

IV. B. 3. 8. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO DEL QUINTO INTERMEDIARIO DE PLEGAMIENTO DEL PCI, Xe.

La caracterización estructural por digestión con proteasas de la especie scrambled Xe no se realizó debido a no disponer de cantidades suficientes de proteína. Recordamos que la fracción Xe es la que se presenta como minoritaria en la separación cromatográfica de las especies scrambled (figura IV. A. 2. 1) cuando la obtenemos en ausencia de desnaturalizante.

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

En la siguiente figura mostramos la separación cromatográfica por fase reversa de la mezcla de isómeros de Xe parcialmente reducidos y cianilados, y parte de intermediario no reducido.

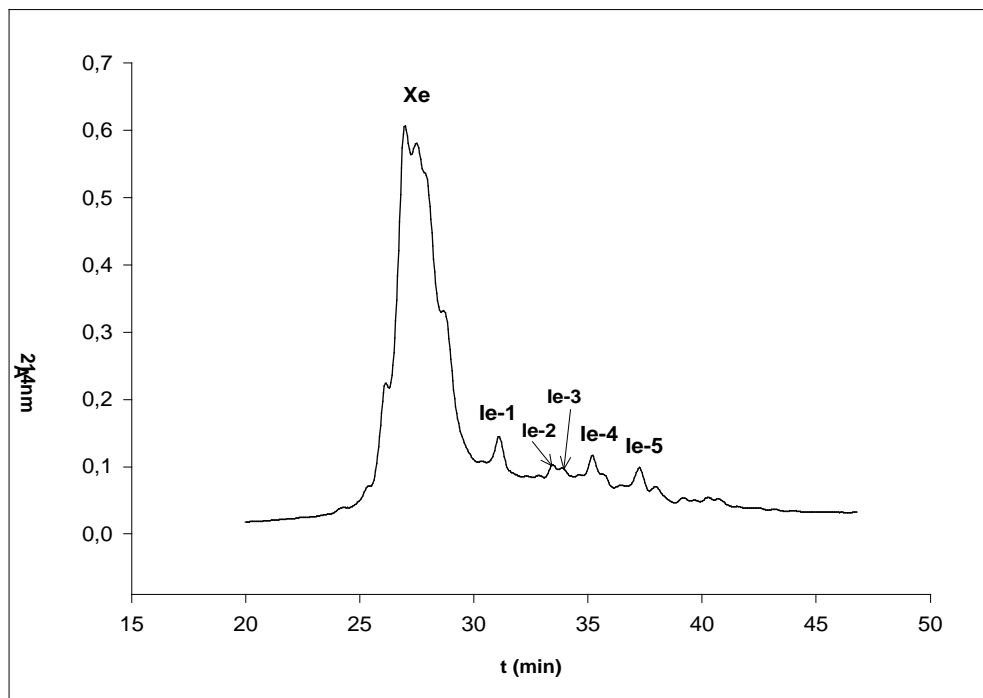


Figura IV. B. 3. 8. 1. Cromatograma obtenido de la separación por HPLC (fase reversa) de la mezcla de isómeros de Xe, parcialmente reducidos por un puente disulfuro y posteriormente cianilados.

En la separación de isómeros obtenida del intermediario de plegamiento Xe existe una fracción mayoritaria (Xe) que corresponde al intermediario de plegamiento no reducido y cinco fracciones (le- 1, le- 2, le- 3, le- 4 y le- 5) que corresponden a cinco isómeros cianilados. Esto nos indica que los intermediarios purificados en la fracción Xe son como mínimo dos especies diferentes.

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

- **Isómero (Ie- 1).**

En la siguiente figura 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 Xe (Ie- 1).

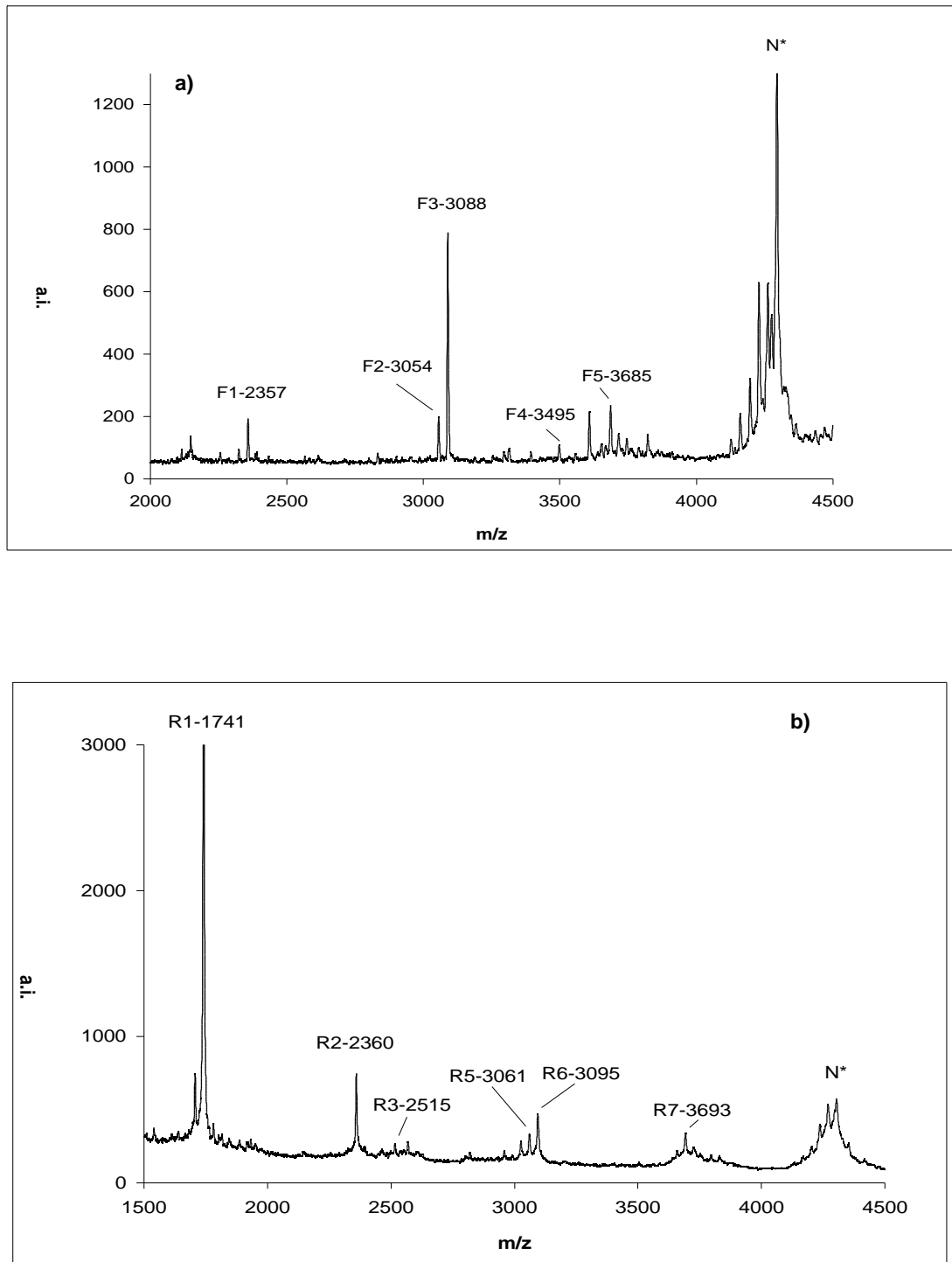


Figura IV. B. 3. 8. 2. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación (a) y de la reducción total posterior (b) del primer isómero reducido y cianilado de la fracción Xe (Ie- 1).

Del estudio de los espectros podríamos deducir que la fracción (Ie- 1) contiene más de un isómero parcialmente reducido y cianilado debido a que según los datos obtenidos parece que en la fragmentación están implicadas seis cisteínas. Deducimos por lo tanto que las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de los tres isómeros encontrados de la fracción (Ie- 1) son Cys 8- Cys 12, Cys 18- Cys 24 y Cys 12- Cys 34. A continuación mostramos una tabla resumen de los resultados obtenidos.

Tabla IV. B. 3. 8. 1. 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 (Ie- 1).

Isómero (Ie-1) (Cys 8- Cys 12)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-7	810		-
	itz8-11	486		-
	itz12-39	3088	(Ie- 1) F3	3088
	(1-11)	1218		-
	(itz8-39)	3497	(Ie- 1) F4	3495
Reducción Total.	1-7	810		-
	itz8-11	486		-
	itz12-39	3092	(Ie- 1) R6	3095
	(1-11)	1218		-
	(itz8-39)	3501		-
(Cys 18- Cys 24)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-17()itz24-39	3689	(Ie- 1) F5	3685
	itz18-23	695		-
	(1-23)	2568	(Ie- 1) F2	-
	(itz18-39)	2357	(Ie- 1) F1	2357
Reducción Total.	1-17	1952		-
	itz18-23	695		-
	itz24-39	1741	(Ie- 1) R1	1741
	(1-23)	2570	(Ie- 1) R4	2569
	(itz18-39)	2359	(Ie- 1) R2	2360
(Cys 12- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1itz-33	3763	(Ie- 1) F6	3759
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3687	(Ie- 1) F5	3685
	(itz12-39)	3055	(Ie- 1) F2	3054
Reducción Total.	1-11	1252		-
	itz12-33	2516	(Ie- 1) R3	2515
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3691	(Ie- 1) R7	3693
	(itz12-39)	3058	(Ie- 1) R5	3061

- **Isómero (Ie- 2)**

Del estudio de los espectros (figura IV. B. 3. 8. 3. y tabla IV. B. 3. 8. 2.) podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del segundo isómero de la fracción Xe son Cys 18 y Cys 27.

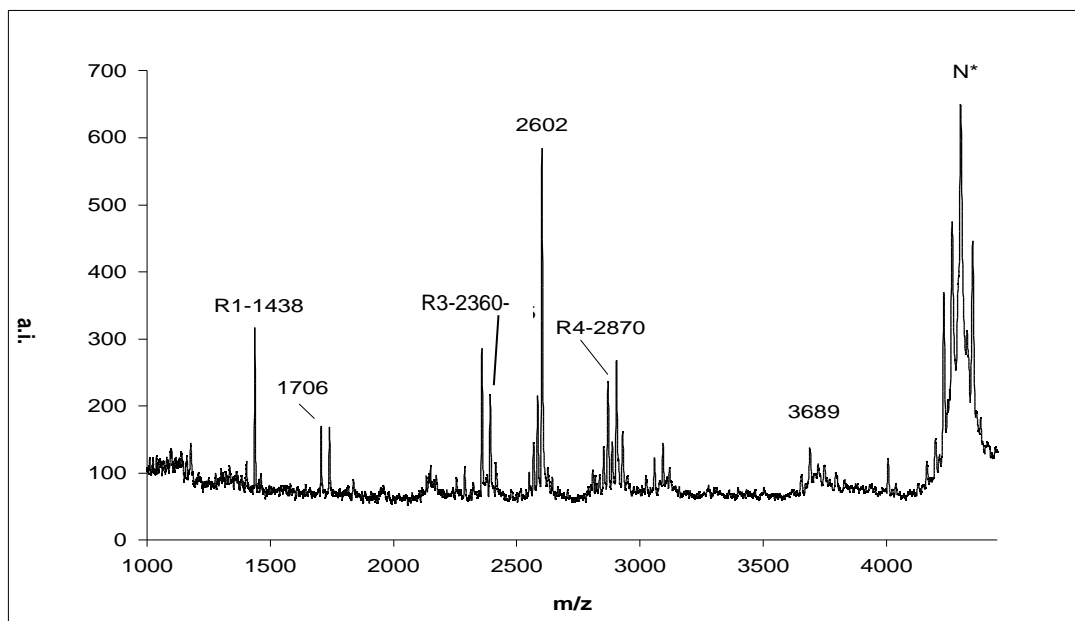


Figura IV. B. 3. 8. 3. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del segundo isómero reducido y cianilado de la fracción Xe (Ie- 2).

En el espectro también observamos otros picos de m/z: 1706, 2602 y 3689. Estos corresponden a fragmentos de reducción total y - eliminación del tercer isómero de Xe (Ie- 3), La separación de estos isómeros por cromatografía (HPLC) de fase reversa (figura IV. B. 3. 8. 1.) no ha sido completa.

Tabla IV. B. 3. 8. 2. 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 (Ie- 2).

Isómero (Ie- 2) (Cys 18- Cys 27)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1ititz-39	4350	(Ie- 2) F1	4349
	(1-26)	2869		-
	(itz18-39)	2357		-
Reducción Total.	1-17	1952	(Ie- 2) R2	1955*
	itz18-26	997		-
	itz27-39	1439	(Ie- 2) R1	1438
	(1-26)	2872	(Ie- 2) R4	2870
	(itz18-39)	2359	(Ie- 2) R3	2360

*Picos observados en otros experimentos realizados.

- **Isómero (Ie- 3)**

En la siguiente figura mostramos los espectros obtenidos de la fragmentación y de la reducción total posterior respectivamente del tercer isómero reducido y cianilado de la fracción Xe (Ie- 3).

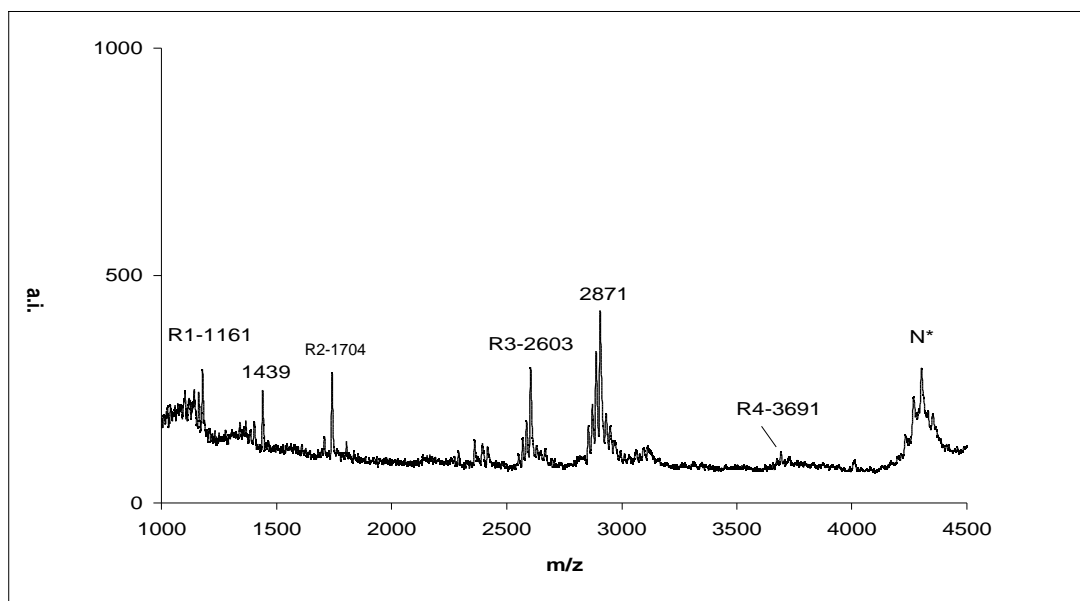


Figura IV. B. 3. 8. 4. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total posterior respectivamente del tercer isómero reducido y cianilado de la fracción Xe (Ie- 3).

En el espectro también observamos otros picos de m/z : 1439 y 2871. Estos corresponden a péptidos de fragmentación, de reducción total y - eliminación del segundo isómero de Xe (Ie- 2). La separación de estos isómeros por HPLC (figura IV. B. 3. 8. 1.) no es completa y ya el isómero (Ie- 2) presentaba contaminación de (Ie- 3)).

Tabla IV. B. 3. 8. 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 (Ie- 3).

Isómero (Ie- 3) (Cys 24- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-33itz	3763		-
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3687	(Ie- 3) F1	3688*
	(itz24-39)	1706		-

Isómero (Ie- 3) (Cys 24- Cys 34)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Reducción Total.	1-23	2604	(Ie- 3) R3	2603
	itz24-33	1165	(Ie- 3) R1	1161
	itz34-39	620		-
	(1-33)	3691	(Ie- 3) R4	3691
	(itz24-39)	1707	(Ie- 3) R2	1704

Podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del tercer isómero de la fracción Xe son Cys 24 y Cys 34. Seguidamente mostramos una tabla resumen de los resultados del isómero (Ie- 3) previamente asignado.

• **Isómero (Ie- 4).**

A continuación estudiamos el cuarto isómero de Xe, (Ie- 4). En la tabla IV. B. 3. 8. 4. Mostramos las masas moleculares de los fragmentos teóricos y experimentales como resultado de las reacciones de fragmentación y reducción total.

Tabla IV. B. 3. 8. 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 (Ie- 4).

Isómero (Ie- 4) (Cys 12- Cys 27)	Fragmento asignado	M/ z teórico	NomencI. Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-11()itz27-39	2688	(Ie- 4) F2	2687
	ltz12-26	1697	(Ie- 4) F1	1705
	(1-26)	2869	(Ie- 4) F3	2866
	(itz12-39)	3055		-
Reducción Total.	1-11	1252		-
	itz12-26	1697	(Ie- 4) R2	1695
	itz27-39	1439	(Ie- 4) R1	1438
	(1-26)	2872	(Ie- 4) R3	2870
	(itz12-39)	3058	(Ie- 4) R4	3058

En la figura IV. B. 3. 8. 5. Mostramos el mapa de masa moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación y de la reducción total posterior del mismo isómero.

Del estudio de los espectros y comparando los fragmentos teóricos y experimentales expuestos en la anterior tabla podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del cuarto isómero de la fracción Xe son Cys 12 y Cys 27.

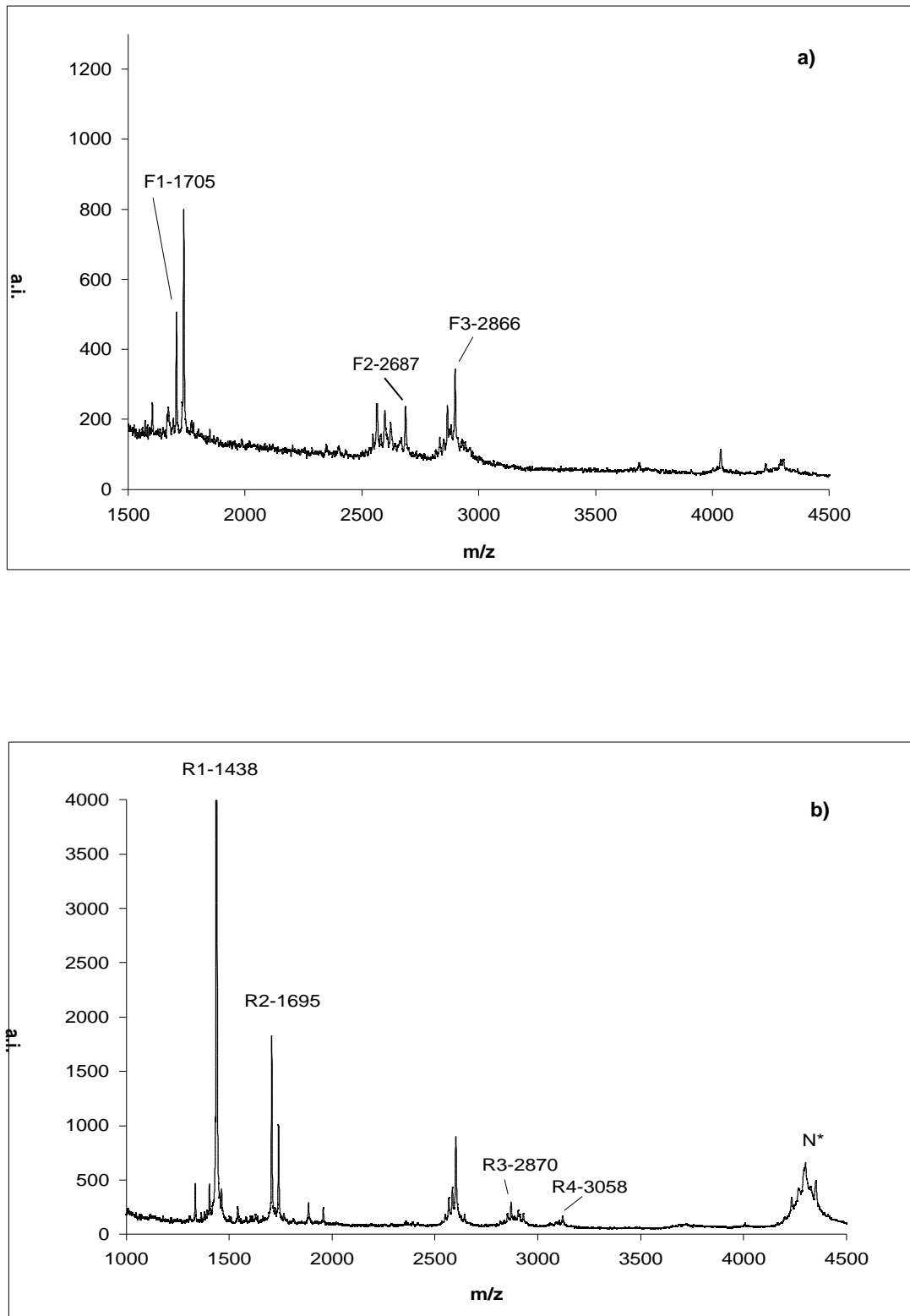


Figura IV. C. 3. 8. 5. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación (a) y de la reducción total (b) del cuarto isómero reducido y cianilado de la fracción Xe (Ie- 4).

- **Isómero (Ie- 5)**

Finalmente estudiamos quinto isómero reducido y cianilado de la fracción Xe (Ie- 5). Del estudio de los espectros (figura IV. B. 3. 8. 6) y de la comparación de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente (tabla IV. B. 3. 8. 5), podríamos deducir que las cisteínas implicadas en el puente disulfuro del quinto isómero de la fracción Xe son Cys 24 y Cys 27.

Tabla IV. B. 3. 8. 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 (Ie- 5).

Isómero (Ie- 5) (Cys 24- Cys 27)	Fragmento asignado	M/ z teórico	Nomenclatura Picos MS	M/z observado
Fragmentación.	1-23(itz27-39)	4037	(Ie- 5) F3	4040
	itz24-26	345		-
	(1-26)	2869	(Ie- 5) F2	2870
	(itz24-39)	1706	(Ie- 5) F1	1707
Reducción Total.	1-23	2605	(Ie- 5) R3	2603
	itz24-26	345		-
	itz27-39	1439	(Ie- 5) R1	1438
	(1-26)	2872	(Ie- 5) R4	2871
	(itz24-39)	1707	(Ie- 5) R2	1708

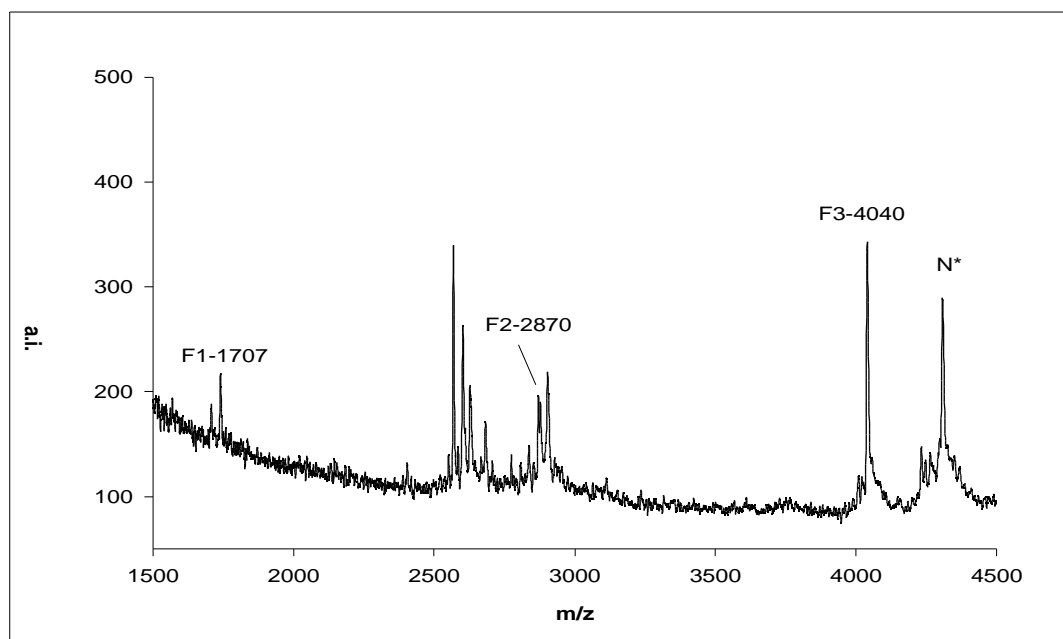


Figura IV. B. 3. 8. 6a. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación del quinto isómero reducido y cianilado de la fracción Xe (Ie- 5).

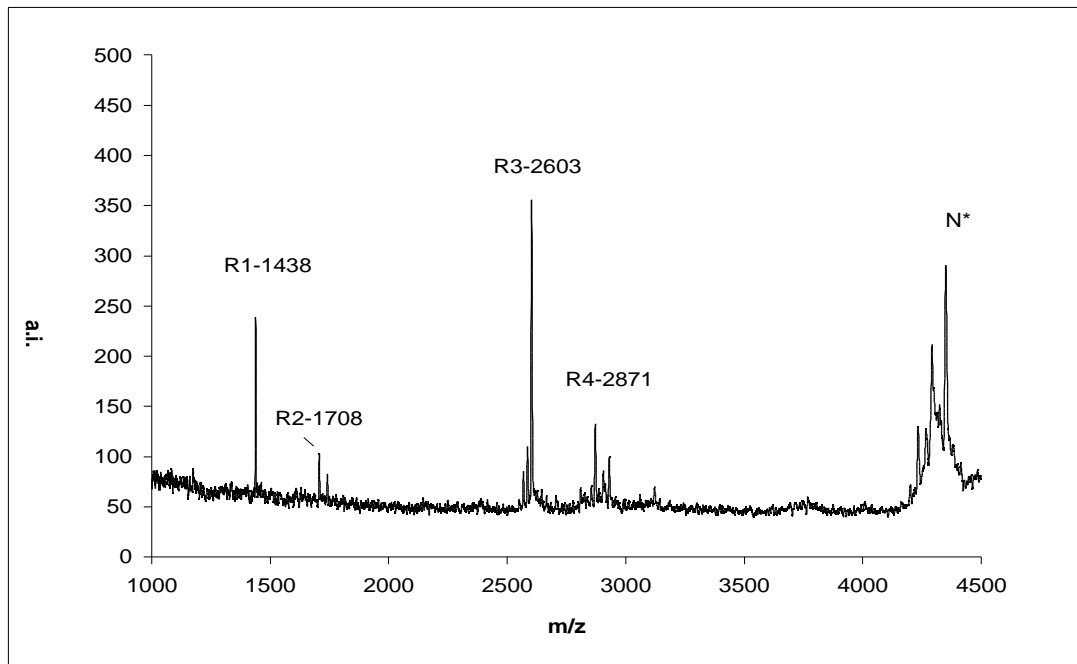


Figura IV. B. 3. 8. 6b. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total posterior del quinto isómero reducido y cianilado de la fracción Xe (Ie- 5).

Resumiendo, con estos datos se podría pensar que uno de los isómeros de la fracción (Ie- 1), los isómeros (Ie- 2) y (Ie- 3) parcialmente reducidos y cianilados son compatibles con la presencia de una especie proteica de la fracción purificada Xe. Se asigna tentativamente que las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de esta especie son (8- 12), (18- 27) y (24- 34). Otro de los isómeros de la fracción (Ie- 1), y el isómero (Ie- 4) parcialmente reducidos y cianilados son compatibles con la presencia de otra especie proteica de la fracción purificada Xe. Se asigna tentativamente que las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de esta especie son (18- 24), (12- 27) y por deducción (8- 34). Finalmente otro de los isómeros de la fracción (Ie- 1), y el isómero (Ie- 5) parcialmente reducidos y cianilados son compatibles con la presencia de otra especie proteica de la fracción purificada Xe. Se podría pensar que las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de esta especie son (12- 34), (24- 27) y por deducción (8- 18).

IV. B. 3. 9. COMENTARIOS GENERALES. VENTAJAS Y PROBLEMAS DEL MÉTODO DE REDUCCIÓN PARCIAL FRENTE AL MÉTODO DE DIGESTIÓN PROTEOLÍTICA.

Se ha observado que todos los isómeros parcialmente reducidos presentan tiempos de retención superiores a los de las correspondientes proteínas nativas. Esto sugiere que la reducción de cada puente disulfuro puede cambiar notablemente la estructura tridimensional de la proteína nativa. Como sabemos el mecanismo de separación de la fase reversa esta basado en la diferente hidrofobicidad de las

muestras (Regnier & Gooding, 1980; Gray, 1993). Cuando se rompe un puente disulfuro se modifica la estructura proteica, exponiendo los aminoácidos hidrofóbicos del interior por lo tanto aumentando su hidrofobicidad. Por ello isómeros con uno o más puentes disulfuro reducidos tienden a interactuar más fuertemente en las columnas de fase reversa y eluir a tiempos de retención superiores a los de la proteína nativa

Una vez conocida la metodología, la interpretación y discusión de los resultados podemos especificar mejor las ventajas y problemas que nos ha ofrecido este método frente la digestión con proteasas, en base a nuestra experiencia en el análisis del PCI o de los intermediarios.

Ventajas:

- Es un método simple, rápido y sensible.
- La reacción de reducción parcial optimizada nos asegura obtener cantidades suficientes de todas las isoformas de la proteína con sólo un puente disulfuro reducido.
 - La rotura específica por los residuos cisteínicos cianilados produce normalmente tres fragmentos.
 - La suma de las masas moleculares de estos tres fragmentos es igual a la masa de la isoforma cianilada más dos moléculas de agua, hecho que en teoría permite computerizar los datos experimentales obtenidos.
 - Los productos obtenidos de la reacción de - eliminación representan péptidos que deberían haberse fragmentado por uno o los dos residuos cisteínicos cianilados, consecuentemente su masa nos sirve para confirmar la asignación de las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de la isoforma analizada.
 - La reorganización de puentes disulfuro de la proteína (“reshuffling”) durante el proceso no tiene lugar debido a que las reacciones se llevan a cabo en medio ácido.

Problemas que surgen en la realización experimental:

- La interpretación de resultados se complica enormemente cuando la fracción proteica a analizar resulta no ser una proteína pura, como nos hemos encontrado en los casos de las fracciones Xb, Xc, Xd y Xe.
 - La separación de los fragmentos cianilados no siempre es completa, sumado al aspecto anteriormente comentado dificulta aún más la asignación.
 - Podemos obtener el mismo fragmento de reducción total para diferentes conformaciones (C1- Cn) cianiladas. Por ejemplo, el fragmento de reducción total (itz27- 39) de masa molecular 1439 se podría obtener teóricamente de la fragmentación y reducción total de las conformaciones C2, C9 y C14 con apareamiento de uno de sus puentes disulfuro Cys18- Cys27; también se podría obtener teóricamente de la fragmentación y reducción total de las conformaciones C3, C6 y C13 con apareamiento de uno de los puentes disulfuro Cys 24- Cys 27; se podría obtener teóricamente de la fragmentación y reducción total de las conformaciones C5 y C15 con apareamiento de uno de sus puentes disulfuro Cys 12- Cys 27; finalmente se podría obtener teóricamente de la fragmentación y reducción total de las conformaciones C10 y C11 con apareamiento de uno de sus puentes disulfuro Cys 8- Cys 27. Este hecho dificulta la asignación de un fragmento a una sola conformación.

- Péptidos de fragmentación y de reducción total de peso molecular inferior a 1000 Da son difíciles de observar y además se confunden con los picos propios de la matriz analítica utilizada para espectroscopía de masas MALDI- TOF. Consecuentemente perdemos muy frecuentemente la asignación de los fragmentos.
- Existen péptidos de fragmentación y de reducción total que se volatilizan más fácilmente que otros, en aplicar la técnica de espectrometría de masas MALDI- TOF. Por ejemplo, los fragmentos de 1436, 1741, 2359 y 2393 Da aparecen en la mayoría de espectros, confundiendo la asignación.
- Existen péptidos de fragmentación y de reducción total que no se volatilizan fácilmente consecuentemente no aparecen en los espectros. Por ejemplo, los fragmentos de 1837, 1918 y 2140 Da.
- Según la matriz de espectrometría de masas MALDI- TOF utilizada en el ensayo, encontramos que favorece la señal de péptidos de fragmentación y de reducción total de masa molecular pequeña, por debajo de 2000 Da, mientras que desfavorece la señal de péptidos de mayor masa molecular, por encima de 2000 Da. En las figuras IV. B. 3. 9. 1. y IV. B. 3. 9. 2. Mostramos los espectros obtenidos de una misma muestra utilizando como matriz α -ciano- 4 hidroxicinámico (CCA) o ácido sinapínico respectivamente.

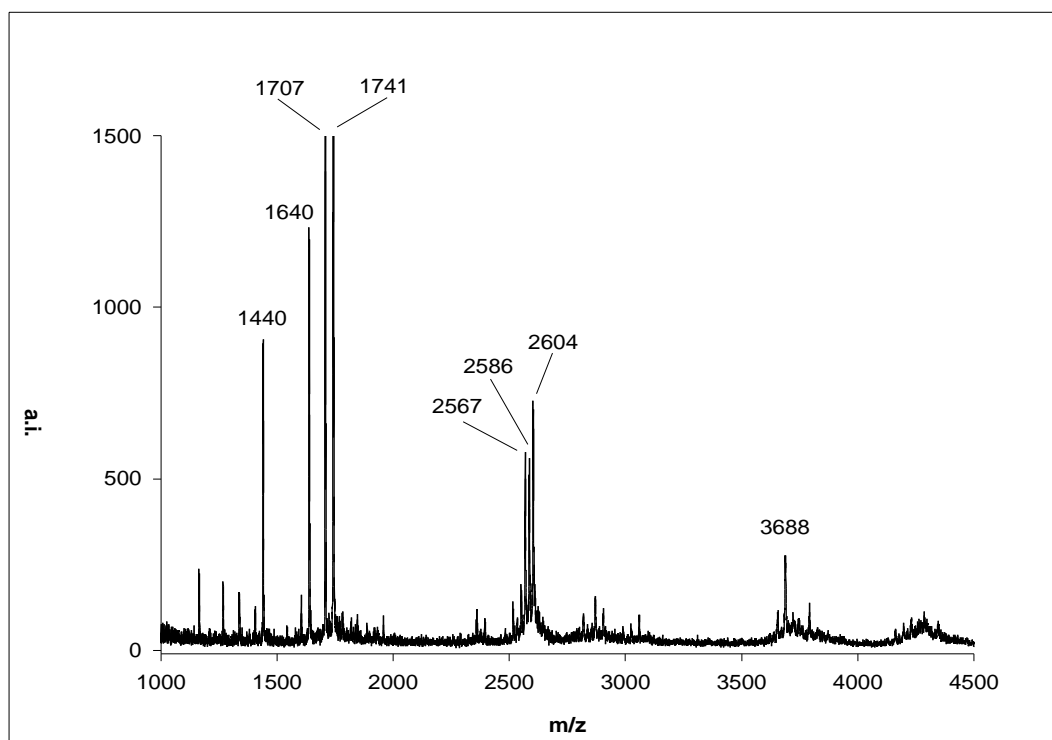


Figura IV. B. 3. 9. 1. Espectro de reducción total del isómero (Ib- 1) obtenido utilizando α -ciano- 4 hidroxicinámico (CCA) como matriz.

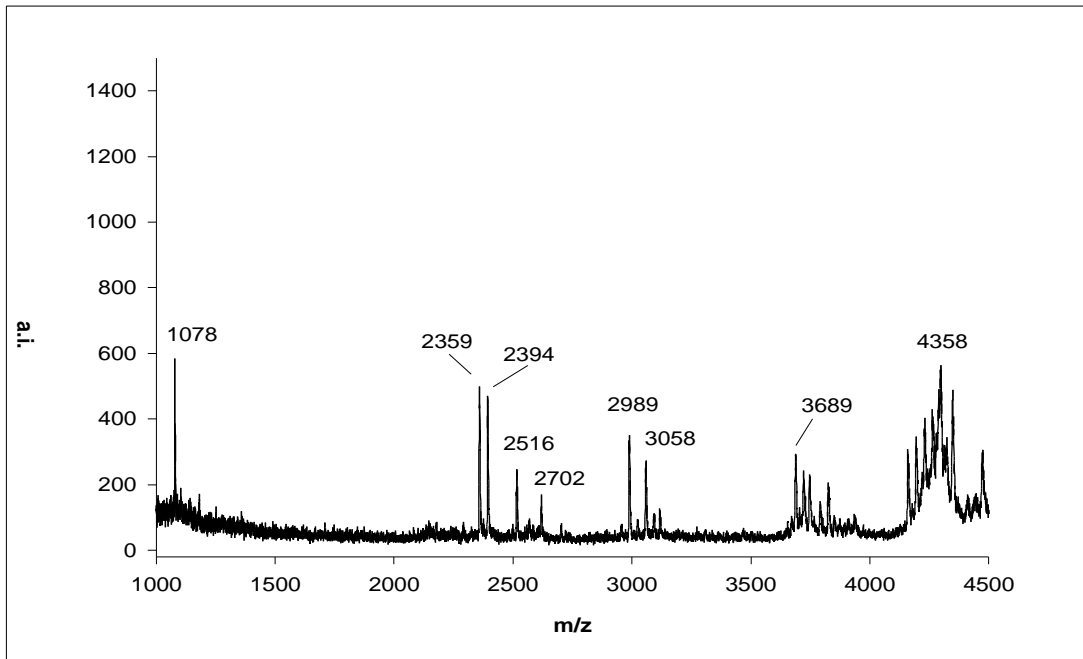


Figura IV. B. 3. 9. 2. Espectro de reducción total del isómero (Ib- 1) obtenido utilizando ácido sinapínico como matriz.

En conclusión, aunque el método de reducción parcial con TCEP puede ir bien en ciertos casos (si la proteína es pura, si los isómeros cianilados se separan completamente por cromatografía...), en nuestro caso ha sido necesario tener en cuenta tanto la información obtenida de los ensayos de digestión proteolítica como los de reducción parcial para poder proponer los apareamientos de puentes disulfuro de las diferentes especies.

IV. B. 3. 10. CONCLUSIONES FINALES.

A continuación presentamos una tabla resumen (tabla IV. B. 3. 10. 1.) de los apareamientos de puentes disulfuro encontrados para cada intermediario de plegamiento del PCI identificado por digestión proteolítica y reducción química parcial. Se indican el número de diferentes especies cianiladas encontradas al someter la muestra a reducción parcial y cianilación y en consecuencia el número mínimo de especies presentes en cada fracción.

Tabla IV. B. 3. 10. 1. Resumen de los apareamientos de puentes disulfuro encontrados para cada intermediario de plegamiento identificado.

Xi	Nº cianilados	Nº mínimo de especies encontradas	Configuración	Apareamiento (Cys- Cys)
Xa	3	1	C10	(8- 27) (12-18) (24- 34)
Xb	7	3	C11	(8- 27) (12- 24) (18- 34)
			C3	(8- 12) (18- 34) (24- 27)
Xc	5	2	C7	(8- 24) (12- 18) (27- 34)
Xd	7	3	C13	(8- 34) (12- 18) (24- 27)
			C4	(8- 18) (12- 24) (27- 34)
Xe	5	3	C2	(8- 12) (18- 27) (24- 34)
			C15	(8- 34) (12- 27) (18- 24)
			C6	(8- 18) (12- 34) (24- 27)
PCI		1		(8- 24) (12- 27) (18- 34)
Total		13		

(Cys-Cys) Apareamiento de puentes disulfuro como los de la especie nativa.

Se destaca de los resultados obtenidos que:

- Existen como mínimo 12 intermediarios de plegamiento de los 14 posibles y se ha podido asignar la configuración de 9 de ellos.
 - La única fracción pura, Xa, no tiene ningún puente disulfuro como los de la estructura nativa.
 - La fracción Xb posiblemente contiene tres especies intermediarias según el número de isómeros cianilados obtenido. Dos de ellas han sido asignadas y tienen un puente disulfuro común y común a la especie nativa, representando en conjunto las tres únicas conformaciones posibles con un puente disulfuro (18- 34).
 - La fracción Xc posiblemente contiene también dos especies intermediarias, una de ellas ha sido asignada y presenta un puente disulfuro como el nativo (8- 24).
 - La fracción Xd posiblemente contiene tres especies intermediarias según el número de isómeros cianilados obtenido. Dos de ellas han sido asignadas y ninguna presenta un puente disulfuro común ni común al nativo.
 - La fracción Xe contiene tres especies intermediarias, dos de ellas no presentan puentes disulfuro comunes a la especie nativa pero una de ellas presenta un puente disulfuro común (12- 17).
 - Siempre hemos encontrado una conformación que represente en un puente disulfuro los tres apareamientos nativos, es decir que cada uno de los puentes disulfuro nativos aparecen en las configuraciones asignadas.
 - La configuraciones no asignadas a ninguna especie son C1, C5, C9, C12 y C14. (véase tabla IV. B. 3. 3. 2.)

A partir de las configuraciones de puentes disulfuro asignadas podemos calcular el porcentaje de moléculas en que se da un determinado apareamiento de cisteínas, en el conjunto de especies

scrambled en equilibrio, para compararlo con el porcentaje que se esperaría de una formación de puentes totalmente al azar.

En la tabla IV. B. 3. 10. 2. Se indica la composición porcentual de la mezcla de especies scrambled en equilibrio. Los valores totales para Xa, Xb, Xc, Xd y Xe corresponden a los observados por cromatografía (HPLC) de fase reversa. Los valores para las diferentes especies presentes en cada fracción, de acuerdo con el análisis por reducción parcial y cianilación, se han estimado de forma aproximada a partir de los resultados de estos análisis.

Tabla IV. B. 3. 10. 2. Composición porcentual de la mezcla de especies scrambled en equilibrio.

Fracción scrambled	% aparición
Xa	25
Xb1	8.7
Xb2	4.4
Xb3	4.4
Total Xb	17.5
Xc1	15
Xc2	15
Total Xc	30
Xd1	8.3
Xd2	8.3
Xd3	8.3
Total Xd	25
Xe1	0.8
Xe2	0.8
Xe3	0.8
Total Xe	2.5
Total	100

El porcentaje de aparición de cada uno de los puentes disulfuro observados (de los quince posibles) se calcula sumando los porcentajes según la composición de la mezcla (tabla IV. B. 3. 10. 2.) de aquellas especies en que esté presente, y dividiendo el total por 3 para corregir por el número de puentes de la molécula.

La probabilidad de aparición de cada puente disulfuro al azar, repartida entre las quince posibilidades sería de $100/15 = 6.6\%$.

En la tabla IV. B. 3. 10. 3. mostramos el porcentaje de aparición de cada uno de los apareamientos encontrados en los intermediarios de plegamiento y el cociente entre este porcentaje encontrado y el porcentaje de aparición de uno de ellos al azar.

Tabla IV. B. 3. 10. 3. Porcentaje de aparición de cada uno de los puentes disulfuro y su cociente entre el porcentaje de aparición de un puente disulfuro al azar.

(Cys- Cys)	% de aparición	% (Cys- Cys) / % azar
(8- 12)	1.8	0.3
(8- 18)	3	0.45
(8- 24)	5	0.75
(8- 27)	11.2	1.7
(8- 34)	3	0.45
(12- 18)	16.1	2.4
(12- 24)	5.6	0.8
(12- 27)	0.3	0.05
(12- 34)	0.3	0.05
(18- 24)	0.3	0.05
(18- 27)	0.3	0.05
(18- 34)	4.4	0.6
(24- 27)	4.6	0.7
(24- 34)	8.6	1.3
(27- 34)	7.9	1.2

(Cys- Cys)- Cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de la estructura nativa.

Se ha de destacar de la anterior tabla que el porcentaje de aparición de cada uno de los apareamientos anteriores no da una suma total de 100 sino de 72.1. El porcentaje restante corresponde a los apareamientos de los intermediarios que no se han podido asignar (Xb3, Xc2 y Xd3).

Los valores obtenidos del cociente entre porcentajes nos dan una idea sobre si un apareamiento se presenta con una probabilidad mayor que la que da el azar (valores superiores a la unidad) o no (valores inferiores a la unidad).

A pesar del porcentaje de moléculas cuyos puentes disulfuro no se han podido deducir (en torno al 27%), los datos obtenidos son suficientes para extraer las siguientes conclusiones:

- La formación de los puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento no es totalmente al azar. Los apareamientos más favorecidos, parecen ser los formados por las cisteínas: 8- 27, 12- 18, 24- 34 y 27- 34.
- De estos cuatro puentes más favorables dos de ellos (12- 18) y (27- 34) corresponden a cisteínas contiguas en la secuencia y que se encuentran a distancias de 6 y 7 residuos respectivamente. Es esperable que la formación de estos puentes disulfuro esté favorecida (Heaton, 1956; Jarvis, 1961 y Hardy, 1971). Respecto a los restantes puentes posibles entre cisteínas contiguas, dos de ellas, (8- 12) y (24- 27) están a distancias sólo de 4 y 3 residuos lo que las hace menos probables. El otro puente (18- 24), cuya frecuencia observada es muy baja, no puede descartarse que sea más abundante ya que se encuentra en dos de las cinco configuraciones no asignadas.

- Los otros dos apareamientos más favorecidos, (8- 27) y (24- 34) no corresponden a cisteínas contiguas, y sería indicativo de una formación no al azar de los puentes disulfuro.
- Los apareamientos de la estructura nativa no parecen ser los de mayor frecuencia de aparición. En el caso de (8- 24) y (12- 27) las frecuencias podrían ser algo mayores, pues estos puentes se dan en las configuraciones no asignadas C9 y C5 respectivamente. Sin embargo, el puente (18- 34) no aparece en ninguna de las configuraciones no asignadas, por lo que se frecuencia es la mostrada en la tabla,
- La formación de puentes disulfuro no al azar implica que existen interacciones no covalentes que favorecen que se formen determinados apareamientos frente otros, consecuentemente existe una estabilidad diferente en las diferentes especies scrambled.

IV. B. 4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.

IV. B. 4. 1. ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD).

Mediante el análisis de la actividad óptica de las proteínas en disolución podemos obtener información de su estructura secundaria y cierta información sobre la terciaria. La conformación de una proteína, la disposición asimétrica y periódica de las unidades peptídicas en el espacio, determina un espectro de dicroísmo circular característico. La técnica de DC es muy sensible y puede ser utilizada en reacciones que impliquen cambios de conformación, como por ejemplo reacciones de desnaturalización. En el presente estudio queremos observar las diferencias estructurales entre la proteína nativa, su forma reducida y sus intermediarios de plegamiento. Para ello analizamos las diferentes muestras por espectroscopía de dicroísmo circular.

Las estructuras secundarias típicas adoptadas por proteínas tienen espectros dicroicos diferentes en el UV lejano. La estructura de hélices presentan dos bandas negativas que se encuentran cerca de 222 y 208 nm; y una banda positiva a 190 nm. La hoja presenta un espectro CD menos intenso presentando una banda negativa cerca de 217 nm, una positiva cerca de 195 nm y otra banda negativa cerca de 180 nm. Los α -turns pueden presentar variedad de espectros dicroicos, pero el más común observado es el que presenta una banda negativa suave entre 220- 230 nm y una banda positiva entre 200 y 210 nm. Finalmente la forma desordenada, "random coil" presenta una banda suave cerca de 220 nm y una banda negativa cerca de 200 nm.

En nuestro caso no hay estructura secundaria regular, pero la presencia de puentes disulfuro, y aminoácidos aromáticos puede dar alguna señal.

El espectro de absorción de los residuos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano, y de cistinas incluyen bandas en la región del UV cercano (240- 300 nm). Estos mismos residuos, junto con la histidina incluyen bandas en la región del UV lejano (185- 240 nm). Algunas de estas bandas pueden ser ópticamente activas en la proteína, especialmente si la cadena lateral se encuentra en un medio asimétrico.

La contribución de las cadenas laterales de los residuos del PCI a su espectro de dicroísmo circular probablemente es debido a la existencia de tirosinas y puentes disulfuro en su estructura. El espectro de absorción de una tirosina no ionizada contiene una banda débil a 275 nm y dos picos a 224 y 194 nm. Y cuando el grupo fenólico del residuo se ioniza la absorción y las bandas se desplazan a longitudes de onda más largas. La contribución de los puentes disulfuro y de los residuos de cisteína debe también tenerse en cuenta. Estos absorben hacia la región de 195- 230 nm y la cistina tiene una banda adicional a 250 nm. Por otra parte, la inexistencia en el PCI nativo de estructura secundaria regular, aparte de una vuelta helicoidal en su primera mitad, hace suponer que las bandas de CD típicas de hélice y estructura en la región de 225- 200 nm tendrán poca presencia en su espectro.

IV. B. 4. 1. 1. ESTUDIO DE LOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE PCI NATIVO, PCI REDUCIDO Y LAS ESPECIES SCRAMBLED.

Inicialmente estudiaremos los espectros obtenidos de las muestras preparadas con diferentes disoluciones tamponadoras: glicina (25 mM, pH= 3.0) y fosfato sódico (50 mM, pH=7.0) y las compararemos con los espectros obtenidos en agua milli- Q acidificada con TFA (pH= 3.0) (III. D. 4. 1. 1.).

Después estudiaremos la influencia de la urea a diferentes concentraciones en las mismas muestras disueltas en las dos disoluciones tamponadoras.

Según las bandas teóricas expuestas anteriormente vamos a estudiar el espectro de dicroísmo circular de la proteína nativa. Un espectro típico podría ser el obtenido en tampón glicina a pH= 3.0 (figura IV. B. 4. 1. 1. 1.).

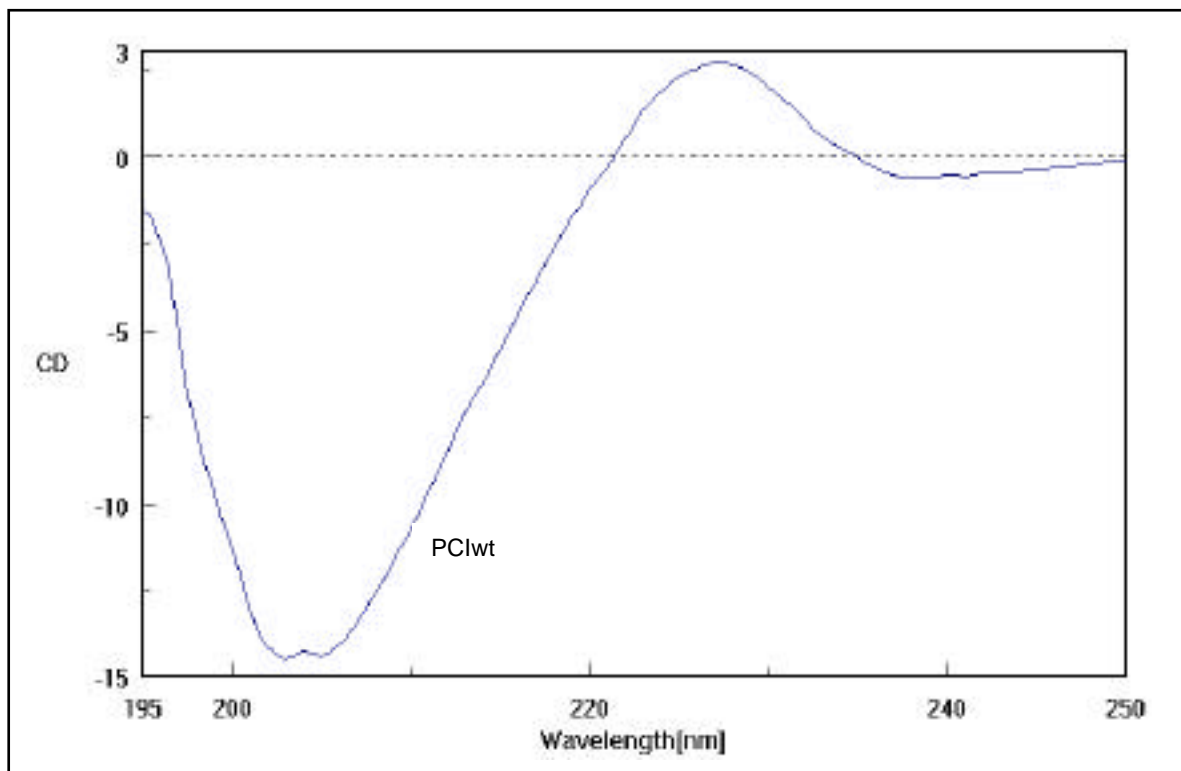


Figura IV. B. 4. 1. 1. 1. Espectro de dicroísmo circular del PCI nativo en tampón glicina a pH= 3.0.

Como se observa en el espectro anterior, el PCI nativo presenta un máximo a 227 nm que podría ser debido a los residuos de tirosina y de cistina. También presenta un mínimo a 204 nm, de difícil asignación. En cualquier caso, ambos tienen un valor de muy bajo.

Este espectro característico de la proteína no varía al cambiar las condiciones ambientales del análisis, por ejemplo si la muestra está disuelta en agua milli- Q con TFA, a pH= 3.0 (figura IV. B. 4. 1. 1. 2.), o en disolución tamponadora de glicina a pH= 3.0 o de fosfato sódico a pH= 7.0, como se muestra en la figuras: IV. B. 4. 1. 1. 3 y IV. B. 4. 1. 1. 4.

En cambio, el espectro de CD sufre un fuerte cambio cuando el PCI se encuentra con los puentes disulfuro reducidos o con apareamientos distintos de la forma nativa (formas scrambled) (figura IV. B. 4. 1. 1. 2.).

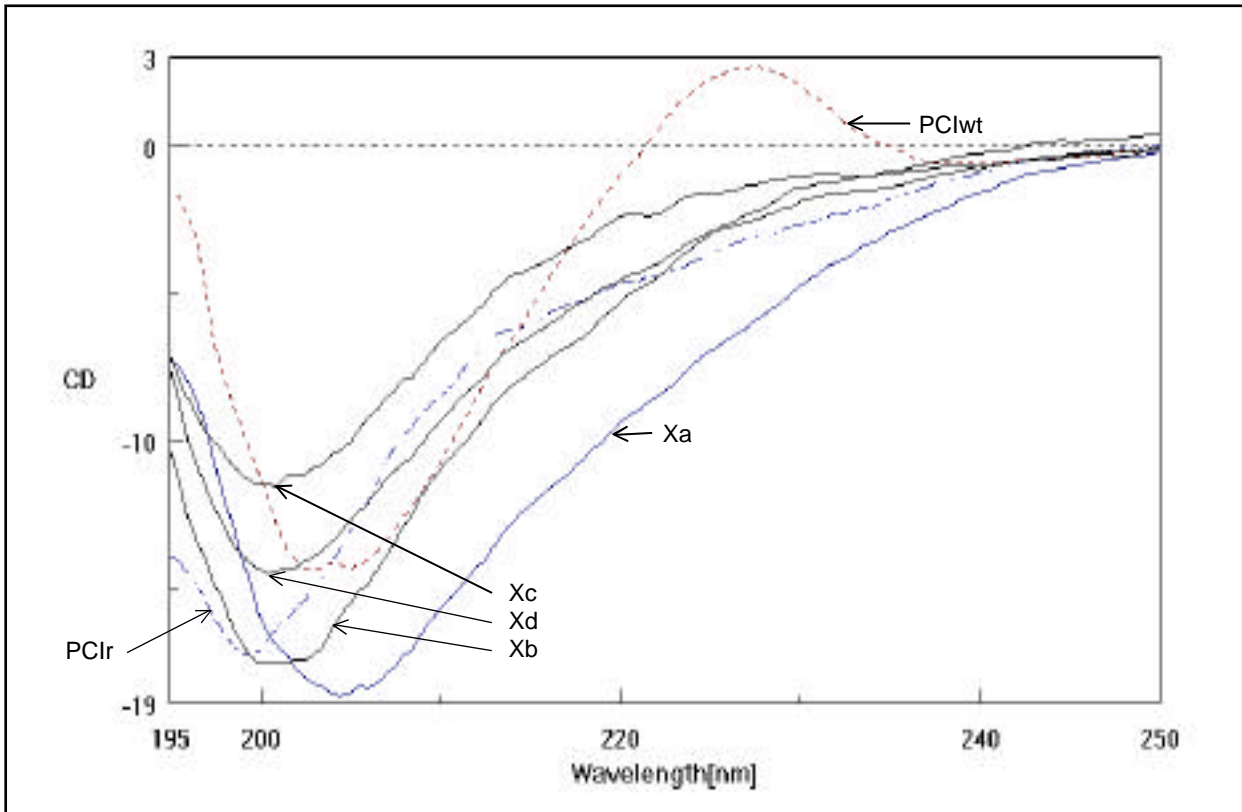


Figura IV. B. 4. 1. 1. 2. Espectros de dicroísmo circular de PCI nativo, su forma reducida y las especies intermediarias en agua milli- Q , ajustada a pH= 3.0 con TFA.

En la superposición de espectros anterior se observa que ni el PCI reducido ni las especies scrambled presentan ningún máximo en la región cercana a 227 nm como lo hace el PCI nativo. En cuanto a los mínimos obtenidos podemos decir que la especie scrambled Xa es la que con diferencia se separa más del comportamiento de las demás, presentando un mínimo a 204 nm como la especie nativa. La proteína reducida junto con la especie scrambled Xe presentan un mínimo hacia 199 nm y las demás especies, Xb, Xc y Xd lo presentan hacia 200- 201 nm.

Se obtuvieron resultados parecidos para el PCI reducido y las formas scrambled cuando el ajuste a pH 3.0 se realizó por adición al medio de un tampón de glicina (25 mM) (figura IV. B. 4. 1. 1. 3.).

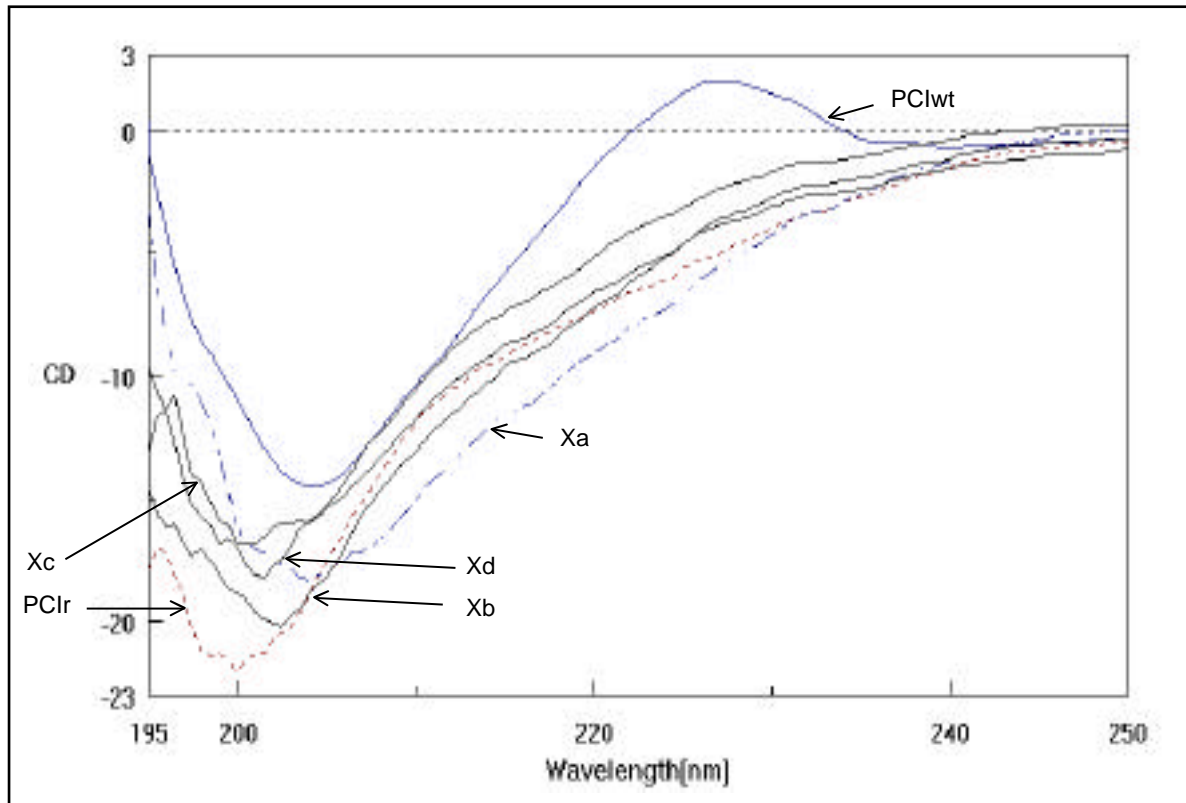


Figura IV. B. 4. 1. 1. 3. Espectros de dicroísmo circular de PCI nativo, su forma reducida y las especies intermedias en una disolución de glicina (25 mM) a pH= 3.0.

En este caso se observa también un mínimo común entre la proteína nativa y la especie Xa a 204 nm. La especie Xb parece que ha desplazado su mínimo hacia 202 nm y por lo que se refiere a la proteína reducida y los demás intermedios presentan mínimos hacia 200 nm.

El ajuste de la disolución de PCI, formas reducida y scrambled a pH 7.0, con tampón fosfato sódico 50 mM tampoco altera significativamente los resultados (figura IV. B. 4. 1. 1. 4.).

En este análisis observamos nuevamente que el mínimo de proteína nativa y especie Xa es el mismo a 204 nm, mientras que las demás especies presentan su mínimo hacia 200 nm.

En base a los resultados descritos podemos hipotetizar que tanto la proteína reducida como las especies scrambled presentan una conformación diferente a la nativa ya que no muestran el máximo a 227 nm característico de la proteína nativa. La conformación de la especie Xa podría ser que tuviera algunos aspectos conformacionales similares a la proteína nativa ya que presenta un mínimo común con ésta. Por lo que respecta a la proteína reducida y a las especies scrambled presentan conformaciones similares entre si y que recuerdan al espectro característico de "random coil", por lo que probablemente no tienen una estructura definida.

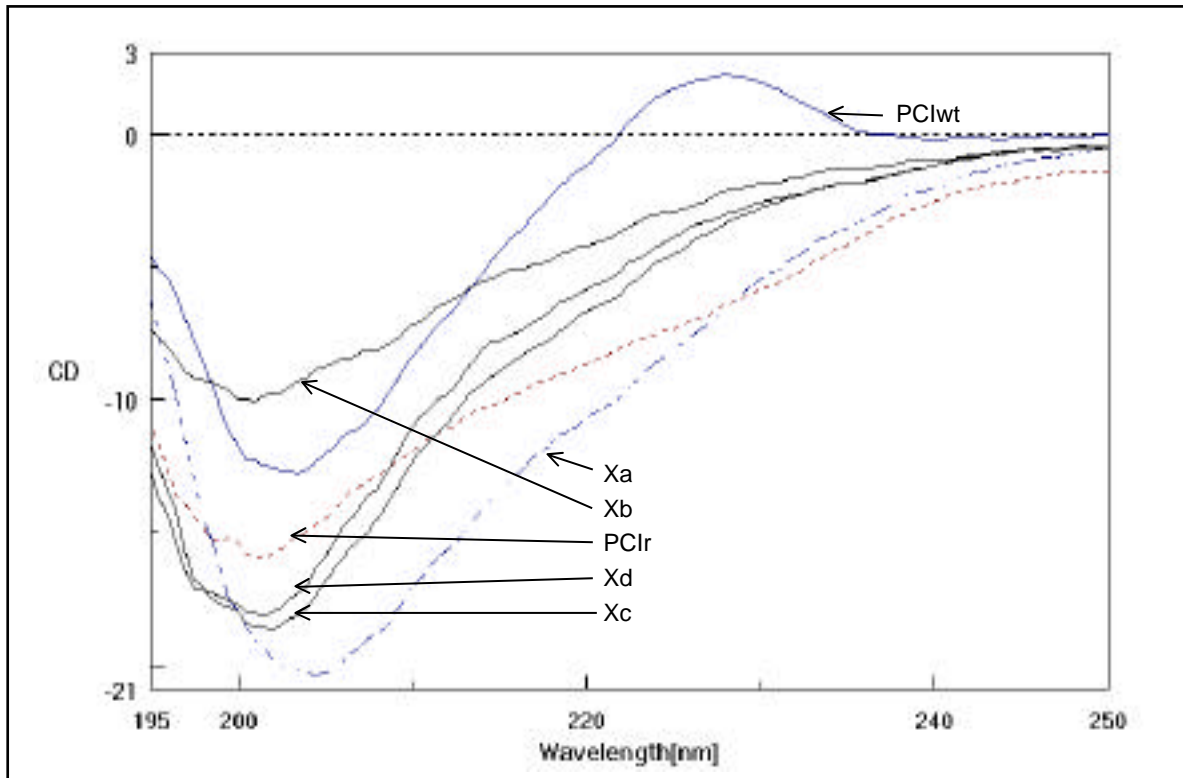


Figura IV: B. 4. 1. 1. 4. Espectros de dicroísmo circular de PCI nativo, su forma reducida y las especies intermedias en una disolución de fosfato sódico (50 mM) a pH= 7.0.

IV. B. 4. 1. 2. ESTUDIO DE LOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE PCI NATIVO, PCI REDUCIDO Y LAS ESPECIES SCRAMBLED EN PRESENCIA DE UREA.

Como intento de comprobación de si existe alguna estructura que se vería afectada por la presencia de desnaturante, provocando cambios en el espectro de CD, se preparó un conjunto de muestras en disoluciones de 2, 4, 6 y 8 M urea en tampón glicina 25 mM (pH= 3.0) o tampón fosfato sódico 50 mM (pH= 7.0) (III. D. 4. 1. 2.).

Comparando los espectros dicroicos obtenidos del PCI (figuras IV. B. 4. 1. 2. 1.; IV. B. 4. 1. 2. 2. y IV. B. 4. 1. 2. 3), se observa que la existencia de urea en el medio no afecta su máximo característico a 227 nm, ni en tampón glicina a pH= 3.0 y tampoco en tampón fosfato a pH = 7.0. Por lo que respecta a los mínimos, observamos que el mínimo característico se ha desplazado de 204 nm a 210- 212 nm.

De los espectros realizados con la especie reducida y las especies scrambled (Xa y Xb) (figura IV. B. 4. 1. 2. 4.) en tampón glicina y en presencia de 6M urea no puede obtenerse ninguna información significativa. Los espectros no presentan ningún máximo, al igual que ocurría en ausencia de urea, y los mínimos no pueden apreciarse al quedar por debajo de la zona de absorción de la urea.

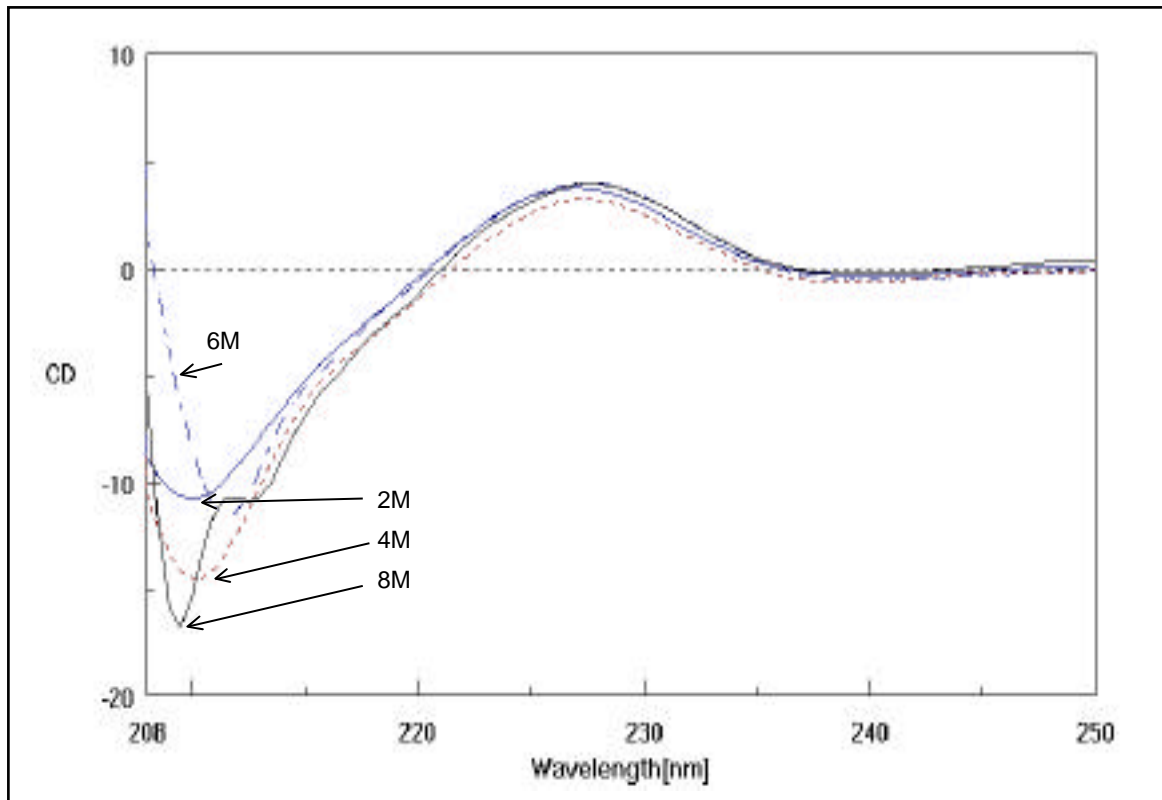


Figura IV. B. 4. 1. 2. 1. Espectros de CD de PCI en tampón glicina (25mM, pH= 3.0) a diferentes concentraciones de urea: 2, 4, 6 y 8 M.

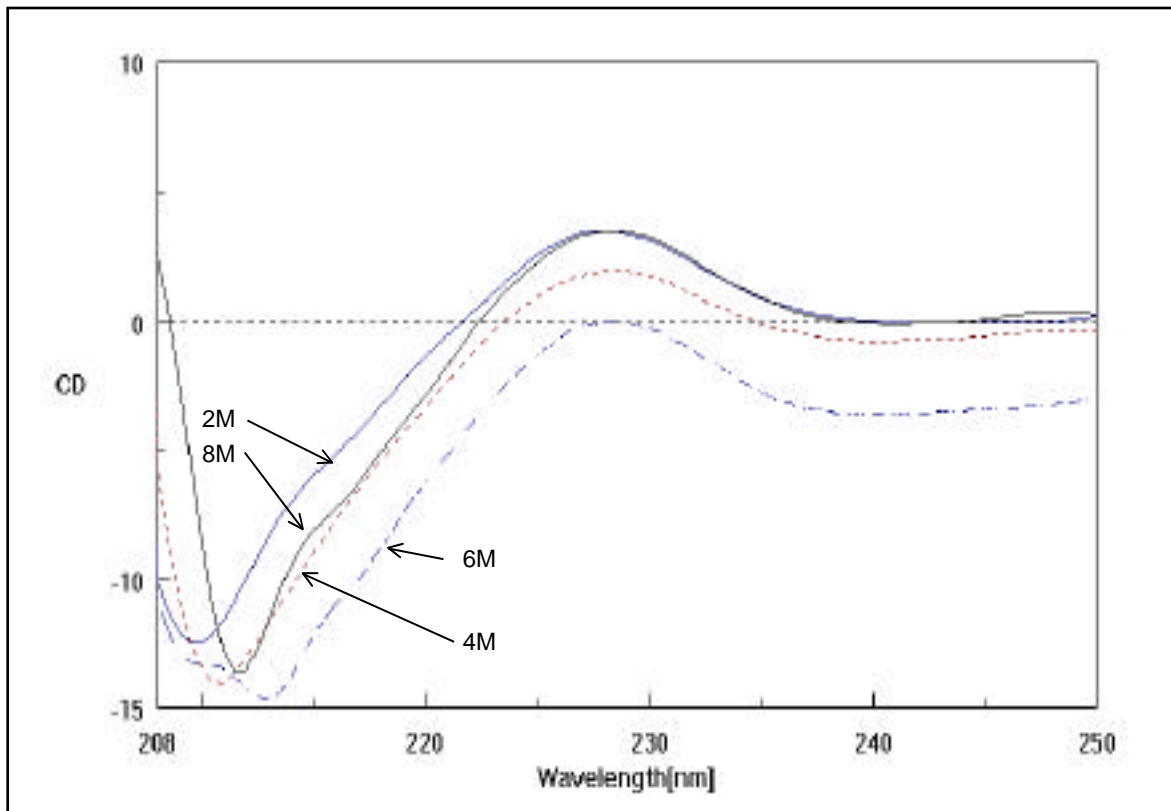


Figura IV. B. 4. 1. 2. 2. Espectros de CD de PCI en tampón fosfato (50 mM, pH= 7.0) a diferentes concentraciones de urea: 2, 4, 6 y 8 M.

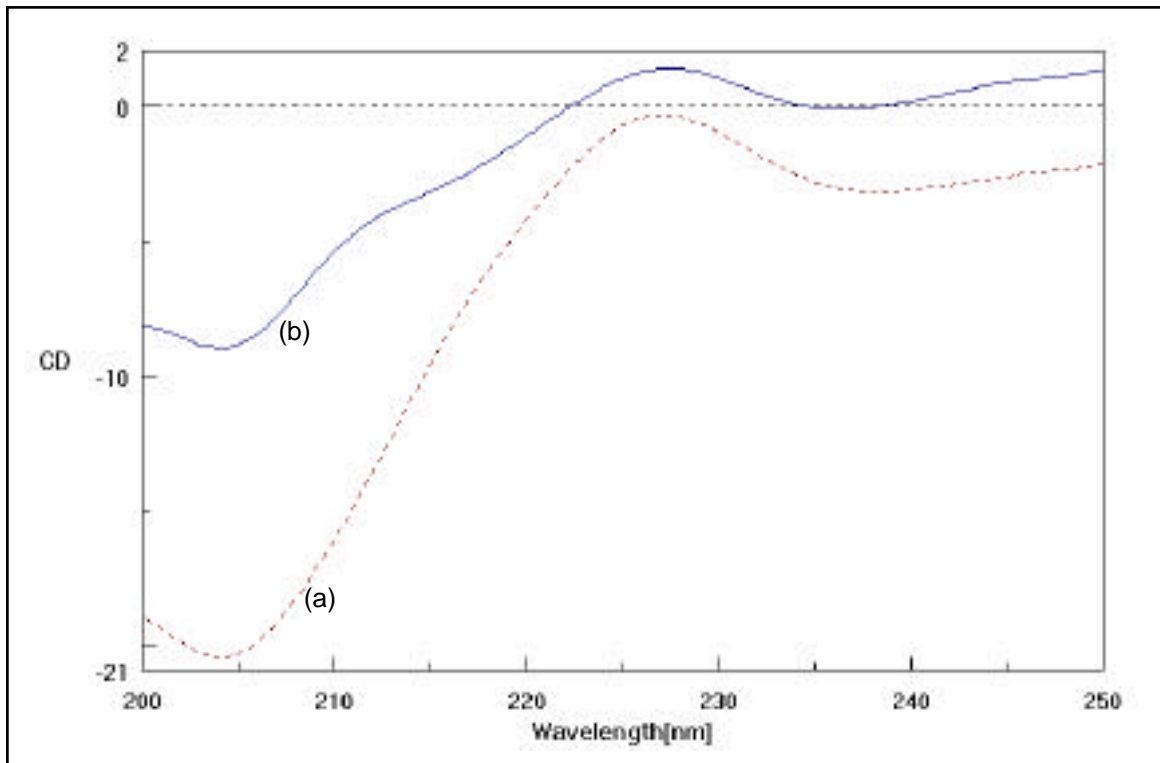


Figura IV. B. 4. 1. 2. 3. Espectros de CD de PCI en tampón glicina (a)(25mM, pH= 3.0) y en tampón fosfato (b) (50 mM, pH= 7.0) sin urea.

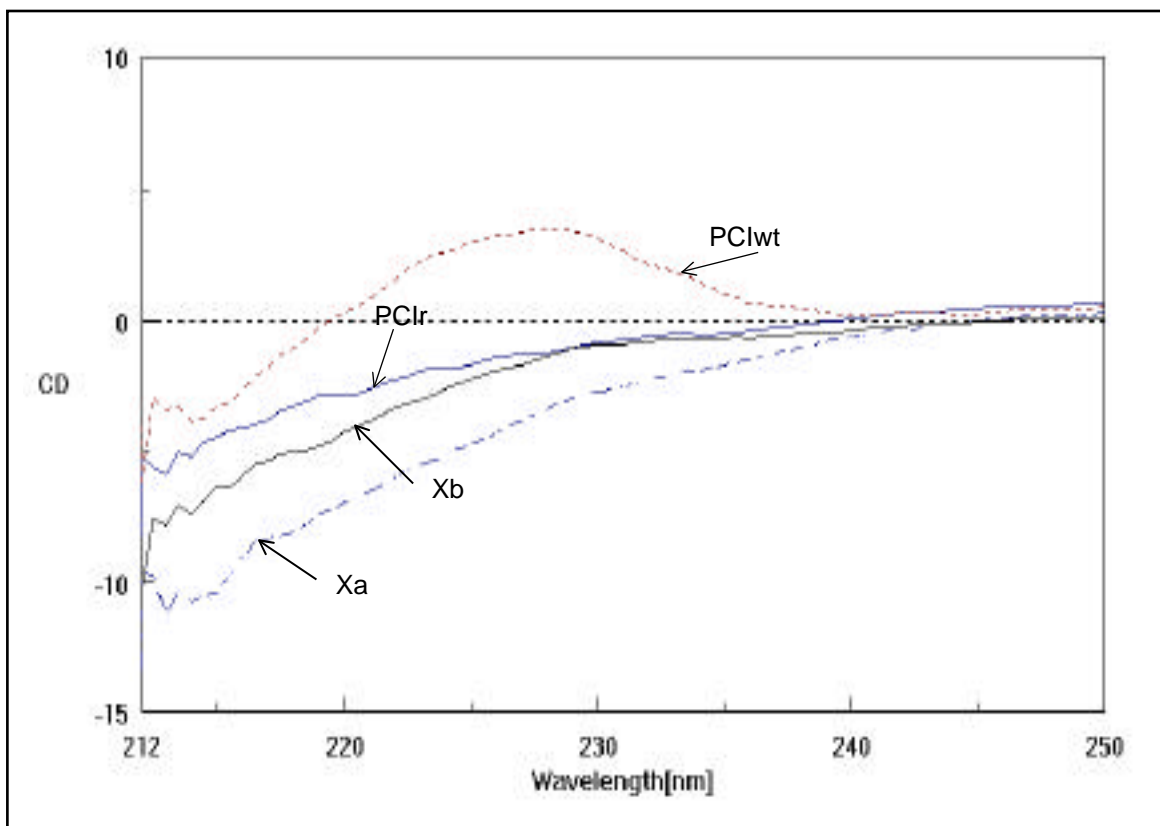


Figura IV. B. 4. 1. 2. 4. Espectros de dicroísmo circular del PCIwt, PCI reducido, Xa y Xb en tampón glicina a pH=3.0 y a una concentración de urea 6 M.

IV. B. 4. 2. ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN) SOBRE LA CONFORMACION DE INTERMEDIARIOS DEL PLEGAMIENTO DEL PCI.

Complementando los estudios conformacionales cualitativos de los intermediarios de plegamiento del PCI realizados mediante espectroscopía de dicroísmo circular (IV. B. 4. 1.), se realizaron estudios mediante Resonancia Magnética Nuclear. Debido a la transitoriedad de muchos de dichos intermediarios, y a su conformación no compacta o definida, ha dificultado la aplicación de técnicas espectroscópicas habituales (difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear ...etc) y consecuentemente existen en la literatura científica pocos ejemplos previos que hayan tenido éxito.

Los estudios de NMR fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Manuel Rico, del Instituto de Estructura de la Materia del CSIC, en Madrid, especialistas en dicha metodología, y más concretamente con el Dr. Carlos Gonzalez. Dado que con dicho grupo se habían obtenido recientemente los espectros bidimensionales básicos de NMR del PCI nativo que han permitido refinar su estructura en disolución (trabajo en fase de redacción), tales como tipo COSY y tipo NOESY, nos centramos en la obtención de espectros monodimensionales o bidimensionales tipo NOESY, bien completos, bien en las zonas más "sensibles" para la detección de estructura tridimensional o de sus cambios (tales como la de 7.0 a 11.0 ppm, típica de resonancias provenientes de residuos aromáticos, de His, o de NHs).

La primera lectura de los resultados obtenidos parece indicar que los intermediarios disponen de muy poca estructura terciaria, o esta es poco definida dándose múltiples formas de plegamiento de baja estabilidad. Así, en el espectro NOESY parcial que muestra el par regional zona aromática / zona alifática (figura IV. B. 4. 2. 1.), se observa una mucho menor dispersión de "picos cruzados" ("cross peaks") en uno de los intermediarios con mayor probabilidad de estructura terciaria (presenta sensibilidad a agentes desnaturalizantes, IV. C. 2.), Xa, con respecto al PCI nativo. En particular, cabe destacar la ausencia en el espectro de Xa (b) picos cruzados en la región de 11.0 a 9.0 ppm, en contraste con la forma nativa (a). Los espectros monodimensionales (figura IV. B. 4. 2. 2.) indican también una mucho menor riqueza de resonancias asignables a grupos NHs o de intercambio rápido (p.e. en la zona de 10.5 a 7.5 ppm, figura IV. B. 4. 2. 3.), así como de resonancias por "corrientes de anillo" ("ring-current shifts") en la zona de 1.0 a 0 ppm, asignables a empaquetamientos globulares alifáticos / aromáticos.

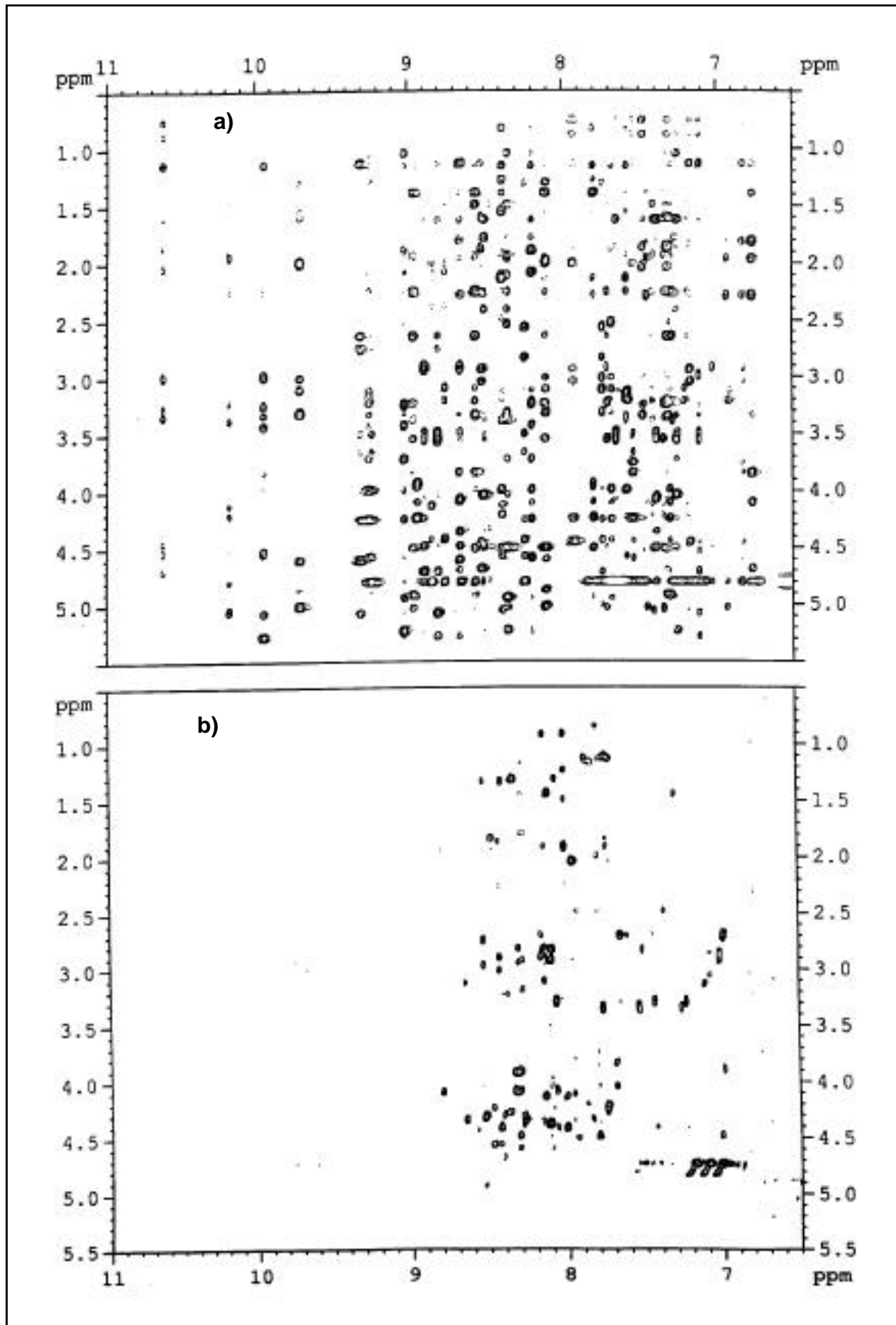


Figura IV. B. 4. 2. 1. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear 2D- NOESY del PCI nativo (a) y de la especie "scrambled" Xa (b).

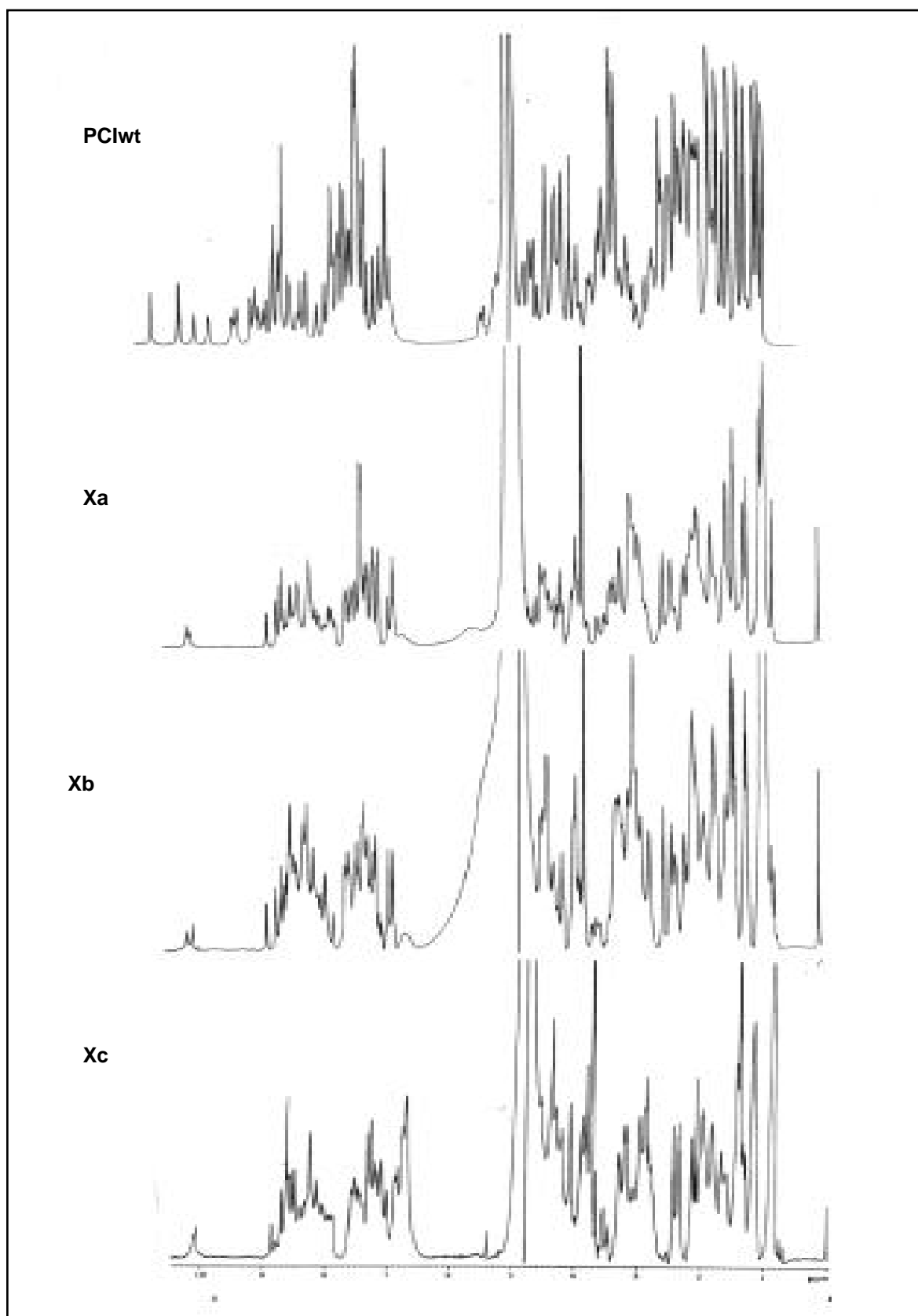


Figura IV. B. 4. 2. 2. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear monomensionales de PCI nativo y las especies scrambled Xa, Xb y Xc.

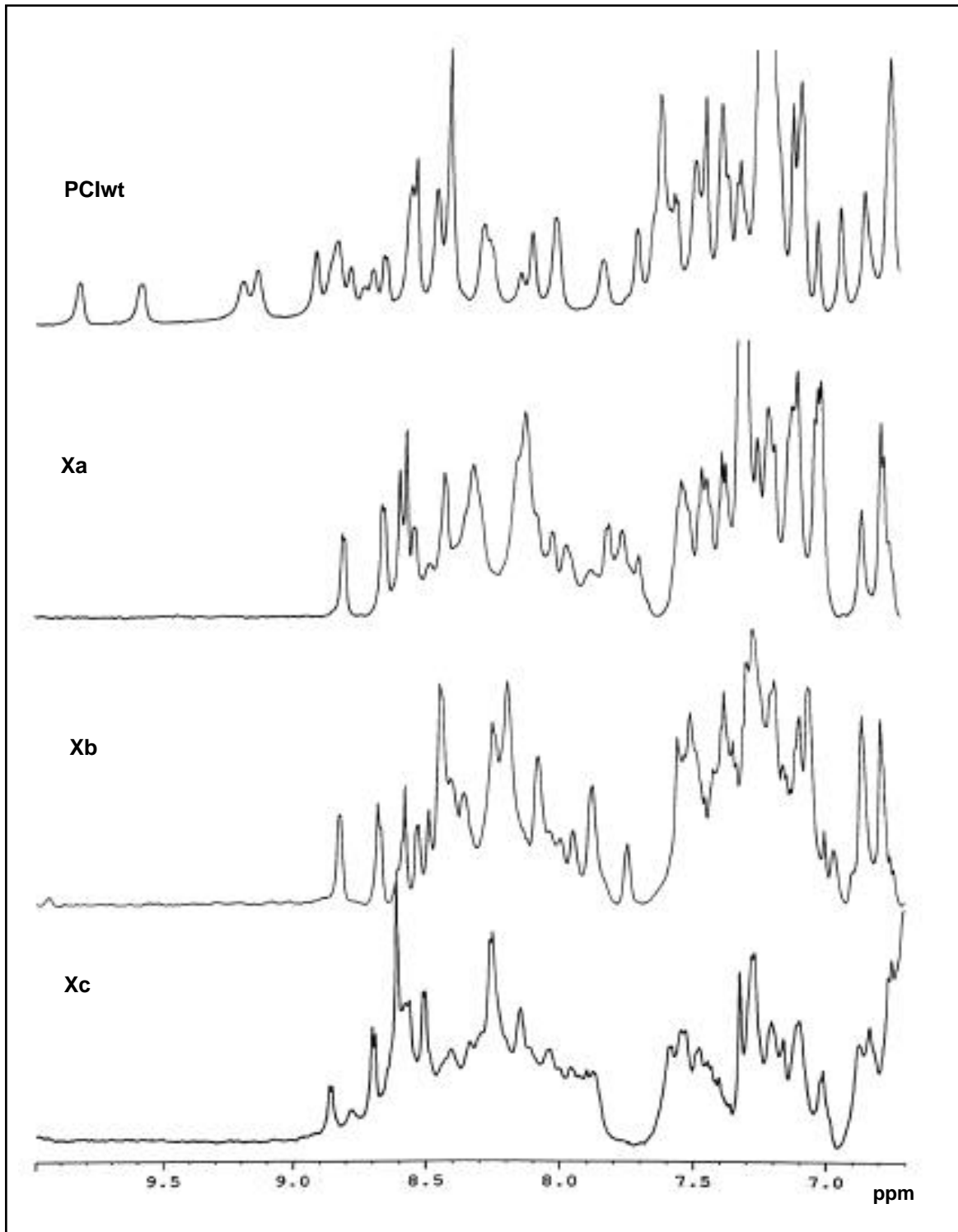


Figura IV. B. 4. 2. 3. Comparación de la zona correspondiente a las resonancias de protones de grupos aromáticos y NH's de los espectros monodimensionales del PCI nativo y las especies scrambled Xa, Xb y Xc.

Finalmente, en la figura IV. B. 4. 2. 4 se muestran los espectros obtenidos en experimentos de intercambio de protón- deuterio para en PCI nativo (a), para la forma scrambled Xa (b) y la forma scrambled Xb (c).

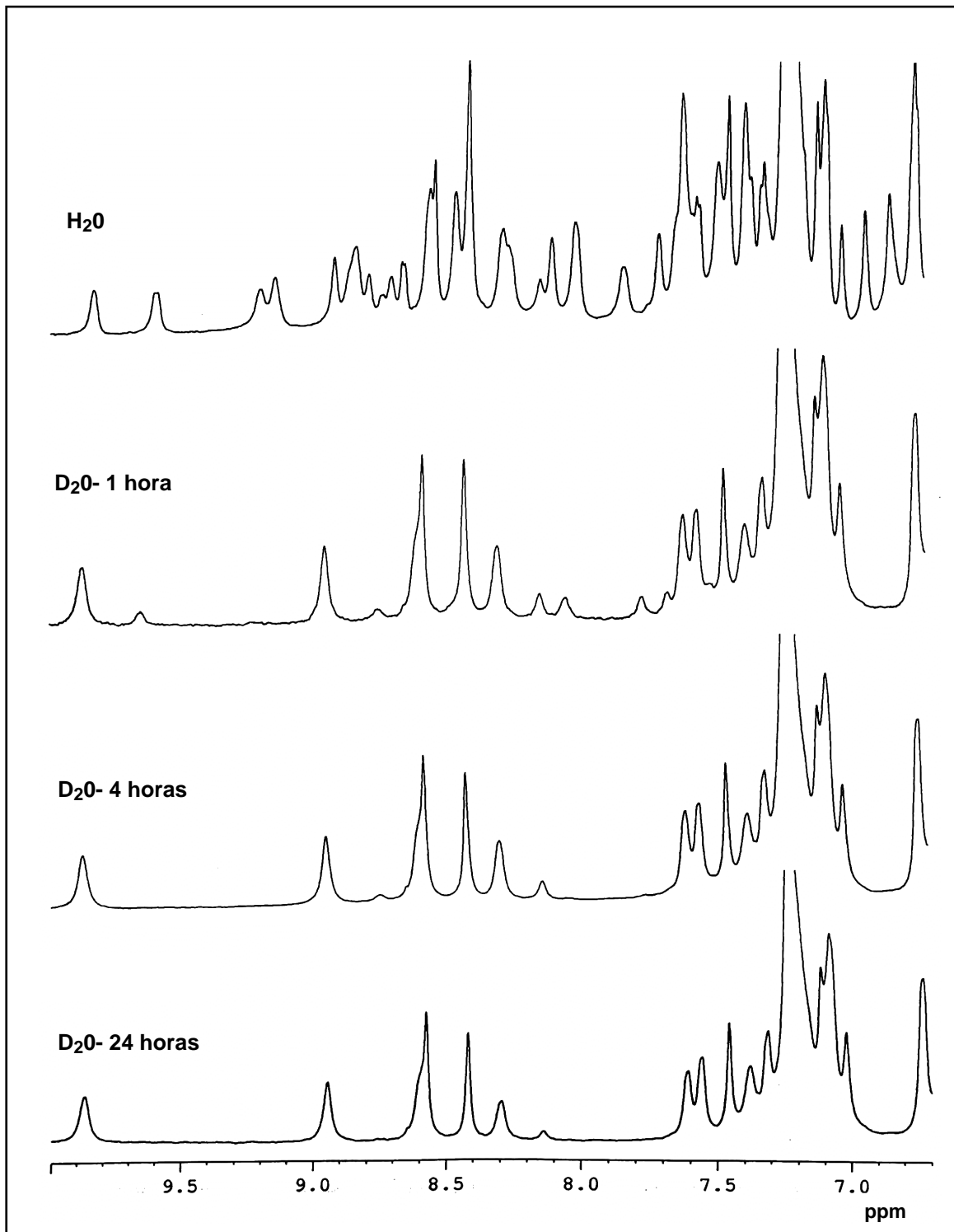


Figura IV. B. 4. 2. 4. (a). Experimento de intercambio H- D a diferentes tiempos tras la disolución de una muestra de PCI nativo.