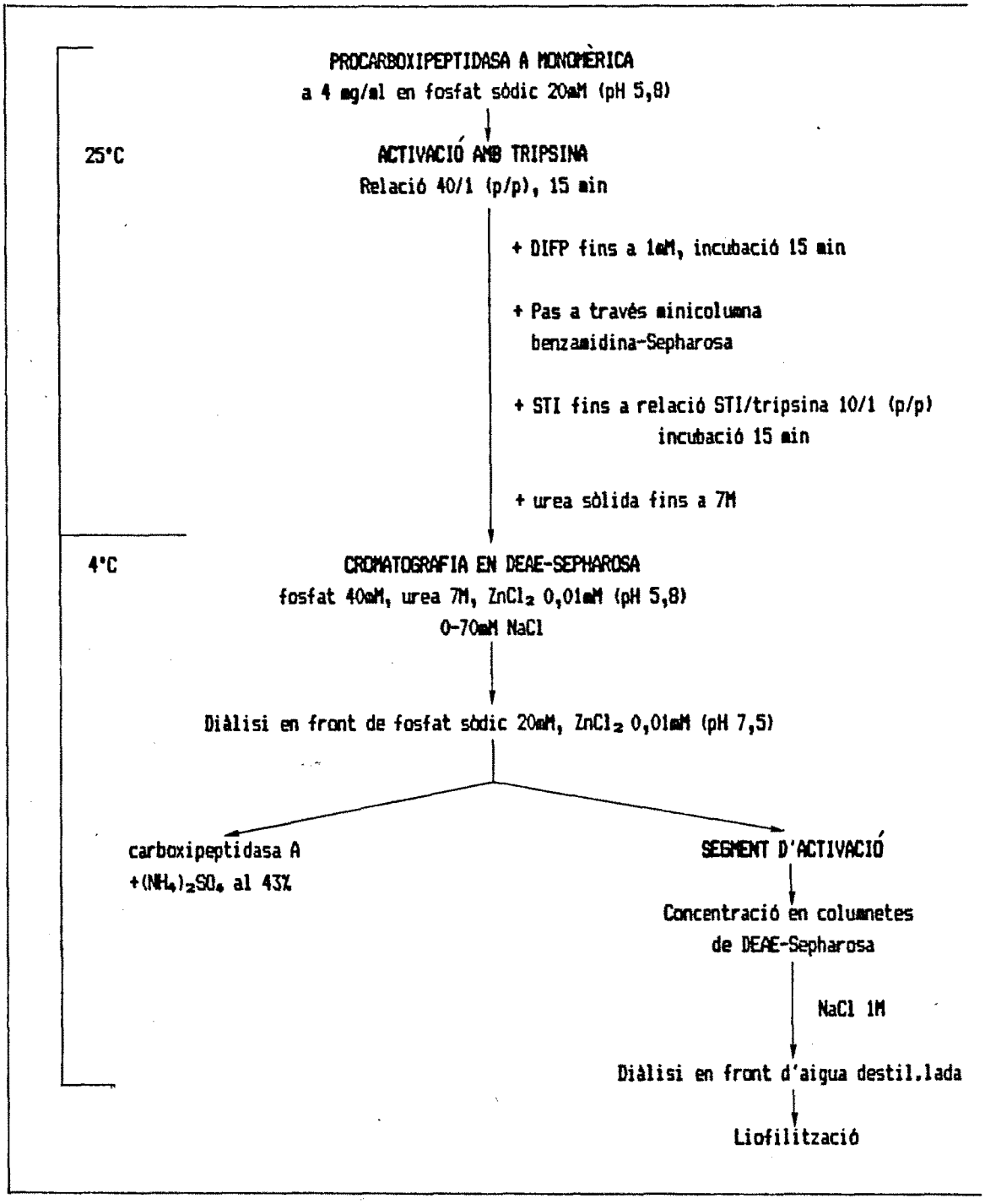


FIGURA II.6. Esquema del procés d'obtenció del segment d'activació de la procarboxipeptidasa A per cromatografia de bescanvi iònic en presència d'urea.

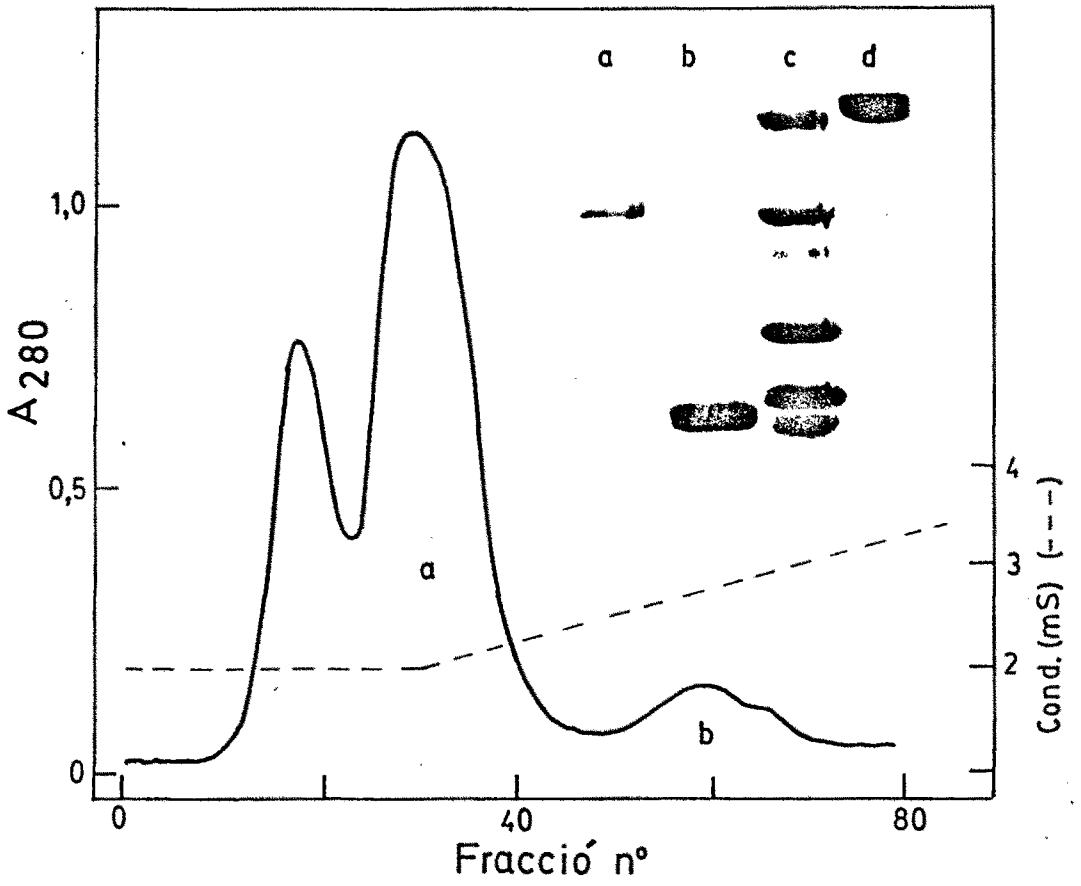


FIGURA II.7. Separació cromatogràfica en DEAE-Sepharosa de carboxipeptidasa A i el seu pèptid d'activació generat per proteòlisi limitada amb tripsina. L'inserit mostra l'electroforesi de les fraccions en gels de poliacrilamida-SDS juntament amb patrons (c) i la procarboxipeptidasa A original (d).

presència d'urea 7M per obtenir segment d'activació lliure de la presència de carboxipeptidasa A (San Segundo et al., 1982).

El mètode emprat és bàsicament el que s'ha esmentat anteriorment, amb lleugeres modificacions (vegi's esquema a la Figura II.6):

Es parteix de procarboxipeptidasa A monomèrica en fosfat sòdic 20mM, $ZnCl_2$ 0,01mM (pH 5,8) a una concentració de 4 mg/ml i se li afegeix tripsina dissolta en HCl 1mM, $CaCl_2$ 1mM a una relació proteïna/tripsina de 40/1 (p/p). La incubació es manté durant 15 min a 25°C i a continuació s'inhibeix l'acció de la tripsina per addició de diisopropilfluorofosfat 1mM i incubació durant 15 min. Seguidament es passa la barreja per una minicolumna de benzamidina-Sepharosa (Pharmacia) de 2 x 0,5 cm. La possible tripsina residual s'acaba d'inhibir per addició d'inhibidor de tripsina de soja purificat (Vilanova, 1987) a una relació inhibidor/tripsina 10/1 (p/p) i incubació durant 15 min més. Finalment, s'afegeix urea sòlida a la mostra de digerit fins arribar a una concentració de 7M, s'ajusta el pH a 5,8 i es comproba que la conductivitat sigui inferior a 1,8 mS.

El digerit es cromatografia en una columna de DEAE-Sepharosa (1,5 x 50 cm) equilibrada amb fosfat sòdic 40mM, urea 7M, $ZnCl_2$ 0,01mM (pH 5,8), a 4°C. L'elució de la carboxipeptidasa A i el segment d'activació es fa per aplicació d'un gradient de 0 a 70mM en NaCl en el mateix tampó d'equilibrat. Les fraccions proteiques així aïllades es dialitzen amb tampó fosfat sòdic 20mM, $ZnCl_2$ (pH 7,5) i a continuació les fraccions que contenen carboxipeptidasa A es precipiten amb $(NH_4)_2SO_4$ al 43%, mentre que les que contenen segment d'activació es concentren en petites columnes de DEAE-Sepharosa (per addició de NaCl 1M) i es dialitzen finalment en un medi d'aigua destil.lada a pH aproximat de 8,0. Totes les diàlisis es fan a 4°C; és necessari utilitzar sacs de diàlisi acetil.lats al dialitzar mostres de segment d'activació aïllat (Vilanova, 1987). Finalment, el segment d'activació es conserva liofilitzat i a -20° C. A la Figura II.7 es pot veure un perfil cromatogràfic típic d'obtenció de segment d'activació.

II.2. METODES ESPECTROSCÒPICS

II.2.1. ESPECTROSCÒPIA D'ABSORCIÓ A L'ULTRAVIOLAT

II.2.1.a. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

La concentració de les diferents espècies proteiques utilitzades es va determinar mitjançant mesura de l'absorbància de les seves dissolucions, fent servir els coeficients d'absorció citats a continuació (Taula II.1). Aquests coeficients foren obtinguts en cada cas a partir de la determinació quantitativa del contingut en aminoàcids d'una mostra de proteïna d'absorbància coneguda, hidrolitzada a 110°C durant tres temps diferents i sotmesa després a anàlisi d'aminoàcids.

TAULA II.1.
COEFICIENTS D'ABSORCIÓ EMPRATS PER A MESURAR LA CONCENTRACIÓ DE LES DIFERENTS PROTEÏNES

Proteïna	*Coeficient d'absorció a l'1%*	*Referència*
Procarboxipeptidasa A I	$E^{1\%}_{280,1cm}$ = 19,9	Martínez et al., 1983
Procarboxipeptidasa A II	$E^{1\%}_{280,1cm}$ = 16,3	Martínez et al., 1983
Carboxipeptidasa A	$E^{1\%}_{278,1cm}$ = 19,6	Folk & Schirmer, 1963
Proproteïnasa E	$E^{1\%}_{280,1cm}$ = 24,5	Mallory & Travis,1975
Segment d'activació	$E^{1\%}_{280,1cm}$ = 14,8	Vilanova et al., 1985

II.2.1.b. MESURA D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

Totes les mesures d'activitats enzimàtiques han estat fetes per espectrofotometria d'absorció a l'ultraviolat, mitjançant el seguiment de la variació d'absorció que es produeix quan un substrat artificial és hidrolitzat per l'enzim corresponent. Normalment s'ha utilitzat cubetes de quarz de 1cm de pas òptic i s'ha fet la mesura a 25°C.

MESURA DE L'ACTIVITAT CARBOXIPEPTIDASA A

En els treballs d'aquesta Tesi només s'ha utilitzat el mètode de mesures d'activitat peptidàsica de la carboxipeptidasa A descrit per Folk & Schirmer (1963), no fent en cap moment mesures d'activitat esteràsica.

El substrat utilitzat en aquest mètode és el N-benzoil-glicil-L-fenilalanina (BGP) (Sigma), i les condicions per a una mesura estàndard són les següents:

Concentració de substrat: 1mM
Tampó utilitzat: Tris-HCl 25mM, NaCl 0,5M (pH 7,5)
Longitud d'ona: 254 nm (augment de l'absorció)
Temperatura: 25°C
Assaig: a una cubeta de 1 cm de pas òptic que conté 1,5 ml de HPA se li afegeix 10-20 µl de dissolució enzimàtica que contenen aprox. 10-20 µg de proteïna, observant la variació d'absorció durant 2-3 min.

Encara que, en principi, l'estabilitat de la dissolució aqüosa del substrat BGP és de 24 hores a temperatura ambient, és convenient comprovar la seva concentració real mitjançant una hidròlisi total a l'acabar la sèrie de mesures.

CÀLCUL DE L'ACTIVITAT ESPECÍFICA DE LA CARBOXIPEPTIDASA A

Per a poder comparar experiments fets en dies diferents o bé amb mostres obtingudes de diferentes preparacions, és necessari tenir un

mètode de normalització de les mesures d'activitat enzimàtica. Aquest mètode consisteix en expressar les variacions d'absorció a 254 nm en activitats específiques, és a dir, per mg d'enzim i per ml de dissolució, per la qual cosa resulta imprescindible conèixer la concentració de la dissolució d'enzim

Segons Folk i Schirmer (1963), cal utilitzar un valor de l'increment de l'absorció a 254 nm de 0,36 U.D.O./mM pel substrat BGP pur al 100%, a 1mM.

Es fa servir el càlcul següent:

$$\text{Activitat específica} = \frac{A_{254\ nm}/\text{min}}{0{,}36 \times \text{mg d'enzim / ml de solució de substrat}}$$

D'aquesta manera l'activitat específica queda expressada en:

$$\frac{\text{U.D.O./m}}{\text{U.D.O./mmol/L} \times \text{mg / ml}}$$, és a dir:

umol de substrat hidrolitzat / min / mg d'enzim.

MESURA DE L'ACTIVITAT CARBOXIPEPTIDASA B

S'ha utilitzat el mètode de Folk et al. (1960) emprant el substrat N-benzoil-glicil-L- arginina (BGA) (Sigma), i les següents condicions experimentals:

Concentració de substrat: 1mM
Tampó: Tris-Hcl 25mM, NaCl 0,1M (pH 7,5)
Longitud d'ona: 254 nm (augment de l'absorció)
Temperatura: 25°C
Assaig: de la mateixa manera que el corresponent a la carboxipeptidasa A

MESURA DE L'ACTIVITAT QUIMOTRIPSINA

S'ha utilitzat el mètode d'Schwert i Takenaka (1955) modificat. Com a substrat s'empra N-acetil-tirosina etil ester (ATEE) (Sigma), que és trencat per l'enllaç ester per l'acció de la quimotripsina. Les condicions de l'assaig són les següents:

Concentració de substrat: 1mM
Tampó: Tris-Hcl 25mM (pH 8,0)
Longitud d'ona: 237 nm (disminució de l'absorció)
Temperatura: 25°C
Assaig: de la mateixa manera que el corresponent a la carboxipeptidasa A

MESURA DE L'ACTIVITAT TRIPSINA

S'ha utilitzat el mètode d'Schwert i Takenaka (1955) modificat. Com a substrat es fa servir N-benzoil-L-arginina etil ester (BAEE) (Cambrian Chemicals), que sofreix hidròlisi per l'enllaç ester per l'acció de la tripsina. Les condicions de mesura de l'activitat són les següents:

Concentració de substrat: 0,25mM
Tampó: fosfat potàsic 67mM (pH 7,6)
Longitud d'ona: 253 nm (augment d'absorció)
Temperatura: 25°C
Assaig: de la mateixa manera que el corresponent a la carboxipeptidasa A

MESURA DE L'ACTIVITAT PROTEÏNASA E

Als inicis del treball es va provar diversos mètodes i substrats per a la determinació de l'activitat proteïnasa E. Entre ells cal citar: N-acetil-L-alanilalanilalanina metil ester (Gertler i Hoffmann, 1970), un substrat que requereix l'utilització d'un pH-stat per a seguir la seva hidròlisi; N-carbobenzoxi-L-alanina-p-nitrofenilester (Geneste i Bender, 1969); N-ter-butiloxicarbonil-L-alanina-p-nitrofenil ester (Visser i Blout, 1972); N-acetil-L-alanil-alanil-alanina-p-nitroanilida (Feinstein et al., 1973; Bieth i Wermuth, 1973).

Tots aquests substrats van donar resultats menys satisfactoris que el finalment adoptat: N-succinil-alanilalanilalanina p-nitrolanilida (Bieth et al., 1974). La hidròlisi d'aquest substrat per l'acció de la proteïnasa E, que provoca l'alliberament del grup p-nitroanilida, permet el seu seguiment espectrofotomètric a la longitud d'ona de 410nm. Aquestes són les condicions per a una mesura estàndard de l'activitat:

Concentració de substrat: 1mM
Tampó: Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)
Longitud d'ona: 410 nm (augment de l'absorció)
Temperatura: 25°C
Assaig: de la mateixa manera que el corresponent a la carboxipeptidasa A.

II.2.2. ESPECTROSCÒPIA DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

L'espectroscòpia de RMN, menys comúnament utilitzada que la de l'ultraviolat, es basa en l'absorció d'una quantitat discreta d'energía pels nuclis dels àtoms amb moment nuclear d'*spin* diferent de 0, quan són sotmesos a l'acció d'un camp magnètic extern i adopten un moment magnètic orientat. En absorbir energía, a la banda de les radiofreqüències, els nuclis varíen l'orientació del seu moment magnètic, el que vol dir que es produeixen transicions entre nivells energètics.

L'espectròmetre de RMN està composat a nivell general pels mateixos elements que configuren un espectròmetre de, per exemple, llum ultraviolada: font de radiació, fotomultiplicador, detector i sistema de decodificació i lectura de la senyal. Consta, a més, i com a característica important i diferenciadora, d'un magnet encarregat de generar un camp magnètic elevat i uniforme. De la intensitat del camp magnètic en depèn la magnitud de la diferència entre nivells energètics i, per tant, la resolució final de l'espectre: a major camp, major resolució.

En aquest treball hem obtingut espectres de RMN de protó. Al contenir les proteïnes un nombre elevadíssim de protons, per potent que sigui el magnet de l'espectròmetre, sempre hi haurà problemes de resolució, i per tant els estudis que aquí es presenten es limiten a una sèrie de ressonàncies ben caracteritzades que pertanyen a grups que es diferencien clarament de la resta.

S'ha treballat amb un aparell Brucker WH270, equipat amb detecció de quadratura i accessori de control de temperatura. El magnet superconductor amb què va equipat l'aparell produeix un camp magnètic de 6,4 Teslas, equivalent a una freqüència de ressonància de 270 MHz per protó. L'aplicació de transformades de Fourier va permetre convertir els espectres obtinguts en el domini temporal a espectres expressats en el domini de les freqüències. Normalment es va acumular 2.000 escombrats successius, utilitzant un pols de 90° durant 12 µs, precedit d'un pols de desacoblament a la freqüència d'aparició de l'aigua de 0,3 µs a fí de reduir la seva senyal, amb un interval de 0,1 seg entre ambdues operacions. Es va utilitzar un temps de mostreig de 0,6 seg per l'acumulació dels FID (free induction decays). Es va incrementar la resolució mitjançant diferència de convolució (Campbell et al., 1973). Es va referir els desplaçaments químics a la ressonància dels ^1H del DSS (àcid 2,2-dimetil-2-silàpentà-1-sulfònic), observada en experiments paral.lels i a la del clorur de tetrametilamoni (1mM) afegit a la mostra (desplaçament químic del TMA: d.q. del DSS + 3,17 ppm).

Les mostres de segment es van dissoldre en ^2H_2O 99,8%. En alguns casos es va eliminar contaminants orgànics de les mostres de segment per precipitació isoelèctrica a pH 4,7 i posterior redissolució en aigua deuterada. El manteniment del segment dissolt en aigua deuterada a 3-5 mg/ml i a pH 8,5 durant 15 minuts a temperatura ambient permetè eliminar la major part de les ressonàncies dels protons de -NH, que compliquen la lectura de l'espectre. Les variacions de pH, entre 5,7 i 13,0, es feren per addició de NaO^2H o ^2HCl, i aquell es mesurà directament dins del tub de RMN amb un elèctrode de 3mm de diàmetre. Les lectures de pH es van prendre directament, sense fer correccions per la presència de ^2H_2O.Tots els espectres van ser enregistrats a 25°C.

II.3. DIGESTIONS ENZIMÀTIQUES I TRENCAMENTS QUÍMICS

Es descriu en aquest apartat els mètodes seguits per a la fragmentació enzimàtica o química tant de proteïnes senceres com de pèptids més curts, com per exemple el segment d'activació. En cada cas s'especificarà, però, sobre quina o quines mostres s'ha aplicat el protocol corresponent.

II.3.1. REDUCCIÓ I CARBOXIMETIL.LACIÓ DE PROTEÏNES

Com a pas previ a qualsevol tipus de digestió enzimàtica d'una proteïna que presenta una forta estructura globular i conté ponts disulfur, és necessari portar a terme una reducció i carboximetil.lació de la mateixa. També cal aplicar el procés de carboximetil.lació quan es tracta d'obtenir la seqüència N-terminal d'una proteïna sencera, tal i com es veurà a l'apartat corresponent.

En el nostre cas només es va aplicar aquest procediment a la procarboxipeptidasa A en ser aquesta l'única proteïna utilitzada que presenta una complexa estructura globular amb un pont disulfur.

Tractament de la mostra:

Es dialitza la proteïna (o bé es dissol, cas d'estar liofilitzada) a una concentració aproximada de 5 mg/ml en tampó Tris-HCl 0,5M (pH 8,5) i se li afegeix clorur de guanidini sòlid fins a una concentració 6M, mantenint el mateix pH per addició de NaOH 0,1M. A continuació es manté la mostra sota corrent de nitrògen durant 2-3 min., se li afegeix ditiotreitol fins a una concentració de 2mM, i es torna a tractar amb corrent de nitrògen. La mostra així tractada amb agent reductor s'incuba 1 hora a 37°C o bé 4 hores a T ambient.

Després de la incubació en condicions reductores s'alquila la mostra mitjançant l'addició d'àcid iodeacètic, dissolt en el mateix tampó que la mostra, fins a una concentració final de 10mM (relació

molar de 5:1 amb respecte al ditiotreitol). Seguidament s'incuba la mostra a temperatura ambient durant 30 min. i en la foscor.

Finalment, la mostra es dialitza de manera exhaustiva en front de NH_4OH al 0,2% i es liofilitza. Cal afegir que aquest agent dialitzant és adequat per a mostres acídiques (com és el cas de les procarboxipeptidases A). En el cas de mostres bàsiques és millor dialitzar en front d'àcid acètic al 5% (Glazer, 1975).

II.3.2. DIGESTIÓ AMB TRIPSINA

La tripsina catalitza la hidròlisi dels enllaços peptídics pel cantó carbòxil de lisines i arginines i és una de les proteïnases més utilitzades per obtenir pèptids de llargada intermèdia (5-20 residus) a partir de pèptids de major nombre de residus o de proteïnes desnaturalitzades. Els pèptids tríptics són força adequats per seqüenciació manual donada la seva llargada i solubilitat i solen servir per establir solapaments entre seqüències de pèptids més llargs. La tripsina presenta una molt elevada especificitat pels residus lisina i arginina però, malgrat això, algunes preparacions comercials venen contaminades amb quimotripsina, pel que han de ser tractades amb l'inhibidor N-tosil-L-fenilalanil clormetil cetona (TPCK); fins i tot la tripsina pura té una reduïda activitat quimotríptica residual (Keil-Dlouha et al., 1971).

Per a la digestió tríptica de pèptids i proteïnes s'ha seguit mètodes estàndards (Allen, 1982). Sempre que s'ha volgut obtenir digestions exhaustives amb tripsina que donessin lloc a barreges de pèptids límit típics s'ha utilitzat tripsina Worthington tractada amb TPCK. En alguns casos en que s'ha detectat activitat quimotríptica residual en el lot de tripsina comercial ha estat necessari procedir a un nou tractament amb TPCK al laboratori, seguit per purificació per cromatografia líquida (apartat II.4.3). El tractament amb tripsina s'ha aplicat sobre procarboxipeptidasa A II, procarboxipeptidasa A I monomèrica, carboxipeptidasa A i segment d'activació.

Condicions de la digestió:

Medi de digestió: bicarbonat sòdic 0,1M (pH 8,0), o bé
N-Etil-morfolina 0,2M (pH 8,2)
Tripsina dissolta en HCl 1mM, $CaCl_2$ 1mM
Concentració de la mostra: 1-2 mg/ml
Temperatura d'incubació: 37°C
Protocol: la proteïna, dissolta en el tampó de digestió a la concentració adequada es col.loca en un bany o estufa a 37°C. A continuació s'afegeix tripsina fins a una relació proteïna/tripsina 50/1 (p/p) i es manté la mostra en incubació durant 2 hores; al final d'aquest temps es torna a repetir l'addició de tripsina i s'incuba durant 2 hores més. La relació final és per tant 25/1 (p/p). Finalment la mostra es liofilitza. Cas de voler-la entrar directament a l'HPLC, se li afegeix TFA fins al 0,1% i s'injecta després de centrifugar-la en una centrífuga Eppendorf durant 5 min.

II.3.3. DIGESTIÓ AMB PROTEÏNASA V-8 DE *Staphylococcus Aureus*

S'ha descrit a la proteïnasa V-8 de *Staphylococcus Aureus* com una endopeptidasa específica pels enllaços peptídics que involucren un residu de glutàmic (Houmard i Drapeau, 1972). Es per aquesta raó que també se la coneix com glutàmic-endoproteïnasa. Presenta també, però, una lleugera afinitat per altres tipus d'enllaços com aquells en els que hi participen residus glutamina, aspàrtic i asparagina. Aquesta afinitat secundària resulta incrementada per als residus aspàrtic en presència de tampó fosfat (Houmard i Drapeau, 1972).

El tractament amb glutàmic endoproteïnasa es va aplicar a nivell analític sobre procarboxipeptidasa A i carboxipeptidasa A; a nivell preparatiu només es va aplicar sobre el segment d'activació.

Es va fer diverses proves per a trobar les condicions idònies de

digestió. Es va fer digestions a pH 8,0 i 4,0, en presència o absència d'agents dissociants (SDS i urea) i es va comprovar l'efectivitat de diversos medis de digestió i el rendiment de diferents relacions proteïna/V-8. Les condicions considerades finalment com a més adequades no difereixen gaire de les proposades per Drapeau (1977):

Medi de digestió: N-Metil-morfolina 0,2M (pH 8,0), o bé el mateix tampó amb urea 4M

Concentració de la mostra: 2 mg/ml

Temperatura d'incubació: 37°C

Protocol: a la proteïna, atemperada a 37°C, se li afegeix proteïnasa V-8 fins a una relació proteïna/V-8 de 50/1 (p/p) i s'incuba durant 10 hores a 37°C; a continuació es repeteix l'addició de proteïnasa V-8 i s'incuba durant 10 hores més. La relació final és, per tant, 25/1 (p/p). Finalment, s'addiciona TFA fins al 0,5%, se centrifuga la mostra durant 5 min. en una centrífuga Eppendorf i s'injecta directament a l'HPLC.

II.3.4. DIGESTIO AMB PEPSINA

Els enllaços peptídics hidrolitzats amb preferència per la pepsina són aquells formats per dos residus hidrofòbics adjacents, particularment fenilalanines, i també aquells en els que hi participen leucines i aromàtics, però també és capaç d'hidrolitzar un ample espectre d'enllaços peptídics (glutàmics, pels dos cantons, etc.) (Fruton, 1974). El fet que la pepsina sigui activa a pH àcid fa que es pugui treballar moltes vegades amb proteïna desplegada, sense que calgui desnaturalitzar-la prèviament.

El tractament amb pepsina s'ha aplicat només sobre el segment d'activació, seguint el protocol següent (Allen, 1982):

Medi de digestió: àcid fòrmic al 5%, HCl 1mM

Concentració de la mostra: 2 mg/ml

Temperatura d'incubació: 25°C

Relació proteïna/pepsina: 100/1 (p/p)

Protocol: a la mostra atemperada a 25°C, i dissolta en el medi de digestió, se li afegeix pepsina dissolta en les mateixes condicions fins a una relació 100/1 (p/p). Es manté la incubació durant 2 hores i al capdavall d'aquest temps se li afegeix TFA fins al 0,1%. Finalment se centrifuga en una centrífuga Eppendorf durant 5 min. i s'injecta la mostra directament a l'HPLC.

II.3.5. TRENCAMENTS QUÍMICS

Els trencaments químics aquí esmentats s'han aplicat només sobre el segment d'activació aïllat.

TRENCAMENT AMB BROMUR DE CIANÒGEN

El tractament de proteïnes amb bromur de cianògen en condicions àcides (Gross i Witkop, 1961) produeix un trencament pel cantó C-terminal dels residus metionina. Aquests queden convertits en una barreja d' homoserina i homoserina-lactona C-terminals (Ambler, 1965). En aquest treball la reacció s'ha portat a terme sota les condicions següents:

Medi de reacció: àcid fòrmic al 70%

Concentració de la proteïna: 5 mg/ml

Relació molar CNBr/proteïna: 100/1

Temperatura: ambient

Temps de reacció: 20-24 hores, en la foscor

Protocol: a la mostra, dissolta en fòrmic al 70%, se li afegeix bromur de cianògen (Merck) en forma sòlida fins a la relació molar CNBr/proteïna 100/1. Després de mantenir la incubació durant 20-24 hores en la foscor i a temperatura ambient, s'afegeix 10 volums d'aigua destil.lada i es liofilitza. Finalment es repeteix la liofilització per

eliminar les restes de reactiu.

ALTRES PROCEDIMENTS DE TRENCAMENT QUÍMIC

Es fa esment a continuació els altres procediments de trencament químic aplicats sobre el segment d'activació aïllat, juntament amb les referències corresponents:

- **CNBr + DMSO** (trencament per triptòfans) (Huang et al., 1983)
- **àcid o-iodosobenzoic** (trencament per triptòfans i tirosines) (Mahoney i Hermodson, 1979; Johnson i Stockmal, 1980)
- **BNPS-skatol** (trencament per triptòfans) (Fontana, 1972)

II.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA PRESSIÓ

En aquest apartat es descriurà l'equipament i les metodologies emprades en cromatografia líquida d'alta pressió, que ha estat una tècnica amplament utilitzada al llarg de tot aquest treball. Aquí es descriurà les tècniques aplicades a la cromatografia analítica i preparativa de pèptids i proteïnes, mentre que es deixa per un apartat individual el desenvolupament de la tècnica d'anàlisi d'aminoàcids per HPLC.

II.4.1. EQUIPAMENT. CONSIDERACIONS GENERALS

S'ha utilitzat un equip de cromatografia líquida d'alta pressió de Waters Assoc., que consta de les parts següents:

2 bombes d'alta pressió model 6000A
Controlador de flux i gradients model 680
Injector manual model U6K
Injector automàtic model WISP 710
Detector puntual model 440 equipat amb:
    làmpara de Zinc amb filtre de 214 nm
    làmpara de Mercuri amb filtres de 254, 280 i 436nm
Detector de longitud d'ona variable (M450) equipat amb:
    làmpara de Deuteri (absorció a l'UV)
    làmpara de Tungstè (absorció al VIS)
Unitat de registre i integració model Data Module M730
Aparell de termostatització de columnes amb control de temperatura.

A la Figura II.8 s'hi dibuixa un esquema de l'equipament prèviament descrit.

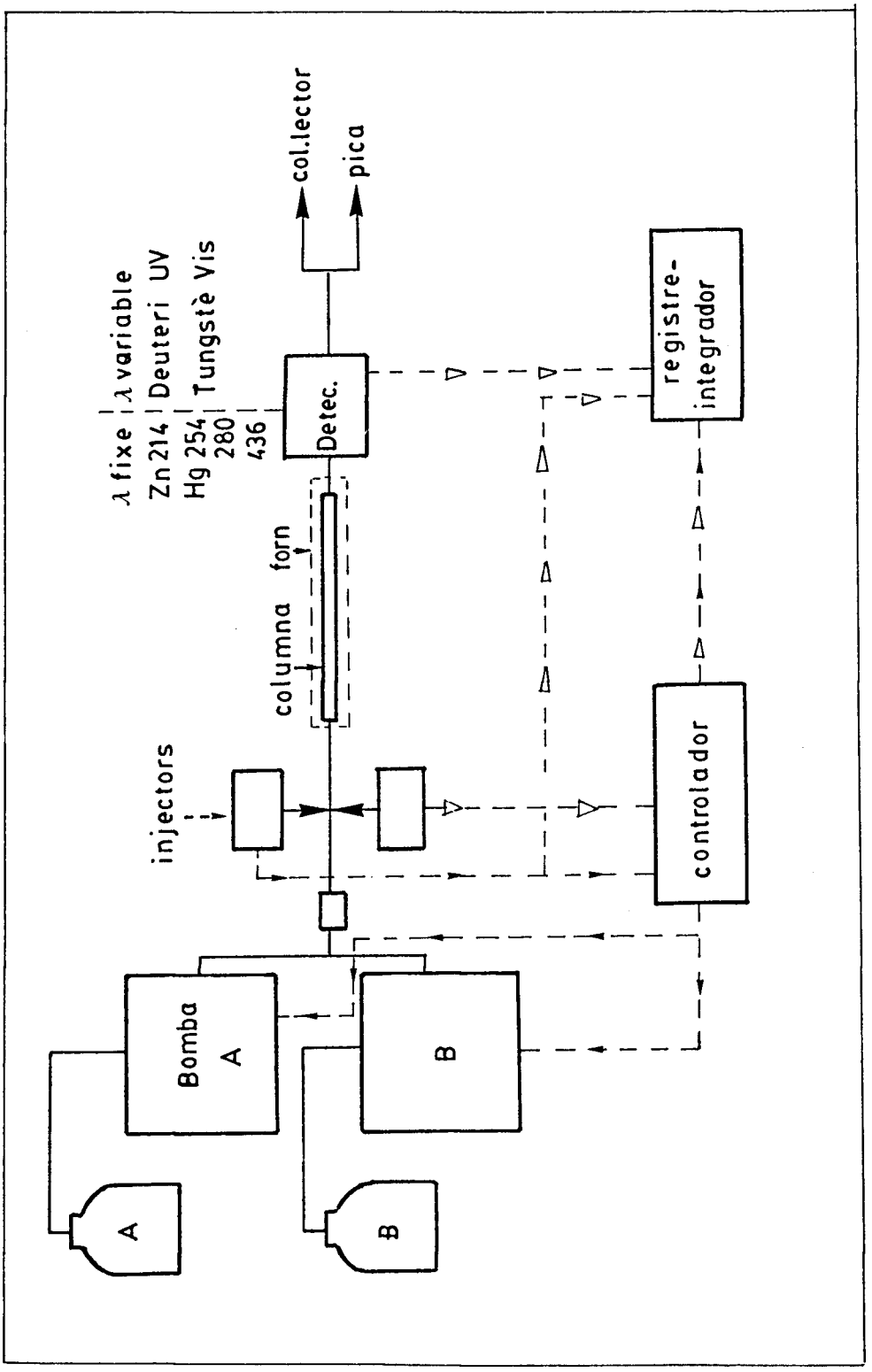


FIGURA II.8. Esquema simplificat de l'equip de cromatografia líquida d'alta pressió.

——— : línea cromatogràfica; — ▸ — —▸: flux de senyals de control;

— — △ — — — : flux de senyals informatives

II.4.1.a. TRACTAMENT DELS DISSOLVENTS

AIGUA I DISSOLUCIONS TAMPÓ

Cal que l'aigua utilitzada en cromatografia líquida d'alta pressió sigui de la millor qualitat possible: ha d'estar lliure de partícules, desionitzada, i és molt important que estigui lliure de materials orgànics, puix que aquests poden interaccionar amb les columnes de fase reversa (les més utilitzades, tant en aquest treball com en general), on hi queden retinguts, podent produir pics falsos i contaminants a les cromatografies quan es produeix la seva elució.

Es va partir sempre d'aigua prèviament tractada amb un sistema de desionització Milli-R (Millipore); aquesta aigua desionitzada es va passar posteriorment a través d'un cartutx Norganic (Millipore) que reté el material orgànic, i d'un filtre Durapore (Millipore) de 0,22 μm de diàmetre de porus. Abans de ser utilitzades com a solvents, totes les solucions aquoses van ser degasificades durant 15 min en una trompa de buit.

Les dissolucions tampó aquoses es van preparar sempre amb aigua prèviament tractada de la manera descrita abans i van ser posteriorment refiltrades a través d'un filtre Durapore. A continuació es van degasificar durant 10 min., es va ajustar el pH, i es va tornar a degasificar durant 10 min més.

No convé conservar gaire dies les solucions aquoses pel perill que es pugui produir creixement bacterià. Es per això recomenable preparar només els volums necessaris per les cromatografies immediatament previstes.

DISSOLVENTS ORGÀNICS

Tots els solvents orgànics comercials van ser filtrats abans de la seva utilització per filtres Durapore de 0,22 μm. En aquest cas, la degasificació prèvia a la cromatografia fou només de 6-8 min. per evitar excessives evaporacions.

II.4.1.b. CONDICIONS D'ENTRADA DE MOSTRES

Les mostres a injectar en un aparell d'HPLC han de reunir dues condicions importants: estar completament netes i lliures de partícules contaminants i estar dissoltes en un solvent el més semblant possible a aquell amb que s'iniciarà el gradient, i si pot ser, en un volum petit. Amb respecte a la primera condició és suficient amb filtrar-les a través d'un filtre de 0,22 μm, i pel que fa a la segona el més indicat és partir de mostres liofilitzades, que són dissoltes a continuació amb el solvent d'inici de gradient en un volum que sol estar comprés entre 10 i 50 μl.

Malhauradament, en el treball quotidià d'un químic de proteïnes, les mostres de que sol disposar per injectar, tant a nivell analític com preparatiu, a un aparell d'HPLC solen ser de volum reduït. Això fa difícil, i a vegades impossible, la seva filtració per eliminar partícules que podrien malmetre les conduccions del sistema i els èmbols de les bombes impulsores. En aquest cas el problema es resol parcialment sotmetent la mostra a centrifugació durant 5 minuts en una centrífuga Eppendorf i traspassant a continuació el sobrenedant a un altre tub net per evitar arrossegar precipitat amb la xeringa d'injecció.

Si bé els volums entrats a l'HPLC solen ser petits, es pot injectar a vegades volums més grans, depenent de les necessitats: hom es pot trobar, per exemple, amb que una mostra exigeix ser entrada immediatament després d' aplicar-li un tractament determinat, corrent si no és fa així el risc de perdre-la per degradació o agregació i essent per tant impossible procedir a la seva liofilització; o pot ser que la mateixa liofilització modifiqui la mostra irreversiblement. En aquests casos, abans que procedir a una contraproduent reducció de volum, és preferible injectar la totalitat de la mostra, sempre que el volum de l'injector ho permeti. En el equip emprat en aquest treball, els injectors manual i automàtic admeten, respectivament, uns volums màxims d'injecció de 2 ml i 200 μl.

II.4.2. HPLC DE PÈPTIDS

Fins a mitjans o finals de la dècada dels 70, moment de la introducció a un nivell relativament massiu de la tècnica d' HPLC, el fraccionament de barreges de pèptids curts i de llargada mitja (menys de 30-40 residus) era una feina primordialment empírica, que implicava l'adopció de tècniques força variades, i amb poders de ressolució i capacitats de recuperació que sovint estaven molt lluny del desitjable. Això es traduïa en la necessitat de fer servir quantitats de material de partida a vegades inabastables i en la dedicació de molt de temps al desenvolupament de les diverses tècniques.

Abans de la seva aplicació al camp concret de la química de proteïnes, la tècnica de l'HPLC ja havia demostrat ser una tècnica potent i versàtil per a la separació d'una amplia gamma de materials biològics (veure Hawk, 1978, per una revisió del tema). Va ser a finals de la dècada passada quan van aparèixer les primeres referències sobre la utilitat de l'HPLC en la separació de pèptids en el curs de la determinació d'estructures proteiques (Hughes i Wilson, 1982). Com a exemple, en un treball publicat en aquell temps (Fullmer i Wasserman, 1979), s'aconseguia separar en una única cromatografia des d'un pèptid petit i hidrofílic de 4 residus fins a un altre llarg i hidrofòbic de 30 residus.

L'èxit de la tècnica d'HPLC ha de ser atribuïda en gran part a les millores que s'han assolit tant en instrumentació com en la tecnologia de fabricació de farciments de columnes. El mateix avenç de la tècnica ha anat seleccionant els materials emprats:

SUPORTS CROMATOGRÀFICS I SOLVENTS

El tipus de cromatografia més utilitzat en general i que està donant els millors resultats amb pèptids és la cromatografia en fase reversa. La fase reversa permet utilitzar una amplia gamma de solvents i separar una amplia gamma de soluts. A més, la fase reversa arriba amb força facilitat a l'equilibri, les condicions cromatogràfiques són suficientment estables i permet, cas de ser necessari, la injecció directa de mostres biològiques.

El material d'empaquetament de la fase reversa per a pèptids sol estar format per un suport de sílica de mida de porus d'aproximadament 100 Å, que porta unides covalentment cadenes hidrocarbonades normalment d'entre 8 i 18 àtoms de carboni; la mida de les partícules sol ser de 5 o 10 μm. Variacions en la mida del porus, de la partícula i en la densitat i llargada de les cadenes hidrocarbonades determinaran diferents especificitats o aplicacions.

Al dissoldre's la sílica a pH superior a 5 (en el cas dels suports de fase reversa, els diversos tractaments que reben els permet, però, ser estables fins a pH 8,0), és preferible treballar a pH baix. Un dels primers solvents per a separar pèptids per fase reversa va ser l'àcid fosfòric diluït (Hancock et al., 1978). Alguns problemes en la solubilització de cert tipus de pèptids va fer canviar les preferències cap als àcids orgànics perfluorinats, particularment cap a l'àcid trifluoroacètic (Dunlap et al., 1978; Mahoney i Hermodson, 1980), puix que aquest resulta ser un molt bon solvent de pèptids, completamemnt volàtil i utilitzable a longituds d'ona tant baixes com 214 nm.

TAULA II.2

PROPIETATS FÍSIQUES DELS SOLVENTS MES UTILITZATS EN LA CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA DE PÈPTIDS I PROTEÏNES (reproduït de Hughes i Wilson, 1982)

Solvent	UV Cutoff (nm)	Boiling Point (°C)	Viscosity (cP, 25°C)	ε^{*a}	Dielectric Constant ε(20°C)	Solvent Strength[b]
Acetonitrile	190	82	0.34	0.65	37.5	3.1
Ethanol	205	78	1.08	0.88	24.6	3.6
Methanol	210	65	0.54	0.95	32.7	3.0
1-Propanol	240	97	1.9	0.82	20.3	
2-Propanol	210	82	1.9	0.82	20.3	4.2
Pyridine	305	115	0.88	0.71	12.4	
Acetic acid		118	1.1	Large	6.2	
Formic acid		101		Large	58.5	
Water		100	0.89	Very large	80	0.0

Els solvents orgànics que han de provocar l'elució dels pèptids han de permetre la seva bona solubilització, han de ser miscibles en aigua i transparents a l'UV. D'entre els més utilitzats en la cromatografia de pèptids en fase reversa, l'ordre en quant a força o poder d'elució és el següent:

1-propanol > 2-propanol > tetrahidrofurà ≈ dioxà > etanol > acetonitril > metanol

A la taula II.2 es troben les propietats físiques d'alguns dels solvents més utilitzats en fase reversa.

TRACTAMENT PREVI DE LES MOSTRES A CROMATOGRAFIAR. SOLVENTS

Els pèptids injectats en dissolució aqüosa a una columna d'HPLC queden retinguts al cap de columna fins que la concentració de solvent orgànic arriba a ser la característica de l'elució de cada un en particular. Normalment, les mostres s'injecten dissoltes en un petit volum de dissolvent inicial. No sempre, però, es disposa d'una barreja de pèptids soluble en aquestes condicions. Es pot optar per utilitzar un àcid orgànic com el fòrmic (al 1-5%) (Gerber et al., 1979), però es corre el perill de tenir interferències en la interacció dels pèptids més petits i hidrofílics amb la columna. En aquests casos, els millors sol.lubilitzadors, inerts pel que respecta a l'afinitat dels pèptids per la columna, són la urea 7-8 M i en alguns casos el clorur guanidini 6 M. No obstant, amb aquests darrers compostos també cal recordar la possibilitat que alguns pèptids que hi siguin solubles poden no ser-ho en cap concentració de solvent orgànic emprat a la cromatografia, el que pot provocar precipitacions al cap de columna.

CROMATOGRAFIES ANALÍTIQUES I PREPARATIVES

El fet de seguir les cromatografies a 214 nm permet detectar quantitats molt petites de mostra. Normalment és suficient 1 nanomol de proteïna o pèptid a digerir per detectar la totalitat dels seus fragments. Això permet poder dedicar part de la mostra a posar a punt les millors condicions cromatogràfiques per una mostra donada. Quan aquestes són conegudes, n'hi ha prou amb aplicar-les a la mostra

preparativa, amb la precaució de no ultrapassar certs límits de sol.lubilitat.

II.4.2.a. TIPUS DE COLUMNES UTILITZADES

El fraccionament de barreges de pèptids s'ha fet sempre amb columnes de fase reversa. Concretament s'ha utilitzat les columnes llistades a continuació, de les que s'indica entre parèntesi les mides externes, la mida de partícula i el diàmetre de por. També s'indica per quin tipus de cromatografia han estat utilitzades

μ-Bondapak C-18 (300 x 4 mm, 10 μm, 100 Å).Utilitzada tant per cromatografies analítiques com preparatives. (Waters Assoc.)

Vydac TP-RP C-4 (250 x 8 mm, 5 μm, 100 Å). Semipreparativa i preparativa. (Separation Systems).

Ultrapore C-3 (75 x 4,6 mm, 10 μm, 300 Å). Analítica i preparativa (Beckman).

Nucleosil 300-5 C-4 (250 x 4 mm, 5 μm, 250 Å). Analítica i semipreparativa (Mackerey-Nagel).

Sempre que es va treballar amb pèptids es va protegir el sistema amb una pre-columna de 23 x 4,5 mm farcida amb suport pel.licular Corasil C-18 de Waters Assoc. en el primer cas, o de suport pel.licular Perisorb C-2 (Merck) en els altres tres casos.

II.4.2.b. MAPES PEPTÍDICS PER HPLC

Les cromatografies de pèptids s'han fet sempre a pH àcid en presència d'àcid trifluoroacètic. Els solvents emprats gairebé exclusivament han estat:

solvent A: H_2O + TFA 0,05%

solvent B: acetonitril al 80% + TFA 0,045%

(l'acetonitril era de Carlo Erba o de Merck)

En algunes cromatografies analítiques s'ha utilitzat 2-propanol o metanol. Tot i així, en pràcticament tots els casos s'ha vist que l'acetonitril donava igual o millor ressolució. La raó d'utilitzar una concentració de TFA lleugerament més baixa en el solvent B que en el A és la de compensar en part la pujada de la línea base deguda a l'augment de solvent orgànic a mida que avança el gradient.

S'ha fet servir gradients adequats per a cada tipus de separació particular, i així s'indicarà a cada cas; no obstant, en general, l'augment de solvent orgànic per minut ha estat sempre entre el 1% i el 0,025%, i el flux ha estat gairebé sempre de 1 ml/min.

La detecció dels pèptids s'ha fet per seguiment de l'absorció a l'UV amb una làmpara de Zn i filtre de 214 nm. Els límits d'absorbàcia del detector s'han variat segons la càrrega de mostra entre 0,05 i 2,0 u.d.o.

En el cas de les cromatografies preparatives, les mostres, una vegada col.lectades, van ser degasificades per a evaporar la major part de solvent orgànic i a continuació liofilitzades.

II.4.2.c. PURIFICACIÓ DE PÈPTIDS NO HOMOGENIS

Quan es treballa amb barreges molt complexes, és molt habitual trobar-se amb solapament de pics, el que dóna lloc a l'obtenció de mostres contaminades. Els solapaments mencionats sovint no poden sr evitats, per lent que sigui el gradient aplicat. Aquest comportament cromatogràfic té una fàcil explicació si es considera el concepte de factor de capacitat. Aquest es defineix com:

Factor de capacitat : $k = (t_r - t_o)/t_o$

on t_r = temps de retenció d'un pic determinat i
t_o = temps de retenció d'un pic no retingut

El factor k és característic d'un tipus de columna, d'uns dissolvents i d'una mostra determinats.

A la vegada, la resolució es defineix com:

Resolució = k/(k + 1)

Representant la resolució com a funció del factor de capacitat (Figura II.9) es pot veure que per damunt d'un factor de 10 la resolució augmenta molt a poc a poc.

La tría de solvents i la velocitat del gradient amb què aquests són passats per la columna tenen influència sobre el factor de capacitat. No obstant, com hem vist, a partir d'un cert punt les millores aconseguides en resolució són mínimes. Quan no pot millorar-se la resolució en una

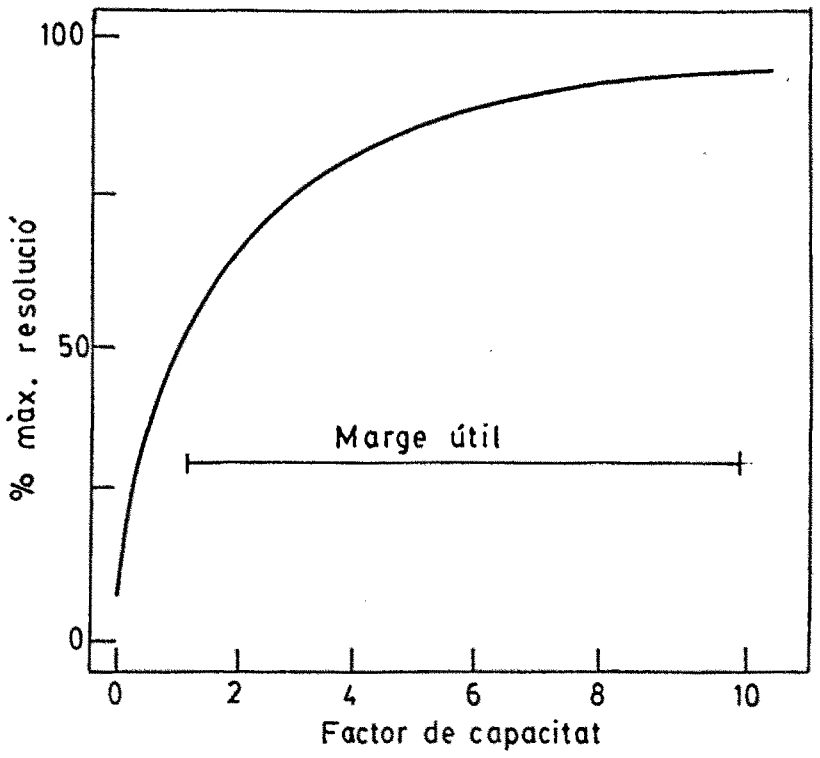


FIGURA II.9. Relació entre resolució i factor de capacitat o retenció en HPLC

cromatografia cal procedir a la recromatografia per poder obtenir pèptids no contaminats:

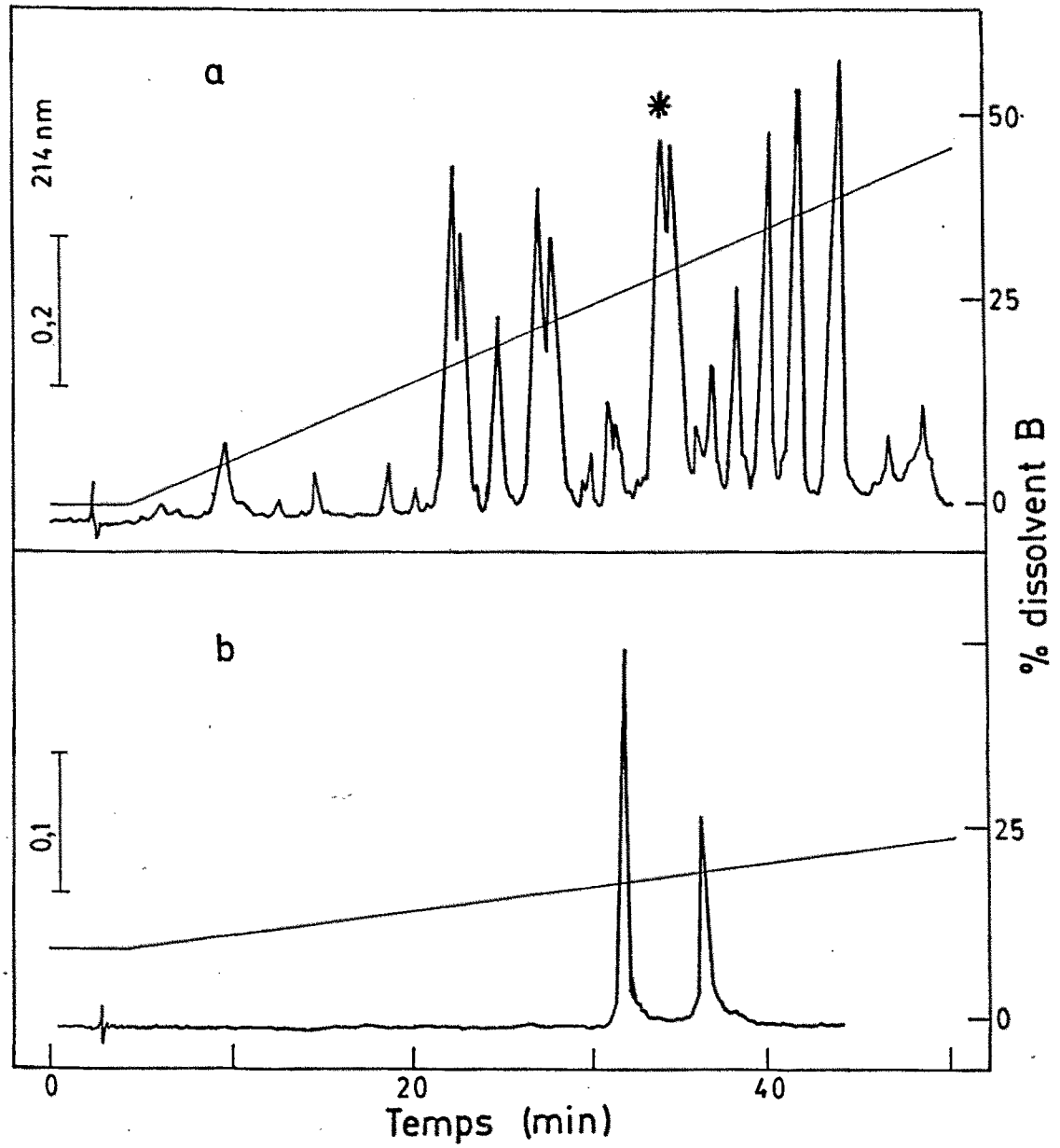


FIGURA II.10. Exemple de l'aplicació de la recromatografia en la purificació de pèptids. El pèptid marcat (*) al cromatograma (a) va ser repassat per la mateixa columna (b) fent servir un gradient més suau que començava a una concentració de solvent B lleugeramnent inferior a la de la seva elució en el primer cas.

En el nostre cas, els pèptids contaminats es van col.lectar i liofilitzar. A continuació s'aplicaren a la mateixa columna en la que havien estat cromatografiats en un petit volum de solució d'inici de gradient. Es va iniciar el gradient aplicat per la repurificació a una concentració de solvent orgànic inferior en un 5-7% a la que corresponía a l'elució del pèptid; l'augment de solvent orgànic es va fer molt més lent que en la cromatografia preparativa, arribant, si calia, a una ganància de solvent B de 0,01%/min. A la Figura II.10 es pot veure un exemple de purificació d'un pèptid per recromatografia en la mateixa columna.

II.4.3. HPLC DE PROTEÏNES

La tècnica de cromatografia líquida d'alta pressió ha estat, com ja s'ha dit, amplament aplicada al camp de la separació de pèptids producte del trencament de proteïnes o bé de pèptids naturals biològicament inactius, així com a la separació de molts altres compostos biològics de pes molecular relativament petit. En canvi, aquesta tècnica no sol donar tan bons resultats en l'aïllament de proteïnes en condicions natives. De fet, fins ara no es pot dir que, per exemple en cromatografia en fase reversa, s'hagi obtingut amb proteïnes separacions de la qualitat i recuperació de les que s'obtenen amb pèptids.

Els problemes amb què hom es troba en la cromatografia de proteïnes no són, potser, més que la magnificació dels que ja hi ha en la cromatografia de pèptids: un recubriment defectuós o parcial del suport de sílica pot donar problemes d'absorció, malmetent les separacions i recuperacions, encara que el mateix suport hagi donat abans magnífics rendiments a la separació de patrons de menor pes molecular; la càrrega de cadena hidrocarbonada tant elevada als suports de fase reversa fa que la quantitat de solvent orgànic necessari per l'elució sigui considerable, sobretot quan la proteïna és molt hidrofòbica (Regnier, 1983). Aquests problemes de partida en poden ocasionar altres derivats d'ell, com per exemple, la desnaturalitzacio, agregació o pèrdua d'activitat que es poden produir a causa de l'elevada proporció de

solvent orgànic necessària per l'elució de determinades proteïnes.

La manca d'un suport òptim per la separació de proteïnes per HPLC ha fet que aquesta tècnica s'hagi diversificat força en aquest aspecte: s'utilitza a l'actualitat columnes d'exclusió molecular, de bescanvi iònic, de fase reversa i d'interacció hidrofòbica. Les dues primeres classes de columnes són el resultat de la modificació dels suports clàssics respectius per a fer-los compatibles amb sistemes d'alta pressió. No obstant, la tecnologia té encara un bon camp a recórrer abans de poder oferir separacions, rendiments i capacitats de càrrega rentables a l'hora de separar proteïnes per aquests mètodes.

TAULA II.3

EXEMPLES DE PROTEÏNES CROMATOGRAFIADES PER HPLC DE FASE REVERSA(reproduït de Hughes i Wilson, 1982)

Protein	Molecular Weight (× 10^{-3})	Approximate Yield (%)	Reference[a]	Protein	Molecular Weight (× 10^{-3})	Approximate Yield (%)	Reference[a]
Epidermal growth factor	6.0	n.a.	10	Human placental lactogen	22.1	n.a.	10
Basic pancreatic trypsin inhibitor	6.5	81	14	Prolactin	22.6	n.a.	10
				Elastase	25.9	n.a.	10
Metallothionein	6.5	90	7	Apolipoprotein I	28.0	88	5
Parathyroid hormone	9.5	n.a.	10	Carbonic anhydrase	31.0	n.a.	10
Histones	11.3–14.0	n.a.	2			81	14
Cytochrome c	11.7	94	9	Maleic dehydrogenase	35.0	0	14
		n.a.	10	Alcohol dehydrogenase	36.7	19	14
		>80	13	H-2[a] Heavy chain	38.0	35	1
		46	14	Creatine kinase	42.0	67	14
Parvalbumin	11.7	100	14	Ovalbumin	43.0	n.a.	10
β_2-Microglobulin	12.0	80	1			57	14
Ribonuclease	13.7	n.a.	10	3-Phosphoglycerate kinase	47.0	38	10
		50–100	12				
[-Lactalbumin	13.7	n.a.	10	Albumin			
Lysozyme	14.3	n.a.	10	Chicken	65.0	100	14
Hemoglobin chains	15–16	100	6	Human	68.0	82	9
		n.a.	10			n.a.	10
		70–100	11			99	14
Calmodulin	16.7	80–90	8	Bovine	69.0	n.a.	10
Myoglobin	17.2	n.a.	10	Collagen α_1	95.0		3
		98	14				9
Apolipoprotein AII	17.4	85	5	Tyrosinase	128.0	86	9
Troponin C	17.8	80–90	8				
Interferon	20–21	50–100	4				
Growth hormone	22.0	n.a.	10				

No obstant els problemes esmentats, hi ha avui dia una considerable quantitat d'informació sobre separació de proteïnes per HPLC en la variant més emprada, la de fase reversa: s'ha aplicat a camps i materials tant distints com el fraccionament d'histones (Gurley et al., 1983), l'aïllament de proteïnes cereals (Bietz, 1983), la purificació d'interferó de leucòcits humans (Rubenstein et al., 1979), la separació de cadenes normals i cadenes mutants d'hemoglobina humana (Petrides et al., 1980) o la separació de tripsina de la quimotripsina que la contamina a les preparacions comercials (Titani et al., 1982). A la taula II.3 se'n pot veure una relació més extensa.

En aquest treball només s'ha utilitzat columnes de fase reversa quan es tractava de treballar amb proteïnes. Les consideracions sobre suports cromatogràfics i solvents són les mateixes que per als pèptids, amb una puntualització important: el diàmetre de porus influeix considerablement la resolució de molècules grans. Aquest fet, enunciat en primer lloc per Lewis et al. (1980) i reconegut des de llavors (Warren i Bidlingmeyer, 1985) fa que la mida mínima de porus aconsellable sigui de 300 Å quan el material a cromatografiar són proteïnes.

II.4.3.a. TIPUS DE COLUMNES UTILITZADES

En els treballs d'aquesta Tesi la separació de proteïnes per HPLC de fase reversa s'ha fet amb tres tipus de columnes:

Ultrapore C-3 (75 x 4,6 mm, 10 μm, 300 Å) (Beckman)

Vydac TR-P4 C-4 (250 x 8 mm, 5 μm, 100 Å) (Separation Systems)

Nucleosil 300-5 C-4 (250 x 4 mm, 5 μm, 250 Å) (Mackerey-Nagel)

Les tres columnes s'han utilitzat tant en processos analítics com preparatius. En tots els casos, la pre-columna utilitzada era de 23 x 4,5 mm i farcida amb suport pel.licular Perisorb C-2 de Merck.

II.4.3.b. SEPARACIÓ ANALÍTICA DE PROTEÏNES

La finalitat darrera de posar a punt mètodes de separació analítica de proteïnes era la de disposar d'un sistema que permetés l'anàlisi ràpida d'extractes aquosos de pols de pàncreas, a fi de detectar i analitzar la presència de procarboxipeptidases. Per això les proves es feren a partir de barreges de carboxipeptidases i de procarboxipeptidases A. La columna utilitzada en aquests estudis preliminars va ser la Ultrapore C-3 de Beckman, equipada amb una pre-columna Perisorb C-2 de Merck. Aquesta columna dóna excel.lents resultats amb barreges de proteïnes patró, com es pot veure a la Figura II.11.

L'interés d'aquest estudi radicava en escollir els millors sistemes solvents en quant a la seva capacitat de separació i a la vegada en escollir les condicions en què la recuperació fos millor; per això es van dur a terme els següents estudis:

ASSAIG DE DIFERENTS CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES

La variació de solvents orgànics, pH de la cromatografia i solucions tampó utilitzades, va donar lloc a l'assaig de les mescles binàries de solvents descrites a continuació:

- H_2O + TFA 0,1% / acetonitril 80% + TFA 0,1%
- H_2O + TFA 0,1% / isopropanol 60% + TFA 0,1%
- fosfat de trietilamina 25mM (pH 6,5) / idem en acetonitril
- fosfat de trietilamina 0,25M (pH 2,5) / idem en acetonitril 80% (Claiken i Hough, 1980)
- piperazina 10mM / piperazina 10mM, acetonitril 60% (pH 6,5 ajustat amb TFA)
- piperazina 10mM / piperazina 10mM, isopropanol 50% (pH 6,5 ajustat amb TFA)

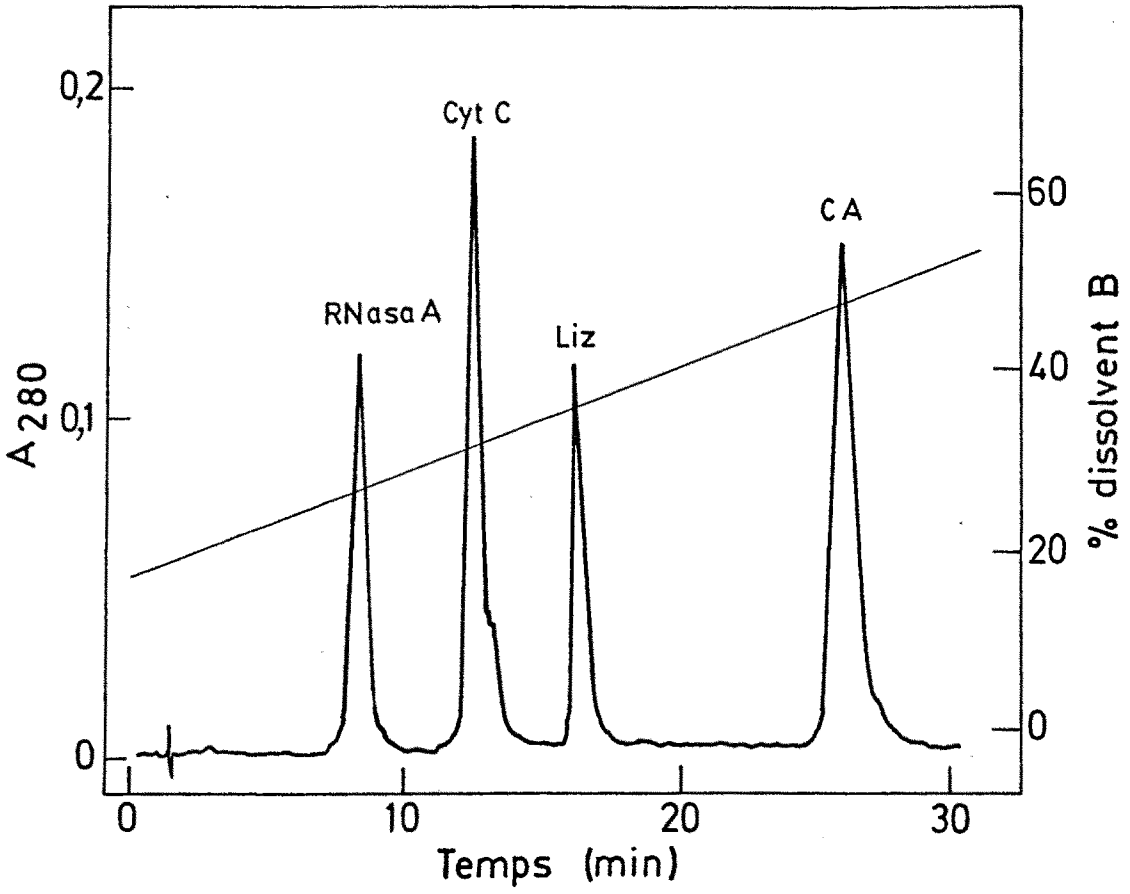


FIGURA II.11. Separació de proteïnes patró enb columna Ultrapore C-3 (Beckman). Solvent A: TFA 0,1%; solvent B: acetonitril + TFA 0,1%. Es van aplicar 40μg de RNasaA, 30μg de CA i 15 μg de Liz i Cyt C.

ESTIMACIÓ DE LA RECUPERACIÓ SEGONS EL TEMPS DE RESIDÈNCIA I LA QUANTITAT DE MOSTRA ENTRADA

En proves prèvies es va observar que les procarboxipeptidases i carboxipeptidases porcines no es recuperaven en un 100% al cromatografiar-les en columnes de fase reversa. Per a comprovar la relació que podés existir entre recuperació i temps de residència a la columna es va procedir a aplicar la mateixa mostra eluïnt-la amb diferents gradients, de manera que s'adelantés o endarrerís el seu temps d'elució. En aquest cas, la quantitat de mostra entrada es mantenia constant.

Contràriament, quan es tractava de veure la relació entre recuperació i quantitat de mostra entrada es mantenia constant el gradient aplicat per eluir la mostra, mentre que es variava la quantitat injectada.

II.4.3.c. AÏLLAMENT PREPARATIU DE SEGMENT D'ACTIVACIÓ

Es va probar de posar a punt el mètode d'aïllament del segment d'activació per HPLC per evitar en part la desnaturalització a què el segment és sotmés en la columna d'urea i per millorar el baix rendiment de recuperació. Les condicions d'activació prèvies a la separació cromatogràfica per HPLC van ser les mateixes que en el cas de la separació per bescanvi iònic en presència d'urea (veure apartat II.1.3.) El procediment d'activació i posterior cromatografia adoptat és el següent:

Es parteix de procarboxipeptidasa A monomèrica dialitzada en front de fosfat sòdic 40 mM, $ZnCl_2$ 0,01 mM (pH 5,8), a una concentració de 5 mg/ml i s'incuba durant 15 min a 25°C amb tripsina a una relació 40/1 (p/p). Al final de la incubació s'afegeix TFA fins a una concentració final de 0,25% (per donar un pH entre 1,7 i 1,8), s'elimina els agregats de carboxipeptidasa A (provocats pel baix pH utilitzat) per centrifugació en una centrifuga Eppendorf (13.000 rpm) durant 5 min i s'aplica el sobrenedant a una columna Ultrapore C-3 de fase reversa.

L'elució dels components de la barreja de reacció, s'efectua mitjançant l'aplicació del gradient següent:

Temps (min)	% Solvent A	% Solvent B
0	98	2
5	98	2
35	49	51
38	0	100

Solvent A: TFA 0,05&%; solvent B: acetonitril 80% + TFA 0,045%. Entre els minuts 5 i 35 s'aplicà la corba n° 5 del controlador de gradients del sistema.

Cal tenir en compte que l'obtenció de segment per HPLC té uns límits quantitatius, puix que a partir de certa càrrega de material inicial la columna pot quedar colapsada, arruinant la separació. Hem observat que el límit de seguretat per obtenir bones separacions en les columnes esmentades està en 2 mg de procarboxipeptidasa A per injecció. Una càrrega de 2 mg permet obtenir aproximadament entre 200 i 250 μg de segment.

El segment aïllat es dialitza durant tota la nit en front d'aigua ajustada a pH 8,5 amb NH_4OH, finalment es liofilitza, conservant-lo a -20°C.

II.4.3.d. PURIFICACIÓ DE TRIPSINA COMERCIAL

Prèviament a la cromatografia per columna μ-Bondapak C-18 de fase reversa, va ser necessari en alguns cassos retractar la tripsina amb TPCK segons el protocol següent (Carpenter et al.,1967):

Es dissol tripsina a 3 mg/ml en $CaCl_2$ 1 mM i s'ajusta a pH 7,0 amb sosa diluïda; a continuació s'afegeix TPCK d'una dissolució a 10 mg/ml en etanol al 100%, gota a gota, fins arribar a una relació tripsina/TPCK 30/1 (p/p). L'addició de l'inhibidor es fa amb agitació intermitent i a temperatura ambient. Es deixa en agitació intermitent durant 6 hores,

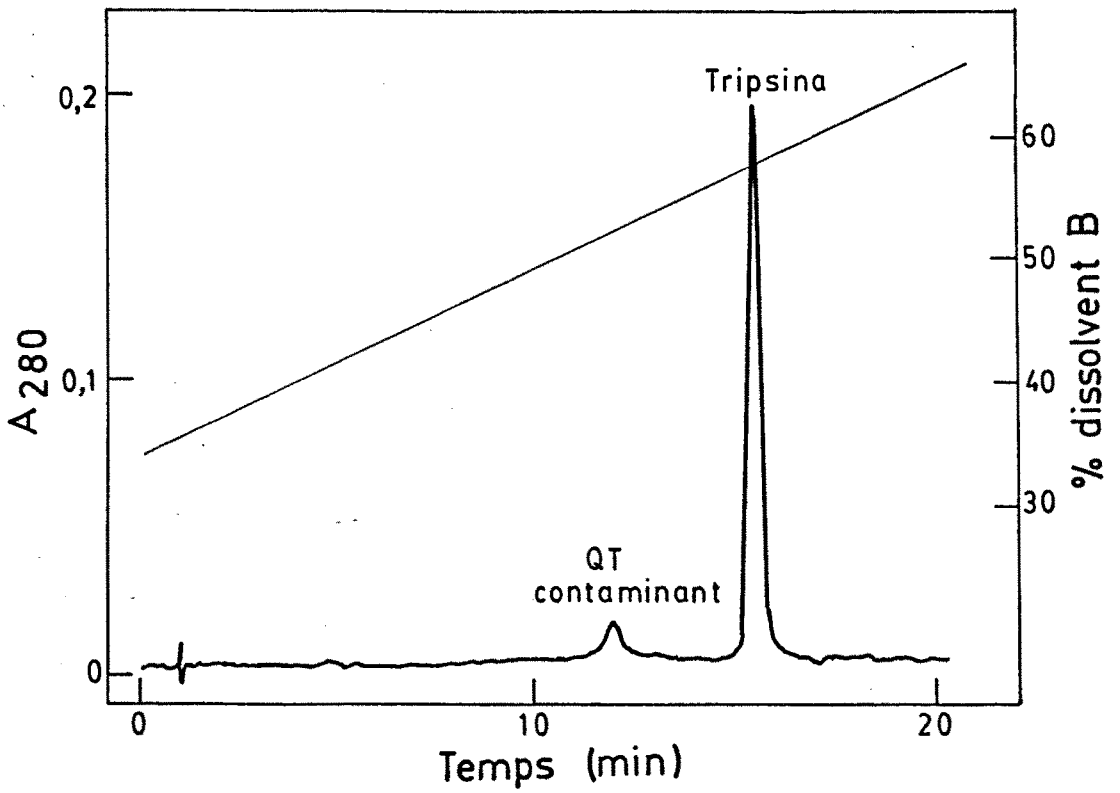


FIGURA II.12. Purificació de tripsina comercial per HPLC. Columna: μ-Bondapak C-18 (Waters). Solvent A: TFA 0,05%; solvent B: acetonitril 80% + TFA 0,045%.

ajustant el pH de tant en tant a 7,0 amb sosa. Al cap de les 5 hores es passa la barreja a pH 3,0 per addició de HCl 1 M i a continuació es dialitza en front d' aigua acidificada (pH 3,0) durant 24 hores a 4°C. Finalment es liofilitza.

Després del tractament amb TPCK, i per purificar la tripsina per HPLC, es va seguir el mètode de Titani et al. (1982) amb lleugeres modificacions de gradient:

La tripsina es dissol a 2 mg/ml en TFA 0,05% i s'aplica a una columna μ-Bondapak C-18 (Waters), eluïnt-la mitjançant el següent gradient entre acetonitril 80% i aigua, ambdós contenint TFA al 0,05%:

Temps (min)	% Solvent A	% Solvent B
0	65	35
26	26	74
29	0	100

Solvent A: TFA 0,05%; solvent B: acetonitril 80% + TFA 0,045%.

Finalment, la tripsina retractada amb TPCK i purificada per HPLC es congela i liofilitza. A la Figura II.12 es pot veure el perfil cromatogràfic de purificació de tripsina. El rendiment d'aquest procés és del 34% respecte de la quantitat de tripsina comercial de partida abans de tractar-la amb TPCK.

II.4.4. APENDIX: REGENERACIÓ DE COLUMNES DE HPLC DETERIORADES

Després d'uns quants mesos d'operació continuada, una columna d'HPLC perd gran part de la seva eficiència original i ha de ser canviada per una de nova o bé tornada a omplir amb material nou. Els factors més habituals que porten a aquesta situació a les columnes basades en suports de sílica (e.g., fase reversa, les úniques utilitzades en aquest treball) són la contaminació del cap de columna o

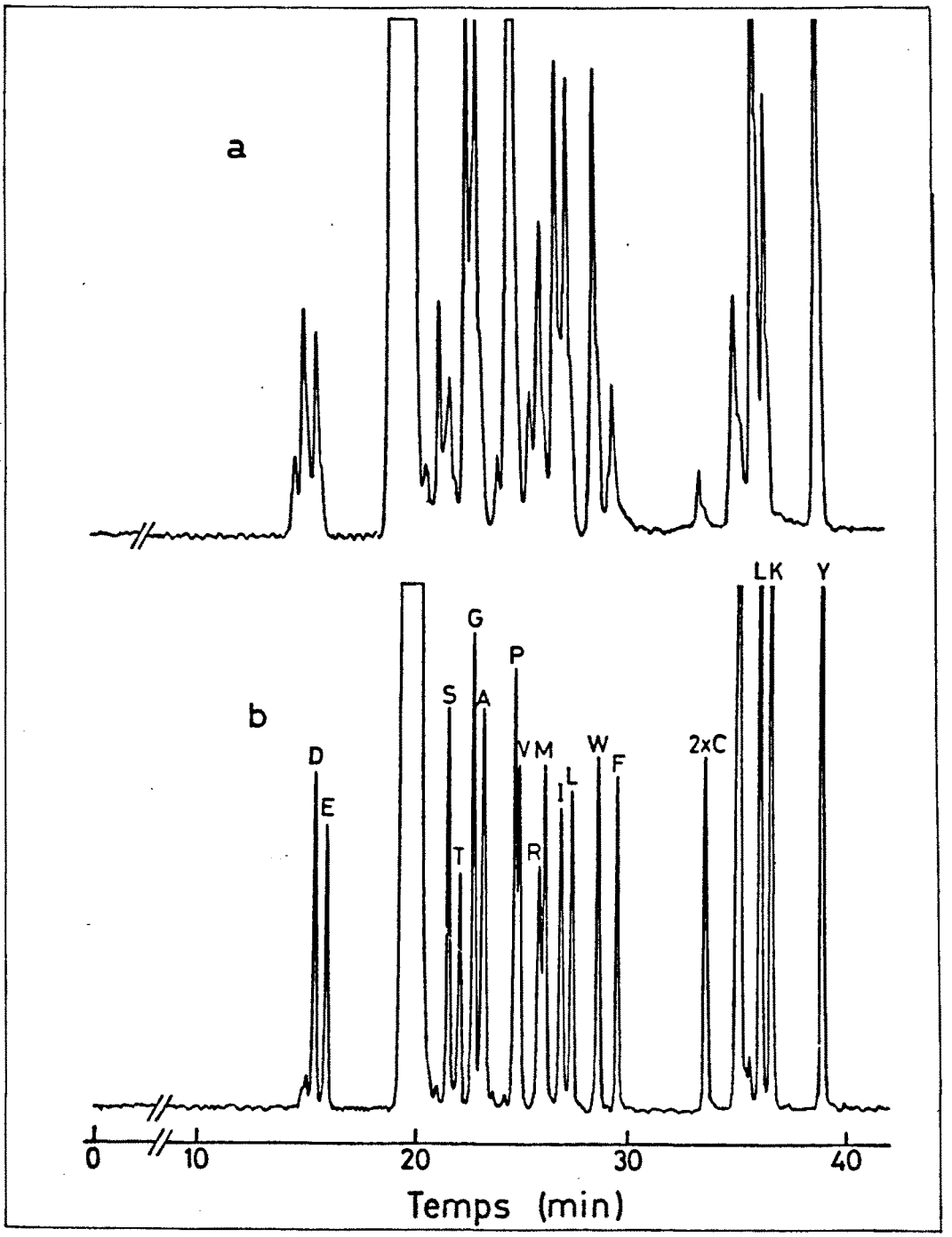


FIGURA II.13. (a) separació cromatogràfica de dabsil-aminoàcids en una columna deteriorada C-18 de fase reversa i (b) en la mateixa columna després de reempaquetar el cap original i invertir el sentit del flux. Per condicions de l'anàlisi, veure Chang et al. (1982).

bé la formació de buits a l'entrada de la mateixa. En primera instància, aquests problemes es poden solucionar reempaquetant el cap de columna amb material original o bé amb materials relacionats. Malhauradament, aquest procediment no té efectes molt perllongats i ha de ser repetit freqüentment. A més, no és aconsellable practicar-lo quan el buit o zona contaminada tenen una profunditat superior a 1 cm (Runsen, 1981). La possibilitat de girar el sentit del flux a la columna sol estar desaconsellada pels subministradors. Malgat això, hem observat que aquesta és una bona alternativa a considerar per columnes de fase reversa.

El procediment que hem desenvolupat a partir de la nostra experiència en la regeneració de columnes deteriorades és el següent: s'obre la columna i s'elimina la contaminació que pugui haver-hi en el cap amb l'ajut d'una petita espàtula. S'omple el buit format amb una suspensió en acetonitril 50% de suport pel.licular Corasil/C18 per columnes d'octadecilsilà o de Perisorb/C2 per columnes de trimetilsilà. A continuació es renta la columna en el sentit original del flux a fi que la primera capa de suport aplicada es dipositi. Es torna a obrir la columna i s'omple el buit que s'hagi pogut produïr. Es renta i es torna a omplir fins que no sigui necessària l'addició de més material. Les dues o tres primeres vegades que es practiqui aquesta operació es podrà fer cromatografies en el mateix sentit original del flux, però més endavant serà necessari girar-lo. Per assegurar la durada dels processos restauradors, es recomana afegir material suplementari sempre pel mateix extrem de la columna.

A la Figura II.13 es pot comprovar el comportament d'una mateixa columna de C-18 abans i després d'haver empaquetat l'entrada original amb Corasil/C18 i haver girat el flux. Aquí es presenta una anàlisi d'aminoàcids en una columna LiChrosorb RP18, però s'ha obtingut el mateix tipus de resposta amb una columna Ultrapore RPSC amb mostres de barreges de pèptids.

Les columnes regenerades poden utilitzar-se durant un nombre d'injeccions similar al de les columnes noves. A més, aquest mètode estalvia la necessitat d'utilitzar instrumentació especial com en altres mètodes també exitosos de regeneració de columnes (Avery i Light, 1985).

II.5. MAPES PEPTÍDICS EN CAPA PRIMA

La metodologia de mapes peptídics en capa prima ha estat aplicada a diversos estudis realitzats en aquesta Tesi, com poden ser el seguiment de l'activació de la procarboxipeptidasa A , la comparació de fragments peptídics per a comprovar identitats entre els dos zimògens naturals, la identificació de residus específics, i d'altres. Per aquesta raó s'ha posat a punt tant la tècnica de cromatografia monodimensional com la de mapes peptídics bidimensionals en els que la segona dimensió correspon a una electroforesi, basant-nos en el mètode d'Stephens (1978). En un cas particular, el de la identificació de residus His i Tyr en pèptids, la capa prima només va servir de suport per a les tincions.

S'ha utilitzat plaques de sílica-gel 60 (Merck) de 20 x 20 cm. Els solvents utilitzats han estat sempre de la mateixa casa Merck. L'aparell d'electroforesi d'alt voltatge era de la casa Savant.

II.5.1. CROMATOGRAFIA MONODIMENSIONAL

Abans de trobar les condicions idònies per a la cromatografia dels nostres pèptids es va fer una sèrie de proves amb barreges diverses i a diverses proporcions dels solvents cloroform, etanol, metanol i hidròxid amònic. Finalment, la barreja que proporcionà una millor separació va ser (s'indica relació de volums):

Cloroform: etanol: metanol: hidròxid amònic (2:1:1:1)

Procediment: es dissol la mostra a aplicar, prèviament liofilitzada, en un volum petit (5-15 μl) d'hidròxid amònic 0,1 M i s'aplica en un extrem de la placa a 1,5 cm del caire exterior. L'aplicació es realitza en diverses addicions successives, molt petites, assecant la taca amb corrent d'aire fred entre cada addició. A continuació s'introdueix la placa en una cambra cromatogràfica que conté 50 ml de la barreja de solvents, amb l'extrem més proper a la mostra

reposant sobre la base, i es deixa desenvolupar la cromatografia durant aproximadament 2 hores 45 min (fins a 1 cm de la part superior). La placa s'asseca amb aire fred en una campana extractora i a continuació es col.loca 20 min en una estufa a 37°C i 20 min en una altra estufa a 105°C. Finalment es deixa atemperar la placa a temperatura ambient, es revela amb la tinció desitjada i es marca el perímetre dels pèptids detectats amb un llapis tou.

II.5.2. MAPES PEPTÍDICS BIDIMENSIONALS

En els mapes bidimensionals s'ha començat sempre amb la cromatografia com a primera dimensió. Aquesta es duu a terme de la mateixa manera descrita a l'apartat anterior, amb l'excepció que no es fa el pas per l'estufa a 105°C.

Després de la primera dimensió, la placa de sílica gel s'arrossa amb un spray amb la barreja d'eluents d'electroforesi:

Piridina: acid acètic: aigua (20: 20: 960) (pH 4,7)

La placa humida, suficientment però no fins al punt de gotejar, es co.loca horitzontal sobre la placa refrigerant de l'aparell d'electroforesi i amb dos papers de filtre Whatman molls amb eluent d'electroforesi es fan dos ponts entre els extrems de la placa de sílica i les dues cubetes, connectades cada una a un dels dos pols elèctrics. Es connecta la font alimentadora a 200 V durant 15 min i a continuació a 1000 V durant 1 hora. Finalment, la placa s'asseca amb aire fred en una campana d'extracció i a continuació en una estufa a 37°C durant 20 min i en una altra a 105°C durant 20 min més. Una vegada atemperada a temperatura ambient, es revelen els pèptids amb la tinció desitjada i es marquen els seus perímetres amb un llapis tou.

II.5.3. TINCIÓ AMB FLUORESCAMINA

La tinció amb fluorescamina, que reaciona amb grups amino, serveix per a la detecció de tota mena de pèptids i es la que es fa servir generalment quan es tracta de visualitzar un mapa peptídic complet.

Es dissol fluorescamina al 0,025% en un volum d'uns 10 mls d'acetona completament anhidra. S'arrossa la placa amb la meitat d'aquesta solució, s'asseca amb aire fred, i s'acaba d'arrossar amb la resta. A continuació, i per donar més intensitat a la tinció, s'arrossa lleugerament la placa amb trietilamina al 5% en acetona.

La visualització dels pèptids tenyits es fa sota la llum ultraviolada, on donen una coloració groga brillant. Les fotografies sobre pel.lícula en blanc i negre de les plaques així tenyides cal fer-les en presència d'un filtre groc o taronja per tal d'obtenir millor contrast amb el fons blavós que presenten.

II.5.4. TINCIONS DE RESIDUS ESPECÍFICS

DETECCIÓ DE RESIDUS TRIPTÒFAN

Es va utilitzar la tinció d'Erlich citada per Needleman (1970). Els derivats d'indol reaccionen amb el p-dimetilaminobenzaldehid donant una coloració púrpura. El triptòfan, com a derivat de l'indol substituït en posició 3 només reacciona en medi fortament àcid. El procediment és el següent:

Es prepara una disolució a l'1% de p-dimetilaminobenzaldehid en una barreja acetona-HCl concentrat 9:1 (v/v). S'arrossa la placa i es desenvolupa el color a temperatura ambient.

DETECCIÓ DE RESIDUS HISTIDINA

Es va utilitzar la tinció de Pauli segons la qual es poden detectar en paper o capa fina el grup imidazole de la histidina i el grup fenol de la tirosina (Mann i Leone, 1953). Amb aquesta tinció la histidina apareix com taques grogues amb virola vermella.

Cal preparar les dissolucions següents:

a # Acid sulfanílic al 9% (p/v) en HCl al 9% (v/v)

b # $NaNO_2$ al 5% (p/v)

c # NaOH al 20% (p/v)

d # Na_2CO_3 al 10% (p/v)

Es segueix el següent protocol per a la tinció:

A 2 volums de dissolució (a) fresca se li afegeix 1 volum de dissolució (b). Immediatament després de barrejar-les, s'afegeix 1 volum de dissolució (c). S'arrossa el cromatograma, s'asseca a l'aire i es torna a arrossar amb dissolució (d), deixant desenvolupar el color a T ambient.

DETECCIO DE RESIDUS TIROSINA

Es va utilitzar la tinció amb α-nitroso- β -naftol (Needleman, 1970):

S'arrosa el cromatograma amb dissolució de α-nitroso- β -naftol al 0,1% (p/v) en etanol al 95%. Després d'assecar amb aire calent, es torna a arrossar amb àcid nítric al 10% i s'escalfa a 100°C durant 3 minuts. La tirosina dóna taques malva amb aquesta tinció.

II.6. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS PER DERIVATITZACIÓ AMB CLORUR DE DABSIL - HPLC

Es descriu en aquest apartat les metodologies posades en pràctica durant el desenvolupament d'un mètode d'anàlisi d'aminoàcids per HPLC.

El mètode tradicional per l'anàlisi d'aminoàcids (Moore i Stein, 1963) utilitza columnes de bescanvi iònic i elució isocràtica per passos amb tres o més tampons i posterior detecció post-columna amb ninhidrina. Donada la necessitat de portar a terme aquestes anàlisis en pràcticament tots els laboratoris de química de proteïnes, es va desenvolupar la tecnologia d'aparells específicament dissenyats per a tal finalitat: els autoanalitzadors d'aminoàcids. Posteriorment van anar sortint modificacions del mètode original com les que utilitzaven derivatització post-columna amb o-ftalaldehid (OPA) (Benson i Hare, 1975) o fluorescamina (Stein et al., 1973).

Les millores en la tecnologia de fabricació dels materials de farciment de les columnes va permetre adequar la tècnica a la cromatografia d'alta pressió, amb el que ja no resultava imprescindible el disposar d'un aparell dedicat exclusivament a l'anàlisi d'aminoàcids. En primer lloc es va intentar adaptar els mètodes anteriors a les noves columnes, fent elucions isocràtiques (Hughes et al., 1982) i més tard en gradient (Hughes i Wilson, 1982), però hom va adoptar aviat columnes de fase reversa amb derivatització tant post- com pre-columna.

Les derivatitzacions pre-columna han estat la darrera millora introduïda en l'anàlisi d'aminoàcids, juntament amb l'automatització dels sistemes. Per a tal fi s'ha utilitzat diversos reactius tals com OPA (Jones et al., 1981; Cooper et al., 1984), clorur de dansil (Tapuhi et al., 1981), fenilisotiocianat (PITC) (Heinrikson i Meredith, 1984), dimetilaminoazobenzèisotiocianat DABITC (Yang i Wakil, 1984) i clorur de dimetilaminoazobenzèsulfonil (DABS-Cl) (Chang et al., 1981)

Tots els mètodes descrits presenten avantatges i inconvenients. Així per exemple, els mètodes isocràtics necessiten tres o cinc tampons diferents; hi ha impossibilitat de detectar la prolina i manca d'estabilitat dels aminoàcids derivatitzats quan es treballa amb OPA; o

bé certs problemes de manipulació i d'homogeneïtat de la derivatització quan es treballa amb els altres reactius, etc. El sistema ideal sería aquell que permetés avaluar quantitativament tots els aminoàcids, que donés una resposta homogènia quant a la seva derivatització i que a més permetés fer anàlisis en un temps mínim i a sensibilitat de l'ordre de picomols. No existeix un tal sistema pel moment.

Al nostre laboratori es va adoptar el mètode de Chang et al., (1981) de derivatització d'aminoàcids amb clorur de dabsil. Aquest sistema tot i donant bons resultats va presentar problemes de reproduïbilitat i homogeneïtat que vam intentar resoldre optimitzant les condicions de la reacció i de l'emmagatzament dels derivats. Al mateix temps, es va estendre el mètode de dabsilació a l'anàlisi dels aminoàcids àcid-làbils, és a dir, glutamina, asparagina i triptòfan, i es va dissenyar sistemes cromatogràfics que permeten escurçar el temps d'anàlisi substancialment. També es va utilitzar nous suports cromatogràfics que donen una millor resolució i es va dissenyar gradients extesos que permeten l'anàlisi de barreges molt complexes d'aminoàcids naturals i modificats.

II.6.1. MATERIALS I INSTRUMENTACIÓ

El clorur de dabsil utilitzat era de la casa Fluka i es va recristallitzar en acetona abans del seu ús (Chang et al., 1981). Amb aquesta finalitat es dissolía el reactiu (entre 50 i 100 mg) en acetona (Merck) a 57°C i a 10 mg/ml. S'eliminava el material insoluble filtrant la dissolució per un embut de placa filtrant, i es deixava el filtrat a -20°C durant tota la nit. El dia següent es recollien els cristalls precipitats per centrifugació, procedint posteriorment al seu assecat. L'acetonitril de grau HPLC era de Carlo Erba o de Merck. L'estàndard d'aminoàcids i el HCL 6 M van ser subministrats per Pierce. L'àcid metansulfònic, la lisozima, aminoàcids lliures naturals i modificats, poliaminoàcids, DAPA (àcid 2,3-diaminopropiònic) i DABA (àcid 2,4-diaminobutíric) eren de Sigma. L'àcid p-toluensulfònic era de Merck i es va mantenir al buit sobre pellets d'hidròxid sòdic tota una nit abans

del seu ús. El BTI (bis(trifluoroacetoxi)iodo benzè) era d'Aldrich. La resta de productes emprats eren de qualitat analítica.

La instrumentació utilitzada per l'anàlisi d'aminoàcids per HPLC ja va ser descrita a l'apartat II.4.1. Per la injecció de les mostres es va utilitzar normalment l'injector automàtic WISP 710; el detector 440 es va fixar a 436 nm; la columna es va mantenir sempre a 50°C; les conduccions cromatogràfiques tenien un diàmetre intern de 0,005 polsades i mesuraven 85 cm de injector a columna i 60 cm de columna a detector; es va utilitzar una cel.la detectora de 10 μl (Taper Cell, Waters Asoc.) i es van col.locar dues vàlvules Rheodyne 7060 als extrems de la columna.

II.6.2. TRACTAMENT QUÍMIC DE LES MOSTRES

Alguns dels aminoàcids modificats emprats no van poder ser adquirits comercialment i es van haver de preparar per tractament químic al laboratori. Es distingirà entre obtenció de derivats d'aminoàcids i modificació de Gln i Asn per permetre la seva posterior anàlisi.

II.6.2.a. DERIVATS D'AMINOÀCIDS PROTEÏNOGÈNICS

La barreja d'homoserina i homoserina lactona es va obtenir per tractament de clorhidrat de metionina amb bromur de cianògen en àcid fòrmic al 70% i posterior liofilització (Needleman, 1970). Es va obtenir homoserina pura per tractament de la barreja amb acetat de piridina a 105°C durant 1 hora (Needleman, 1970). Es va obtenir la carboximetilcisteïna i la carboximetilhistidina a partir dels clorhidrats de cisteïna i histidina (Crestfield et al., 1964).

II.6.2.b. TRACTAMENT AMB BTI

Aplicat a aquelles mostres en les que es volia analitzar el seu

contingut en glutamina i asparagina. Es va utilitzar el mètode de Soby i Johnson (1981) que consisteix en dissoldre la proteïna a 2 mg/ml en clorur de guanidini 5 M, TFA 0,1% i afegir-li a continuació 1 volum de BTI a 36 mg/ml en dimetilformamida. Després d'una incubació a 60°C durant 4 hores, la proteïna es dialitza tota la nit en front d'aigua desionitzada. Finalment, s'extreu el reactiu tres vegades amb n-butil acetat i es liofilitza la fase aquosa.

II.6.3. HIDRÒLISI ÀCIDA DE PÈPTIDS I PROTEÏNES

Les proteïnes i pèptids es van hidrolitzar amb HCl 6 M (Pierce), o bé amb àcid p-toluensulfònic 3 M (Liu i Chang, 1971) o amb àcid metànsulfònic 4 M (Simpson et al., 1976), en presència de triptamina al 0,2% en els dos darrers casos.

El procediment seguit és el següent: es liofilitza aproximadament 1 nmol de proteïna o de pèptid en un tub de borosilicat de 0,4 x 6 cm, se li afegeix 25 μl de dissolució d'àcid i es tanca el tub a la flama després de fer el buit durant 1 minut. Després de mantenir el tub a 110°C durant 22, 48 o 72 hores, s'obre el tub a la flama i es liofilitza en el cas del tractament amb HCl o bé s'ajusta a pH 9,0 mitjançant una acurada addició d'hidròxid sòdic 3 M en el cas dels àcids sulfònics. En aquests casos cal assajar paralel.lament l'ajust a pH 9,0 amb una mostra de major volum d'àcid per tal d'assegurar una correcta addició d'àlcali a les mostres en àcid i comprobar el pH amb tiretes de paper indicador (Merck) en el marge de 8,0 a 10,0. Finalment, es dissol el liofilitzat en 100 μl de bicarbonat sòdic 0,15 M en el cas de la hidròlisi amb HCl o bé addicionar a la mostra neutralitzada 50 μl de bicarbonat sòdic 0,30 M en els altres dos casos, per tal de tenir sempre una dissolució d'aminoàcids lliures en 100 μl de bicarbonat sòdic 0,15 M.

II.6.4. TRIA DE LES CONDICIONS DE DABSILACIÓ

Com ja s'ha dit a la introducció d'aquest apartat, el mètode original de Chang et al. (1981) presentava certs problemes de reproduïbilitat i homogeneïtat. Per tal d'optimitzar el mètode es va assajar diferents possibilitats per a cada una de les condicions en què la reacció de derivatització es portava a terme.

Es va partir de les condicions descrites en el procediment estàndard (Chang et al., 1981; Chang et al., 1982; Chang et al., 1983) i es va assajar diferents reactius i condicions per aquest ordre:

a # Acids emprats a la hidròlisi a 110°C. Es va fer hidròlisis amb àcid clorhídric, p-toluensulfònic i metansulfònic.

b # pH de la reacció de derivatització. Es va fer assajos a pH 8,5, 9,0 i 9,5.

c # Solució amortidora i dissolvent orgànic emprats. Com a solucions amortidores es va assajar bicarbonat sòdic, fosfat de trietilamina i N-etilmorfolina. Com a dissolvents orgànics, es va provar l'eficiència de dioxà i acetona.

d # Concentració de clorur de dabsil. Es va assajar concentracions finals a la barreja de reacció entre 1,5 i 9,0 mM.

e # Percentatge de dissolvent orgànic. Es va comprovar el rendiment de la derivatització a uns percentatges d'acetona que variaven entre el 25 i el 80%.

II.6.5. PROCEDIMENT DE DABSILACIÓ ESTÀNDARD

La derivatització es va dur a terme en tubs de vidre tapats amb taps també de vidre (0,6 x 2,5 cm) o bé en tubs Eppendorf segons el procediment que es descriu a continuació: a 100 μl d'una dissolució 0,15 M en bicarbonat sòdic (pH 9,0) que conté la mostra de proteïna hidrolitzada o bé 10 nmols d'un estàndard d'aminoàcids, se li afegeix 100 μl d'una dissolució de clorur de dansil 15 mM en acetona. El tub s'incuba, ben tapat, a 70°C durant 15 min, agitant de tant en tant i

controlant que no hi hagi evaporació d'acetona. A continuació, la mostra es dilueix a 500 μl amb una barreja d'etanol i fosfat sòdic 40 mM (pH 6,5) (1:1, v/v). Per finalitzar, la barreja de derivatització es centrifuga a 13.000 g durant 5 min i s'aplica una alíqüota del sobrenedant a la columna d'HPLC, emmagatzemant la resta a -20°C.

II.6.6. SEPARACIO CROMATOGRÀFICA DELS DABSIL-AA

Com s'ha dit ja al començament d'aquest apartat, es va adoptar el mètode de Chang et al. (1981) tant per la derivatització com per la cromatografia dels aminoàcids. Hi va haver, però, modificacions, que van incloure també les columnes emprades. Els autors anomenats utilitzaven una columna Zorbax ODS (Dupont) o bé una columna LiChrosorb RP-18 (Merck). En el nostre cas vam mantenir aquesta darrera columna en els primers estadis d'aquest treball i vam canviar més endavant a una columna Novapak de Waters. Les especificacions de les columnes eren:

LiChrosorb RP-18 (Merck) partícules irregulars de 5 μm, 4,5 x 250 mm.

Novapak C-18 (Waters) partícules esfèriques de 4 μm, 4,5 x 150 mm.

La darrera columna dóna millor ressolució i per tant permet escurçar el temps de les anàlisis. En tots els cassos es va protegir les columnes amb una pre-columna (0,6 x 2,5 cm) farcida amb suport pel.licular Corasil C-18 (Waters).

Es va utilitzar els dissolvents i programes cromatogràfics citats a Chang et al. (1982) amb la columna LiChrosorb. En canvi, va ser necessari canviar les condicions per ajustar-les a la columna Novapak. Les dissolucions utilitzades foren:

Dissolució A: fosfat sòdic 9,0 mM (pH 6,5) + DMFA al 4%

Dissolució B: acetonitril + DMFA al 4%

En tots els casos es va mantenir el flux a 1 ml/min. Els gradients emprats variaven segons les aplicacions desitjades, és a dir, segons que es volés fer una separació ràpida rutinària o es volés resoldre la composició d'una barreja més complexa d'aminoàcids. Els tres gradients utilitzats foren:

Gradient 1: separació rutinària en 25 min dels 20 aminoàcids proteïnogènics

Temps (min)	% solvent A	% solvent B
0	9	9
8*	77	23
16	63	37
17	54	46
20	51	49
21	40	60

(*) el pas entre els minuts 0 i 8 va ser fet mitjaçant la corba hiperbòlica n° 5 del controlador de gradients M680.

Gradient 2: també per a la separació dels 20 aminoàcids proteïnogènics, però en els casos de proteïnes amb composició molt descompensada i a on convé separar clarament els components majoritaris dels minoritaris (separació dels components en 32 min)

Temps (min)	% solvent A	% solvent B
0	91	9
24	60	40
25	54	46
31	45	55
33	40	60

Gradient 3: per a la separació d'un major nombre de derivats, com pot ser el cas de proteïnes amb modificacions post-translacionals o artificials (separació dels components en 75 min)

Temps (min)	% solvent A	% solvent B
0	93	7
5	93	7
32	81	19
42	76	24
55	66	34
56	62	38
78	47	53
80	40	60

II.6.7. PROGRAMA DE CÀLCUL D'ANÀLISIS D'AMINOÀCIDS I LOCALITZACIÓ DE SEQÜÈNCIES

La quantificació de les anàlisis d'aminoàcids és un procés molt laboriós, puix que cal anar trobant les relacions del valor (d'àrea o alçada) corresponent a cada residu amb el valor del patró corresponent i multiplicar-les per la quantitat de patró introduïda a l'analitzador. El procés augmenta en laboriositat si es vol treballar amb la mitja de diversos patrons, si cal quantificar un gran nombre de mostres o si es vol fer estimacions de possible nombre enter de residus, quantitat (en pes o en nmols) de mostra analitzada o coeficient d'extinció. Per altra banda, a vegades hom es troba en la necessitat de localitzar una composició determinada en una seqüència coneguda o en una seqüència homòloga. Per tota aquesta sèrie de raons, i perquè la quantitatització obtinguda a partir del registrador-integrador del nostre equip d'HPLC no era prou satisfactòria, vam dissenyar un programa d'ordinador en llenguatge BASIC que ofereix les següents prestacions:

Càlcul del percentatge de cada AA a partir de la comparació
- amb un patró
- amb dos, tres o quatre patrons
- amb la mitja de tots ells o d'alguns en particular

Càlcul de la composició d'un pèptid o d'un proteïna en números sencers o decimals a partir d'una llargada prèviament estimada.

Càlcul de la composició a partir del pes molecular.

Càlcul de la quantitat de mostra entrada en pes si no es coneix el pes molecular de la proteïna, i en pes i mols si es coneix.

Càlcul del coeficient d'extinció si es coneix l'absorbància de la mostra original abans de ser liofilitzada i hidrolitzada.

Localització del punt de màxima coincidència de la composició prèviament calculada amb una seqüència coneguda, que pot ser aquella de la que procedeix el pèptid o bé una d'homòloga. Cal, per procedir a aquesta localització, introduïr com a dada una llargada estimada subjectivament per al pèptid en qüestió.

II.7. SEQUENCIACIÓ DE PÈPTIDS I PROTEÏNES

Malgrat certes prospectives catastrofistes que preveien tants mals auguris com, textualment el "*decline and fall of protein chemistry*" (Malcolm, 1978), la seqüenciació de proteïnes és una tècnica que, lluny de desaparèixer, continúa essent avui en dia una eina fonamental i a vegades única per a conèixer l'estructura primària de les proteïnes. Així com és cert que els avenços en la tecnologia de seqüenciació del DNA (millor encara si es tracta d'un cDNA) permeten la ràpida obtenció de seqüències proteiques i que aquesta tècnica ha suposat una millora importantíssima en aquest camp, no ho és menys que la nova tècnica no pot suplir l'anàlisi ràpida de pèptids o regions proteiques petites, ni donar compte de la situació dels ponts disulfur, del punt d'anclatge dels grups prostètics, de la presència d'aminoàcids modificats, etc. En una paraula, no pot donar compte de les modificacions post-traduccionals, definitives en molts casos pel que respecta a la funcionalitat de les proteïnes. De fet, en un futur immediat hom contemplarà la complementació de les tècniques de seqüenciació d'àcids nucleics, de seqüenciació de proteïnes i de cristalografia de raigs X, dirigida al coneixement no només de l'estructura primària d'una proteïna, sino del seu procés complert de maduració.

Dins del terreny concret de la determinació de seqüències d'aminoàcids a pèptids i proteïnes, la tècnica més important de les fins ara utilitzades és el mètode de degradació amb fenilisotiocianat introduït i desenvolupat per Edman (Edman, 1950; Edman i Begg, 1967).

II.7.1. LA DEGRADACIÓ D'EDMAN

La degradació d'Edman és un procés cíclic pel que es van eliminant, de un en un i en forma de feniltiohidantoïnes (PTH), els aminoàcids de l'extrem N-terminal del pèptid a analitzar mitjançant un procés que comença amb l'acoblament del reactiu fenilisotiocianat (PITC) i acaba amb una hidròlisi àcida de l'enllaç peptídic N-terminal. Aquesta

degradació d'Edman s'ha utilitzat segons el mètode substractiu, pel que s'analitza la composició del pèptid escurçat, el mètode Edman-dansil on on s'analitza el nou N-terminal per anàlisi d'*end-group* i sobretot segons el mètode directe, en el que s'identifiquen les feniltiohidantoïnes (PTH) alliberades per diferents mètodes cromatogràfics o per anàlisi d'aminoàcids després d'una hidròlisi.

Al llarg del temps han anat sortint alternatives al PITC com reactiu d'acoblament, la majoría d'elles basades en altres isotiocianats. Entre aquestes, la que contempla l'ús del 4-N,N-Dimetilaminoazobenzè-4'-isotiocianat (DABITC) és la que posseeix millors característiques (Chang et al., 1976; Chang, 1981). També s'ha utilitzat ^{35}S-PITC (Bridgen, 1976) i altres reactius diferents dels isotiocianats com l'àcid tioacetiltioglicòlic (Takagi i Doolittle, 1975). No obstant, el PITC segueix essent amb molt el reactiu més emprat.

QUIMICA DE LA DEGRADACIÓ D'EDMAN

Cadascún dels cicles de la degradació d'Edman comprèn tres passos: l'acoblament del residu N-terminal amb el PITC, el trencament del seu enllaç peptídic en medi àcid i la conversió de la tiazolinona formada a un derivat més estable (feniltiohidantoïna, PTH) que pot ser identificat cromatogràficament. Per una revisió de les condicions i les alternatives de cada un dels passos de la reacció veure Edman i Henschen (1975). A la Figura II.14 es pot veure un esquema dels tres passos de la reacció.

La reacció d'acoblament té lloc en condicions alcalines, doncs és necessari el grup amino en forma nucleòfila. Aquesta reacció rendeix el feniltiocarbamil-pèptid (PTC-pèptid). Es de gran importància el posterior rentat de l'excés de reactiu i dels productes laterals mitjançant aplicació de buit i extracció orgànica. Després de l'extracció, el pèptid acoblat s'asseca abans de procedir a l'etapa de trencament. La reacció de trencament té lloc en medi àcid i en condicions anhidres, després de la qual s'elimina l'àcid al buit i s'extreu l'anilinotiazolinona de l'aminoàcid segregat (ATZ-aa) amb solvent orgànic. Finalment s'asseca l'ATZ-aa sota nitrògen i es converteix en PTH, un derivat més estable (veure apartat II.7.3).

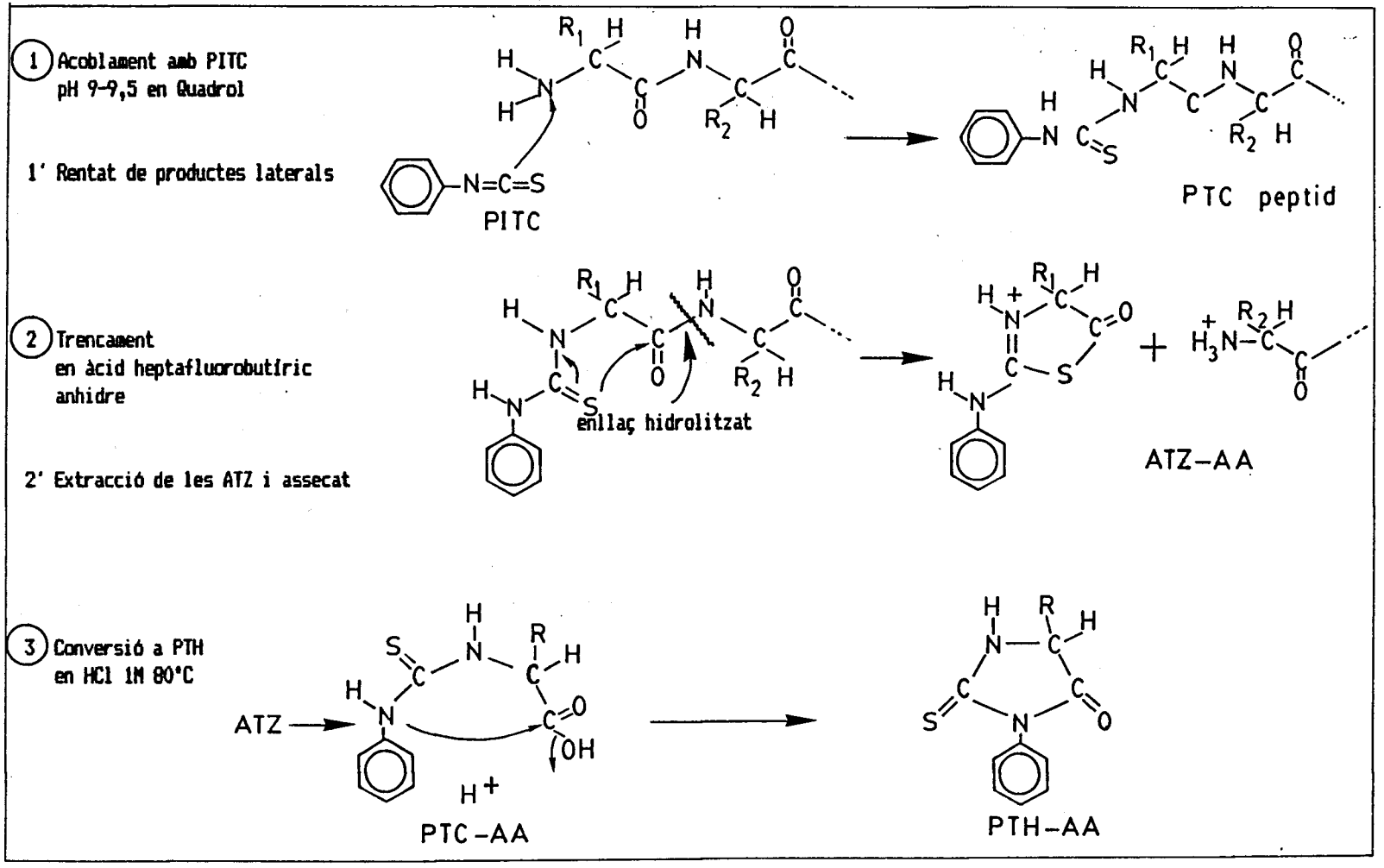


FIGURA II.14. Esquema de les reaccions implicades en cada cicle de la degradació d'Edman. El PTH-AA (fenitiohidantoïna del aminoàcid corresponent és estable i identificable per HPLC).

Es de gran importància posar molta atenció a la puresa dels reactius si es pretén assolir rendiments del 90-99% en el procés de degradació d'Edman. Els controls de qualitat han d'incloure a més dels reactius i solvents, els gasos emprats i el mateix suport físic dels aparells: el sistema de buit, conduccions, recipients i copa del seqüenciador.

II.7.2. SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA

L'esquema degradatiu d'Edman pot utilitzar-se tant en fase líquida com en fase sòlida o en fase gasosa, és a dir, amb el pèptid o proteïna en dissolució o units covalentment a un suport insoluble, o amb la determinació d'*ions de seqüència* per espectrometria de masses. En els dos primers cassos s'han desenvolupat metodologies manuals i també metodologies automàtiques. En el cas de la seqüenciació en fase líquida, els seqüenciadors automàtics s'han basat en el model originalment proposat per Edman i Begg (1967).

El sistema de degradació automàtica permet obviar certs problemes associats amb el mètode de seqüenciació manual com poden ser la dificultat de mantenir en alguns passos una atmosfera exenta d'oxígen i de contaminacions, que limiten la llargada de la seqüència a analitzar, i permet alhora augmentar el nombre de cicles de degradació que poden fer-se en un dia de treball. La seqüenciació manual tampoc funciona bé amb proteïnes grans per problemes d'insolubilitat. Malgrat això, i amb l'afegit que el seqüenciador automàtic permet treballar amb quantitats de mostra menors i està més protegit contra contaminacions externes, aquest no és sempre el millor mètode a triar: en el cas de pèptids petits es pot donar en el mètode automàtic un rentat del pèptid sencer al ser aquest soluble en els dissolvents d'extracció. A més, el mètode manual, tot i essent més lent, permet treballar amb vàries mostres a la vegada, amb el que la seva lentitud queda relativitzada. Tot això fa que en alguns casos sigui aconsellable fer seqüenciació manual.

Normalment, en el seqüenciador automàtic tenen lloc les dues primeres reaccions del cicle degradatiu d'Edman: l'acoblament i el

trencament. En aquest treball s'ha utilitzat un seqüenciador Beckman model 890D, i l'esquema operatiu és el següent:

ACOBLAMENT

El pèptid o la proteïna s'introdueixen en un dissolvent adequat i volàtil en la "copa" del seqüenciador, dispositiu que gira sobre el seu eix i que permet d'aquesta manera que la mostra quedi dipositada sobre les seves parets formant una pel.lícula fina. Quan es tracta de pèptids se sol afegir una certa quantitat de Polibrè (Aldrich), un reactiu estabililtzador del film, per evitar el possible rentat del pèptid en passos posteriors. A continuació s'introdueix una dissolució de PITC i el tampó d'acoblament (Quadrol, Wyandotte Chemicals Corp.) normalment a concentració 1 M per a proteïnes i 0,1 M per a pèptids. Després de la reacció d'acoblament s'elimina l'excés de reactiu i els dissolvents al buit i s'extreu el Quadrol i els productes laterals per extracció orgànica. Es en aquesta fase on es corre perill d'arrossegar els pèptids petits a causa de l'ús de dissolvents relativament polars i on es justifica l'addició prèvia del Polibrè. Al mateix temps, la utilització d'una concentració de Quadrol 0,1 M fa que siguin necessàries menys extraccions i que aquestes siguin menys exhaustives, reduïnt el perill de rentat de pèptids o de petites quantitats de proteïnes.

TRENCAMENT

Després de la citada extracció orgànica es torna a assecar el film de mostra i s'introdueix àcid heptafluorobutíric anhidre. Al final de la reacció de trencament s'elimina l'àcid al buit i s'extreu l'anilinotiazolinona formada, que és recollida i assecada en un col.lector.

En un paràgraf anterior es deia que en els seqüenciadors automàtics normalment es duen a terme únicament les dues primeres reaccions del cicle degradatiu, fent-se a fora la conversió i la identificació. No obstant, i tenint en compte que el producte intermedi ATZ-AA és poc estable, s'ha volgut desenvolupar mètodes que minimitzéssin el període

d'inestabilitat del compost i per a tal fi s'ha dissenyat unitats de conversió *on-line* directament acoblades a l'interior del seqüenciador entre la sortida de la copa i el col.lector (Wittman-Liebold et al., 1976). En altres cassos s'ha dissenyat fins i tot un sistema que permet la identificació automàtica dels PTH per acoblament d'un HPLC al seqüenciador.

II.7.3. CONVERSIÓ ATZ-PTH

Les anilinotiazolinones assecades i mantingudes sota atmosfera de nitrògen s'escalfen a 80°C durant 12 min amb 200 μl de HCl 1 M que conté ditiotreitol (DTT) a 0,3 mg/ml. A continuació s'extreu els PTH dues vegades amb 700 μl d'acetat d'etil. La fase orgànica s'asseca i es dissol en un volum de metanol que oscil.la entre 25 i 100 μl. Es fa el mateix amb la fase aqüosa, on només hi resten His i Arg, essent els demés restes aminoàcids arrossegats pel solvent orgànic.

II.7.4. IDENTIFICACIÓ DE PTH's

En els primers estadis d'aquest treball es va fer servir el mètode de cromatografia de capa prima i anàlisi d'aminoàcids complementari després d'una *back hydrolysis* (retrohidròlisi). Més tard, en l'anàlisi de pèptids producte de trencaments enzimàtics es va adoptar exclusivament el mètode d'identificació per HPLC.

II.7.4.a. IDENTIFICACIÓ PER CAPA PRIMA I RETROHIDRÒLISI

La cromatografia en capa prima en plaques de sílica-gel es va dur a terme en un primer sistema de dissolvents n-heptà/àcid propiònic/1,2-dicloroetà (140:40:100 v/v) i en un segon sistema de cloroform/metanol (261:39 v/v) segons un mètode prèviament descrit (Jeppsson i Sjöquist, 1967). La regeneració dels corresponents

aminoàcids a partir de les feniltiohidantoïnes es va fer per hidròlisi en HCl 6 M, 0,1% $SnCl_2$ a 150°C durant 4 h; a continuació es va procedir a fer anàlisi d'aminoàcids convencional en un autoanalitzador Beckman model 121-M.

II.7.4.b. IDENTIFICACIÓ PER HPLC

Els PTH's dissolts en metanol (apartat II.7.3) es van analitzar per HPLC en una columna Novapak C-18 de 3,9 x 150 mm i partícules de 4 μm (Waters) fent servir el programa de gradient i els sistemes de dissolvents prèviament descrits per Barber et al. (1986):

Temps (min)	% solvent A	% solvent B
0	100	0
1,0	100	0
4,5*	60	40
7,5	60	40
9,0	40	60
10,0	40	60
10,1	100	0

(*) el pas entre els minuts 1,0 i 4,5 es va fer mitjançant la corba hiperbòlica n° 4 del controlador M680. Flux: 1 ml/min; temps total entre injecció i injecció: 18 min.

Dissolvent A: acetat sódic 35 mM en acetonitril 15 %, pH ajustat a 5,0 amb acètic.

Dissolvent B: isopropanol al 60 %.

El volum de la mostra injectada oscil.lava entre 5 i 25 μl. La quantitat de patrons injectada era de 200 pmol. A la Figura II.15 es pot veure una separació cromatogràfica del *pool* d'aminoàcids patró.

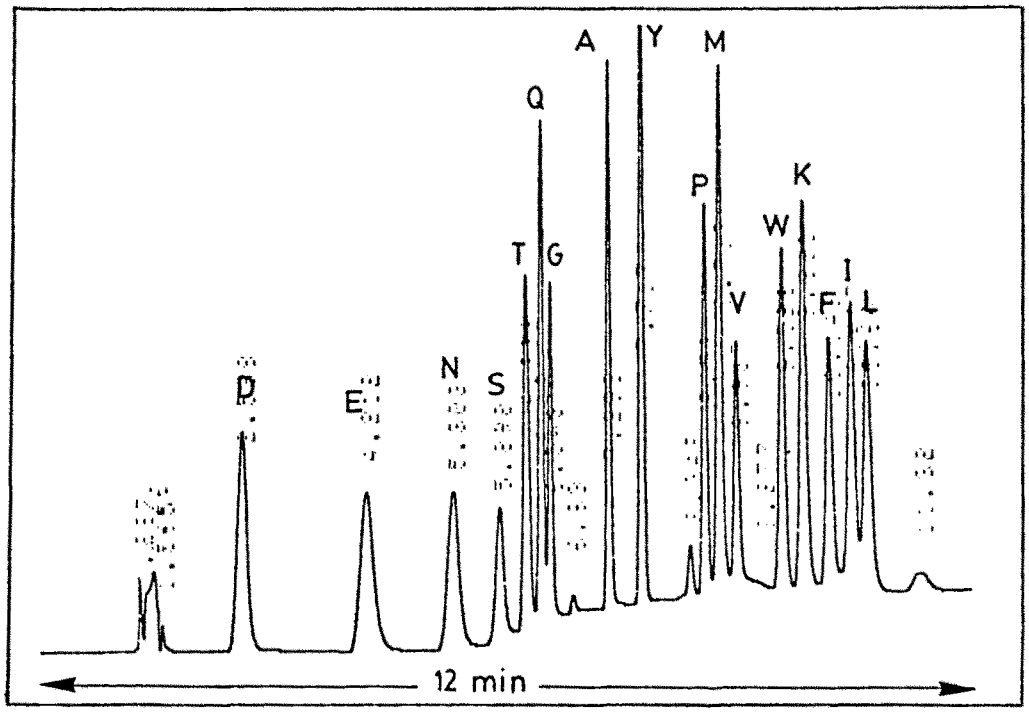


FIGURA II.15. Separació cromatogràfica d'un *pool* de PTH-aminoàcids patró en columna Novapak C-18 (Waters). Les condicions de la separació estan descrites al text.

II.7.5. SEQUENCIACIÓ MANUAL

Alguns dels pèptids tríptics del segment d'activació van ser seqüenciats manualment seguint el mètode del DABITC posat a punt per Genescà (1985) i que es basava en els anteriorment descrits de Chang (1981), Allen (1981) i Wittman-Liebold i Kimura (1984). En la metodologia aquí emprada s'utilitza doble acoblament amb DABITC i PITC. L'extracció de l'excés de reactiu es fa amb heptà/etilacetat i el trencament àcid es fa amb àcid trifluoracètic anhidre. L'extracció de l'aminoàcid N-terminal separat del pèptid es fa amb butil-acetat i el residu sec de la fase orgànica que conté el DATZ es transforma en DABTH per tractament amb àcid trifluoracètic al 50%. L'anàlisi d'aquests darrers compostos es fa en plaques de poliamida i en dos sistemes solvents diferents: (a) àcid acètic al 33% i (b) toluè/n-hexà/àcid acètic (2,5:1:1).

II.8. TÈCNIQUES ELECTROFORÈTIQUES

II.8.1. MATERIALS

L'acrilamida utilitzada a les electroforesis d'urea-SDS era de la casa Fluka (4 x crist.). També era de la casa Fluka el SDS. Als altres tipus d'electroforesi es va utilitzar acrilamida de la casa Kodak purificada amb carbó actiu i desionitzada.

La bisacrilamida (N,N'-metilen-bisacrilamida), el Tris (tris-hidroximetilaminometà) i la urea eren de Bio-Rad.

La glicina, el TEMED (N,N,N,N',N'-tetrametilendiamina) i el persulfat amònic eren de Merck.

L'aigua era desionitzada amb un sistema Milli-R (Millipore).

II.8.2. ELECTROFORESI DISCONTINUA EN SDS

L'electroforesi discontínua en presència de SDS és un mètode pensat per analitzar mescles complexes de proteïnes (Laemmli, 1970). El seu suport físic és una malla formada per fibres d'acrilamida entrecreuades amb bisacrilamida que polimeritzen en dissolució en presència de radicals lliures. Els radicals lliures són aportats pel persulfat amònic i estabilitzats pel TEMED. La densitat de la malla vé condicionada tant per la concentració dels monòmers com per la relació acrilamida/bisacrilamida. La funció del SDS és la de destruir l'estructura tridimensional de la proteïna, embolcallant-la en una micel.la formada pel detergent, que desnaturalitza les proteïnes gairebé per complet. Al ser el SDS un detergent aniònic, apantalla les càrregues de la proteïna, no permetent que tinguin influència a la càrrega total de la micel.la, on la proporció dels seus components és d'aproximadament 1,4 g d'SDS per g de proteïna. Per aquestes raons, el desplaçament de les proteïnes en un gel d'SDS es dóna únicament en raó dels seus pesos moleculars.

Aquest sistema consta de dos gels: un de superior o concentrador i un d'inferior o separador. La funció del primer dels gels és la de fer

avançar les proteïnes de manera homogènia fins que troben la barrera del gel separador. Això s'aconsegueix per mor de dos efectes complementaris: la menor densitat del gel concentrador fa que les proteïnes es concentrin en una banda molt estreta en topar contra el gel separador, i a la vegada el seu pH de 6,8, on la glicina presenta un ionització no total, fa que les proteïnes avançin entre dos fronts iònics per un procés d'isotacoforesi, provocant un augment local de la diferència de potencial i fent que el desplaçament en aquesta regió sigui ràpid, el que contibueix a compactar la zona on es troben les proteïnes. En el gel separador, al començament del qual les proteïnes estan totes agrupades en una banda molt fina, el desplaçament ja és diferencial degut a la major densitat de la malla de poliacrilamida i al pH de 8,8 del gel i 8,4 del tampó d'electroforesi en el que la glicina ja està completament ionitzada i es comporta com un ió ràpid.

S'ha seguit el mètode estàndard d'electroforesi vertical en placa, partint de les dissolucions:

A: acrilamida al 30%
bisacrilamida al 0,8%

B: Tris 1,5 M, SDS 0,4%, pH 8,8 ajustat amb HCl

C: Tris 0,46 M, SDS 0,4%, pH 6,8 amb HCl

S'han fet dos tipus d'electroforesi: lineals i amb gradient de poliacrilamida. Els volums necessaris de les tres dissolucions per elaborar el gel separador als dos casos van ser:

Gel lineal al 15% de poliacrilamida:

Dissolució A: 20 ml
Dissolució B: 10 ml
Aigua : 10 ml

Com a polimeritzadors es va afegir 500 μl de persulfat amònic al 10% i 30 μl de TEMED.

Gel en gradient del 12% al 17% de poliacrilamida:

	12%	17%
Dissolució A:	10,0 ml	14,4 ml
Dissolució B:	6,3 ml	6,3 ml
Aigua :	8,8 ml	1,8 ml
Glicerol :	0 ml	2,5 ml

Com a polimeritzadors es va afegir a cada dissolució 150 μl de persulfat al 10% i 15 μl de TEMED.

El gel separador s'aboca entre mig de dues plaques de vidre de dimensions 180 x 120 x 1,5 mm prèviament segellades a les parts laterals amb dos separadors de plàstic, i a la part inferior amb un volum de 15 ml de la mateixa dissolució d'acrilamida al 15% o al 17% segons els casos. En el cas del gel lineal, aquest s'aboca directament, mentre que en el cas del gel en gradient es parteix de les dues dissolucions col.locades en un sistema de vasos comunicants amb agitació, buidant entre mig de les plaques a partir de la sortida connectada al vas que conté la dissolució més concentrada. El gel separador ha d'omplir aproximadament 3/4 de l'espai entre plaques. A continuació es diposita un petit volum d'aigua o bé de n-butanol o isopropanol al damunt del gel abans que aquest polimeritzi, el que permet assegurar l'obtenció d'un front regular. El gel es pot deixar polimeritzar entre 10 minuts i tota una nit.

El gel concentrador al 4,5% d'acrilamida es fa immediatament abans d'iniciar l'electroforesi amb la següent barreja:

Dissolució A: 3 ml
Dissolució C: 5 ml
Aigua : 12 ml

Aquest gel es polimeritza amb 500 μl de persulfat amònic al 10% i 20 μl de TEMED. A continuació s'aboca al damunt del gel separador ja polimeritzat una vegada eliminada l'aigua o el dissolvent del damunt i s'inserta la pinta formadora de butxaques, deixant-la a una distància

d'entre 1 i 2 cm del gel separador. Una vegada polimeritzat (uns 10 o 20 minuts) es retira la pinta i s'adapta el conjunt de plaques i gel a un aparell tal com el descrit per Ames (1974).

La dissolució de cubetes i elèctrodes es prepara just abans de fer córrer l'electroforesi, amb la següent composició:

25 mM Tris
200 mM Glicina
0,1 % SDS

Aquesta dissolució dóna directament pH 8,4.

Finalment, es netegen les butxaques i es dipositen les mostres barrejades a relació 1:1 amb el tampó d'aplicació, de composició:

60 mM Tris ; pH 6,8 amb HCl
4 % SDS
10 % Glicerol
5 % 2-mercaptoetanol
0,01 % blau de bromofenol

Abans de la seva aplicació , les mostres han de ser incubades en la mateixa dissolució durant 1 minut a 100°C.

L'electroforesi es fa córrer, amb refrigeració, durant 3-4 h a 200 V, fent servir blau de bromofenol de referència de front electroforètic en una o diverses butxaques.

II.8.3. ELECTROFORESI EN UREA-SDS

L'electroforesi discontínua de SDS segons el mètode tradicional de Laemmli permet l'anàlisi de mescles de proteïnes de pesos moleculars molt variats, sempre que la densitat de la malla del gel, determinada pel percentatge d'acrilamida, estigui ajustada al marge de pesos moleculars que hom vol analitzar. La linealitat de la relació desplaçament electroforètic-logaritme del pes molecular (Weber i Osborn,

1969) es perd parcialment quan es tracta d'analitzar proteïnes de pesos moleculars petits, més o menys per sota de 10.000-12.000. Hom creu que aquest fenòmen és degut a que els complexes SDS-proteïna existents en aquest marge de pesos moleculars tenen una mida inferior a la mida micel.lar mitja (Kyte i Rodríguez, 1983). En relació directa amb aquest fenòmen, en les regions del gel on es troben les bandes corresponents a proteïnes de pes molecular baix, la resolució és molt deficient.

Aquests fets han propiciat el desenvolupament de modificacions del mètode tradicional que permetéssin l'anàlisi de proteïnes petites i pèptids grans. S'ha vist que l'addició d'urea al medi electroforètic fa recuperar als pèptids la seva mobilitat diferencial, en eliminar en part les micel.les de detergent (Swank i Munckes, 1971). Al nostre laboratori hem utilitzat el mètode de Hashimoto et al. (1983), posteriorment modificat per Burgos (1984). Aquest mètode utilitza una concentració d'acrilamida del 12,5% en presència d'urea 7M i SDS.

En aquest sistema el gel separador té la següent composició (s'indica al costat la quantitat necessària per fer 50 ml, corresponents a 15 ml de gel de tancat i 35 ml de gel separador):

12,5 % acrilamida	6,25 g
0,7 % bisacrilamida	0,33 g
0,45 M Tris	2,72 g
7 M urea	21,02 g
0,1 % SDS	0,05 g
10 % sacarosa	5 g

El gel s'elabora segons aquest procediment: es dissol l'acrilamida, la bisacrilamida, la urea i la sacarosa en aigua Mili-R al bany maria amb agitació i en presència de resina mixta desionitzadora AG 501-X8 (D) (Bio-Rad). Es deixa 30 min en aquesta situació i a continuació es filtra per llana de vidre, afegint-hi després el Tris i el SDS. S'ajusta el pH a 9,1 amb HCl, s'enrasa a 50 ml i finalment es filtra a través d'un filtre Millipore de 0,45 μm. El gel es polimeritza amb l'addició de 60 μl de persulfat amònic al 10% i 14 μl de TEMED (per 35 ml). Es col.loca

una capa d'aigua al damunt per assegurar un front uniforme i es deixa polimeritzant tota la nit.

El gel concentrador, la manipulació del qual és la mateixa que en l'apartat II.8.2, té la següent composició (s'indica la quantitat per 15 ml):

5 % acrilamida	0,75 g
0,13 % bisacrilamida	19,5 mg
66 mM Tris	0,12 g
0,1 % SDS	15 mg

El pH s'ajusta a 6,8 amb HCl i es polimeritza amb 140 μl de persulfat amònic al 10 % i 14 μl de TEMED.

La dissolució de cubetes és la mateixa que en l'apartat II.8.2, mentre que el tampó d'aplicació emprat és més concentrat per permetre aplicar volumns més petits a les butxaques:

90 mM Tris; ajustat a pH 6,8 amb HCl
6 % SDS
15 % sacarosa
7 % 2-mercaptoetanol
0,1 % blau de bromofenol

L'electroforesi es fa córrer, amb refrigeració, a 120 V durant tota la nit.

II.8.4. ELECTROFORESI EN UREA 7 M

Com s'ha dit ja abans, la presència de SDS permet que el desplaçament electroforètic de les proteïnes en un gel d'acrilamida obeeixi només al seu pes molecular. En absència d'aquest detergent, el factor pes molecular perdrà importància amb respecte al factor càrrega, abans anul.lat. L'electroforesi en urea 7M (Creighton, 1979) a pH 8,6 permet diferenciar entre formes proteiques de diferent càrrega. Aquestes electroforesis a vegades no duen gel concentrador i es parteix d'una única dissolució polimeritzant, de composició:

9,5 % acrilamida
0,087 % bisacrilamida
7 M urea

Abans d'elaborar el gel cal afegir-li la barreja TBE (Tris-bòric-EDTA) a les següents concentracions (s'expressa la quantitat necessària per fer 65 ml, 15 dels quals corresponen al gel de tancat):

45 mM Tris	0,345 g
25 mM àcid bòric	0,1 g
0,78 mM EDTA	19 mg

Aquesta barreja dóna un pH de 8,6. Les quantitats de catalitzadors són, per 50 ml de gel, 200 μl de persulfat amònic al 10 % i 40 μl de TEMED. El gel, amb la pinta formadora de butxaques, es deixa polimeritzant tot el dia i s'entra a la càmara freda a 4°C unes dues hores abans de connectar-la. El tampó de cubetes és de la mateixa composició en Tris, bòric i EDTA que el gel, també a pH 8,6. Les mostres s'apliquen, una vegada les butxaques netes, en el medi en què estiguin disoltes, preferiblement de força iònica baixa o aigua, amb addició d'urea fins a 7M.

L'electroforesi es fa córrer a 80 V i 4°C durant tota la nit, fent servir com a referència una petita quantitat de blau de bromofenol que es pot addicionar a alguna de les mostres.

II.8.5. ELECTROFORESI EN GRADIENT D'UREA TRANSVERSAL

El desplaçament electroforètic de proteïnes per un gradient transversal d'urea pot donar lloc a transicions entre formes de diferent mobilitat producte de canvis conformacionals o del desplegament de la proteïna a certes concentracions d'urea. A més, espècies proteiques que es desplaçen conjuntament en absència d'agent desnaturalitzant poden presentar mobilitats diferents en aquesta mena de gels, degut precisament al comportament diferencial en front de dit agent. L'electroforesi en gradients d'urea és en segons quins casos un instrument vàlid per estudiar si existeix interacció (afinitat) entre espècies diferents.

Al nostre laboratori hem vingut utilitzant el mètode de Creighton (1979) modificat de manera que es disposés als extrems del gel d'una banda de la mateixa concentració en urea que la zona adjacent.

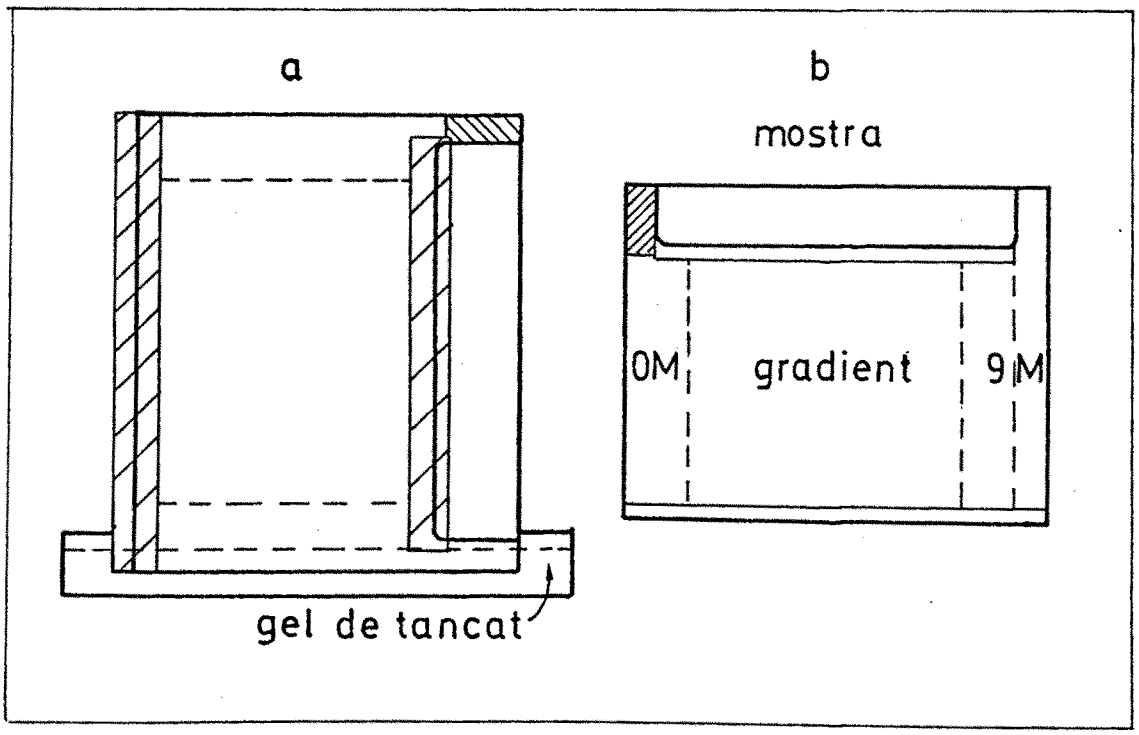


FIGURA II.16. Esquema del muntatge d'un gel en gradient d'urea transversal entre 0 i 9 M. (a) procés d'elaboració. (b) situació final.

La disposició de les diferents zones de concentració d'urea en el gel es mostren a la Figura II.16

Les dissolucions a 0 i 9 M d'urea contenen:

13 % acrilamida	13 % acrilamida
0,087 % bisacrilamida	0,087 % bisacrilamida
45 mM Tris	9 M urea
25 mM bòric	45 mM Tris
0,78 mM EDTA	25 mM bòric
	0,78 mM EDTA

Es prepara dissolucions stock sense Tris, bòric ni EDTA, i aquests components s'afegeixen abans de fer el gel, ajustant en cada cas el pH a 8,6 amb HCl.

Els volums i quantitats de catalitzadors per a cada una de les zones són:

Gel de tancat : 20 ml de solució 9M + 35 μl TEMED + 90 μl persulfat amònic (p.a.)

Zona d'urea 9 M: 10 ml solució 9M + 17 μl TEMED + 42 μl p.a.

Gradient : 15 ml solució 0M + 25 μl TEMED + 63 μl p.a.
+
15 ml solució 9M + 25 μl TEMED + 63 μl p.a.

Zona d'urea 0 M: 25 ml solució 0M + 45 μl TEMED + 115 μl p.a.

El tampó de cubetes és el mateix que en el cas de l'electroforesi de TBE sense gradient d'urea:

45 mM Tris
25 mM àcid bòric Dóna un pH de 8,6 directament
0,78 mM EDTA

La mostra, que conté urea 7M, s'aplica a la butxaca formada a la part superior del gel i l'electroforesi es corre a 4°C durant tota la

nit a 80 V, prenent com a referència una petita quantitat de blau de bromofenol que s'addiciona a la mostra.

II.8.6. TINCIÓ DELS GELS

Els gels es van tenyir amb Coomassie Blue (Bio-Rad), colorant específic de proteïnes. La dissolució de colorant es prepara segons la següent recepta:

Coomassie Blue al 0,15% en etanol 30 %, àcid acètic al 10%.

Una vegada preparada, aquesta dissolució s'ha de filtar amb paper. La tinció s'efectúa durant tota una nit a temperatura ambient o bé durant 4 h a 37°C. La destinció s'efectúa mitjançant reiterats rentats del gel en:

Etanol 25 %, àcid acètic 10%

durant dos o més dies. Una vegada destenyits els gels es poden conservar en la mateixa dissolució de destinció o bé en bosses de plàstic segellades. Les fotografies del gel destenyit es van fer bé amb una màquina Polaroid amb negatiu de 6 x 9 cm, exposant durant 3-4 seg amb una obertura f/11, o bé amb un negatiu convencional de 35 mm.

En alguns casos, per a comprovar l'existència o no de bandes no detectades amb Coomassie Blue, es va procedir a la posterior tinció del gel amb plata segons el procediment de Wray et al. (1981)

II.9. SEGUIMENT DEL PROCÉS D'ACTIVACIÓ TRÍPTIC DE LES PROCARBOXIPEPTIDASES A

El seguiment del procés d'activació de les procarboxipeptidases A després d'una proteòlisi llimitada per acció de la tripsina va fer-se per diversos mètodes: mitjançant la mesura de la generació d'activitat carboxipeptidasa A al llarg del temps, mitjançant l'anàlisi electroforètica de les espècies de carboxipeptidasa A i de segment d'activació generades també al llarg del temps, i mitjançant cromatografia líquida d'alta pressió.

L'activació es va seguir a més en diverses condicions, tal com es descriu a continuació.

II.9.1. CONDICIONS D'ACTIVACIÓ

En tots els casos que es descriu s'han mantingut constants les següents condicions:

Concentració de PCPA II: 1,0 mg/ml

Concentració de PCPA I : 1,58 mg/ml

(això equival a tenir en cada cas una concentració de subunitat PCPA de 1 mg/ml)

Temperatura d'incubació: 25°C

Sempre que es volia seguir un procés d'activació, les mostres de PCPA es dialitzaven la nit abans en front del mateix tampó en que es duria a terme l'activació, ajustant l'endemà la concentració de cada una als valors abans especificats.

II.9.1.a. TAMPONS UTILITZATS

S'ha seguit el procés d'activació en dos tampons diferents:

Tris-HCl 50 mM, $ZnCl_2$ 10^{-4} M, pH 7,5

Fosfat sòdic 20 mM, $ZnCl_2$ 10^{-4} M, pH 6,5

En aquests casos es mantenien constants les condicions:

Tripsina bovina-TPCK, a relació 4/1 (PCPA/tripsina)

II.9.1.b. TIPUS DE TRIPSINA UTILITZATS

S'ha assajat l'eficiència de tripsina bovina i de tripsina de porc, ambdues tractades amb TPCK. En aquests casos es mantenien constants les condicions:

Activació en medi Tris-HCl 50 mM, $ZnCl_2$ 10^{-4} M, pH 7,5.
Relació 4/1 (PCPA/tripsina)

II.9.1.c. RELACIONS PROTEÏNA/TRIPSINA

Es va seguir l'activació de les procarboxipeptidases A a dues relacions proteïna/tripsina:

4/1

40/1

En aquests cassos es mantenien constants les condicions:

Activació en medi Tris-HCl 50 mM, $ZnCl_2$ 10^{-4} M, amb tripsina bovina-TPCK.

En tots els cassos la tripsina es dissolia en HCl 1 mM, $CaCl_2$ 1mM, a concentracions que oscil.laven, segons les relacions a emprar, entre 2 i 10 mg/ml.

II.9.2. SEGUIMENT DE LA GENERACIÓ D'ACTIVITAT CPA

Considerant com a temps inicial aquell en què es posa la tripsina en contacte amb les mostres de PCPA, es van agafar per duplicat alíquotes de 20 μl de la mostra en incubació (en un bany a 25°C) als temps següents:

1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h.

Amb aquestes alíquotes es procedia a la determinació de la seva activitat carboxipeptidasa A segons el mètode descrit a l'apartat II.2.2.

II.9.3. SEGUIMENT DE L'ACTIVACIÓ PER ELECTROFORESI

L'aparició de diferents espècies tant de carboxipeptidasa A com de segment d'activació al llarg del temps es va seguir mitjançant tres tipus d'electroforesi: en urea-SDS, en urea 7M i en gradient d'urea transversal. Es van agafar mostres per electroforesi als mateixos temps que es van fer mesures d'activitats (apartat II.9.2).

ELECTROFORESI DISCONTINUA D'UREA-SDS

L'atur de la reacció d'activació es va fer de la manera següent: es van agafar 80 μl de la barreja en activació i s'hi va afegir 1,5 μl de PMSF 100 mM, 8 μl de STI a 5 mg/ml (activacions 4/1) o a 0,5 mg/ml (activacions 40/1) i 44 μl de tampó d'aplicació de mostres per electroforesi en urea-SDS. A continuació les mostres van ser escalfades durant 1 min a 100°C i es conservaren congelades fins el moment de la seva anàlisi.

L'anàlisi electroforètic es va fer per aplicació de 40 μl de cada una de les mostres a un gel d'urea-SDS al 12,5 %. Després de fer córrer l'electroforesi durant tota la nit a 120 V, el gel es va tenyir amb Coomassie Blue.

ELECTROFORESI EN UREA 7 M

A alíquotes de 80 μl de la barreja en activació s'els hi va afegir 1,5 μl de PMSF 100 mM i 8 μl de STI a 25 mg/ml (activacions 4/1) o a 2,5 mg/ml (activacions 40/1). Les mostres es mantingueren a temperatura ambient durant 1 min i a continuació es congelaren fins el moment de la seva aplicació. Immediatament abans d'aquesta s'els hi va afegir urea sòlida fins a 7 M i 1 μl d'una dissolució de blau de bromofenol concentrada.

L'anàlisi electroforètica es va fer per aplicació de 45 μl de cada una de les mostres a un gel d'urea 7 M amb acrilamida al 9,5 % i pH 8,6. L'electroforesi es va fer córrer tota la nit a 90 V i el gel es va tenyir amb Coomassie Blue.

ELECTROFORESI EN GRADIENT D'UREA TRANSVERSAL

Es va afegir 10μl de PMSF i 6μl de STI a 5 mg/ml a 600 l de barreja d'activació a relació 40/1. Després de mantenir les mostres 1 min a temperatura ambient, els hi fou addicionada una quantitat d'urea suficient com per donar una concentració de 7M, i una petita quantitat de blau de bromofenol. Es va aplicar tota la mostra a l'única butxaca del gel, repartint-la de manera constant per tota la seva llargada. L'electroforesi es va fer córrer tota la nit a 90 V i el gel es va tenyir amb Coomassie Blue.

II.9.4. SEGUIMENT DE L'ACTIVACIÓ PER HPLC

Amb l'objecte d'estudiar quantitativament la generació de fragments procedents del segment d'activació després de la seva segregació de l'enzim actiu i alhora d'aïllar-los a nivell preparatiu, es va procedir al seguiment del procés d'activació de la procarboxipeptidasa A monomèrica per HPLC. A diferència dels altres casos, aplicats a totes les condicions de medi, tipus de tripsina i relacions proteïna/tripsina, en aquest cas es va fer el seguiment només en les condicions següents:

Tampó: Tris-HCl 50 mM, $ZnCl_2$ 10^{-6} M, pH 7,5
Tripsina bovina-TPCK, relació 40/1

A una alíquota de 60 o 600μl de PCPA II activada amb tripsina (segons es tractés d'una cromatografia analítica o preparativa) se li va afegir TFA fins a una concentració del 0,25 %. La mostra es va centrifugar en una centrífuga Eppendorf durant 5 min i a continuació es va aplicar a una columna μ-Bondapak C18 o a una columna Nucleosil C4. L'elució dels diferents components de la barreja es va fer mitjançant l'aplicació de gradients d'acetonitril en un medi que contenía TFA al 0,05 %. En les cromatografies preparatives, les mostres es van col.lectar a mà, liofilitzant-se posteriorment en fraccions dedicades a la seva anàlisi electroforètica, a l'anàlisi seqüencial del seu N-terminal o a l'anàlisi del seu poder inhibidor de la CPA.

II.9.5. ESTUDIS D'INHIBICIÓ DE LES CARBOXIPEPTIDASES A

Aquests estudis es van dur a terme amb els fragments d'activació aïllats per HPLC (veure apartat anterior). Es va agafar diverses alíquotes dels fragments eluïts de la columna, que corresponien a les quantitats necessàries per donar relacions molars fragment/CPA entre 0 i 10, amb la quantitat de CPA constant, i es van liofilitzar en tubs Eppendorf. A continuació s'afegí la mateixa quantitat de CPA a sobre de cada una de les mostres, i la barreja es va mantenir 30 min a 25°C. Al

capdevall es va barrejar tota la mostra amb dissolució de substrat de mesura d'activitat peptidàsica de la CPA, i es va mesurar aquesta de la manera descrita a l'apartat II.2.1.b. Per determinar la concentració dels fragments eluïts de la columna de HPLC es va considerar, com a primera aproximació, que el coeficient d'extinció de cada un d'ells era igual que el del segment sencer, donat que, probablement, els aminoàcids aromàtics són presents en cada una de les formes estudiades. La concentració de CPA a la barreja final de reacció fou sempre de 50nM.