

IV. B. 3. 5. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO DEL SEGUNDO INTERMEDIARIO DE PLEGAMIENTO DEL PCI, Xb.

- **Determinación de los puentes disulfuro por digestión con proteasas.**

En la digestión de Xb con Termolisina en tampón N- Etilmorfolina (figura IV. B. 3. 5. 1.), se obtuvieron las tres fracciones comunes (fracciones 1, 3 y 5) observadas en las digestiones de los otros intermediarios; dos fracciones mayoritarias no comunes (fracciones 4 y 7); y tres fracciones minoritarias no comunes (fracciones 2, 6 y 8).

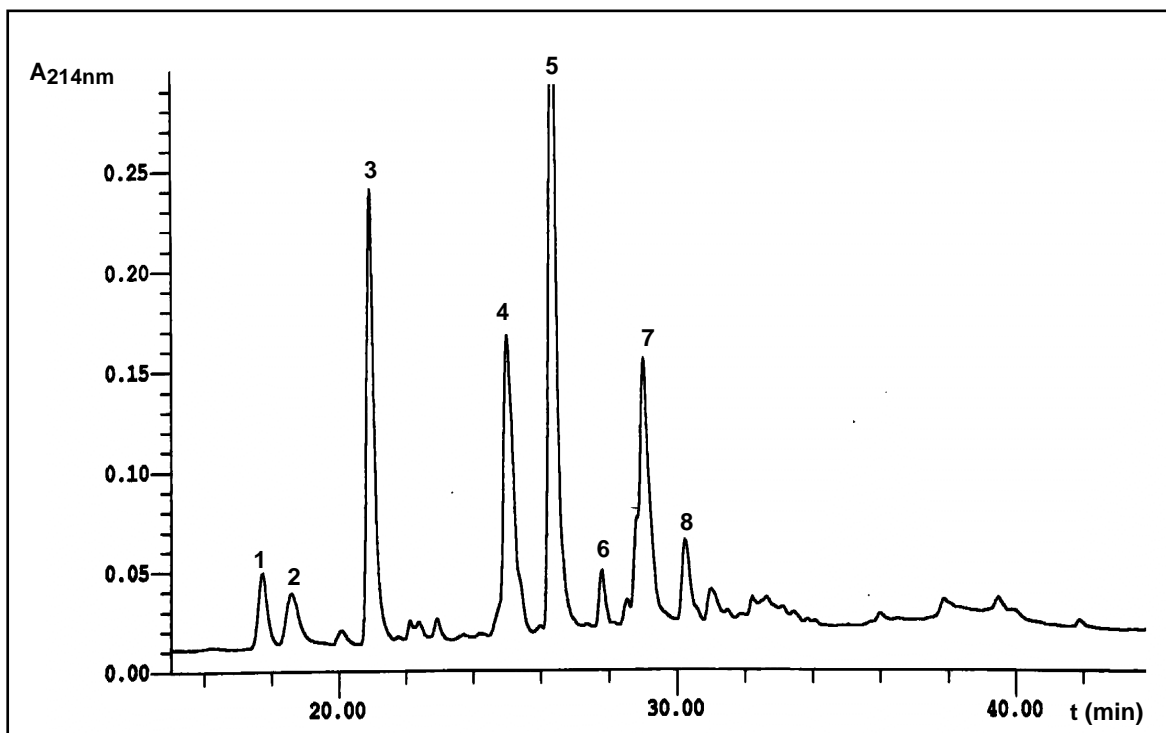


Figura IV. B. 3. 5. 1. Cromatograma obtenido de la digestión de Xb con Termolisina en tampón N-Etilmorfolina.

Algunas de las fracciones obtenidas (las fracciones que consideramos pueden darnos una información útil) se analizaron por espectrometría de masas MALDI (III. D. 3. 1. 7.) y posterior secuenciación automática (III. D. 3. 1. 8.).

De los resultados obtenidos de la digestión, del análisis de masas y de la secuenciación de la fracción Xb podríamos deducir cuales son las cisteínas implicadas en dos de los puentes disulfuro del intermediario de plegamiento. Si observamos la tabla de resultados (tabla IV. B. 3. 5. 1.), encontramos que la fracción 4 contiene tres péptidos de digestión y dos de ellos tienen un único puente disulfuro en su estructura que están formados por las cisteínas 18- 34 y 8- 12.

Tabla IV. B. 3. 5. 1. Resultados obtenidos del análisis por espectrometría de masas MALDI y secuenciación automática de los péptidos de digestión de Xb.

Fracción N	Masa	Secuencia	Cys- Cys	Posición
4	1500	T H D D C18 S G A R T C34 G P Y	18- 34	14- 30 31- 37
	1915	F C24 Q I C8 N K P C12 K T H D D C18 S G	24 8, 12, 18	23- 25 7- 20
	1086	A D P I C8 N K P C12 K	8- 12	4- 13
5	1372	F C24 Q A C27 I C8 N K P C12 K	24, 27 8, 12	23- 27 26- 27
		7	1654	F C24 Q A C27 A D P I C8 N K P C12 K
A R T C34 G P Y	34			31-
I C8 N K P C12 K T H	8, 12			7-

La existencia del puente disulfuro formado por las cisteínas 18- 34 parece definitiva pero no podemos afirmar lo mismo para el puente disulfuro formado por las cisteínas 8- 12 porque obtenemos dos péptidos que son incompatibles. Estos péptidos son los que se encuentran en las fracciones 4 y 5 que implican la presencia de las cisteínas (8, 12, 18, 24) y (8, 12, 24, 27) respectivamente.

Para intentar resolver estas incompatibilidades se realizó una nueva digestión de la fracción 5 con Lys- C. Como resultado se obtuvieron dos nuevos péptidos de digestión cuya masa y secuencia se detallan en la tabla (IV. B. 3. 5. 2.).

Tabla IV. B. 3. 5. 2. Resultados obtenidos por espectrometría de masas y secuenciación automática de los péptidos de digestión de la fracción 5 con Lys- C.

Fracción N	Masa	Secuencia	Cys- Cys	Posición
5. 1	570	F C24 Q A C27	24- 27	23- 27
5. 2	1391	I C8 N K	8	7- 10
		F C24 Q A C27	24, 27	23- 27
		P C12 K	12	11- 13

De estos nuevos resultados podríamos deducir que las cisteínas implicadas en otro de los puentes disulfuro de Xb son las cisteínas 24- 27 y como consecuencia, esto implicaría que el tercer puente disulfuro estaría formado por las cisteínas 8- 12.

Estos resultados siguen siendo incompatibles con la presencia del péptido F **C24** Q / I **C8** N K P **C12**K T H D D **C18** S G (obtenido en la fracción 4) si la especie Xb es una especie pura o si no ha ocurrido en ningún momento de la reacción una reorganización de puentes disulfuro (“reshuffling”).

Resumiendo, podríamos afirmar únicamente la presencia del puente disulfuro formado por las cisteínas 18- 34 en el intermediario de plegamiento Xb.

- **Determinación de los puentes disulfuro por reducción química parcial.**

A continuación discutiremos los resultados obtenidos de los experimentos de reducción química parcial de los puentes disulfuro de Xb.

En la separación cromatográfica de isómeros obtenida del intermediario de plegamiento Xb (figura IV. B. 3. 5. 2.), existe una fracción mayoritaria (Xb) que corresponde al intermediario de plegamiento no reducido y siete fracciones (Ib- 1, Ib- 2, Ib- 3, Ib- 4, Ib- 5, Ib- 6 y Ib- 7) que corresponden a siete isómeros cianilados. Esto nos indica que los intermediarios purificados en la fracción Xb son como mínimo tres especies diferentes.

En dicho cromatograma se observan dos grupos de isómeros con intensidades claramente diferenciadas: los que corresponden a las fracciones (Ib- 4), (Ib- 5) y (Ib- 6) de intensidad mayoritaria; y los que corresponden a las fracciones (Ib- 1), (Ib- 2), (Ib- 3) y (Ib- 7) de intensidad minoritaria. Consecuentemente podríamos interpretar que una de las especies existente en la fracción Xb purificada se presenta como mayoritaria frente a las demás (resultado que se verificará en la discusión posterior).

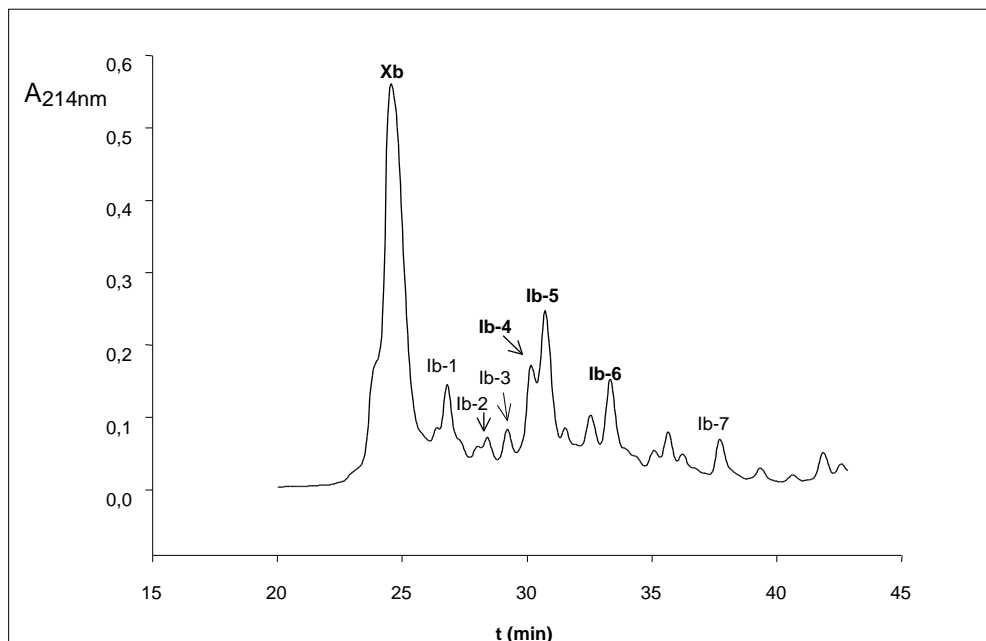


Figura IV. B. 3. 5. 2. Cromatograma obtenido de la separación por HPLC (fase reversa) de la mezcla de isómeros de Xb, parcialmente reducidos por un puente disulfuro y posteriormente cianilados.

A continuación mostramos los resultados obtenidos de la fragmentación y reducción total posterior de cada uno de los isómeros parcialmente reducidos y cianilados de Xb.

- **Isómero (Ib- 4).**

En la figura IV. B. 3. 5. 3. mostramos el mapa de masas moleculares obtenido por espectrometría de masas MALDI- TOF de los péptidos obtenidos de la fragmentación y de la reducción total posterior respectivamente del primer isómero mayoritario reducido y cianilado de Xb (Ib- 4).

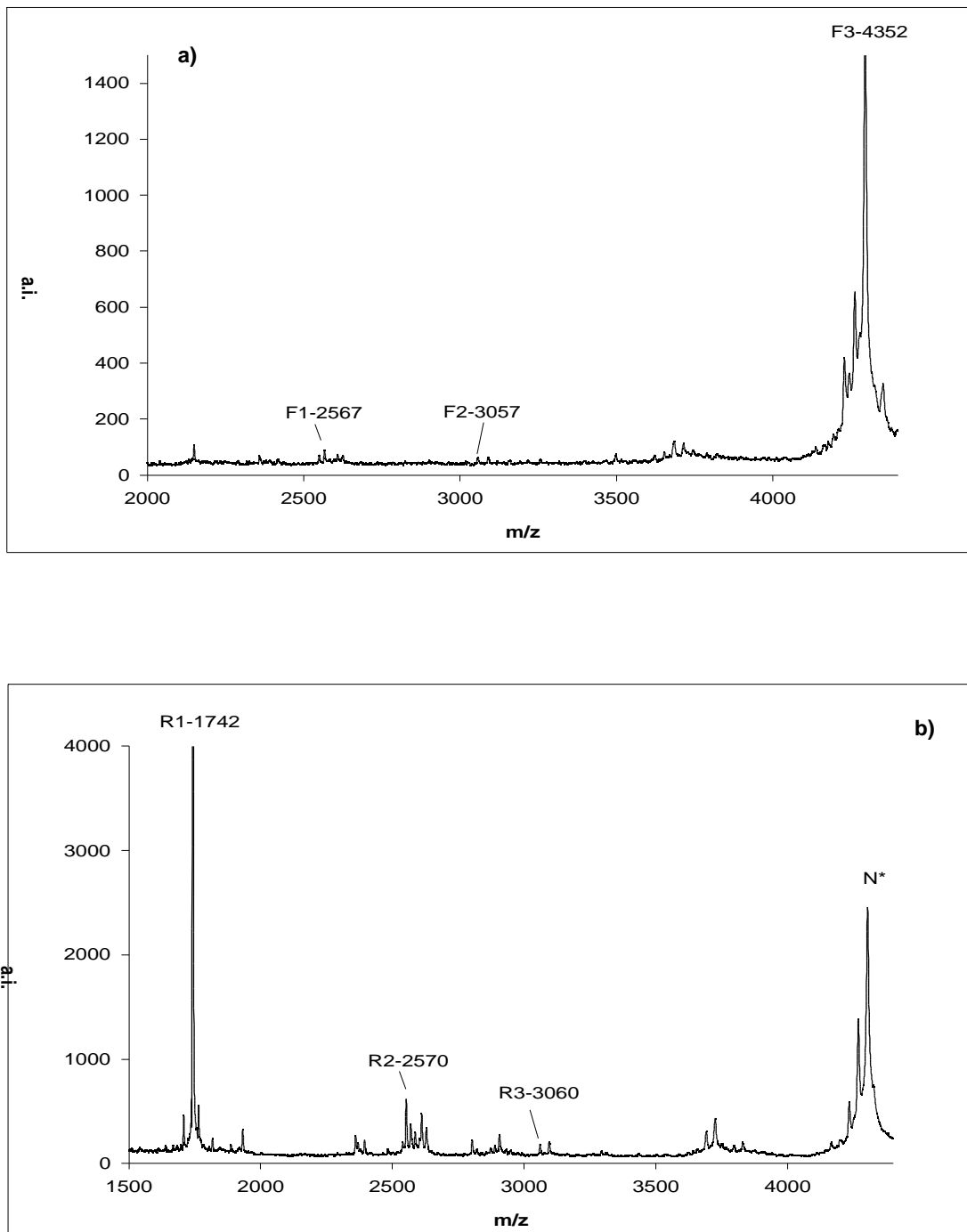


Figura IV. B. 3. 5. 3. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenido de la fragmentación (a) y de la reducción total posterior (b) del primer isómero mayoritario reducido y cianilado de Xb (Ib- 4).

Resultado obtenido de la comparación entre los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente después de la reacción de fragmentación y de la reducción total del isómero (Ib- 4) (tabla IV. B. 3. 5. 3.).

Tabla IV. B. 3. 5. 3. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ib- 4).

Isómero (Ib- 4) (Cys 12- Cys 24)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-39	4350	(Ib-4) F3	4352
	(1-23)	2568	(Ib-4) F1	2567
	(itz12-39)	3055	(Ib-4) F2	3057
Reducción Total.	1-11	1252		
	itz12-23	1395		-
	itz24-39	1741	(Ib-4) R1	1742
	(1-23)	2570	(Ib-4) R2	2570
	(itz12-39)	3058	(Ib-4) R3	3060

Del estudio de los espectros podríamos deducir que las cisteínas implicadas en uno de los puentes disulfuro de la especie mayoritaria de la fracción Xb son Cys 12 y Cys 24.

- **Isomero (Ib- 5).**

En la siguiente figura mostramos el mapa de masas moleculares del segundo isómero de Xb, (Ib- 5).

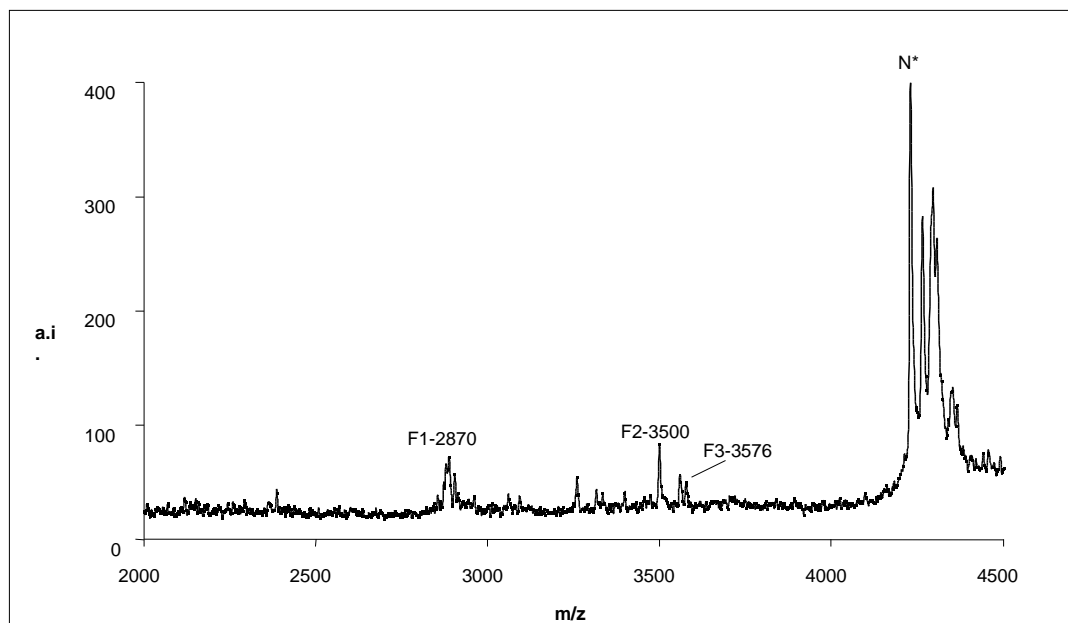


Figura IV. B. 3. 5. 4a. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación del segundo isómero mayoritario reducido y cianilado de Xb (Ib- 5).

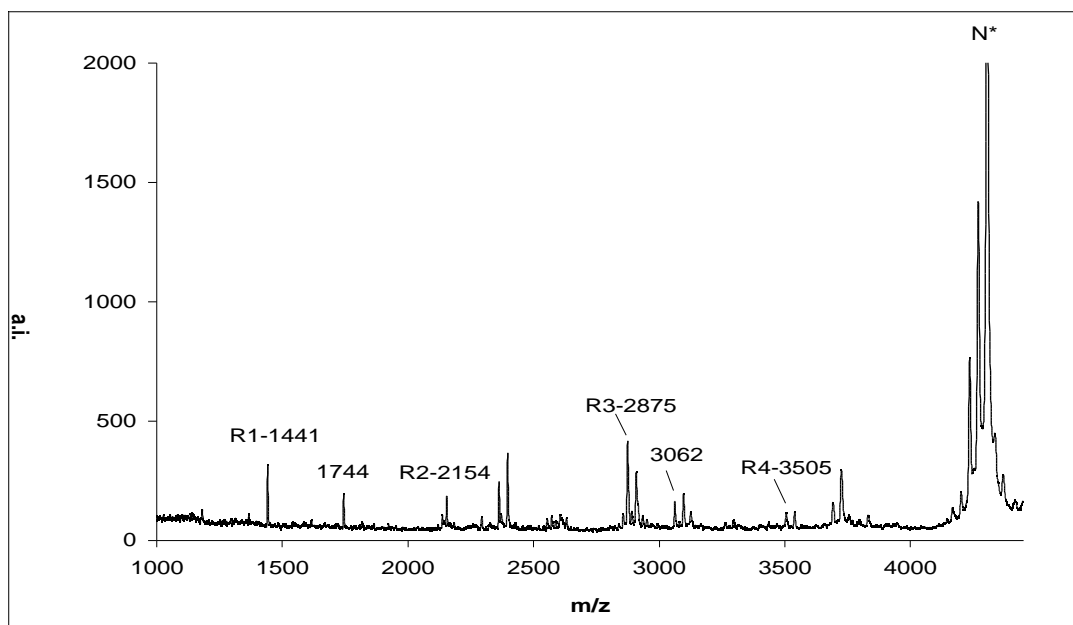


Figura IV. B. 3. 5. 4b. Mapa de masas moleculares obtenido por espectrometría de masas MALDI- TOF de los péptidos obtenidos de la reducción total posterior del segundo isómero mayoritario reducido y cianilado de Xb (Ib- 5).

En el espectro también observamos otros picos de m/z : 1744 y 3062. Estos corresponden a fragmentos de reducción total y - eliminación del cuarto isómero de Xb (Ib- 4). Este hecho no es de sorprender ya que la separación de estos isómeros por cromatografía (HPLC) de fase reversa (figura IV. B. 3. 5. 2.) no es completa.

Tabla IV. B. 3. 5. 4. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ib- 5).

Isómero (Ib- 5) (Cys 8- Cys 27)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenci. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-7	810		-
	itz8itz-39	3573	(Ib- 5) F3	3576
	(1-26)	2869	(Ib- 5) F1	2870
	(itz8-39)	3497	(Ib- 5) F2	3500
Reducción Total.	1-7	810		-
	itz8-26	2139	(Ib- 5) R2	-
	itz27-39	1439	(Ib- 5) R1	1441
	(1-26)	2872	(Ib- 5) R3	2875
	(itz8-39)	3501	(Ib- 5) R4	3505

Del estudio de los espectros y de la comparación entre fragmentos teóricos y los observados experimentalmente (tabla IV. B. 3. 5. 4.), podríamos deducir que las cisteínas implicadas en otro de los puentes disulfuro de la especie mayoritaria de la fracción Xb son Cys 8 y Cys 27.

- **Isómero (Ib- 6).**

Finalmente estudiamos la reducción parcial del tercer isómero mayoritario de Xb, (Ib- 6).

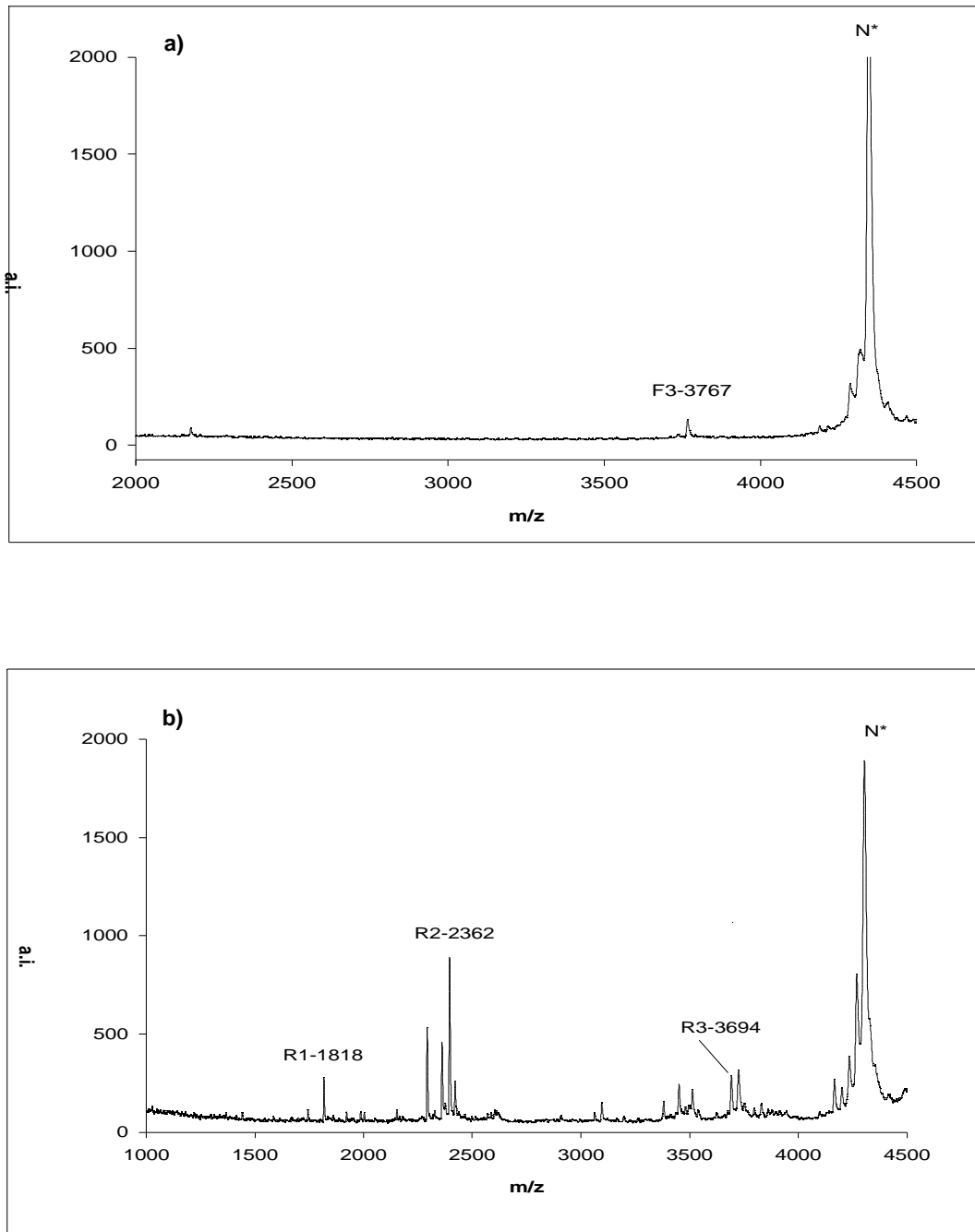


Figura IV. B. 3. 5. 5. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación (a) y de la reducción total posterior (b) del tercer isómero mayoritario reducido y cianilado de Xb (Ib- 6).

Del estudio de los espectros y de las masa moleculares obtenidas (tabla IV. B. 3. 5. 5.) podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el último de los puentes disulfuro de la especie mayoritaria de la fracción Xb son Cys 18 y Cys 34.

Tabla IV. B. 3. 5. 5. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ib- 6).

Isómero (Ib- 6) (Cys 18- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomencl. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	Itz1-33	3763	(Ib- 6) F3	3767
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3687	(Ib- 6) F2	3689*
	(itz18-39)	2357	(Ib- 6) F1	2361*
Reducción Total.	1-17	1952		-
	itz18-33	1816	(Ib- 6) R1	1818
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3691	(Ib- 6) R3	3694
	(itz18-39)	2359	(Ib- 6) R2	2362

*Picos MS obtenidos en otros ensayos.

Resumiendo se podría pensar que los isómeros (Ib- 4), (Ib- 5) y (Ib- 6) parcialmente reducidos y cianilados son compatibles con la presencia de la especie proteica que se presenta como mayoritaria en la fracción purificada Xb. Se asigna tentativamente que las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de este intermediario de plegamiento mayoritario son (12- 24), (8- 27) y (18- 34).

- **Isómero (Ib- 2).**

A continuación estudiamos la reducción química parcial de algunos de los isómeros de Xb que se presentaban como minoritarios en la separación cromatográfica (figura IV. B. 3. 5. 2.), (Ib- 2) y (Ib- 3). El mismo estudio realizado con los dos isómeros minoritarios restantes (Ib- 1) y (Ib- 7) no dio resultados que permitieran realizar una asignación de cisteínas.

En la figura IV. B. 3. 5. 6. mostramos el mapa de masas moleculares obtenido por espectrometría de masas MALDI- TOF de los péptidos obtenidos de la reducción total de uno de los isómeros minoritarios reducido y cianilado de Xb (Ib- 2).

Del estudio de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente (tabla IV. B. 3. 5. 6.) podríamos deducir que las cisteínas implicadas en uno de los puentes disulfuro de una de las especies minoritarias de la fracción Xb son Cys 24 y Cys 27.

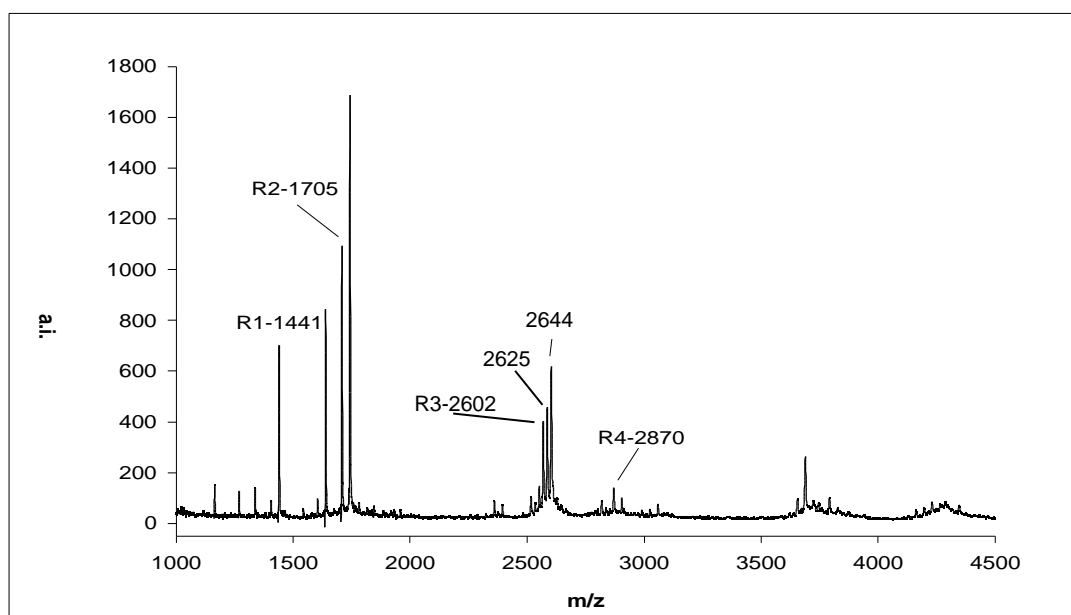


Figura IV. B. 3. 5. 6. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total de uno de los isómeros minoritarios reducido y cianilado de Xb (Ib- 2).

En el espectro anterior y en otros espectros se observan ciertas agrupaciones de picos (p. e. los fragmentos de M/z 2602, 2625 y 2644) que corresponden a iones provenientes del fragmento de reducción total (1- 23) protonado $(M + H)^+$, al aducto con sodio $(M + Na)^+$ y al aducto con potasio $(M + K)^+$. Este efecto es frecuente en espectrometría de masas MALDI- TOF debido a la presencia de iones sodio y potasio en la matriz de análisis.

Tabla IV. B. 3. 5. 6. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ib- 2).

Isómero (Ib- 2) (Cys 24- Cys 27)	Fragmento asignado	M/z teórico	Nomenclatura. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-23(itz27-39)	4037		-
	itz24-26	345		-
	(1-26)	2869	(Ib- 2) F2	2871
	(itz24-39)	1706	(Ib- 2) F1	1705
Reducción Total.	1-23	2605	(Ib- 2) R3	2602
	itz24-26	345		-
	itz27-39	1439	(Ib- 2) R1	1441
	(1-26)	2872	(Ib- 2) R4	2870
	(itz24-39)	1707	(Ib- 2) R2	1705

- **Isómero (Ib- 3).**

Finalmente estudiamos el último de los isómeros minoritarios de Xb, (Ib- 3). Del estudio de la reducción parcial de la especie minoritaria de la fracción Xb (figura IV. B. 3. 5. 7. y tabla IV. B. 3. 5. 7.), podríamos sospechar que las cisteínas implicadas en uno de los puentes disulfuro son Cys 18 y Cys 34.

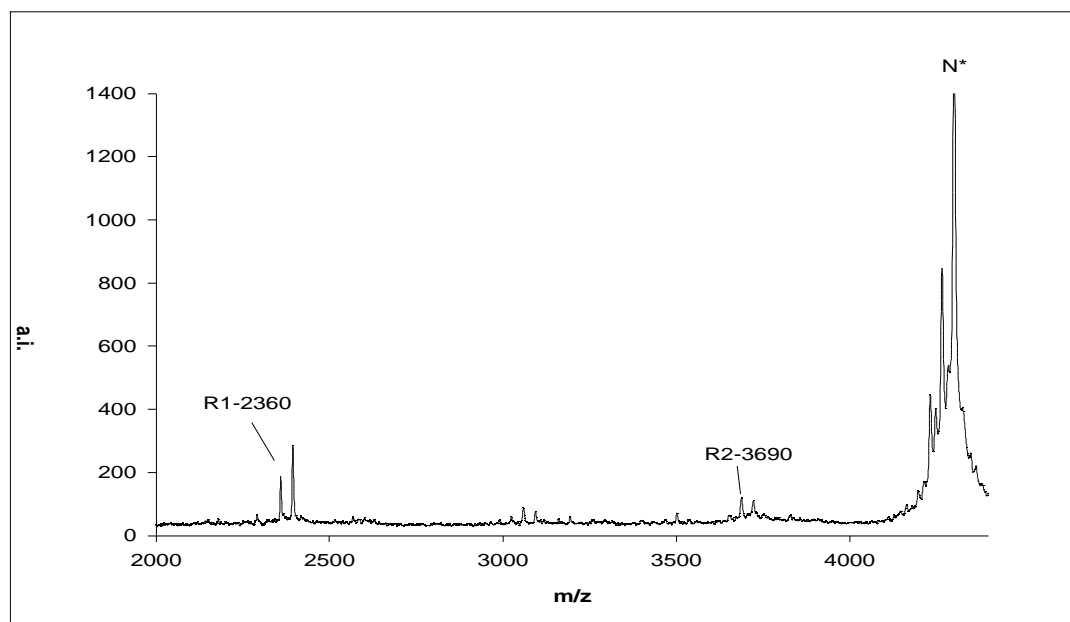


Figura IV. B. 3. 5. 7. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos reducción total de otro de los isómeros minoritario reducido y cianilado de Xb (Ib- 3).

Tabla IV. B. 3. 5. 7. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ib- 3).

Isómero (Ib- 3) (Cys 18- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenci. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	ltz1-33	3763		-
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3687		-
	(itz18-39)	2357		-
Reducción Total.	1-17	1952		-
	itz18-33	1816		-
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3691	(Ib- 3) R2	3690
	(itz18-39)	2359	(Ib- 3) R1	2360

Se podría pensar que los isómeros (lb- 2) y (lb- 3) parcialmente reducidos y cianilados son compatibles con la presencia de la especie proteica que se presenta como minoritaria en la fracción purificada Xb. Se asigna tentativamente que las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de este intermediario de plegamiento minoritario son (18- 34), (24- 27) y por exclusión (8- 12).

Como ya se ha comentado, los espectros obtenidos de los isómeros parcialmente reducidos y cianilados (b- 1) y (b- 7) son muy complejos y no permiten una asignación de puentes disulfuro clara.

Resumiendo, la fracción purificada como Xb presenta tres especies diferentes, dos de las cuales ha sido asignada su apareamiento de puentes disulfuro. Los puentes disulfuro de la especie mayoritaria están formados por las cisteínas (12- 24), (8- 27) y (18- 34), y los de la minoritaria por las cisteínas (18- 34), (24- 27) y (8- 12).

IV. B. 3. 6. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO DEL TERCER INTERMEDIARIO DE PLEGAMIENTO DEL PCI, Xc.

- **Determinación de los puentes disulfuro por digestión con proteasas.**

En la siguiente figura mostramos el cromatograma de digestión de Xc con Termolisina en tampón N-Etilmorfolina.

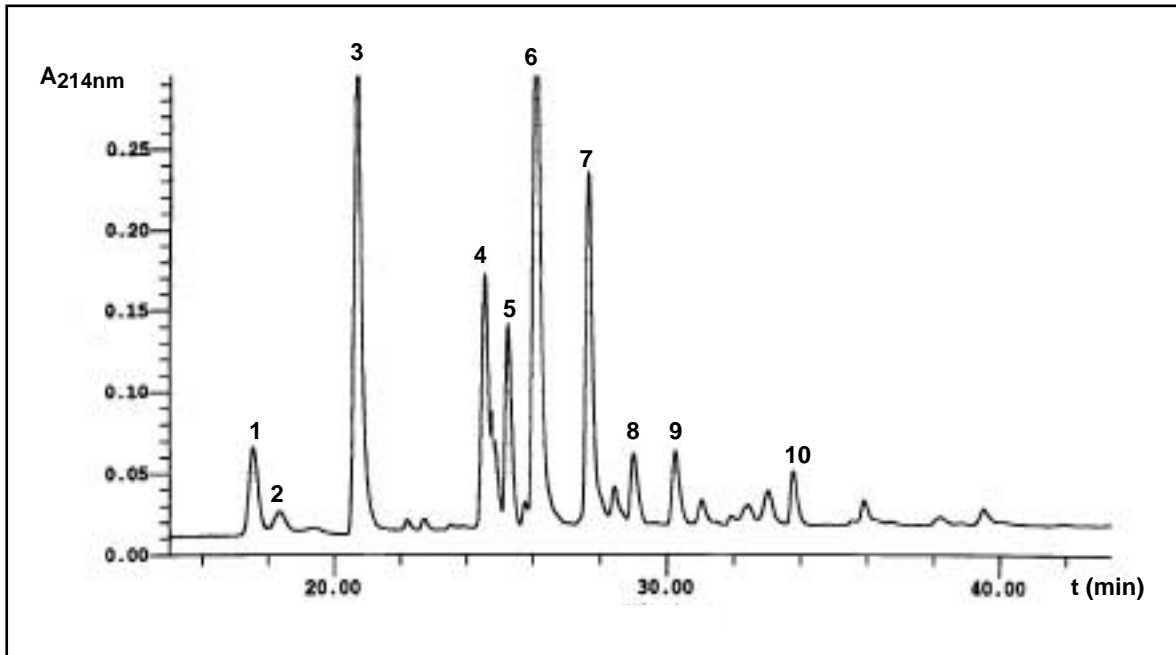


Figura IV. B. 3. 6. 1. Cromatograma de HPLC (fase reversa) obtenido de la digestión de Xc con Termolisina en tampón N- Etilmorfolina.

En la digestión de Xc se obtuvieron las tres fracciones comunes (fracciones 1, 3 y 6) observadas en las digestiones de los otros intermediarios; tres fracciones mayoritarias no comunes (fracciones 4, 5 y 7); y cuatro fracciones minoritarias no comunes (fracciones 2, 8, 9 y 10).

Algunas de las fracciones se analizaron por espectrometría de masas (III. D. 3. 1. 7.) y posterior secuenciación automática (III. D. 3. 1. 8.) y los resultados se resumen en la tabla IV. B. 3. 6. 1.

De los resultados expuestos deducimos cuales son las cisteínas implicadas en uno de los puentes disulfuro de su estructura. Observamos de la tabla de resultados que las fracciones 4 y 10 contienen un péptido con un único puente disulfuro en su estructura y está formado por las cisteínas 27- 34.

Las demás fracciones obtenidas contienen más de un único puente disulfuro (en el caso de las fracciones 5 y 6 tienen dos, y en el caso de las fracciones 8 y 9 tienen los tres puentes disulfuro de la proteína) que impide distinguir los apareamientos entre sus cisteínas.

Tabla IV. B. 3. 6. 1. Resultados obtenidos del análisis por espectrometría de masas MALDI y secuenciación automática de los péptidos de digestión de Xc.

Fracción N	Masa	Secuencia	Cys- Cys	Posición
4	794	A C ₂₇	27- 34	26- 27
		ART C ₃₄ GP		31- 36
5	1913	F C ₂₄ Q	24	23- 25
		IC ₈ NK P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G	8, 12, 18	7- 20
7	2196	F C ₂₄ Q	24	23- 25
		AD P I C ₈ NK P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G	8, 12, 18	4- 20
8	2852 (2939)	IC ₈ NK P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G	8, 12, 18	7- 20
		F C ₂₄ Q A C ₂₇	24, 27	23- 27
		(S) ART C ₃₄ G P Y	34	(30) 31- 37
9	3136 (3223)	AD P I C ₈ NK P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G	8, 12, 18	4- 20
		F C ₂₄ Q A C ₂₇	24, 27	23- 27
		(S) ART C ₃₄ G P Y	34	(30) 31- 37
10	1143	ART C ₃₄ G P Y	27- 34	31- 33
		A C ₂₇ W		26- 28

Para determinar cuales son los dos puentes disulfuro restantes se realizó una nueva digestión de la fracción 6 con Lys- C y como resultado se obtuvieron cinco péptidos de digestión nuevos (tabla IV. B. 3. 6. 2).

Tabla IV. B. 3. 6. 2. Resultados obtenidos por espectrometría de masas (MALDI) y secuenciación automática de los péptidos de digestión de la fracción 6 con Lys- C.

Fracción N	Masa	Secuencia	Cys- Cys	Posición
6. 1	1078	THDD C ₁₈ S G	12- 18	14- 20
		P C ₁₂ K		23- 26
6. 2	1128	THDD C ₁₈ S G	18- 24	14- 20
		F C ₂₄ Q		23- 26
6. 3	1086	AD P I C ₈ NK P C ₁₂ K	8- 12	4- 13
6. 4	1154	F C ₂₄ Q	8- 24	23- 26
		AD P I C ₈ NK		4- 10
6. 5	2214	THDD C ₁₈ S G	18	14- 20
		AD P I C ₈ NK P C ₁₂ K	8, 12	4- 13
		F C ₂₄ Q	24	23- 25

Como resultado del análisis de masas y de secuenciación de esta nueva digestión se han obtenido cuatro de los cinco péptidos con un único puente disulfuro en su estructura. Se observa la existencia de incompatibilidades entre tales péptidos de digestión. Los péptidos de la fracción 6.1 son incompatibles con los péptidos de la fracción 6. 2 porque los puentes disulfuro de tales péptidos están formados por las cisteínas 12- 18 en el primer caso y 18- 24 en el segundo. Los péptidos obtenidos de la fracción 6. 2, además de incompatibles con los péptidos de la fracción 6. 1, son incompatibles con los péptidos

obtenidos de la fracción 6. 4 porque los puentes disulfuro están formados por las cisteínas 18- 24 en el primer caso y 8- 24 en el segundo. Finalmente los péptidos obtenidos de la fracción 6. 3 son incompatibles con los péptidos obtenidos de la fracción 6. 4 porque los puentes disulfuro de tales péptidos están formados por las cisteínas 8- 12 en el primer caso y 8- 24 en el segundo.

Estas las incompatibilidades encontradas no nos permiten hacer una asignación de todos los puentes disulfuro para el intermediario Xc, lo que indicaría que, o bien no es una especie pura, o ha ocurrido una reorganización de puentes disulfuro durante las digestiones. Únicamente podemos afirmar que un puente disulfuro esta formado por las cisteínas 27- 34 y, que dados los péptidos de digestión obtenidos, existirían dos posibilidades de unión entre cisteínas para la formación de los dos puentes disulfuro restantes, la primera posibilidad implicaría a las cisteínas 12- 18 y 8- 24 y la segunda a las cisteínas 18- 24 y 8- 12.

- **Determinación de los puentes disulfuro por reducción química parcial.**

A continuación discutiremos los resultados obtenidos de los experimentos de reducción química parcial de los puentes disulfuro de Xc.

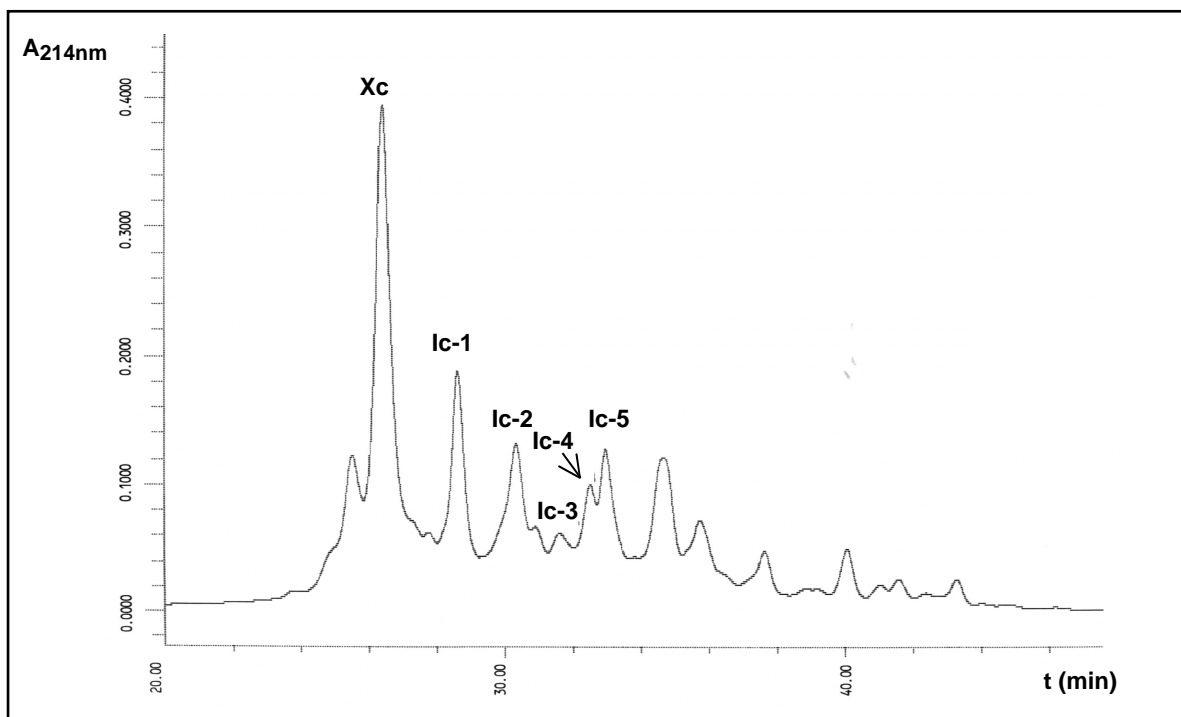


Figura IV. B. 3. 6. 2. Cromatograma obtenido de la separación por HPLC (fase reversa) de la mezcla de isómeros de Xc, parcialmente reducidos por un puente disulfuro y posteriormente cianilados.

En el cromatograma de separación de los isómeros cianilados (figura IV. B. 3. 6. 2.), existe una fracción mayoritaria (Xc) que corresponde a la proteína nativa y cinco fracciones (Ic- 1, Ic- 2, Ic- 3, Ic- 4 y Ic- 5) parcialmente reducidas y cianiladas. Esto nos indica que los intermediarios purificados en la fracción Xc son como mínimo dos especies diferentes

- **Isómero (Ic- 1).**

En la figura IV. B. 3. 6. 3. mostramos el mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del primer isómero reducido y cianilado de Xc (Ic- 1).

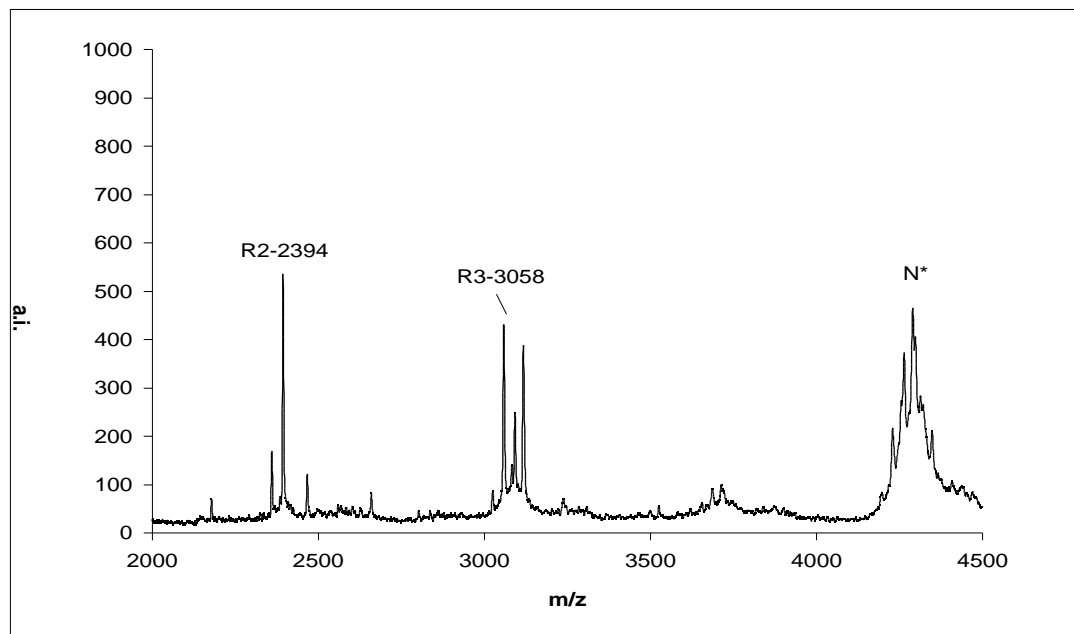


Figura IV. B. 3. 6. 3. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total posterior del primer isómero reducido y cianilado de Xc (Ic- 1).

En la siguiente tabla mostramos el resumen de masas moleculares de los fragmentos teóricos y experimentales.

Tabla IV. B. 3. 6. 3. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ic- 1).

Isómero (Ic- 1) (Cys 12- Cys 18)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomencl. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	Itz12-17	743		-
	1-11()itz18-39	3640	(Ic- 1) F2	3642*
	(1-17)	1917		-
	(itz12-39)	3055	(Ic- 1) F1	3058*
Reducción Total.	1-11	1252	(Ic- 1) R1	1252*
	Itz12-17	743		-
	itz18-39	2392	(Ic- 1) R2	2394
	(1-17)	1918		-
	(itz12-39)	3058	(Ic- 1) R3	3058

*Fragmentos obtenidos en otros experimentos.

Del estudio de los espectros y de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente, podríamos deducir que las cisteínas implicadas en uno de los puentes disulfuro del isómero (Ic- 1) son Cys 12 y Cys 18.

- **Isómero (Ic- 2)**

De los estudios de reducción química parcial (figura IV. B. 3. 6. 4. y tabla IV. B. 3. 6. 4.), podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del segundo isómero de la fracción Xc son Cys 8 y Cys 24.

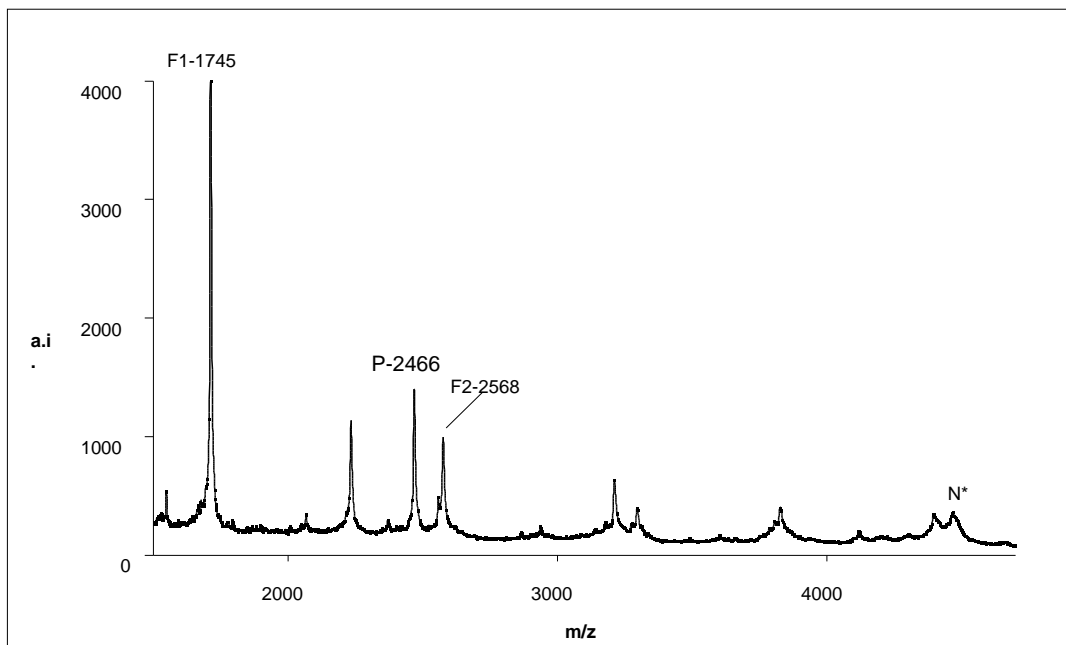


Figura IV. B. 3. 6. 4a. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación del segundo isómero reducido y cianilado de la fracción Xc (Ic- 2).

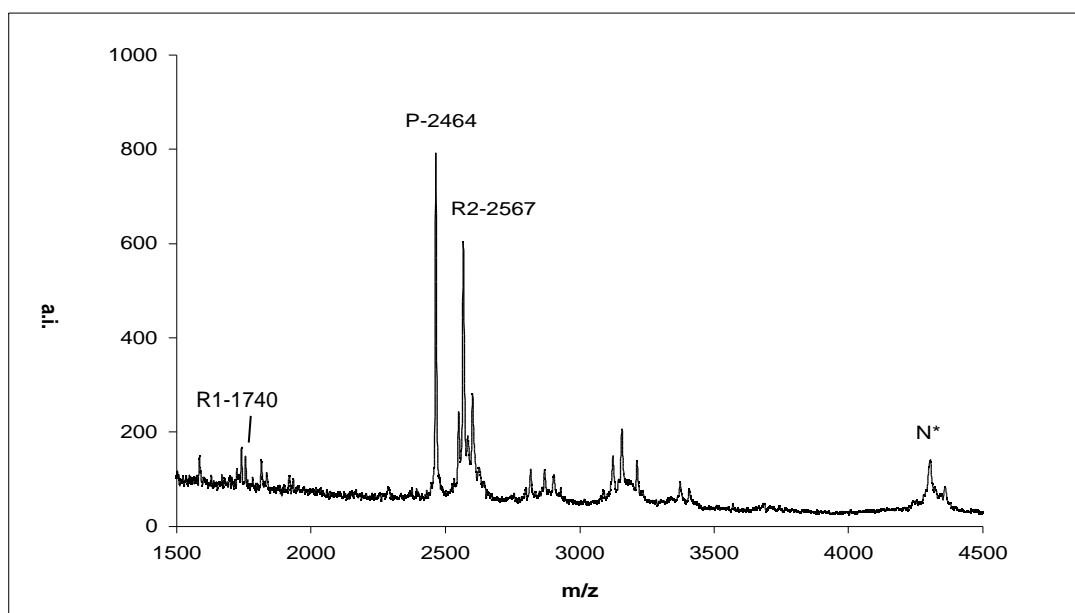


Figura IV. B. 3. 6. 4b. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del segundo isómero reducido y cianilado de la fracción Xc (Ic- 2).

Tabla IV. B. 3. 6. 4. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ic- 2).

Isómero (Ic- 2) (Cys 8- Cys 24)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomencl. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-7	810		-
	Itz8-23	1835		
	Itz24-39	1739	(Ic- 2) F1	1745
	(1-23)	2568	(Ic- 2) F2	2568
	(Itz8-39)	3497		-
Reducción Total.	1-7	810		-
	Itz8-23	1837		
	Itz24-39	1741	(Ic- 2) R1	1740
	(1-23)	2570	(Ic- 2) R2	2567
	(Itz8-39)	3501		-

- **Isómero (Ic- 3).**

Seguidamente mostramos el mapa de masas moleculares (figura IV. B. 6. 5.) obtenido de los péptidos obtenidos de la fragmentación y de la reducción total posterior respectivamente del tercer isómero reducido y cianilado de la fracción Xc (Ic- 3).

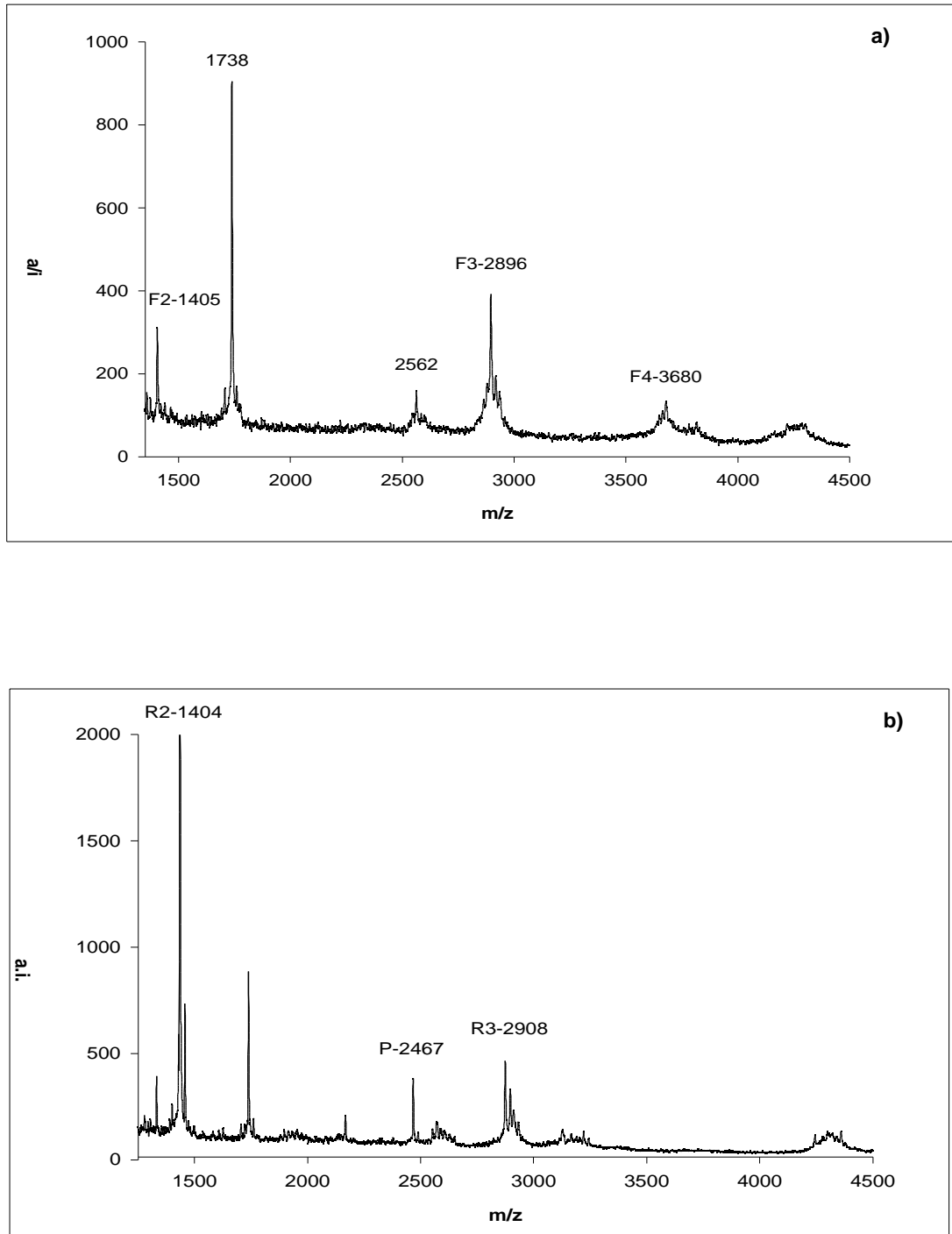


Figura IV. B. 3. 6. 5. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación (a) y de la reducción total posterior (b) del tercer isómero reducido y cianilado de la fracción Xc (Ic- 3).

En el espectro de fragmentación también se observan los picos 1738 y 2562, estos pertenecen a péptidos de fragmentación del isómero Ic- 2 y es debido a que la separación cromatográfica de los isómeros no ha sido completa (figura IV. B. 3. 6. 2.).

Del estudio de los espectros podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del tercer isómero de la fracción Xc son Cys 27 y Cys 34

Las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total del isómero previamente asignado se muestran en la siguiente tabla.

Tabla IV. B. 3. 6. 5. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ic- 3).

Isómero (Ic-3) (Cys 27- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenci. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-26	2902	(Ic- 3) F3	2896
	itz27-33	862	(Ic- 3) F1	862*
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3687	(Ic- 3) F4	-
	(itz27-39)	1405	(Ic- 3) F2	1405
Reducción Total.	1-26	2906	(Ic- 3) R3	2908
	itz27-33	862	(Ic- 3) R1	862*
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3691	(Ic- 3) R4	3692*
	(itz27-39)	1405	(Ic- 3) R2	1404

* Fragmentos encontrados en otros ensayos realizados de reducción parcial sobre Xc.

- **Isómeros (Ic- 4) y (Ic- 5).**

Finalmente en la figura IV. B. 3. 6. 6. mostramos el mapa de masas moleculares obtenido de los péptidos del cuarto y quinto isómero reducido y cianilado de la fracción Xc (Ic- 4 y Ic- 5). Los analizamos juntos debido a que su separación por fase reversa (figura IV. B. 3. 6. 2.) no ha sido óptima y consecuentemente los resultados obtenidos son los mismos.

Del estudio de los espectros podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del cuarto o del quinto isómero de la fracción Xc son también Cys 27 y Cys 34.

Resumimos en la tabla IV. B. 3. 6. 6. las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente de los isómeros previamente asignados.

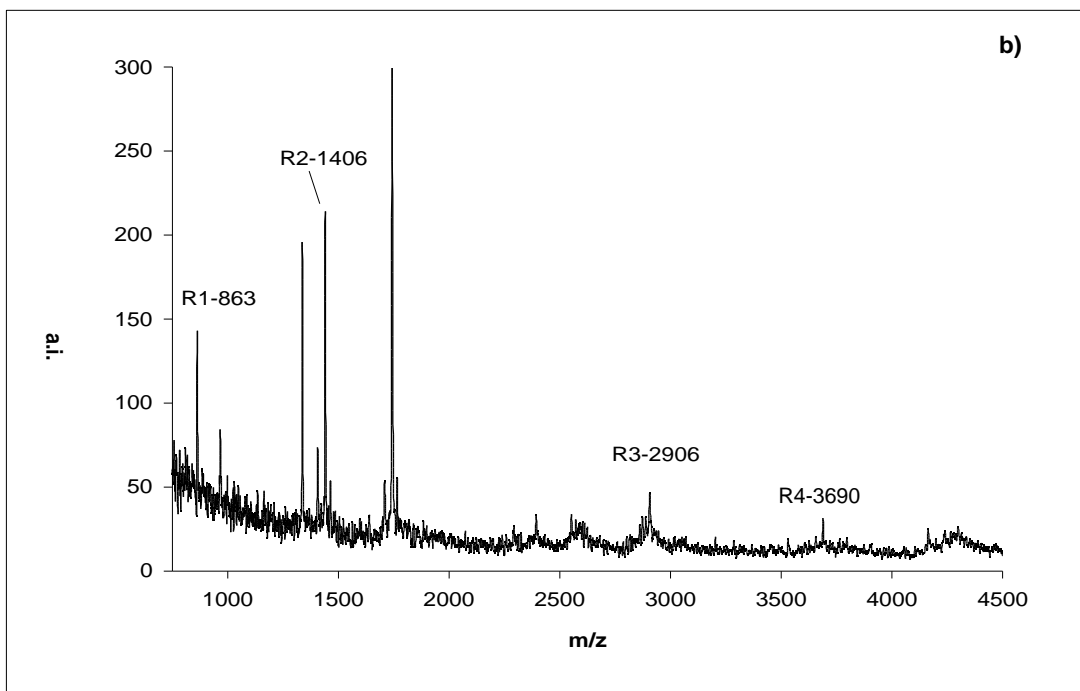
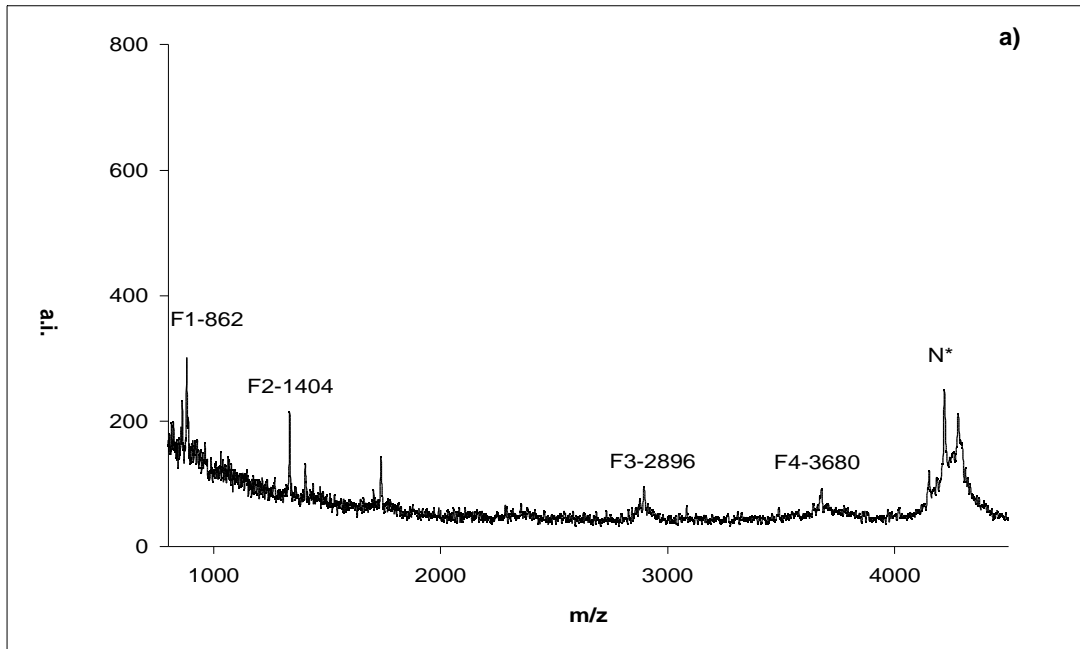


Figura IV. B. 3. 6. 6. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación (a) y de la reducción total posterior (b) del cuarto y quinto isómero reducido y cianilado de la fracción Xc (Ic- 4 y Ic- 5).

Tabla IV. B. 3. 6. 6. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior de los isómeros (Ic- 4) y (Ic- 5).

Isómeros (Ic- 4) y (Ic- 5) (Cys 27- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenci. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-26	2902	(Ic- 4, 5) F3	2896
	itz27-33	862	(Ic- 4, 5) F1	862
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3687	(Ic- 4, 5) F4	3680
	(itz27-39)	1405	(Ic- 4, 5) F2	1404
Reducción Total.	1-26	2906	(Ic- 4, 5) R3	2906
	itz27-33	862	(Ic- 4, 5) R1	863
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3691	(Ic- 4, 5) R4	3690
	(itz27-39)	1405	(Ic- 4, 5) R2	1406

Con estos datos y con los obtenidos en los análisis de digestión con proteasas se podría deducir que los isómeros de la fracción (Ic- 1), (Ic- 2) y (Ic- 3), (Ic- 4) o (Ic- 5) parcialmente reducidos y cianilados pertenecen a una especie proteica que se presenta en la fracción purificada Xc.

Se podría confirmar que las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de este intermediario de plegamiento purificado en la fracción Xc son (8- 24), (12- 18) y (27- 34) que coincide con los resultados vistos por proteólisis. La otra posible asignación vista del análisis de digestión no se ha podido confirmar por reducción parcial, lo que nos hace pensar que durante la proteólisis hubo reorganización de los puentes disulfuro de la especie scrambled Xc.

El hecho de que se hayan determinado tres isómeros (Ic- 3, Ic- 4 y Ic- 5) con una asignación de puentes disulfuro igual nos hace sospechar que existe un segundo o tal vez un tercer intermediario de plegamiento en la fracción purificada como Xc con un apareamiento de puentes disulfuro Cys 27- Cys 34. O bien que uno de los isómeros, por ejemplo Ic- 5, se presenta como mayoritaria y contamina las demás fracciones, no dejando deducir sus asignaciones de puentes disulfuro.

IV. B. 3. 7. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO DEL CUARTO INTERMEDIARIO DE PLEGAMIENTO DEL PCI, Xd.

- **Determinación de los puentes disulfuro por digestión con proteasas.**

A continuación discutiremos los resultados obtenidos de la digestión con proteasas del cuarto intermediario de plegamiento, Xd.

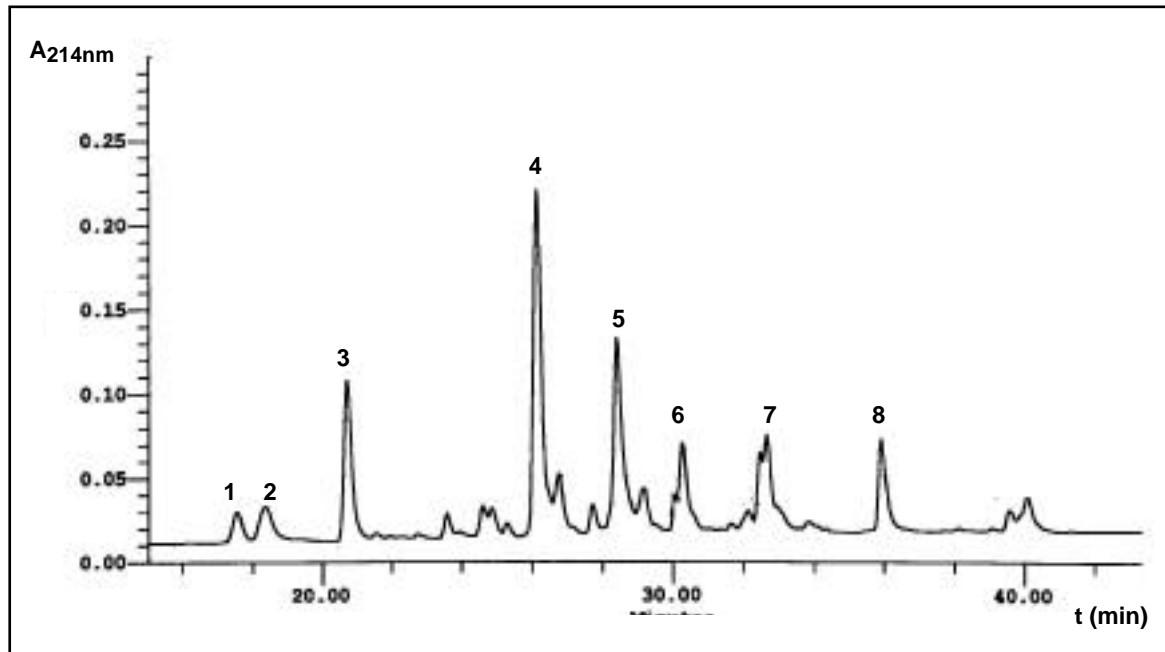


Figura IV. B. 3. 7. 1. Cromatograma obtenido de la digestión de Xd con Termolisina en tampón N-Etilmorfolina.

En la digestión proteolítica de Xd se obtuvieron las tres fracciones comunes (fracciones 1, 3 y 4) observadas en las digestiones de los otros intermediarios; y cuatro fracciones mayoritarias no comunes (fracciones 5, 6, 7 y 8) (figura IV. B. 3. 7. 1).

Los resultados obtenidos de la espectrometría de masas (III. D. 3. 1. 7.) y secuenciación automática (III. D. 3. 1. 8.) de algunos de los fragmentos se resumen en la tabla IV. B. 3. 7. 1.

Observando dichos resultados podríamos deducir cuales son las cisteínas implicadas en uno de los puentes disulfuro de su estructura. Observamos de la tabla de resultados que las fracciones 7 y 8 contienen un péptido con un único puente disulfuro en su estructura y está formado por las cisteínas 24-27.

Las demás fracciones obtenidas contienen dos puentes disulfuro y además los péptidos de digestión obtenidos son incompatibles entre si. Los péptidos de digestión de la fracción 4 contienen las cisteínas 8, 12, 18 y 24, mientras que los péptidos de digestión de la fracción 5 contienen las cisteínas 8, 12, 18 y 34.

Tabla IV. B. 3. 7. 1. Resultados obtenidos del análisis por espectrometría de masas MALDI y secuenciación automática de los péptidos de digestión de Xd.

Fracción N	Masa	Secuencia	Cys- Cys	Posición
4	1913	A W		21- 22
		I C ₈ N K P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G	8, 12, 18	7- 20
		F C ₂₄ Q	24	23-
5	2654	S A R T C ₃₄ G P Y	34	30- 37
		A D P I C ₈ N K P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G	8, 12, 18	7- 20
7	¿	F C ₂₄ Q A C ₂₇ W N	24- 27	23- 29
8	755	F C ₂₄ Q A C ₂₇ W	24- 27	23- 28

Para determinar cuales son los dos puentes disulfuro restantes se realizó una nueva digestión de la fracción 5 con Lys- C. Como resultado del análisis de masas y de secuenciación (tabla IV. B. 3. 7. 2) de esta nueva digestión se han obtenido dos péptidos con un único puente disulfuro en su estructura, pero las cisteínas implicadas en ellos son incompatibles entre sí.

Tabla IV. B. 3. 7. 2. Resultados obtenidos por espectrometría de masas MALDI y secuenciación automática de los péptidos de digestión de la fracción 5 obtenida anteriormente con Lys- C.

Fracción N	Masa	Secuencia	Cys- Cys	Posición.
5. 1	1492	A D P I C ₈ N K	8- 18	4- 10
		T H D D C ₁₈ S G		14- 20
5. 2	1586	S A R T C ₃₄ G P Y	18- 34	30- 37
		T H D D C ₁₈ S G		14- 20

Resumiendo, podríamos afirmar que uno de los puentes disulfuro del intermediario Xd está formado por las cisteínas 24- 27 y otro podía estar formado por las cisteínas 8- 18, o bien por las cisteínas 18- 34. Como consecuencia el tercer puente disulfuro estaría formado por las cisteínas 12- 34 en el primer caso, o bien por las cisteínas 8- 12 en el segundo. Esta incompatibilidad de resultados implica que bien Xd no es una especie pura, observación que ya se denotó cuando estudiábamos la heterogeneidad de las especies scrambled por electroforesis capilar (IV. B. 1.).

- **Determinación de los puentes disulfuro por reducción química parcial.**

A continuación discutiremos los resultados obtenidos de la reducción química parcial de los puentes disulfuro de Xd.

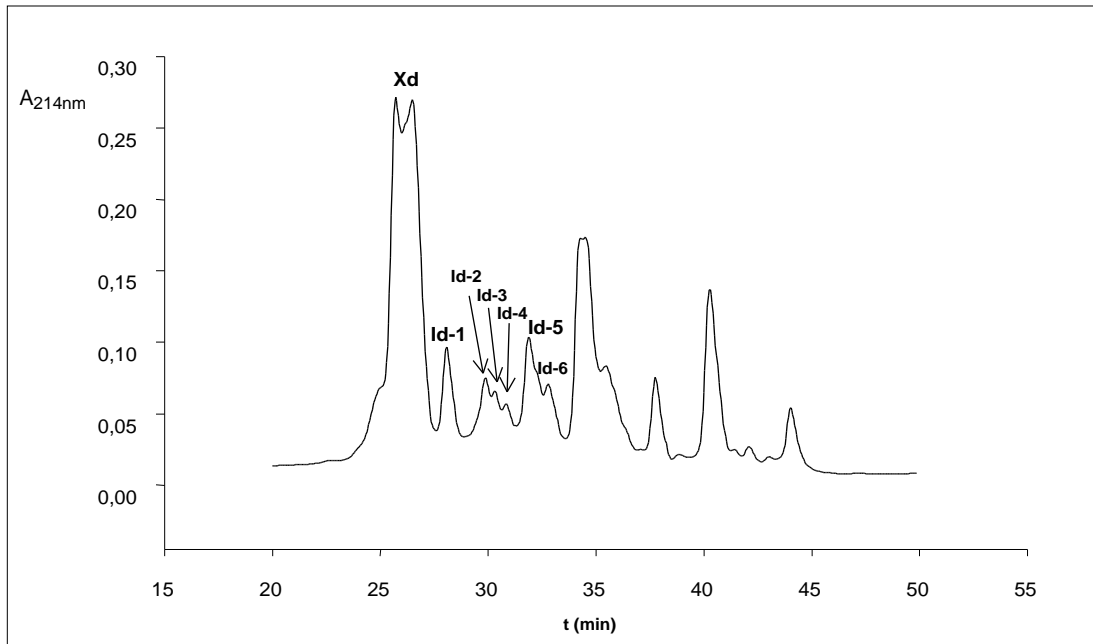


Figura IV. B. 3. 7. 2. Cromatograma obtenido de la separación por HPLC (fase reversa) de la mezcla de isómeros de Xd, parcialmente reducidos por un puente disulfuro y posteriormente cianilados.

En la separación cromatográfica por fase reversa de la mezcla de isómeros de Xd parcialmente reducidos y cianilados (figura IV. B. 3. 7. 2.) existe una fracción mayoritaria (Xd) que corresponde al intermediario de plegamiento no reducido y siete fracciones (Id- 1, Id- 2, Id- 3, Id- 4, Id- 5, Id- 6 y Id- 7) que corresponden a siete isómeros cianilados. Esto nos indica que los intermediarios purificados en la fracción Xd son como mínimo tres especies diferentes.

Además se observa que la fracción mayoritaria presenta dos picos, esto confirma nuevamente el hecho de que la fracción purificada como Xd no es una única especie pura.

- **Isómero (Id- 1)**

En la figura IV. B. 3. 7. 3. mostramos el mapa de masas moleculares obtenido por espectrometría de masas MALDI- TOF de los péptidos obtenidos de la fragmentación y de la reducción total posterior respectivamente del primer isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 1).

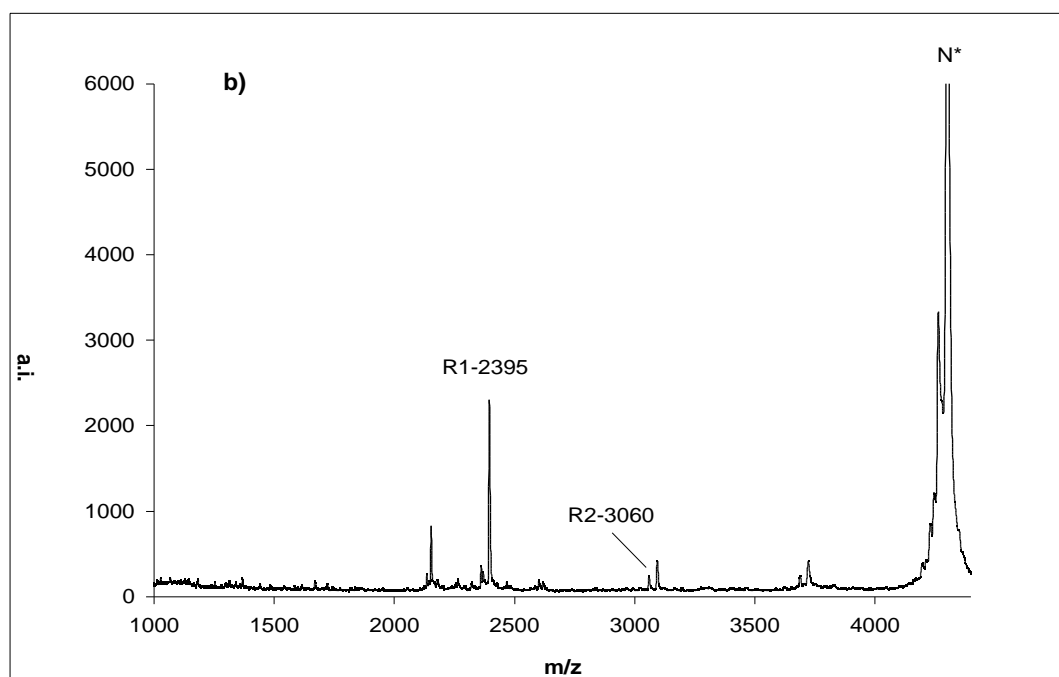
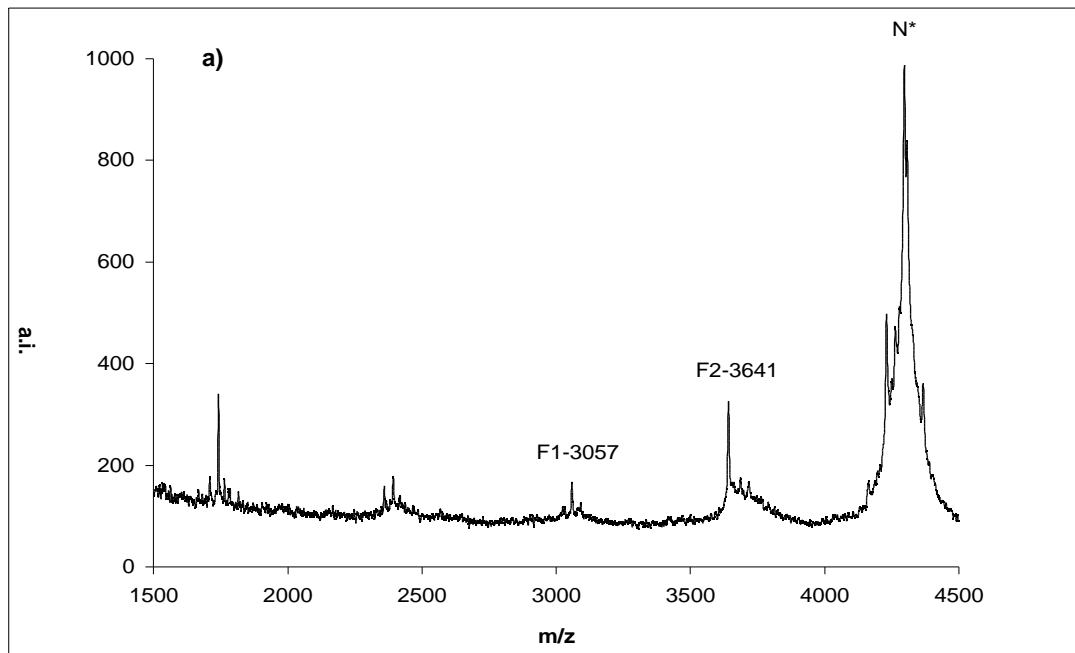


Figura IV. B. 3. 7. 3. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación (a) y de la reducción total posterior (b) del primer isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 1).

Del estudio de los espectros podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del primer isómero de la fracción Xd son Cys 12 y Cys 18.

En la tabla IV. B. 3. 7. 3. exponemos las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Id- 1) previamente asignado.

Tabla IV. B. 3. 7. 3. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Id- 1).

Isómero (Id- 1) (Cys 12- Cys 18)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	Itz12-17	743		-
	1-11(itz18-39)	3640	(Id- 1) F2	3641
	(1-17)	1917		-
	(itz12-39)	3055	(Id- 1) F1	3057
Reducción Total.	1-11	1252		-
	Itz12-17	743		-
	itz18-39	2392	(Id- 1) R1	2395
	(1-17)	1918		-
	(itz12-39)	3058	(Id- 1) R2	3060

- **Isómero (Id- 2)**

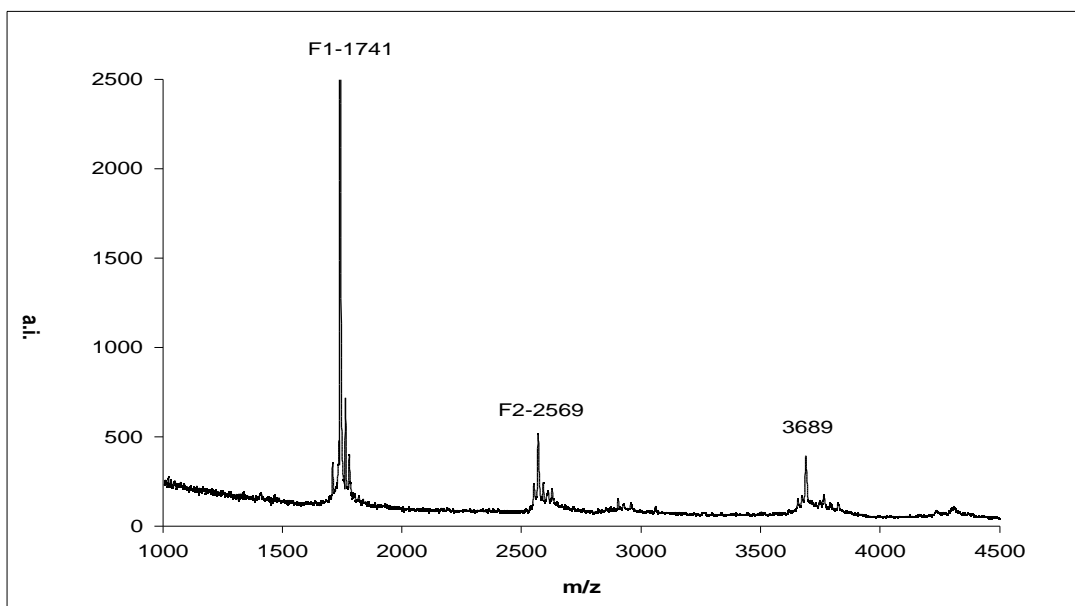


Figura IV. B. 3. 7. 4a. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación del segundo isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 2).

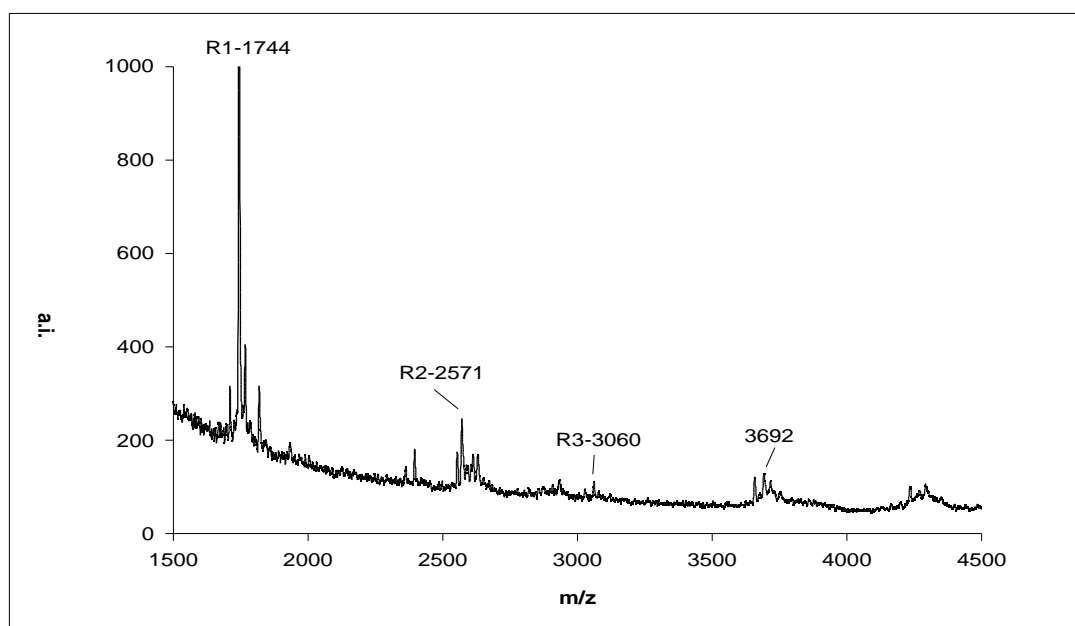


Figura IV. B. 3. 7. 4b. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total posterior del segundo isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 2).

En los espectros de fragmentación y de reducción total (figura IV. B. 3. 7. 4.) también observamos otro pico de m/z : 3690 aproximadamente. Este corresponde a fragmentos de - eliminación del cuarto isómero de Xd (Id- 4), debido a que la separación de estos isómeros por cromatografía (HPLC) de fase reversa (figura IV. B. 3. 7. 2.) no es completa.

Tabla IV. B. 3. 7. 4. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Id- 2).

Isómero (Id- 2) (Cys 18- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomencl. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1itz-23	2644		-
	ltz24-39	1739	(Id- 2) F1	1741
	(1-23)	2568	(Id- 2) F2	2569
	(itz12-39)	3055	(Id- 2) F3	-
Reducción Total.	1-11	1252		-
	itz12-23	1395		-
	itz24-39	1741	(Id- 2) R1	1744
	(1-23)	2570	(Id- 2) R2	2571
	(itz12-39)	3058	(Id- 2) R3	3060

Del estudio de los espectros (figura IV. B. 3. 7. 4.), comparando las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados (tabla IV. B. 3. 7. 4.), podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del segundo isómero de la fracción Xd son Cys 12 y Cys 24.

• **Isómero (Id- 4)**

Del estudio de los espectros (figura IV. B. 3. 7. 5. y tabla IV. B. 3. 7. 5.) podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del cuarto isómero de la fracción Xd son Cys 8 y Cys 34.

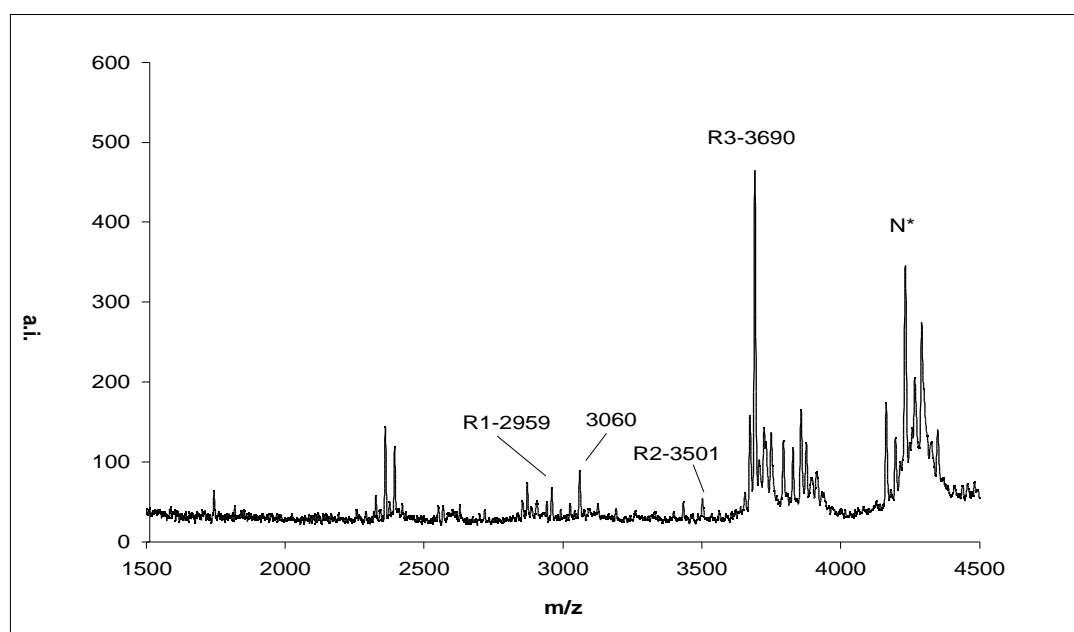


Figura IV. B. 3. 7. 5. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del cuarto isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 4).

Tabla IV. B. 3. 7. 5. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Id- 4).

Isómero (Id- 4) (Cys 18- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomencl. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-7	810		-
	itz8-33	2954		-
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3687		-
	(itz8-39)	3497		-

Isómero (Id- 4) (Cys 18- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomencl. Picos MS	M/z observado
Reducción Total.	1-7	810		-
	itz8-33	2958	(Id- 4) R1	2959
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3691	(Id- 4) R3	3690
	(itz8-39)	3501	(Id- 4) R2	3501

En el espectro también observamos otros picos de m/z: 1744*, 2568* y 3060. Estos corresponden a fragmentos de reducción total y - eliminación del segundo isómero de Xd (Id- 2). La separación de estos isómeros (figura IV. B. 3. 7. 2.) no es completa y ya el isómero (Id- 2) presentaba contaminación de (Id- 4).

- **Isómeros (Id- 5) y (Id- 6).**

En la siguiente figura mostramos el mapa de masas moleculares del quinto y sexto isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 5 y Id- 6). Los analizamos juntos debido a que su separación por fase reversa no ha sido óptima (figura IV. B. 3. 7. 2) y consecuentemente los resultados obtenidos son los mismos.

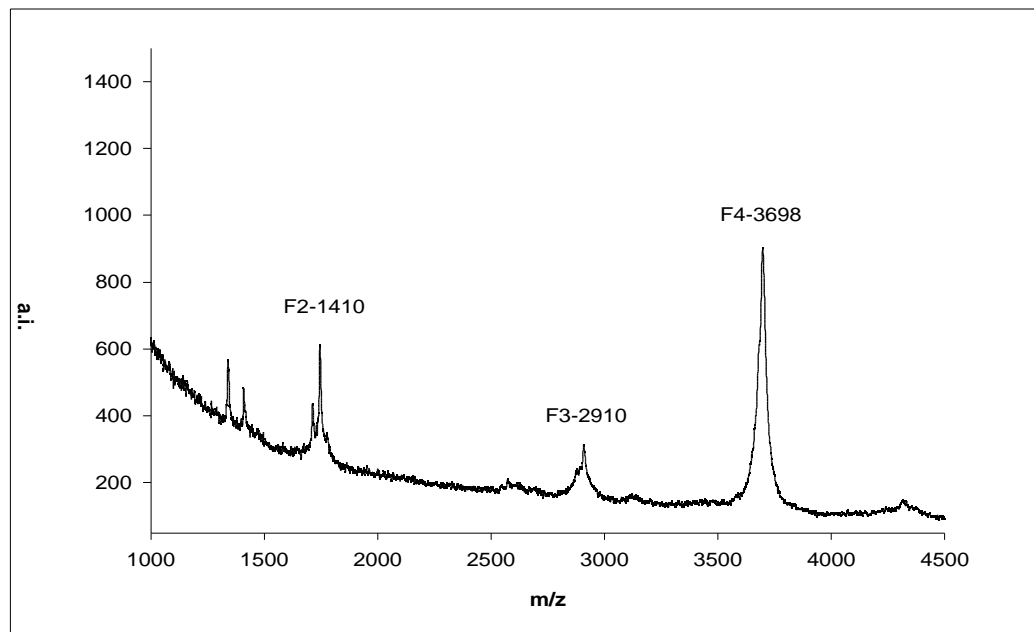


Figura IV. B. 3. 7. 6a. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación del quinto y sexto isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 5 y Id- 6).

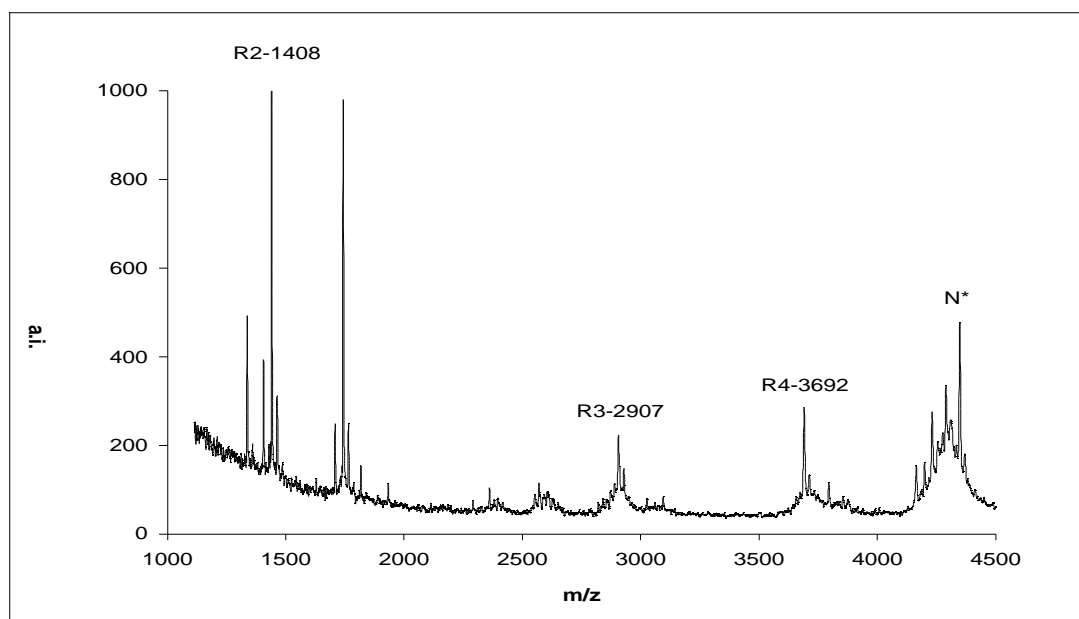


Figura IV. B. 3. 7. 6b. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del quinto y sexto isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 5 y Id- 6).

En la siguiente tabla mostramos las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior de los isómeros (Id- 5) y (Id- 6).

Tabla IV. B. 3. 7. 6. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior de los isómeros (Id- 5) y (Id- 6).

Isómeros (Id- 5) y (Id- 6) (Cys 27- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-26	2902	(Id- 5, 6) F3	2910
	itz27-33	862	(Id- 5, 6) F1	865*
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3687	(Id- 5, 6) F4	-
	(itz27-39)	1405	(Id- 5, 6) F2	1410
Reducción Total.	1-26	2906	(Id- 5, 6) R3	2907
	itz27-33	862	(Id- 5, 6) R1	865*
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3691	(Id- 5, 6) R4	3692
	(itz27-39)	1405	(Id- 5, 6) R3	1408

*Picos de MS observados en otros ensayos.

Del estudio realizado podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del quinto o del sexto isómero de la fracción Xc son Cys 27 y Cys 34.

- **Isómero (Id- 7)**

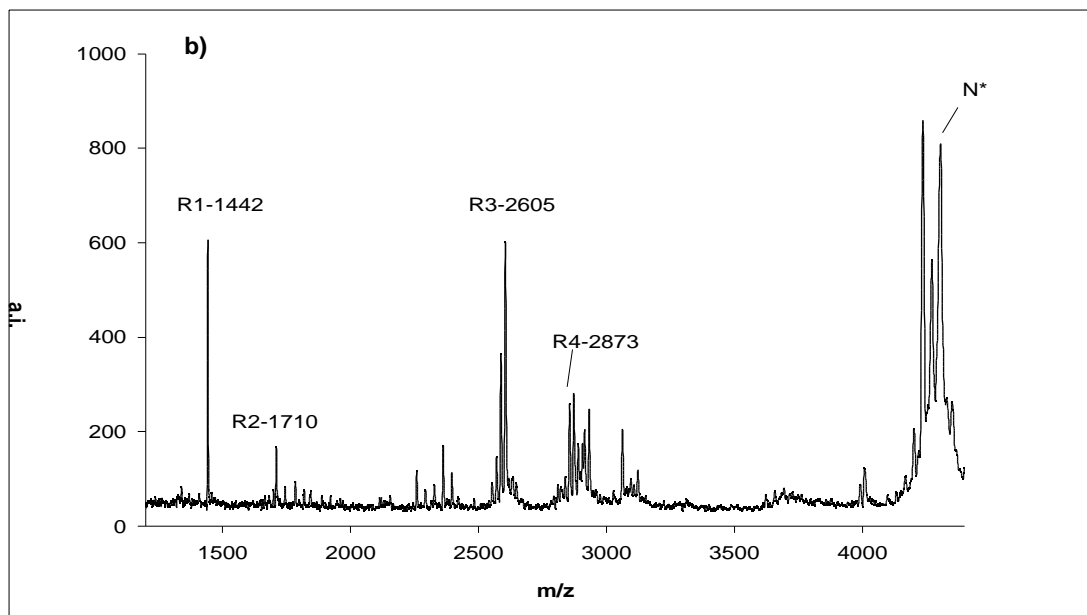
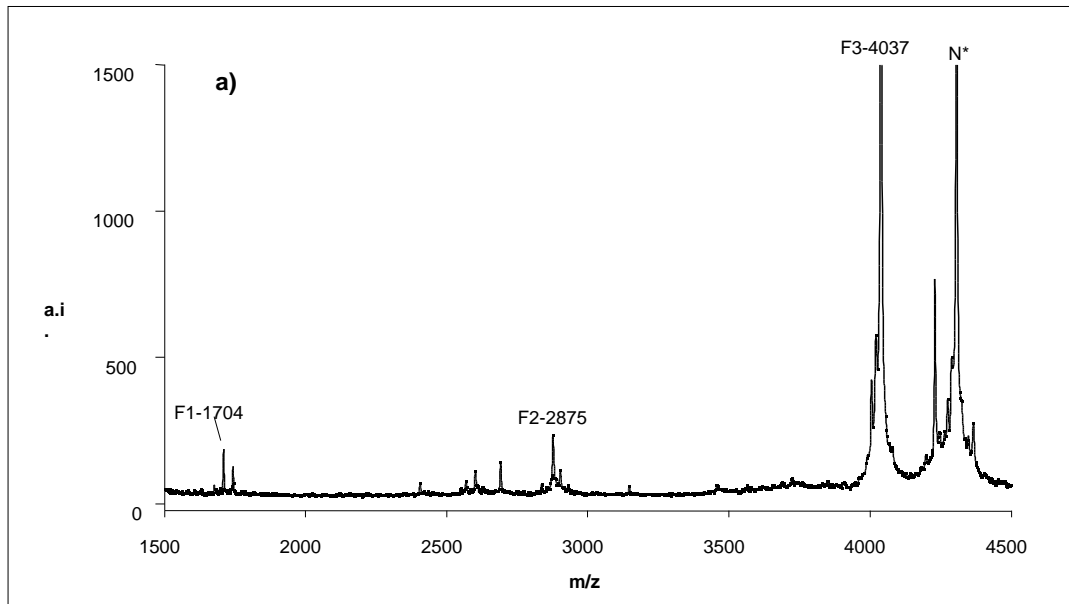


Figura IV. D. 3. 7. 7. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación (a) y de la reducción total (b) del séptimo isómero reducido y cianilado de la fracción Xd (Id- 7).

Finalmente estudiamos la reducción química parcial del séptimo isómero de la fracción Xd (Id- 7). De los resultados obtenidos (figura IV. B. 3. 7. 7. y tabla IV. B. 3. 7. 7.) podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del séptimo isómero de la fracción Xd son Cys 24 y Cys 27.

Tabla IV. B. 3. 7. 7. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Id- 7).

Isómero (Id- 7) (Cys 24- Cys 27)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-23(itz27-39)	4037	(Id- 7) F3	4037
	itz24-26	345		-
	(1-26)	2869	(Id- 7) F2	2875
	(itz24-39)	1706	(Id- 7) F1	1704
Reducción Total.	1-23	2605	(Id- 7) R3	2605
	itz24-26	345		-
	itz27-39	1439	(Id- 7) R1	1442
	(1-26)	2872	(Id- 7) R4	2873
	(itz24-39)	1707	(Id- 7) R2	1710

En resumen, la fracción purificada como Xd, presenta como mínimo tres especies diferentes. De las cuales se ha asignado tentativamente el apareamiento de puentes disulfuro de dos de ellas.

Con los datos de reducción parcial y con los obtenidos en los análisis de digestión con proteasas se podría pensar que los isómeros (Id- 1), (Id- 4) y (Id- 7) parcialmente reducidos y cianilados son compatibles con la presencia de una especie proteica que se presenta en la fracción purificada Xd. Y los isómeros (Id- 2) y (Id- 5) o (Id- 6) parcialmente reducidos y cianilados son compatibles con la presencia de otra especie proteica .

Se asigna tentativamente que las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de uno de los dos intermediarios de plegamiento purificados en la fracción Xd son (8- 34), (12- 18) y (24- 27). Y las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro del segundo intermediario de plegamiento son (8- 18), (12- 24) y (27- 34).