

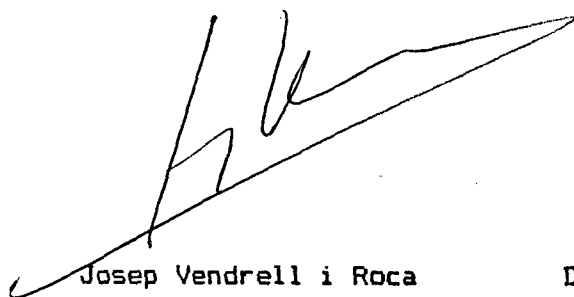


DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE CIÈNCIES
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**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

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

A diferència d'altres zimògens pancreàtics, el mecanisme d'activació de les procarboxipeptidases A és un procés conegut amb escassa profunditat. Es coneixen, per exemple, amb detall els aconteixements que tenen lloc durant l'activació de la tripsina i quimotripsina, havent-se definit les seves característiques cinètiques i identificat els residus implicats en els trencaments proteolítics que pateixen. No obstant, tant sols es disposa de dades generals sobre el mecanisme d'activació de les procarboxipeptidases A de pàncreas de bou, que fan referència a les espècies d'enzim actiu alliberades i al temps i condicions necessàries per a l'activació. A més, les dades trobades a la bibliografia són sovint parcialment contradictòries. Menys és encara el que es coneix sobre el mecanisme que presenten els corresponents zimògens de pàncreas de porc.

Diverses són les raons que justifiquen l'interès de l'estudi presentat en aquest apartat. En primer lloc, i de caire general, la presència en pàncreas porcí d'una forma monomèrica de la procarboxipeptidasa A facilita aquest estudi al fer innecessari un tractament dissociatiu previ, imprescindible en estudis que s'han dut a terme amb proteïnes de pàncreas de bou (Freisheim et al., 1967b) i que, com veurem més endavant, ha introduït factors de dubte a la interpretació dels resultats. Per altra banda, i també a diferència dels zimògens de les endopeptidases pancreàtiques més conegudes (tripsinògen, quimotripsinògen, proelastasa), l'activació *in vitro* de procarboxipeptidasa A és molt lenta, fins i tot a elevades relacions tripsina/proteïna. En darrer terme, un altre factor molt important que fa atractiu aquest estudi i que singularitza el procés que es comenta, és la considerable llargada del pèptid d'activació (94 residus en el cas del porc).

Estudis previs (San Segundo, 1982; San Segundo et al., 1982) han demostrat que, si bé l'alliberament del pèptid d'activació per proteòlisi limitada és immediat al tractament amb tripsina, la seva

degradació posterior transcorre molt més lentament, fent palesa una important resistència a la proteòlisi. En aquells estudis també es va demostrar que el pèptid aïllat es comporta com un potent inhibidor de la carboxipeptidasa A, amb una constant d'inhibició de l'ordre nanomolar.

De les característiques anteriorment descrites se'n dedueix l'interés en l'estudi del procés d'activació, que se centra en intentar conèixer les raons de la lentitud en la generació d'activitat i el tipus d'interaccions que poden tenir lloc entre l'enzim actiu i el segment o fragments del mateix generats durant la seva lenta degradació. Definint, per tant, el transcurs de l'aparició i desaparició del pèptid d'activació i dels fragments que d'ell es generen, i l'efecte que té cada un d'ells sobre l'activitat de l'enzim, es podrà accedir a un primer nivell de comprensió d'aquest fenomen.

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en l'estudi del procés d'activació de la procarboxipeptidasa A monomèrica de pàncreas de porc. Al mateix temps, i donat que diversos estudis (Freisheim et al., 1967b; Puigserver i Desnuelle, 1977; Vendrell et al., 1982) s'han referit a l'influència que sobre la velocitat d'activació pot tenir la presència d'estructura quaternària, es presenta també en alguns dels experiments un estudi comparatiu dels processos d'activació de la forma monomèrica i la forma de complex binari, ambdues presents en pàncreas porcí.

III.5.1. GENERACIÓ D'ACTIVITAT CPA

El seguiment de la conversió de PCPA en CPA per acció de la tripsina va fer-se en dos medis diferents: en fosfat sòdic a pH 6,5 i en Tris-HCl a pH 7,5 (veure II.9). Les diferències observades foren només d'ordre qualitatiu, veient-se que l'activació de la forma monomèrica a pH 6,5 era lleugerament més lenta que a pH 7,5. La forma de la corba d'activació obtinguda en els dos casos era perfectament comparable. Donada la poca importància de les diferències observades i la més completa activació obtinguda a pH 7,5, la totalitat d'experiments posteriors es van dur a terme en aquestes darreres condicions. En aquest apartat, doncs, només es farà esment dels resultats assolits a pH 7,5 en Tris-HCl 50 mM.

Quelcom semblant passa en l'apartat de comparació de l'efecte dels dos tipus de tripsina assajats. Es va activar els zimògens amb tripsines bovina i porcina, ambdues tractades amb TPCK. Els resultats foren pràcticament idèntics en els dos casos. També aquí, per evitar repeticions i perquè es disposa d'un nombre més gran d'assajos fets amb la tripsina de bou, es farà esment únicament dels resultats assolits amb aquest segon tipus de tripsina.

Donat que l'activació de les diferents PCPAs és molt lenta *in vitro* a 37° C (veure Yamasaki et al., 1963, pel cas de les formes de pàncreas de bou) i que aquest fenomen és difícil que es produeixi amb la mateixa lentitud en el duodè, on l'activació dels zimògens és indispensable per a que es doni una normal digestió, vam considerar que les condicions d'activació *in vitro* normalment utilitzades no eren un fidel reflex del procés natural (cal només recordar que les proteases activadores poden ser altres a més de la tripsina). A partir d'aquesta consideració vam adoptar la temperatura de 25° C per les activacions de les PCPAs porcines; en aquestes condicions, a l'igual que a 37° C, no s'obté una mimesi del procés que té lloc *in vivo*, però es disposa d'un lleuger enlentiment que afavoreix l'estudi de les seves diverses etapes.

A la Figura III.47 es presenta el perfil de generació d'activitat CPA al llarg del temps per acció de la tripsina sobre les dues formes de

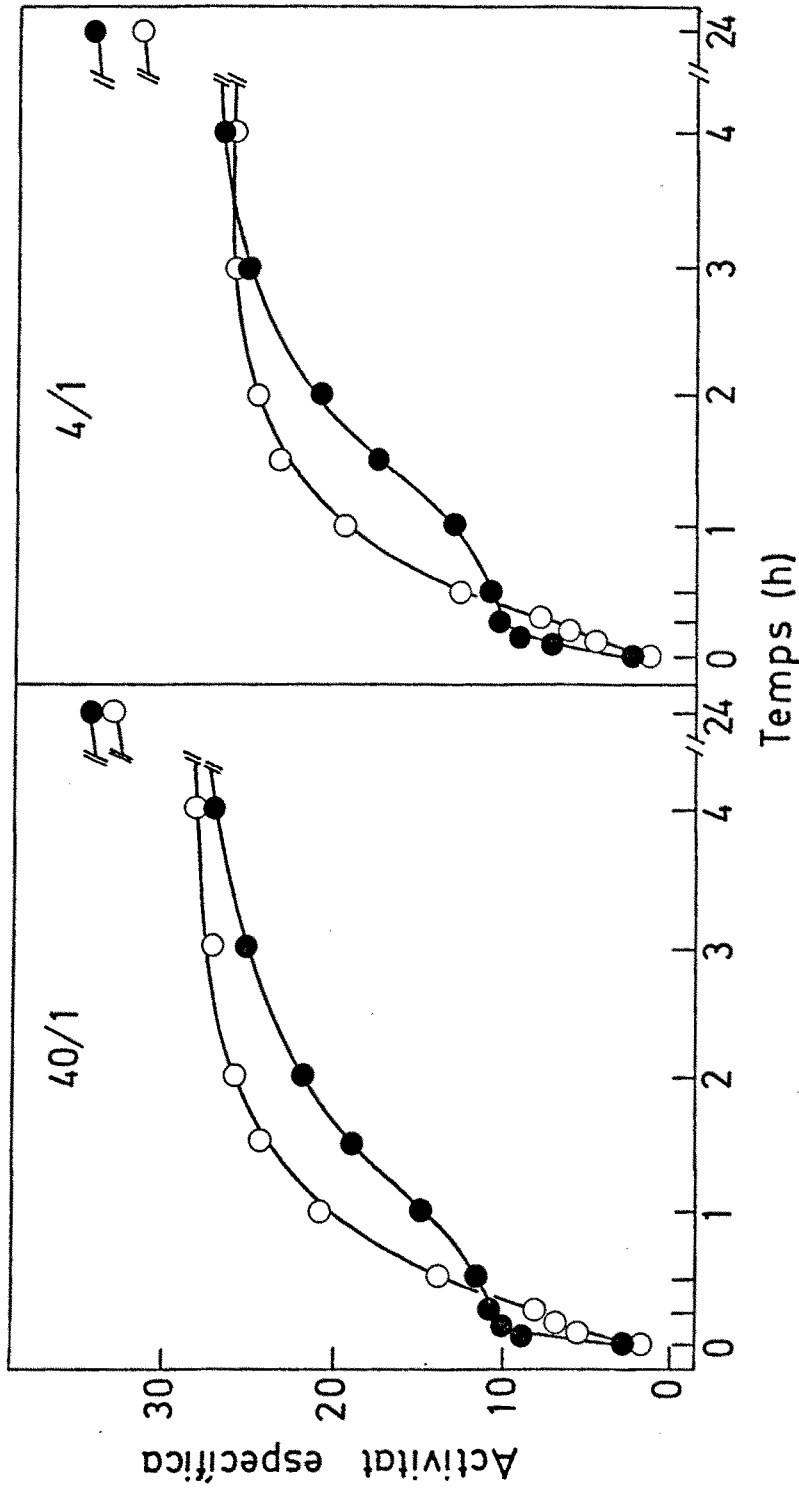


FIGURA III.47 Generació d'activitat carboxipeptidasa A per acció de la tripsina a relacions proteïna/tripsina (p/p) de 40/1 (esquerra) i 4/1 (dreta) sobre PCPA II (●) i PCPA I (○). Les activacions han estat fetes en Tris-HCl 50mM, ZnCl₂ 10⁻⁴M (pH 7,5) a 25° C i a una concentració inicial de zimògen de 22 μM.

PCPA de pàncreas de porc, a relacions proteïna/tripsina de 40/1 i 4/1 (p/p). Es pot comprovar que l'activació és lenta tant pel monòmer com pel complex binari, però que a la vegada hi han diferències qualitatives entre ambdós processos. Estudis d'activació anteriors (Martínez, 1980) havien evidenciat que la generació d'activitat CPA no és completa fins al cap d'aproximadament 2 hores, estabilitzant-se a partir d'aquest moment. Els nostres resultats, en canvi, demostren que l'activitat específica mesurada va creixent fins més enllà de les 4 hores des de l'inici de l'activació, i que el seu màxim s'assoleix abans de les 24 hores (a partir d'aquest punt l'activitat comença lentament a deprimir; resultats no presentats). Es poden trobar discrepàncies semblants amb els resultats de Kobayashi et al. (1978) on només s'estudia l'activació del complex binari.

Les dues formes de PCPA presenten camins d'activació diferents. Així, mentre que amb la forma monomèrica s'obté una expressió inicial més ràpida de l'activitat, que després creix més lentament, amb el complex binari s'observa un procés en certa manera complementari que fa que la generació d'activitat sigui lenta al començament, i que a partir d'un cert punt s'acceleri, donant valors d'activitat més elevats que el monòmer. En línies generals, la presència del zimògen E endarrereix en un principi l'expressió de l'activitat, mentre que a continuació la promou en un grau superior al que es dona en la seva absència. El canvi entre una situació i l'altra es produeix entre els 15 i els 30 minuts després de l'addició de la tripsina al medi.

No hi ha diferències importants pel que respecta als resultats assolits amb les dues relacions proteïna/tripsina emprades. L'única diferència a comentar té relació amb els valors d'activitat mesurats a temps llargs: mentre que a relació 40/1 els valors d'activitat s'igualen a temps 4 h i romanen molt semblants, a relació 4/1 la corba corresponent al monòmer ultrapassa la del complex binari entre les 2 i les 4 h. És probable que a concentracions elevades de tripsina i en presència d'una altra proteïnasa (la PFE), es pugui començar a produir degradació de l'enzim actiu, el que explicaria el descens d'activitat en relació amb la forma monomèrica. En tot cas, i en el marge de condicions estudiades, es pot afirmar que l'activació de les PCFAs és

relativament independent de la concentració de tripsina utilitzada. Yamasaki et al. (1963) havien arribat a conclusions semblants amb la PCPA S6 de pàncreas de bou.

En comparació amb els resultats prèviament publicats que fan referència a les PCPAs de pàncreas de bou, les gràfiques presentades a la Figura III.47 coincideixen en l'aspecte de la lentitud del procés general. No obstant, totes les dades de que es disposa en bou (no molt abundants, per altra part), fan referència a l'enlentiment que l'estructura quaternària produeix sobre l'activació de la subunitat precursora de la CPA. Així, Freisheim et al. (1967b) i Puigserver i Desnuelle (1977) observen que la subunitat PCPA aïllada dels complexos ternaris per dos mètodes diferents expressa la seva activitat més ràpidament i en major grau que quan està inclosa en un complex binari o ternari, tant a temps curts com a temps finals d'activació. Les diferències observades entre una i altra forma són, no obstant, tant importants, que no es pot descartar que el fet de treballar amb monòmers aïllats artificialment i, per tant, no naturals, introdueixi una component de labilitat adquirida que faci que aquestes formes siguin menys resistents a l'activació.

Per altra banda, Freisheim et al. (1967b) observen també que l'activació de la subunitat PCPA aïllada és un procés bifàsic, on apareix un replà d'activitat entre els minuts 15 i 30 aproximadament. Els autors adjudiquen aquest procés en dos passos a la deacilació de dues succinil-tirosines i a un possible canvi conformacional que la fa possible. No obstant això, el mateix tipus de procés s'observa amb la PCPA monomèrica de pàncreas de porc, proteïna present naturalment al pàncreas, el que elimina en part la possibilitat que la deacilació sigui la responsable d'aquest fenomen, tot i recordant que es tracta de proteïnes d'espècies diferents. Això voldria indicar que aquest replà observat a la corba d'activació és una característica consustancial del procés, indicativa d'un possible canvi conformacional o de l'existència d'una espècie transitòria, i, com es veurà més endavant i també apunten Freisheim i col., de la progressiva desaparició del medi del segment d'activació complet, que és el que presenta una més gran afinitat per l'enzim.

També es va estudiar la influència dels cations Ca^{2+} i Tb^{3+} sobre el procés de generació d'activitat CPA. Diversos autors havien aportat dades sobre la influència que els cations calci exerceixen sobre la rapidesa de l'activació dels proenzims de bou. En alguns casos (Uren i Neurath, 1972) s'interpretava que l'efecte tenia lloc mitjançant un relaxament de l'estructura quaternària que eliminava l'efecte retardant de l'activació que aquesta tenia sobre la subunitat PCPA. Aquesta versió no era congruent amb l'efecte positiu que els ions Ca^{2+} tenien sobre PCPA monomèriques (Lacko i Neurath, 1970; Reeck i Neurath, 1972), com discutien Puigserver i Desnuelle (1977) al considerar aquesta qüestió. Per altra banda, Freisheim et al. (1967b) no observaren una disminució de la velocitat d'activació de la PCPA succinil·lada en absència d'ions calci; ans al contrari, el monòmer s'activa amb gran velocitat en aquest darrer cas. Per altra banda, en l'únic treball de què es disposa sobre les PCPAs porcines (Kobayashi et al., 1978), no s'utilitza Ca^{2+} en l'activació, i s'obtenen unes corbes de generació d'activitat que indiquen que aquesta transcorre tant ràpidament com estava descrit per a les formes bovines en presència de Ca^{2+} . En treballs previs (Martínez, 1980; San Segundo, 1982) fets en el nostre grup no s'havia observat dependència del procés d'activació en cap mena de catió.

Així, en principi, ultra certes contradiccions en la bibliografia pel que respecta a les proteïnes de bou, no semblava que el calci tingués efecte sobre les PCPA porcines. No obstant, recents treballs del grup han tornat a posar èmfasi en aquesta qüestió, en trobar importants relacions estructurals entre el saA i les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand. Degut a això hem realitzat estudis d'activació triptica de les PCPA porcines en absència i presència de Ca^{2+} i Tb^{3+} , aquest darrer un isòster del primer del que s'ha demostrat que s'uneix fortament al saA (Vilanova, 1987; Avilés et al., 1987). A la Figura III.48 es presenten les corbes de generació d'activitat CPA per acció de la tripsina en presència d'ions Ca^{2+} i Tb^{3+} , ambdós a concentració 2 mM. Si bé resulta evident la relació del segment d'activació amb les proteïnes fixadores de calci, i l'efecte que l'ió terbi té sobre el mateix (veure els treballs esmentats), cap d'aquests cations té un efecte positiu sobre el procés d'activació. Es pot

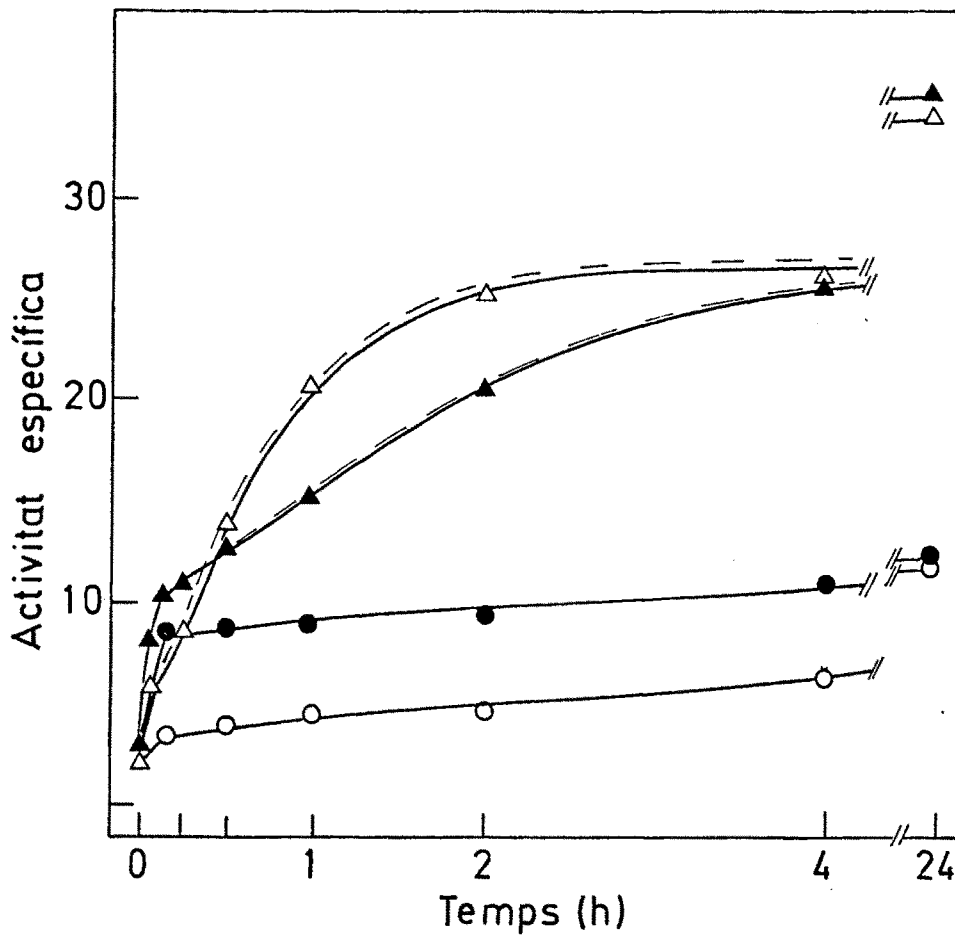


FIGURA III.48 Generació d'activitat CPA per acció de la tripsina a relació proteïna/tripsina 40/1 (p/p). Condicions idèntiques a les de la Figura III.47, amb l'addició de Ca^{2+} 2mM (▲, PCPA II; △, PCPA I) o Tb^{3+} 2mM (●, PCPA II; ○, PCPA I). Les línies en traç discontinu fan referència a les corbes de la figura anterior en absència d'ions.

comprovar que la presència de Ca^{2+} no afecta en absolut la cinètica de generació d'activitat, mentre que el terbi, del que sí s'ha demostrat que s'uneix al segment, provoca un enlentiment de l'activació. Aquest enlentiment podria, però, ser adjudicat, a una certa agregació que aquest catió provoca en les procarboxipeptidases, i especialment en la tripsina, reduint a l'hora el nombre de molècules susceptibles de ser activades i el nombre de molècules activadores. Aquestes consideracions són vàlides tant per al monòmer com per a la forma en complex binari. Cal afegir que anàlisis electroforètiques del procés d'activació (resultats no presentats) indiquen que en presència de Tb^{3+} també es produeix CPA i saA (i fragments) des dels primers minuts de l'addició de tripsina, a l'igual que en les mostres de referència i amb Ca^{2+} . Probablement convindria en el futur repetir aquests experiments en presència de concentracions molt menors de Tb^{3+} a fi d'evitar efectes laterals indesitjats.

III.5.2. SEGUIMENT DE L'ACTIVACIÓ PER ELECTROFORESI HOMOGÈNIA

En estudis anteriors fets en el si del nostre grup (Martínez, 1980; San Segundo, 1982) s'havia analitzat el progrés de l'activació de les dues PCPA per electroforesi en poliacrilamida-SDS i en gradient de poliacrilamida-SDS. Aquestes tècniques només eren capaces de donar compte de la generació de segment d'activació i de la seva desaparició, però no permetien seguir l'aparició de fragments més curts del segment o la possible conversió d'una forma de CPA en una altra. Els dos tipus d'electroforesi aquí utilitzats permeten analitzar pèptids de pes molecular inferior als analitzables amb les electroforesis convencionals en SDS i destriar entre espècies diferents del mateix (o gairebé el mateix) pes molecular. Cal remarcar, no obstant, que en el cas de l'electroforesi de baix pes molecular (en urea 7M - SDS) els fragments curts, tot i sent visibles i clarament separats, poden presentar un pes molecular aparent erroni.

III.5.2.a. ELECTROFORESI EN UREA 7 M - SDS

Al mateix temps que se seguia la generació d'activitat CPA en l'experiment de l'apartat anterior es van anar agafant al·lquotes de la barreja d'activació, que eren immediatament sotmeses a un tractament per inhibir el progrés de l'atac triptíc sobre les espècies generades i posteriorment analitzades per electroforesi. La inhibició es promovia mitjançant l'addició de PMSF i STI, per aquest ordre, a la barreja d'activació, seguida de l'addició de tampó d'aplicació de mostres per electroforesi (amb 2-mercaptoetanol) i escalfament immediat a 100° C (veure II.9.3.). A la Figura III.49 es mostra el resultat de l'anàlisi de les al·lquotes inhibides per electroforesi en urea 7 M - SDS.

De la mateixa manera que succeeix amb la major part de zimògens coneguts, el trencament dels enllaços que alliberen la forma activa es produeix de forma pràcticament immediata a l'atac per la proteïnasa activant. Pot comprovar-se que, a temps tant curts com 1 minut d'activació, la conversió de PCPA en CPA i segment d'activació és total, i que aquesta afirmació és vàlida per les dues PCPA i per les dues relacions de PCPA/tripsina emprades. Per tant, la presència del complex binari no fa disminuir l'accessibilitat de la tripsina a l'enllaç activador. Aquests resultats, considerats en conjunt amb els de generació d'activitat, suggereixen que l'estructura quaternària no impideix l'activació sinó que modifica l'expressió de l'activitat de l'enzim alliberat mitjançant un canvi en les interaccions entre les espècies presents.

El segment generat a temps curts d'activació té un pes molecular aparent d'aproximadament 11.000. Aquest valor coincideix amb dades prèviament publicades (San Segundo, 1982) i indica que el fragment alliberat en primer terme conté la totalitat del pèptid d'activació. La banda electroforètica a que es fa referència segueix present al medi d'activació fins aproximadament les dues hores en el cas de la PCPA II i fins els 30 minuts en el de la PCPA I. Malgrat que el nivell de definició d'aquesta tècnica electroforètica no permeti assegurar-ho, algunes anàlisis semblaven indicar que aquesta banda pot ser en realitat un doblet de dues bandes que representarien espècies diferenciades per

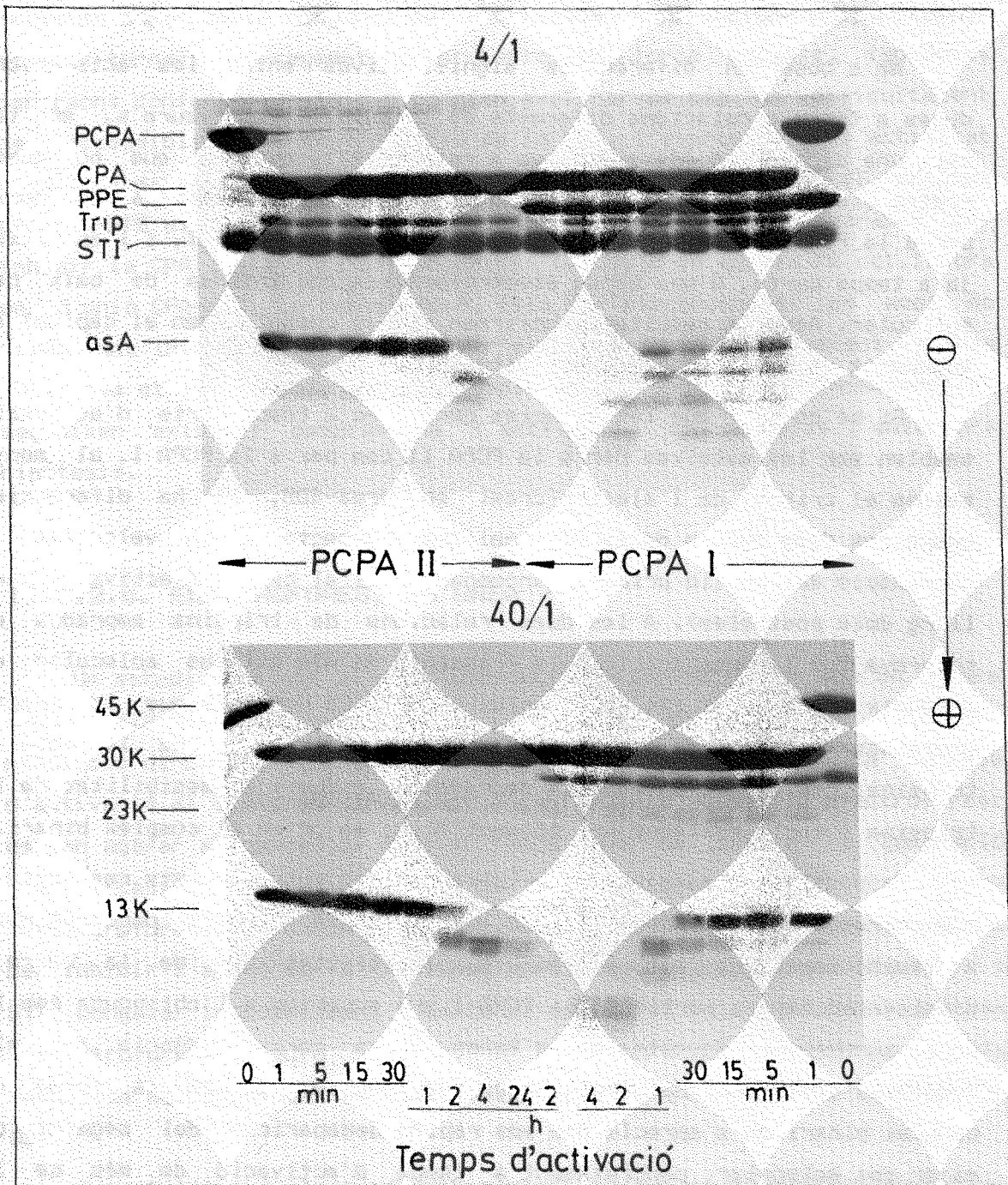


FIGURA III.49. Anàlisi per electroforesi en gels de poliacrilamida en urea 7M-SDS de mostres agafades al llarg de l'activació triptica de la PCPA II (esquerra) i PCPA I (dreta). Condicions de l'activació, com a la Figura III.47, a relacions proteïna/tripsina (p/p) de 4/1 (part superior) i 40/1 (part inferior). A l'electroforesi feta a relació 4/1 no es presenta el temps d'activació de 24 hores.

pocs residus aminoàcids.

No s'observen diferències significatives entre les activacions dutes a terme a relacions diferents de tripsina. Pot veure's, en tot cas, una degradació més extensiva a relació 4/1, que fa que no quedi rastre electroforètic del segment o de fragments del mateix a 24 hores per a la PCPA II i a pràcticament 4 hores per a la PCPA I, i l'aparició, ja a temps curts, d'una banda electroforètica poc intensa de baix pes molecular. Aquests resultats confirmen els ja comentats en el capítol de seguiment de la generació d'activitat CPA.

Si bé és cert que les espècies generades a temps curts d'activació semblen ser les mateixes per a la PCPA II com per a la PCPA I, al menys segons el criteri de l'electroforesi en urea-SDS, hi ha diferències entre les dues formes de la PCPA pel que respecta a la velocitat de degradació del pèptid primari (anomenant així al pèptid d'activació més llarg dels possibles). A les dues relacions de tripsina emprades es comprova que la desaparició dels fragments de més alt pes molecular es produeix abans en el cas del complex binari. És possible que la pròpia proteïnasa E, generada a partir del zimògen E per acció de la mateixa tripsina, col.labori en aquesta degradació, o que l'accessibilitat de la tripsina a certs enllaços del segment sigui major en el complex binari.

Es possible plantejar una primera relació entre aquests resultats i els corresponents a la generació d'activitat CPA. S'havia comprovat que, a temps superiors als 30 minuts, l'activitat CPA de la barreja d'activació feta a partir de la PCPA I era superior a l'obtinguda amb la forma monomèrica. Aquestes dades tenen clara correspondència amb els resultats de l'electroforesi, on es comprova que és en la forma de complex binari on s'aprecia una més ràpida desaparició del segment de major pes molecular, concretament a temps d'activació de més de 30 minuts. En tal cas es planteja, però, una altra qüestió: com és que l'activitat CPA sigui inferior en el complex binari durant els primers minuts posteriors a l'atac triptic? Possiblement, aquesta inversió inicial de l'expressió d'activitat no tingui res a veure amb l'eficiència de l'atac triptic inicial, que hem comprovat que ha de ser del mateix grau en els dos casos. Més raonable sembla pensar que, mentre el segment d'alt pes molecular no és degradat (per acció de la

tripsina o per acció conjunta de la tripsina i la proteïnasa E), el complex ternari CPA-segment-PE, probablement força estable, impideix, per raons conformacionals que podrien explicar-se com un dificultament de l'accessibilitat al centre actiu de la CPA, l'expressió de l'activitat d'aquesta darrera. Es podria fins i tot pensar que en el complex CPA-saA-PPE el segment adopta una posició espacial més favorable per inhibir la CPA que a dins del proenzima natiu, o bé que la PE col·labora en la unió CPA-saA. La demostració, feta per electroforesi en medi no dissociant (San Segundo, 1982) i per electroforesi en gradient d'urea (Vilanova et al., 1985), que els complexos CPA-segment o CPA-segment-PE segueixen existint després de l'activació, abonen les anteriors hipòtesis.

III.5.2.b. ELECTROFORESI EN UREA 7 M

Un estudi semblant al de l'apartat anterior es va fer amb un altre tipus d'electroforesi, en urea 7M i absència de SDS, que dóna una resolució de bandes diferent. Per l'anàlisi de mostres de la barreja d'activació al llarg del temps mitjançant aquest tipus d'electroforesi es van agafar al·lotes al mateix temps que se seguia la generació d'activitat, de manera idèntica a la que es feia per l'altre tipus d'electroforesi; l'única diferència consistia en el procediment emprat per inhibir l'acció de la tripsina, consistent en afegir al medi PMSF i STI, congelar immediatament i mantenir en aquest estat fins el moment de l'electroforesi (veure II.9.3). A la Figura III.50 es veuen els resultats del seguiment de l'activació en gels en urea 7 M i absència de SDS.

Aquest tipus d'electroforesi permet analitzar independentment les dues formes de CPA porcina generades per acció triptica sobre la PCPA: CPA α i CPA β . Les dues CPA es diferencien en el seu aminoàcid N-terminal, essent la forma β el producte de la pèrdua d'un dipèptid Ala-Arg per part de la forma α (Folk, 1963). En aquests gels de poliacrilamida en medi dissociant la forma β és la que presenta un major desplaçament electroforètic (Vilanova et al., 1985) degut a la pèrdua

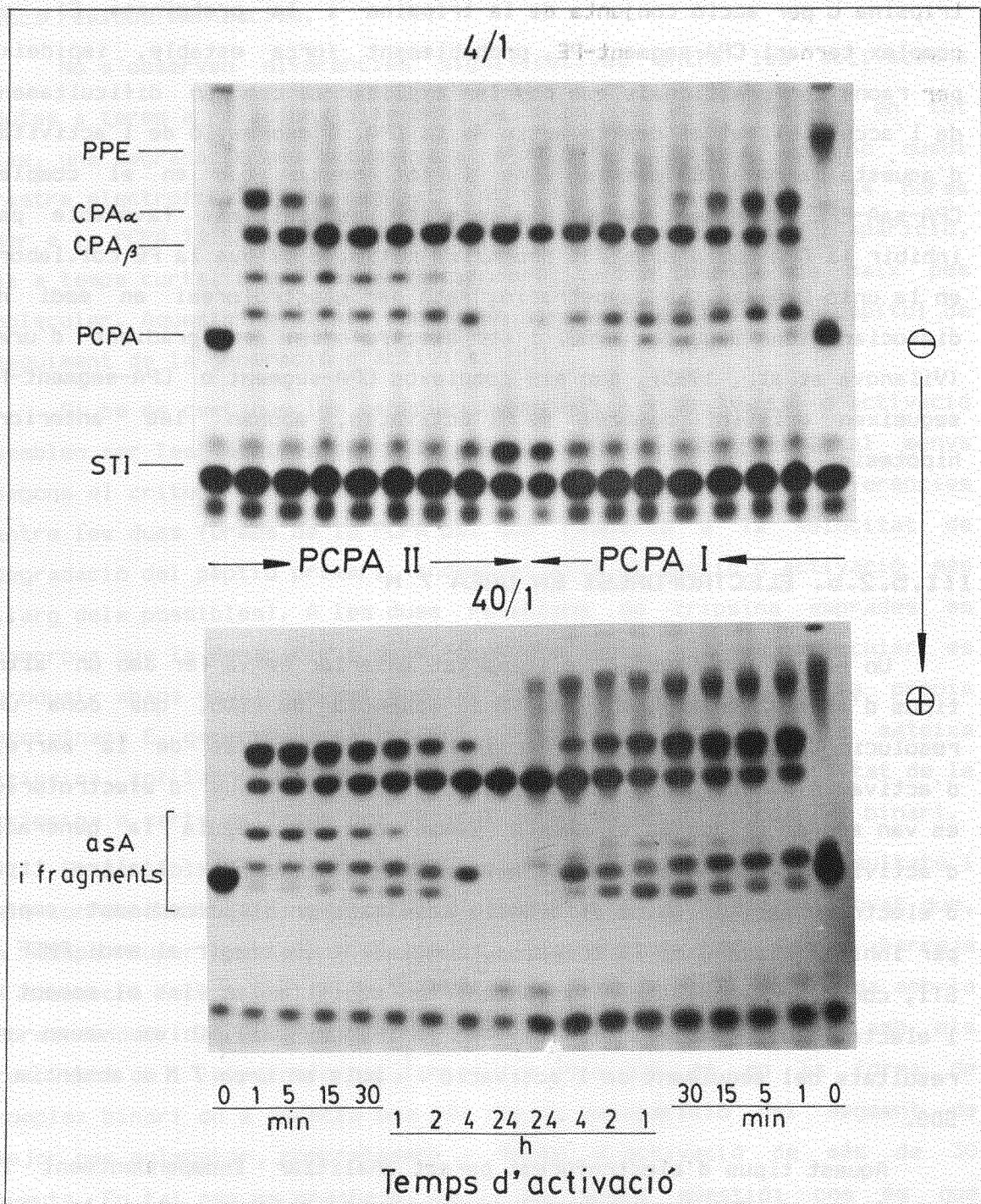


FIGURA III.50. Anàlisi per electroforesi en gels de poliacrilamida en urea 7M del procés d'activació triptic de la PCPA II (esquerra) i la PCPA I (dreta). Condicions d'activació, com a la Figura III.47, a relacions proteïna/tripsina (p/p) de 4/1 (part superior) i 40/1 (part inferior).

d'una càrrega positiva, el que la fa avançar cap al pol positiu.

La informació obtinguda amb aquesta mena de gels és en certa manera complementària a la que proporcionen els gels fets amb SDS. Es torna a comprovar, per exemple, que el trencament de l'enllaç que uneix enzim i segment és immediat després del tractament tríptic i que les diferències entre les activacions a relacions proteïna/tripsina 4/1 i 40/1 no són importants pel que respecta al tipus i proporció dels diferents fragments generats. Es poden fer, però, algunes observacions que no són evidents en els gels fets en presència de SDS:

- * Es comprova que la banda de segment de més alt pes molecular de la Fig. III.49 és en realitat un doblet de bandes i consta de dues espècies diferents segons criteris d'electroforesi en urea 7 M, tal com l'electroforesi en presència de SDS permetia intuir però no confirmava. A l'apartat III.5.4 s'aportaran proves experimentals d'aquesta assignació, que aquí es dedueix de la presència de dues bandes a temps 1 min.
- * Un dels components del doblet de bandes esmentat és absent a les mostres d'activació de la PCPA I. El component que es detecta en l'electroforesi en presència de SDS és el de menor pes molecular dels dos (veure també III.5.4).
- * Si bé no hi han diferències entre les activacions a 4/1 i 40/1 pel que respecta als fragments generats, si n'hi ha pel que respecta a les formes de CPA presents durant l'activació: la forma α desapareix del medi entre els 15 i 30 minuts a relació proteïna/ tripsina 4/1, tant per la PCPA II com per la PCPA I, mentre que a relació 40/1 sembla ser molt més resistent i romandre present fins a temps d'activació tant llargs com 4 hores en ambdós casos.

Si les corbes de generació d'activitat CPA a les dues relacions de tripsina activants no presenten diferències importants, és possible

deduir que la presència en el medi d'una forma de CPA o d'una altra no és un factor rellevant en el procés d'activació i que no és necessària la presència d'una forma concreta d'enzim per a que l'activitat es manifesti. El fet que les dues formes tinguin en estat aïllat una activitat específica semblant (Folk et al., 1963; Serra et al., 1986) recolça aquest punt de vista. Una primera conclusió general que es pot treure és, doncs, que la transformació d'una forma de CPA en una altra no té un reflex important en la generació d'activitat.

La desaparició de la banda de menor desplaçament electroforètic de la zona dels pèptids (adjudicada, com hem vist a l'espècie de major pes molecular i, per tant, al segment sencer) és simultània al creixement de l'activitat, tal com demostra l'anàlisi dels gels per densitometria (veure més endavant). Aquesta banda no és pràcticament present a les activacions de la PCPA I, amb el que es pot deduir que no és el segment més llarg possible el responsable de la inhibició inicial observada en aquest cas, sino que, possiblement, l'altre component del doblet aparegut en la electroforesi en urea-SDS manté la capacitat d'interaccionar amb el complex binari d'enzims proteolítics format per la CPA i la PPE.

Es va quantificar la intensitat de les diferents bandes electroforètiques mitjançant densitogrames dels gels en urea 7 M, i els resultats corresponents a la PCPA II es presenten a la Figura III.51. Es pot comprovar que la generació de segment d'activació o de fragments del mateix segueix un camí semblant tant a relació 4/1 com a relació 40/1. Insistent en el que es deia en el paràgraf anterior, és interessant observar que el grau de desaparició del fragment de desplaçament electroforètic més lent corre paral·lel al d'aparició de l'activitat CPA (comparar amb la Figura III.44). Aquest resultat permet circumscriure al segment d'activació complet la responsabilitat de la inhibició de la CPA o, al menys, la qualitat de ser el fragment amb més afinitat per l'enzim actiu.

Com ja s'ha dit prèviament, les diferències entre les activacions a relacions PCPA/tripsina 4/1 i 40/1 es manifesten principalment en les proporcions de les diferents espècies de CPA en el medi. Els densitogrames de la Figura III.50 corroboren aquest fet.

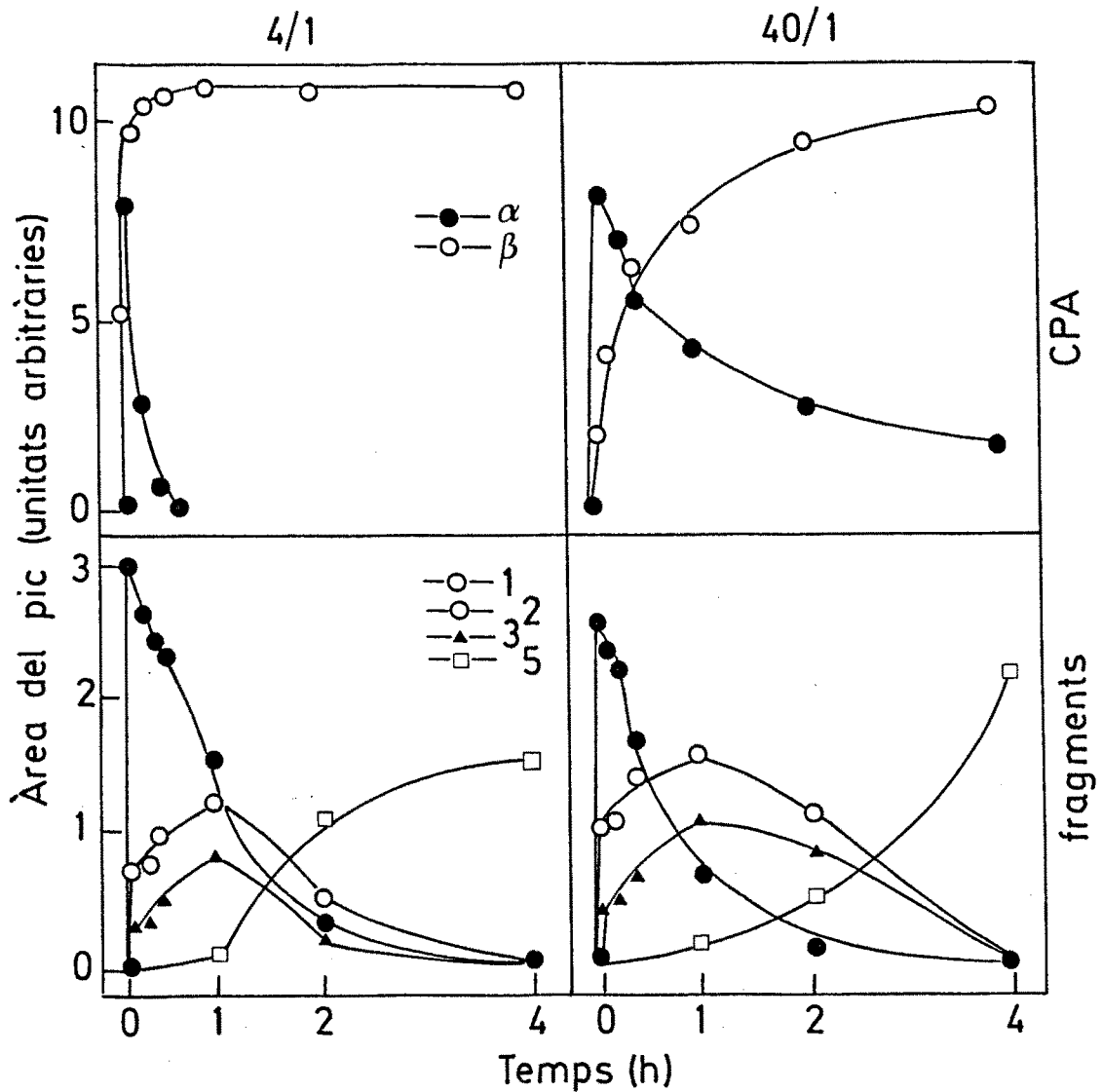


FIGURA III.51. Densitometria de les electroforesis en urea 7M de les mostres agafades al llarg del procés d'activació de la PCPA II (Figura III.47). Es representa les proporcions relatives al llarg de l'activació de les dues formes de CPA (requadres superiors) i dels diferents fragments generats (requadres inferiors). Relacions proteïna/tripsina 40/1 (esquerra) i 4/1 (dreta). Els valors de 2h i 4h s'han deduït amb l'ajut de densitometries puntuals dels gels d'urea-SDS de la Figura III.49 i dels valors d'integració d'àrees presentats a la Figura III.53.

III.5.3. COMPARACIÓ ENTRE LES DUES FORMES DE PCPA

Donat que els experiments presentats fins aquí són aquells que s'han dut a terme amb les dues formes de PCPA, i que en els detallats a continuació només s'ha utilitzat la forma monomèrica, es discutirà breument en aquest apartat els trets diferencials en l'activació de les dues formes.

Ja s'han comentat les diferències en les corbes d'activitat, en les que s'aprecia que l'activació inicial del monòmer és més ràpida que la del complex binari, situació que s'inverteix ja a temps curts d'activació (15-30 min), on s'observa una major activitat peptidàsica en la forma de complex binari activada. Aquest fet guarda una clara relació amb la desaparició de fragments d'alt pes molecular del medi, fet que es produeix més aviat en la PCPA I (veure Figura III.46).

De la mateixa manera que l'observació de diferències en la cinètica de desaparició de la CPA segons l'activació hagués estat feta a una relació de tripsina o altra, juntament amb l'absència de diferències en l'activitat mesurada, permetien deduir que la transformació d'una CPA en una altra no era un factor determinant en l'expressió de l'activitat, la identitat en els processos de transformació de CPA $_{\alpha}$ en CPA $_{\beta}$, tant si es tracta de PCPA II com de PCPA I, permet deduir que aquest procés de transformació no influeix en l'expressió diferencial de l'activitat segons es tracti d'un zimògen o d'un altre. Per tant, un punt de coincidència entre ambdós processos d'activació és que aquests venen modulats per la progressiva transformació dels fragments alliberats i no per les formes d'enzim actiu presents al medi, comuns a les dues formes.

En les electroforesis en urea 7M es pot apreciar una diferència significativa: el segment de menor desplaçament electroforètic, que s'ha demostrat que és el de més alt pes molecular i representa el pèptid d'activació sencer, no apareix pràcticament en el medi en cap moment de l'activació de la PCPA I. S'observa, en canvi, l'aparició de bandes intermèdies, molt minses, entre les dues formes de menor desplaçament, no presents a l'activació de la PCPA II. En general, s'observa una major heterogeneïtat de bandes en el complex binari.

En conjunt sembla detectar-se una major rapidesa en la desaparició dels dos fragments d'aparició més primerenca, producte d'una més ràpida transformació en els altres fragments detectats, que podria explicar la major celeritat observada en l'activació del complex binari. Aquestes diferències són la conseqüència directa de la presència de PPE, que actuaria bé com a proteïnasa, digerint parcialment el segment, bé com agent merament modulador de la conformació del saA i dels seus complexos amb la CPA, convertint aquell en més susceptible a l'atac proteolític. Sigui com sigui, cal aprofundir els estudis amb el complex binari, duent a terme en primer lloc experiments d'aïllament dels fragments generats tal i com s'ha fet amb la PCPA II (veure a continuació) per a poder discutir l'activació del complex binari amb dades més fonamentades.

III.5.4. SEGUIMENT DE L'ACTIVACIÓ DE LA PCPA II PER HPLC ANALÍTICA

Es va utilitzar la cromatografia líquida d'alta pressió com a mètode complementari de les electroforesis per la caracterització dels diferents fragments generats al llarg de l'activació. Aquest mètode permet obtenir una millor resolució entre espècies molt semblants, a l'hora que aporta també dades quantitatives i permet aïllar els diferents fragments d'activació.

Donat que els resultats de l'apartat anterior permetien comprovar una semblança important entre els tipus i quantitats de fragments generats durant l'activació a les dues relacions de tripsina utilitzades, i per evitar en el possible contaminacions per part d'aquesta, el seguiment per HPLC de l'activació només es va fer a relació PCPA/tripsina 40/1 (p/p). A la Figura III.52 es poden veure els perfils cromatogràfics de barreges d'activació analitzades a temps diferents. L'anàlisi electroforètica d'aquestes fraccions en un experiment preparatiu que s'explicarà a continuació (veure III.5.4) va permetre caracteritzar les diferents fraccions, identificant-les amb les bandes electroforètiques que es comenten als dos apartats anteriors. Així, es va poder comprovar que el temps de retenció a la cromatografia

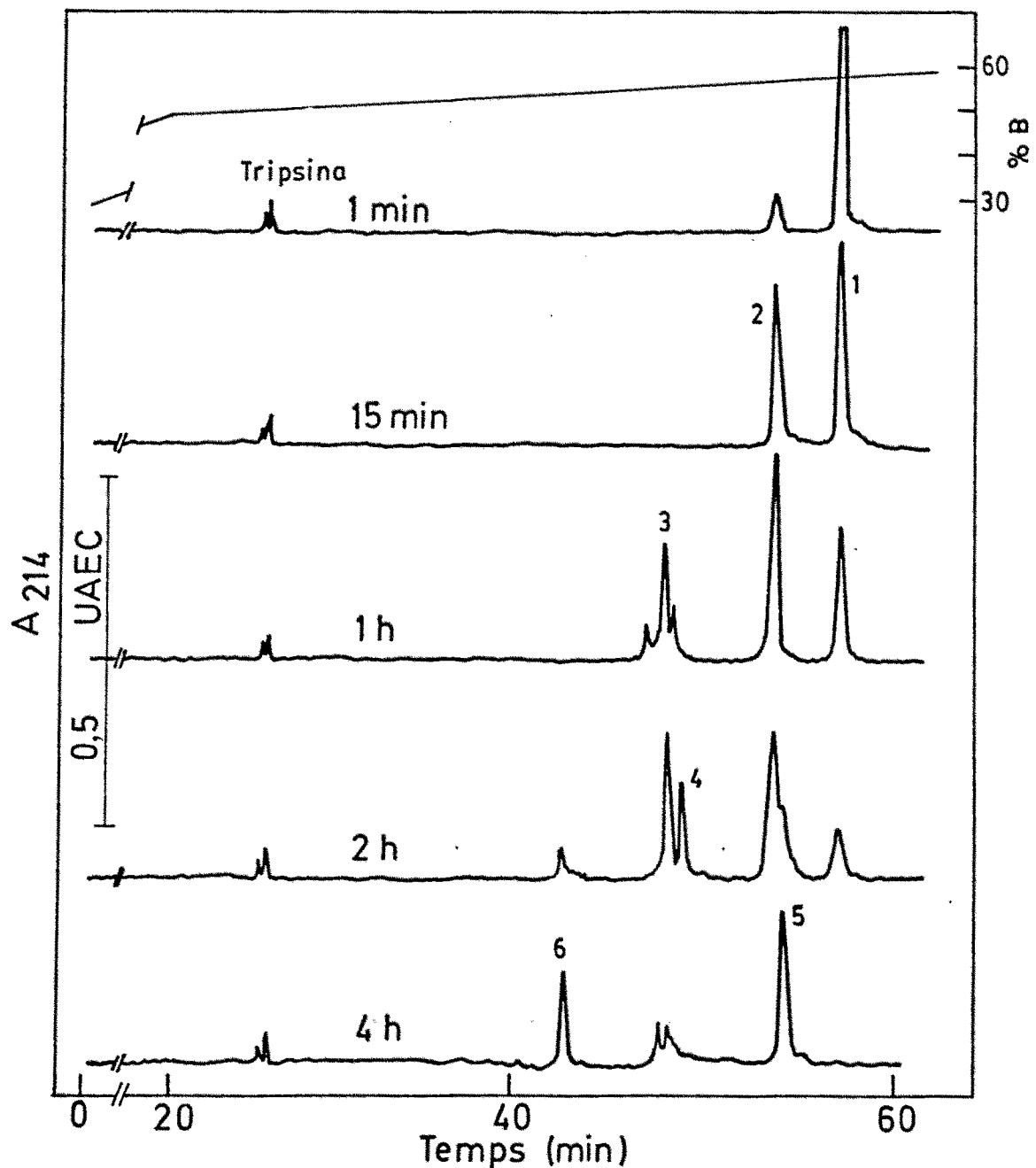


FIGURA III.52. Perfils cromatogràfics de HPLC de mostres de PCPA II injectades a diferents temps al llarg de l'activació amb tripsina a relació PCPA II/tripsina 40/1 (p/p). Condicions d'activació com a la Figura III.47. Columna Nucleosil C-4. Solvents: A, TFA 0,1%; B, CH_3CN 80% + TFA 0,09%. Flux: 0,5 ml/min. La numeració fa referència a l'ordre d'aparició de pics al llarg de l'activació i no a la seva posició cromatogràfica.

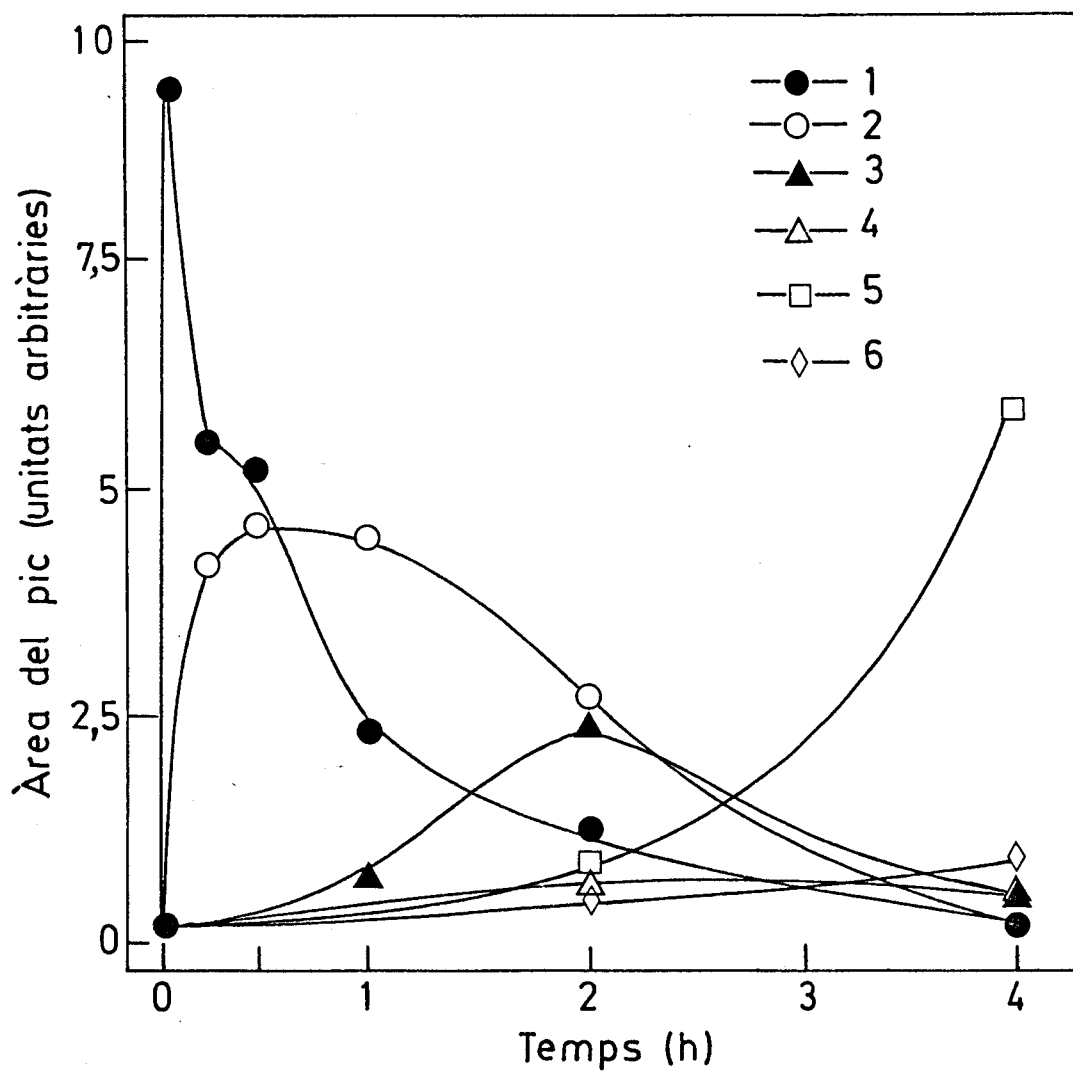


FIGURA III.53. Representació de les àrees dels pics cromatogràfics de la Figura III.52 al llarg del temps d'activació. Els valors d'àrea s'expressen en unitats arbitràries, a partir de les integracions obtingudes amb el sistema de detecció de l'aparell de HPLC. La numeració correspon a la de la figura citada.

segueix un ordre invers al pes molecular dels fragments (excepció feta del pèptid 5), i que a l'aparició a temps curts de l'espècie de major pes molecular li segueix l'aparició consecutiva d'espècies més curtes i el descens paral·lel en l'àrea de la primera. La numeració utilitzada a la figura fa referència a l'ordre d'aparició al llarg de l'activació i no té res a veure amb els temps de retenció cromatogràfics.

A la Figura III.53 es presenta la representació de la recuperació cromatogràfica dels pèptids al llarg del temps. La numeració és la mateixa que en la figura anterior. La comparació de les representacions de les figures III.51 i III.53 permet observar una correspondència entre els pèptids anomenats 1, 2, 3 i 5 a les dues figures pel que respecta a la forma de la corba. La resta de fragments detectats per HPLC no és apreciable en les electroforesis. Es interessant remarcar altra vegada que el perfil de la desaparició del pèptid anomenat 1 és equivalent al d'aparició de l'activitat CPA. Aquest fet és aquí encara més evident que en la representació dels densitogrames de les electroforesis en urea 7M (Figura III.48). El seguiment per HPLC permet també comprovar que el pèptid aquí anomenat 5, majoritari a temps 4 hores d'activació, correspon amb tota probabilitat a una forma de desplaçament intermedi observada en els dos tipus d'electroforesi. Si aquest fragment és de pes molecular inferior a les formes 1 i 2, cal adscriure el seu temps de retenció en HPLC a un cert grau de desplegament que el faria interaccionar amb la columna en major grau a com ho faria un pèptid de la seva mateixa llargada no desplegat.

L'única discrepància que s'observa entre les anàlisis per electroforesi i per HPLC és la proporció de l'espècie anomenada 3 a temps de digestió 1 hora. No ens és possible pel moment explicar aquesta petita discrepància més que per possibles diferències en el procés utilitzat en cada cas per inhibir l'acció de la tripsina: és molt probable que la baixada de pH i immediata cromatografia utilitzades a l'anàlisi per HPLC siguin més efectives que l'atur amb STI dels altres dos casos, sobretot en el de l'electroforesi en absència de SDS.

III.5.5. AILLAMENT PER HPLC DELS PEPTIDS GENERATS

La repetició a nivell preparatiu de les cromatografies que es presenten a la Figura III.52 va permetre l'aïllament de les diferents espècies i la seva posterior caracterització.

A la Figura III.54 es presenta l'anàlisi electroforètica de les diverses fraccions amb els dos tipus de gel de poliacrilamida emprats en aquest capítol. La comparació del desplaçament electroforètic dels pèptids individuals amb la seva posició a les butxaques on s'analitzen les barreges totals d'activació permet assignar bandes d'electroforesi a pics cromatogràfics de HPLC. Concretament, el pic 1 correspon a la banda de més alt pes molecular a la zona dels fragments de la electroforesi en urea-SDS (part superior del doblet) i a la banda de menor desplaçament a l'electroforesi en urea 7 M. El pic 2 correspon al component de menor pes molecular del doblet (urea- SDS) i a la segona banda amb menys desplaçament (urea 7 M). Això confirma l'existència d'un doblet a pes molecular aproximat de 11.000 en l'electroforesi de urea-SDS. El pic 3 correspon a la posició de pes molecular intermedi a la primera electroforesi i a la banda de major desplaçament a l'altra. Els pics 4 i 5 corresponen també a la posició de pes molecular intermedi en l'electroforesi en urea 7M-SDS i a la vegada a la banda de desplaçament intermedi en l'altra electroforesi. Aquest desplaçament intermedi del pic 5, de més tardana aparició probablement que els anteriors, i possiblement més curt, fa pensar una altra vegada en que pugui adoptar una conformació diferent, més oberta que la dels seus precursors. El pic 6 resulta ser el de més baix pes molecular o, dit d'altra manera, el pèptid que ha sofert una més extensiva digestió d'entre aquells que són susceptibles de ser analitzats per electroforesi. L'esquema que es presenta a la Figura III.55 ajudarà a resumir aquestes assignacions. Observi's que la numeració adoptada, de la que ja se n'ha anat fent esment fins ara, és la que correspon a l'ordre de desplaçament dels pèptids a l'electroforesi en urea 7M-SDS, i que aquesta numeració no guarda perfecta relació amb l'ordre de desplaçament o elució dels altres mètodes analítics.

De les dades conjuntes de totes les anàlisis fins aquí esmentades

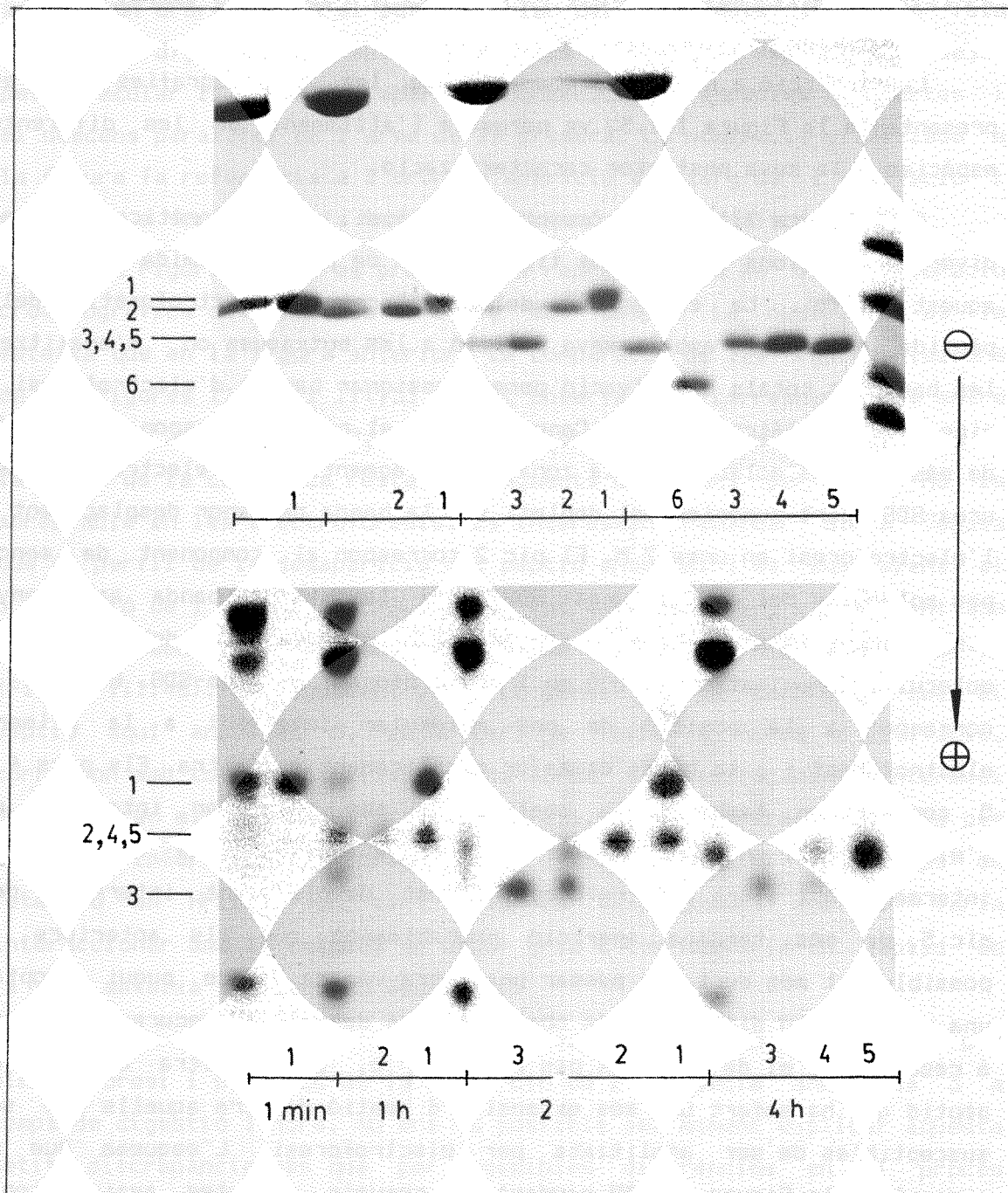


FIGURA III.54. Anàlisi dels pèptids generats durant l'activació i aïllats per HPLC preparativa, feta per dos mètodes electroforètics: en urea 7M-SDS (part superior) i en urea 7M (part inferior). Veure Figura III.55 per la numeració. Juntament amb l'anàlisi de les fraccions es presenta les electroforesis de les barreges totals d'activació als temps assenyalats.

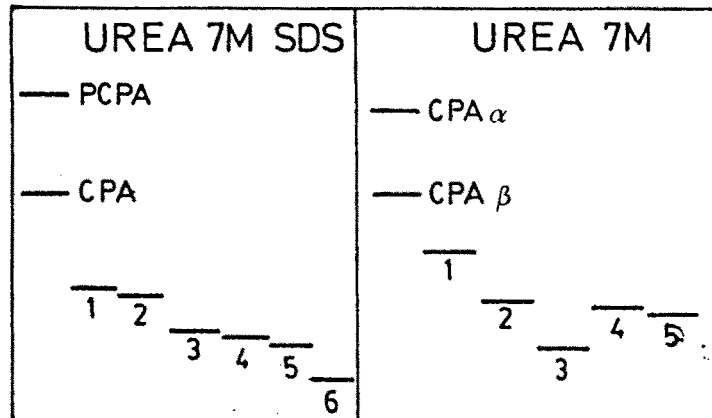


FIGURA III.55. Diagrama comparatiu de les posicions electroforètiques dels fragments generats al llarg de l'activació de la PCPA II en els dos sistemes electroforètics utilitzats: urea 7M-SDS (esquerra) i urea 7M (dreta). La numeració és la mateixa que en les figures III.49, 50, 51, 53 i 54)

s'en pot deduir que la progressió de l'activació és principalment el resultat d'una digestió seqüencial del pèptid primari, entenent com a tal el producte del primer atac triptic que allibera la CPA α i el segment d'activació. Això no exclou, en principi, que canvis conformacionals de fragments del mateix pes molecular o variacions en la interacció de les dues formes de CPA amb els diferents fragments puguin influir també en l'expressió de l'activitat.

III.5.6. CARACTERITZACIÓ N-TERMINAL DELS PÈPTIDS

Alguns dels fragments aïllats per HPLC a diferents punts del procés d'activació de la PCPA monomèrica van poder ser analitzats per degradació automàtica d'Edman, i els resultats d'aquesta anàlisi seqüencial es poden veure a la Taula III.17. Es comprova que els cinc pèptids posseeixen la mateixa seqüència N-terminal i que aquesta és la mateixa que la del segment d'activació sencer. Com a conseqüència

TAULA III.17

DEGRADACIÓ SEQÜENCIAL AUTOMÀTICA DE FRAGMENTES GENERATS AL LLARG DEL PROCÉS D'ACTIVACIÓ

Cicle	Fragment				
	1	2	3	4	5
1	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
2	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
3	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
4	Phe			Phe	

immediata d'aquest fet se'n dedueix que la degradació del segment d'activació té lloc pel seu extrem C-terminal, al menys pel que respecta als pèptids analitzats, que són tots els fins aquí descrits menys el de més baix pes molecular, que no va poder ser aïllat en quantitat suficient per procedir a una anàlisi seqüencial.

Aquests resultats lliguen pobrament amb els que es poden deduir de les electroforesis en urea-SDS. Tot i recordant que el càlcul de pesos moleculars en aquest tipus de gels és força deficient, es pot estimar uns pesos moleculars aproximats pels fragments a partir d'un patró de mioglobina tractada amb bromur de cianògen; fent un càlcul aproximat es pot veure que els dos components del doblet de bandes de menor desplaçament tindrien uns valors de 10.800 i 10.100, corresponents a 94

i 88 residus respectivament, mentre que als pèptids de la zona de pesos moleculars intermedis se'ls hi podria adjudicar un valor d'aproximadament 9.000, corresponent a 78 residus. Aquestes llargades no coincideixen amb cap possible trencament triptic del segment. Efectivament, al comprovar que tots els pèptids analitzats difereixen, en tot cas, en el seu extrem C-terminal, les úniques llargades possibles a partir de digestió triptica (recordem que és l'única proteïnasa present) són 94, 69, 60, etc. residus, cap d'ells coincident amb els valors hipotetitzats. En tot cas, i considerant que les electroforesis indiquen la formació de CPA α i CPA β des de bon començament, es podria considerar també possible la formació del fragment 1-96 (1-94 + 2 residus de la CPA), amb el que les llargades possibles serien 96, 94, 69, 60, etc., que tampoc coincideixen bé.

Potser cal concloure que l'electroforesi d'urea-SDS no és un bon medi d'anàlisi de pesos moleculars, encara que serveixi bé a finalitats de separació de fragments d'altra manera impossibles d'analitzar en gels en presència de SDS. Per altra banda, la petita diferència entre els dos pèptids més llargs només podria ser adjudicada d'antuvi a la pèrdua d'un pèptid curt com el N-terminal; ja s'ha vist que aquesta possibilitat queda aparentment anul.lada per l'anàlisi de seqüència.

Malhauradament no es posseeixen dades fiables d'anàlisi d'aminoàcids dels diferents fragments. Els fragments analitzats a partir d'una cromatografia preparativa van donar en tots els casos unes anàlisis d'aminoàcids molt semblants, fruit probablement d'una contaminació de fons de la columna, la qual, al treballar sempre amb quantitats molt petites de mostra va impedir la clara diferenciació entre les diferents entitats. No obstant, es va poder apreciar una disminució en la senyal de glutàmics i leucines en les anàlisis corresponents als pèptids de desplaçament electroforètic intermedi, dada que recolça l'assumpció que la digestió s'efectua pel extrem C-terminal.

III.5.7. ANÀLISI DE LA CAPACITAT INHIBIDORA DELS PÈPTIDS GENERATS DURANT L'ACTIVACIÓ

Fins aquí hem pogut comprovar la correspondència entre la generació i degradació de fragments del segment d'activació i l'alliberament de l'activitat enzimàtica de la CPA. Es necessari, però, relacionar aquestes observacions amb estudis sobre la capacitat d'aquests fragments per interaccionar amb l'enzim.

Amb aquesta finalitat es van obtenir corbes d'inhibició de les CPA amb els diversos fragments del segment aïllats per HPLC. Els resultats d'aquest experiment es presenten a la Figura III.56 on es mostren les corbes d'inhibició dels fragments anomenats 1, 2 i 3 amb la CPA α i de la totalitat dels fragments (1,2,3,4,5, i 6) amb la CPA β (veure Figures III.47 i III.52 per la nomenclatura de les diferents espècies).

L'addició de pèptid d'activació primari a relacions molars progressives sobre les CPA produeix una creixent inhibició de la seva activitat peptidàsica mesurada en front del substracte BGP. L'activitat residual a relació molar segment primari/CPA de 10 és del 13% per a la forma α i del 17% per a la forma β . Si bé la capacitat d'inhibició del segment primari és lleugerament inferior sobre la forma β , és clar que en cada cas aquesta forma de segment és la que presenta, amb diferència, major capacitat inhibidora.

Es evident en les dues figures el descens en l'afinitat per la CPA que experimenta el segment al transformar-se en la forma anomenada 2. Aquesta espècie no ha pogut ser caracteritzada completament per la seva regió C-terminal, quedant oberta la possibilitat que sigui el producte d'una digestió parcial que afecti a pocs residus del segment primari (la seva lleugerament menor mobilitat electroforètica així ho faria pensar) o bé el producte d'un canvi conformacional que produeixi la seva diferenciació del segment primari per criteris tant d'electroforesi en urea-SDS, urea 7 M i HPLC. Sigui com sigui, aquest fragment, tot i mantenint una important capacitat inhibidora (activitat residual a relació molar de 10 igual al 20% amb la CPA α), posseeix una afinitat per les CPA de grau considerablement inferior a la del segment primari, sent necessàries relacions molars que oscil·len entre 2 i 3 vegades les

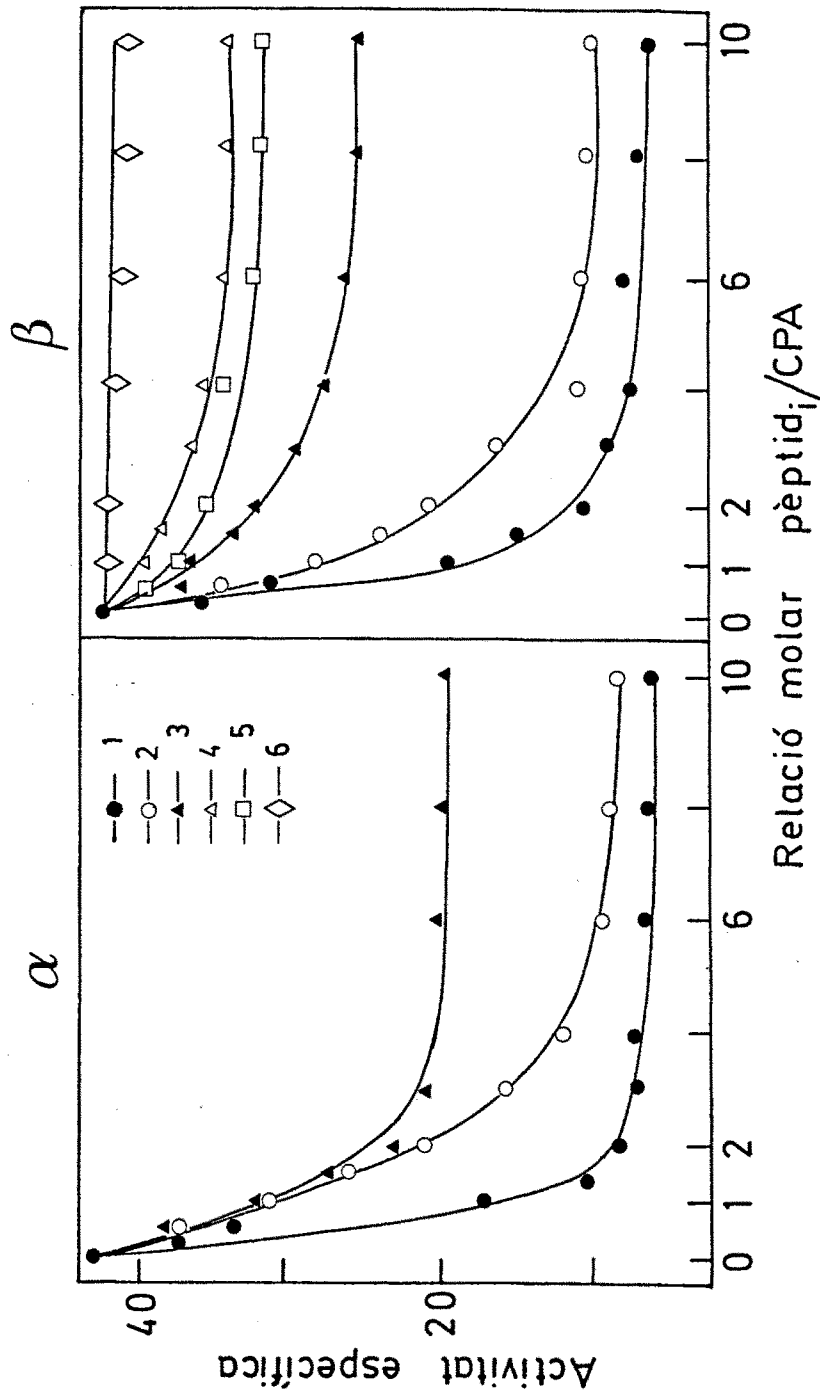


FIGURA III.56. Inhibició de les CPA α i β pels diferents fragments del segment d'activació generats al llarg de l'activació triptica. Numeració com a la Figura III.55. Abans de la mesura de l'activitat es va incubar les barreges CPA/fragment durant 30 min. a 25° C, a volum constant per a totes les barreges analitzades (20 l). Les activitats es van mesurar amb BGP 1mM en medi Tris-HCl 25mM, NaCl 0,5M (pH 7,5) i a concentració constant de CPA 50mM.

corresponents a la forma 1 per obtenir els mateixos graus d'inhibició.

Les altres espècies aïllades, aquestes sí producte inequívoc de digestió enzimàtica de la forma primària, presenten un poder d'inhibició clarament inferior a les altres dues. Els màxims valors d'inhibició assolits a relacions equimolars fragment/CPA són del 43 i 61 % de l'activitat específica inicial per a la forma 3 (amb CPA α i β respectivament), i del 79 % i el 85 % de l'activitat específica inicial per a les formes 5 i 4 respectivament amb la CPA β . Per altra banda, la capacitat inhibidora del fragment 6 és nul·la.

Resulta lògic pensar que la dificultat inicial en l'expressió de l'activitat, remarcable característica del procés d'activació de les PCPA, té com a responsables a les espècies peptídiques amb més capacitat inhibidora, la presència de les quals coincideix, per altra part, amb el període en el qual l'activitat presenta valors llunyans del màxim. No obstant, encara que baixa, la resta de fragments analitzats presenta certa capacitat inhibidora, la qual seria la responsable de que, fins i tot en absència de les formes 1 i 2, l'expressió de l'activitat no sigui la total. D'aquesta manera, malgrat que el grau d'inhibició produït per les formes 3-6 a relació molar 1/1 (que, per altra part, no s'assoleix probablement mai) sigui molt baix, no es pot parlar d'alliberament total de l'activitat CPA fins que la desaparició dels fragments d'activació primari i secundaris no és completa.

En general també cal comentar que el grau d'inhibició mostrat per les diferents espècies estudiades és lleugerament superior amb la forma α de l'enzim que amb la forma β . Aquest fet és sorprenent donats els resultats de les corbes de generació d'activitat realitzades a diferents relacions de tripsina en les que, comprovació feta per electroforesi, hi havia diferències en les proporcions relatives de les dues CPA, sense que això es reflectís en diferències en el curs de generació de l'activitat peptidàsica. No es pot descartar la possibilitat que els valors d'activació de la PCPA a diferents temps i a la relació proteïna/tripsina 40/1 siguin revisables.

En cap de les corbes d'inhibició aquí presentades s'arriba a valors d'activitat CPA comparables al valor residual que presenta la forma proenzimàtica. Això s'interpreta com que, tot i sent el segment

d'activació aïllat un inhibidor molt potent de l'enzim, el trencament de l'enllaç d'activació és determinant en la disminució de la inhibició i en l'expressió de l'activitat.

III.5.8. SEGUIMENT DE L'ACTIVACIÓ DE LA PCPA II PER ELECTROFORESI EN GRADIENT D'UREA TRANSVERSAL

La tècnica electroforètica emprada en aquest apartat permet detectar l'existència d'interacció (i, per tant, afinitat) entre diverses espècies proteiques, i l'efecte que sobre aquesta interacció i sobre cada una de les espècies tenen les diferents concentracions d'urea. (veure II.8.5). El nostre grup es va interessar per aquesta tècnica i la seva aplicació a l'estudi de l'interacció entre proteïnes pancreàtiques. Fruit d'aquest interès n'és, entre altres coses, la definició del tipus de desplaçament electroforètic de tota la sèrie de proteïnes amb les que es treballa en aquest estudi (Vilanova et al., 1985). En aquest treball es va comprovar, per exemple, que la PCPA i la CPA sotmeses a electroforesi en gradient transversal d'urea (0-9 M) corren com una banda contínua sense decreixements sobtats de la mobilitat a concentracions altes d'urea, el que és indicatiu de manca de canvis conformacionals o desplegaments importants de la proteïna al llarg de les concentracions d'urea estudiades. També es va comprovar que el segment d'activació primari aïllat presenta una mobilitat electroforètica sigmoïdal en atravessar un gradient transversal entre 0 i 9M urea, comportament indicatiu d'una desnaturalització que segueix un model de dos estats. Per la seva part, l'anàlisi d'una barreja de CPA i segment d'activació donava com a resultat una banda que corria com la PCPA fins a a 4 M urea, que després es desdoblava en dues bandes de desplaçaments corresponents als de la CPA i el segment aïllats. Dins del treball aquí presentat es va voler aplicar aquesta tècnica a l'anàlisi de la capacitat d'unió dels diferents fragments d'activació a les CPA.

A la Figura III.57 es pot veure les electroforesis en gradient transversal d'urea de mostres agafades a temps d'activació 1 minut i 2 hores. S'observa que la mostra corresponent a 1 minut després de

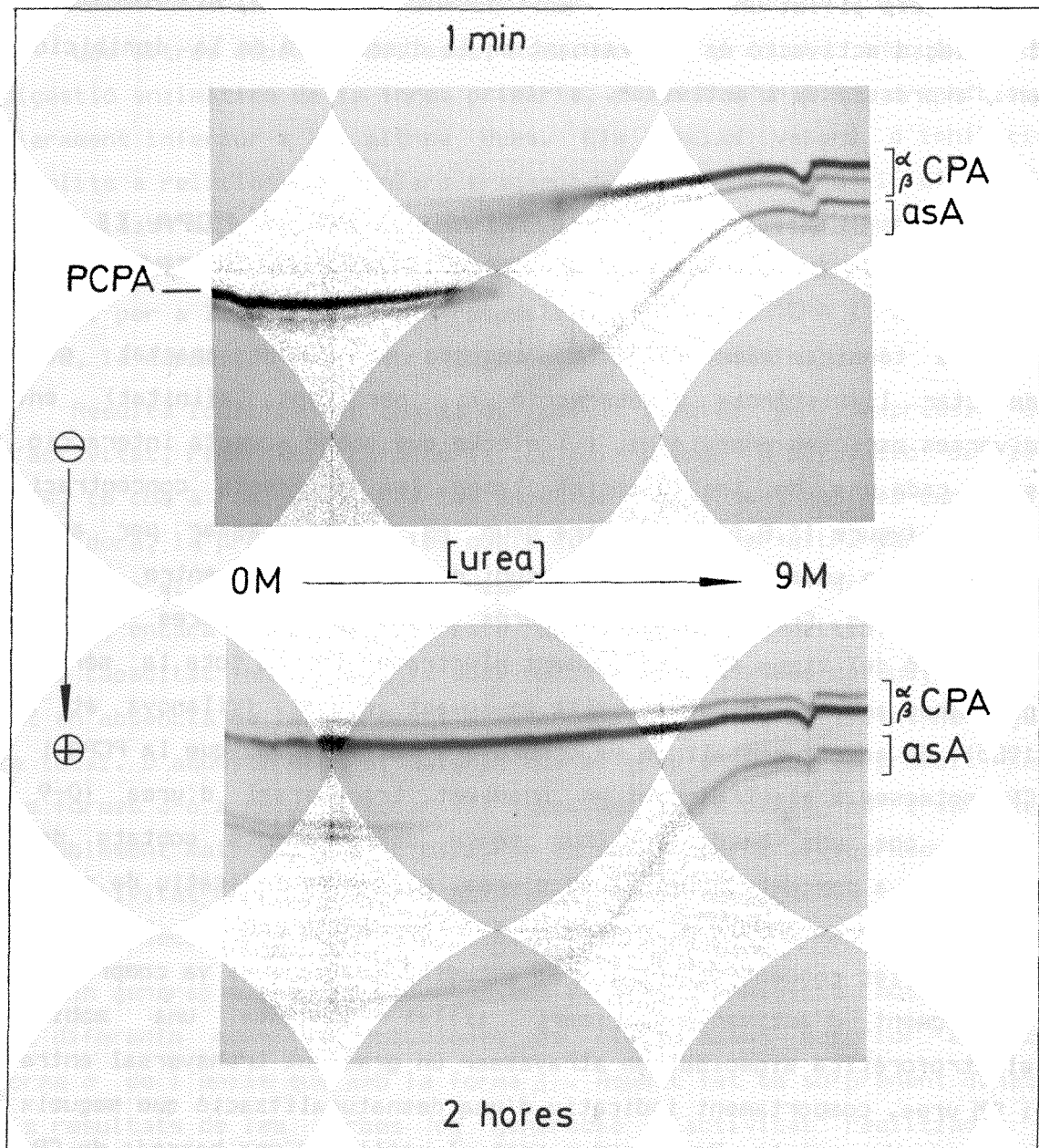


FIGURA III.57. Seguiment del procés d'activació triptica de la PCPA monomèrica mitjançant electroforesi en gradient transversal d'urea. Es presenta les anàlisis de mostres d'activació a 1 minut i 2 hores.

l'addició de tripsina presenta, fins aproximadament 4 M en urea una banda principal i una secundària, corresponents al complex de les dues formes de CPA amb el segment d'activació llarg, puix aquestes són les espècies presents en una barreja d'activació agafada a aquest temps (veure Figura III.50). Per damunt de 4 M urea, es produeix la desaparició de la interacció, cada una de les espècies corre segons el seu desplaçament específic al no estar ja unides covalentment, i s'aprecia l'existència de dues formes de CPA i de dues formes de segment, tal i com era d'esperar.

Els temps intermedis de 1 hora (electroforesi no presentada) i 2 hores d'activació permeten observar un descens progressiu en la intensitat de la banda de complex a concentració 0 M d'urea, a la vegada que una desaparició de la mateixa a concentracions cada vegada més baixes d'urea. Paral·lelament, s'intensifiquen i apareixen a concentracions d'urea més baixes les bandes corresponents a les espècies aïllades que són, en cada cas, fidel reflex de les que s'observen en gels lineals amb urea 7 M (veure també Figura III.50). A l'electroforesi feta amb la mostra de 2 hores d'activació s'observa la conversió de CPA α en CPA β i la presència gairebé a tot el llarg del gradient de dos fragments majoritaris amb desplaçament sigmoidal. Aquests resultats han de ser interpretats com una disminució del grau d'interacció entre les espècies o, dit d'altra manera, com un reflex de la menor afinitat que per les CPA tenen els fragments de segment generats a temps llargs d'activació. Cal també fer notar que de les dues bandes de complexos CPA/segments visibles a baixes concentracions d'urea en aquesta darrera electroforesi, la superior, assignable a CPA α /saA, persisteix més al llarg del gradient que la inferior, assignable a CPA β /saA. Aquest comportament reafirma la lleugerament major afinitat de la CPA α respecte de la CPA β pels diferents fragments del segment observada ja anteriorment (veure apartat III.5.7). L'electroforesi de la mostra de 4 hores d'activació ja no permet observar el menor rastre de complex, el que indica absència d'interacció entre les espècies presents majoritàries, CPA β i fragment 5 (resultats no presentats).

Els resultats aquí descrits recolcen els de l'apartat anterior, demostrant que les capacitats inhibidores mesurades tenen fidel reflexe

en la capacitat d'interacció entre fragments i CPA, producte a la vegada de l'afinitat entre les diferents espècies. El fragment d'activació primari, obtingut a temps curts d'activació i producte directe del primer atac triptíc i, fins a cert punt també el fragment d'activació secundari, són les espècies que mantenen en major grau la capacitat d'interaccionar amb la CPA i inhibir-la. En aquesta Tesi no s'ha abordat l'estudi de la naturalesa d'aquesta interacció, però respecte a aquest punt cal afegir que Chapus et al., 1987) apunten la possibilitat que sigui deguda a les interaccions electrostàtiques que es donen entre les dues espècies i que l'afinitat observada pot ser eliminada i restaurada reversiblement depenent de que s'anul·li o no les càrregues superficials de les proteïnes.

III.5.9. MODEL PROPOSAT PEL PROCES D'ACTIVACIÓ DE LA PCPA MONOMÈRICA

Amb el conjunt de dades que es té sobre la generació d'activitat, generació de diferents fragments a partir del segment d'activació primari i capacitat d'inhibició d'aquests sobre l'enzim actiu, es pot intentar elaborar un model inicial per a explicar a grans trets els aconteixements que tenen lloc durant l'activació triptíca de la PCPA monomèrica en les condicions triades (veure Figura III.58).

L'observació de les intensitats de les bandes electroforètiques o dels pics de HPLC de les espècies generades durant el procés d'activació (Figures III.51 i III.53) indiquen clarament que la conversió de CPA α en CPA β no és el pas determinant de la generació d'activitat. La mateixa observació suggereix que la generació d'activitat segueix principalment el mateix curs que la desaparició del fragment 1 o primari, fins i tot en quant a la inflexió observada entre els 15 i els 30 minuts. Ara bé, la disminució de la inhibició de les CPA al desaparèixer el fragment 1 ha de quedar parcialment compensada per l'acció inhibidora de fragments secundaris, sobre tot el 2, segons indiquen els resultats de la Figura III.56. La quantificació d'aquest procés és, però, difícil, al menys amb els resultats aquí obtinguts.

El conjunt de resultats discutits fa pensar que l'atac triptíc es podria produir exclusivament per l'enllaç 94_{segment} - 1_{enzim} en totes les molècules de PCPA o bé simultàniament per aquest enllaç en una proporció de molècules de PCPA i per l'enllaç situat dos residus més endavant, el 2_{enzim} - 3_{enzim} en la resta de molècules de PCPA. En el primer cas s'alliberaria al medi el fragment d'activació de 94 residus i la CPA, mentre que en el segon cas s'obtindria una barreja de fragments d'activació de 94 i 96 residus i de CPA α i CPA β . Val a dir que els estudis de HPLC, els més fiables quantitativament, recolcen la primera de les dues opcions. La segona opció sembla menys probable que la primera, donat que presuposa que la formació de fragment 1 estaria intimament relacionada amb la de CPA β , de la que se'n forma només aproximadament un 25% a 1 minut d'activació i relació proteïna/tripsina de 40/1, el que implicaria la formació d'una quantitat inicial semblant de fragment 1, situació que no s'observa al ser aquest fragment majoritari a temps curts d'activació sigui quina sigui la tècnica emprada per a mesurar-ho.

Cal, de tota manera, fer notar que la formació simultània dels fragments de 94 i 96 residus explicaria fàcilment els *patterns* electroforètics observats: una sola banda (doble) de Mr 11.000 aproximadament en SDS-urea, i dues bandes en urea 7M, de les que la corresponent al fragment 2 (en aquest cas de 94 residus) presentaria una major mobilitat electroforètica en haver perdut una càrrega positiva (del dipèptid Ala-Arg) respecte al fragment 1.

Si inicialment es formés només el fragment de 94 residus, com es pot explicar l'aparició de dues bandes de fragment en electroforesi en urea 7M a temps curts d'activació? Podria succeir que la CPA formada inicialment ataqués immediatament al segment d'activació primari eliminant el seu residu C-ter (Arg₉₄) i el convertís parcialment i lentament en un fragment de 93 residus. Tindriem en aquest cas dos fragments, de 94 i 93 residus, amb una diferència de pes molecular i de càrrega semblants a la dels hipotètics de 96 i 94 residus, i que també encaixarien amb el *pattern* electroforètic observat.

Aquesta hipòtesi darrera ha de fer front, malgrat tot, a una crítica molt consistent: costa d'acceptar que la CPA digereixi el seu

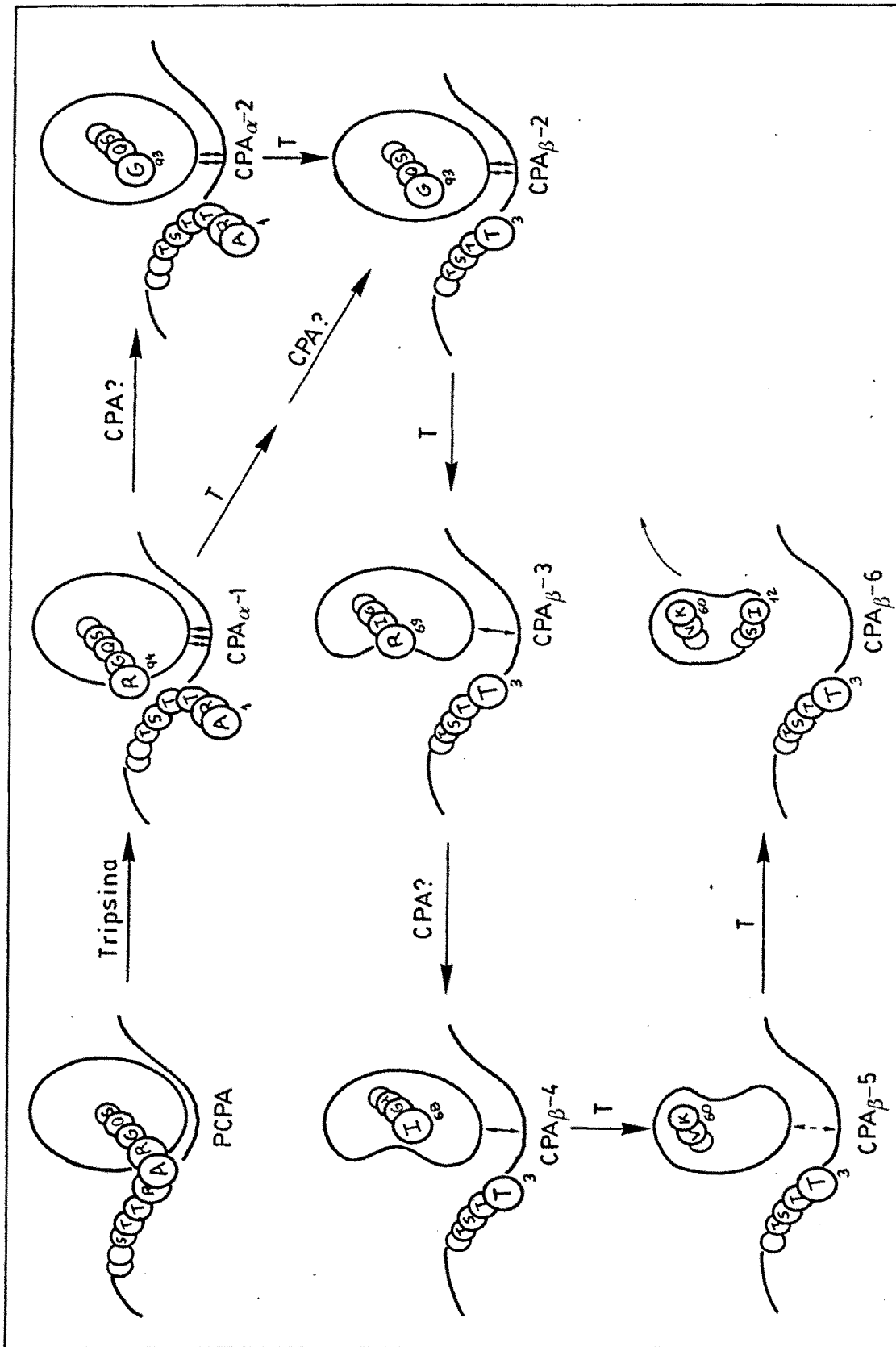


FIGURA III-57. Esquema temptatiu del possible camí que segueix el procés d'activació de la PCPA monomèrica. Els números 1-6 fan referència als diferents fragments generats. Les CPA α i β tenen Ala i Thr, respectivament, com N-terminals. L'afinitat dels fragments per l'enzim es representa pel nombre diferencial de sagetes dobles.

propi segment d'activació, que és un potent inhibidor d'ella mateixa, i que posseeix, a més, un residu C-terminal d'arginina, que encaixa molt poc amb l'especificitat de la CPA. En aquest contexte cal recordar que la CPA també digereix el darrer residu del seu potent inhibidor extret de patates (Haas i Ryan, 1980), residu també difícilment digerible per les CPA en ser una Gly. El fet que el segment d'activació de la PCPA de porc presenti una Gly en posició 93 podria facilitar que la CPA aturi la seva acció degradativa en aquest residu.

Durant tot el procés de transformació del fragment 1 en fragment 2, que no és gaire depenent de la concentració de tripsina addicionada, la CPA α es va convertint en CPA β en un procés que sembla ser independent del primer i que es veu accelerat per la presència d'elevades concentracions de tripsina en el medi. Aquesta transformació de CPA α en CPA β implica la pèrdua del dipèptid N-terminal Ala₁-Arg₂ per acció de la tripsina, com ja han indicat altres autors (Folk, 1963) i nosaltres mateixos (San Segundo et al., 1982).

A partir de les consideracions anteriors es pot proposar un model temptatiu per explicar el comportament de la PCPA II durant l'activació triptica *in vitro*:

Durant les dues primeres hores d'activació es generaria fragment 2 a partir del fragment 1 i CPA β a partir de CPA α , el que donaria lloc a la formació i conversió successiva dels següents complexos: CPA α /FA-1, CPA β /FA-1, CPA α /FA-2, i CPA β /FA-2. Donada la decreixent inhibició enzimàtica d'aquests complexos (veure Figura III.56), les transformacions esmentades permetrien l'increment progressiu de l'activitat CPA durant el període esmentat.

L'acció posterior de la tripsina sobre el segment produïria un tall per l'enllaç 69^{segment} - 70^{segment}, escurçant el fragment d'activació fins a 69 residus (FA-3). Aquí de nou, l'acció posterior de la CPA sobre aquest fragment podria eliminar-li el seu residu C-ter (Arg₆₉) i convertir-lo parcialment i lentament en un fragment de 68 residus (FA-4). Degut a la seva llargada sensiblement menor, els fragments 3 i 4 podrien presentar una mobilitat electroforètica clarament superior als fragments 1 i 2, fet que s'observa experimentalment (veure Figura

III.55). El que ja no queda tant clar és el fet que el fragment 3 presenti una mobilitat electroforètica en urea 7M lleugerament superior a la del 4, si resulta cert que aquest ha perdut una càrrega positiva respecte al primer. Aquesta aparent incongruència podria ser deguda a una major susceptibilitat del fragment 4, el més curt, a l'acció desplegant de l'urea a concentració 7M, possibilitat que ja s'entreveu en l'observació de les electroforesis en gradient d'urea de la Figura III.57. En qualsevol cas, la transformació del fragment 2 en els fragments 3 i 4 provoca una disminució substancial de la inhibició de l'activitat CPA.

Resulta difícil avaluar la contribució quantitativa de la transformació del fragment 2 en els fragments 3 i 4 en el procés d'activació de la PCPA. En base als resultats presentats a la Figura III.56 es pot concloure, però, que els complexos CPA-fragments formats després d'aquesta transformació tindran poca capacitat per a inhibir l'activitat CPA.

Les característiques dels fragments apareguts posteriorment permeten hipotetitzar la producció subseqüent de dos talls per acció de la tripsina: un primer tall sobre l'enllaç 60-61_{segment}, per el que es formaria un pèptid de 60 residus (FA-5) i un tall sobre l'enllaç 11-12_{segment}, per el que es formaria un pèptid de 49 residus (FA-6). El primer d'aquests fragments probablement mantindria una conformació més desplegada que els 3 i 4 en urea 7M i en urea-SDS, el que explicaria que tots tres presentin mobilitats electroforètiques semblants, o que el 5 s'elueixi més tard en fase reversa, malgrat el seu menor pes molecular. La major mobilitat electroforètica del fragment 6, així com la seva elució primerenca en cromatografia en fase reversa, es poden explicar exclusivament en funció del seu menor pes molecular. Aquest darrer fragment (n° 6) seria de fet el primer que hauria sofert escurçament de la seva regió N-terminal respecte del saA complet.

D'aquests dos darrers fragments discutits, només el 5 presenta una certa capacitat inhibidora (veure Figura III.56), raó per la que es pot considerar que, després de la seva transformació en la forma 6, el procés d'activació ha arribat a un punt gairebé final on només resta la total degradació dels fragments restants.

No es disposa pel moment de cap model tridimensional de l'estructura del saA. No obstant això, i considerant les relacions estructurals i funcionals recentment establertes entre el saA i les proteïnes fixadores de calci de la família EF-hand (Vilanova, 1987; Avilés et al., 1987), es pot considerar temptativament que la seva estructura terciària guarda estreta relació amb la definida per aquest tipus de proteïnes. Si això resulta cert, considerant el model estructural general que s'ha proposat (Efimov, 1984), els enllaços que hem definit com probablement sotmesos a hidròlisi en el segment corresponen a zones de la seqüència que interconnecten regions d'hèlix α i que representen regions externes de la molècula. Aquesta accessibilitat al solvent seria més evident per als enllaços 93-94, 92-93, 69-70 i 68-69. Es de suposar que l'eliminació seqüencial de fragments peptídics pel extrem C-terminal fa variar la conformació global de la cadena polipeptídica i converteix en més accessibles els enllaços 59-60 i 11-12, sobre els que hipotèticament tenen lloc els altres trencaments triptics que donen lloc als fragments 5 i 6 respectivament.

IV. DISCUSSIÓ GENERAL

A la Introducció d'aquesta Tesi s'ha posat ja de manifest que són dos els camps d'interés general sobre els que s'ha treballat: el camp metodològic, centrat en la posta a punt de mètodes analítics per HPLC, i el de l'aplicació d'aquestes i altres tècniques a l'estudi estructural i funcional de les procarboxipeptidases A de pàncreas de porc, en particular del seu segment d'activació i del procés de conversió del zimògens en enzim actiu. Es presenta aquí una discussió general dividida en els dos apartats corresponents.

DESENVOLUPAMENT I ESTUDI DE MÈTODES CROMATOGRÀFICS

La utilització en aquesta Tesi de tant sols columnes cromatogràfiques de fase reversa i no d'altres tipus (bescanvi iònic, gel filtració... etc.) ha fet que, deixant de banda un possible estudi de idoneïtat de diferents suports cromatogràfics, el treball s'enfoqués sobre quines eren les millors condicions d'anàlisi i recuperació de proteïnes i pèptids, tant a nivell analític com preparatiu, posant especial èmfasi en els nivells de sensibilitat dels mètodes desenvolupats.

L'observada superioritat de l'acetonitril com agent elutor en front de l'isopropanol en quant a la seva capacitat d'oferir una bona resolució ja havia estat descrita per Regnier (1983). Aquesta millor resolució obtinguda en línies generals amb l'acetonitril es veu compensada per un major poder d'elució de l'isopropanol, particularment evident quan es cromatografien proteïnes hidrofòbiques. Aquesta consideració és vàlida en general per a proteïnes i pèptids àcids sotmesos a un sistema cromatogràfic en que s'utilitza aquests solvents a pH àcid (1,5 - 2,0). Hem trobat però, que les proteïnes objecte del nostre interès no eren en absolut recuperables després de la seva injecció a una columna equilibrada a pH baix. En efecte, només és possible separar i recuperar les diferents PCPs i CPs mitjançant cromatografia a pH intermedi (6,5). Aquestes proteïnes, força voluminoses i àcides, presenten, a l'igual que d'altres proteïnes de

característiques semblants, problemes de solubilitat a pH àcid que desapareixen al treballar a pH intermedi. Cal tenir en compte que existeixen evidències que aquestes proteïnes sofreixen desnaturalització irreversible a pH inferior a 3,0 (López, 1980), fet que, a més de condicionar la seva solubilitat, pot induir l'establiment d'interaccions especialment fortes amb la columna de fase reversa. Encara que el sistema cromatogràfic a pH baix és el més utilitzat a fase reversa, hi han molts exemples d'utilització de pH intermedi en la cromatografia de pèptids i proteïnes (veure Hughes i Wilson, 1983, per una revisió del tema). Contràriament al cas citat, aquelles proteïnes cromatografiables a pH baix no són eluïdes de la columna o resoltes cromatogràficament a pH intermedi. Cal remarcar que, tot i que un simple ajust del pH d'una solució que no contingui cap tipus de sals és suficient per a permetre l'elució de les nostres proteïnes, és convenient treballar amb solucions amortidores diluïdes per assegurar un pH constant. En relació amb aquest darrer punt, cal adoptar mesures de seguretat que impideixin l'aparició de problemes d'obturació del sistema deguts a possibles precipitacions salines en augmentar la concentració de dissolvent orgànic; concretament, hem observat que els límits del nostre sistema són, per exemple, unes concentracions de 25 mM piperazina disolta en 50% isopropanol.

Al tractar assiduament amb quantitats petites de mostra, un dels factors que més ens interessaven era el de la recuperació cromatogràfica de pèptids i proteïnes. Pel que respecta als primers, val a dir que, excepció feta d'alguns pèptids molt llargs o hidrofòbics, la seva elució es pot considerar acceptable en la majoria dels casos. Diferent era el cas de les proteïnes pancreàtiques amb que treballem, de les que ja s'ha comentat la hidrofobicitat i la conseqüent tendència a interaccionar amb la columna. Com a condicionants de la recuperació es va estudiar el temps de retenció, la quantitat de mostra aplicada i la concentració de sals en el medi.

A mesura que augmenta el temps de retenció a dins de la columna disminueix la recuperació de moltes proteïnes, especialment de les més hidrofòbiques o voluminoses. També hem pogut observar que un

augment en la força iònica del medi en el qual s'injecten les mostres de proteïna a la columna pot provocar una disminució en la seva recuperació. Cohen et al. (1984) havien descrit un efecte similar, però referit a la força iònica de la dissolució d'elució i deduíren que en augmentar la força iònica de les dissolucions disminuïa la solubilitat de les espècies a cromatografiar. Nosaltres hem observat que la sola presència de sals en el petit volum d'aplicació de les mostres pot influenciar, encara que en poca mesura, la recuperació final. Aquest efecte pot ser interpretat de la mateixa manera, i suposar que hi ha una certa quantitat de proteïna insolubilitzada prèviament a l'injecció, proteïna que interaccionaria posteriorment amb la matriu i no seria eluïda. També es pot pensar en la possibilitat que la presència d'una alta força iònica debiliti les interaccions polars i incrementi les interaccions hidrofòbiques de la proteïna amb la fase reversa, dificultant la seva elució. La recuperació de proteïnes separades en columnes de fase reversa segueix una relació lineal amb la quantitat injectada inicialment, sempre que aquesta estigui per damunt d'un valor mínim, per sota del qual la proteïna no és recuperable de la columna.

Les observacions del paràgraf anterior tenen importància quan s'ha de treballar amb quantitats petites i no fàcilment obtenibles de proteïna. Aquest és, per exemple, el cas de l'anàlisi i identificació de procarboxipeptidases procedents de suc pancreàtic humà (Burgos et al., treball en preparació) en el que cal dissenyar sistemes cromatogràfics capaços de separar les proteïnes en temps curts i d'oferir, a la vegada, una bona separació. Cal partir, per tant, de concentracions no massa baixes de dissolvent orgànic, treballar per damunt de l'umbral de detecció i tenir la precaució de dialitzar les mostres, cas que aquestes estiguin en un medi d'elevada força iònica.

A més de la quantitat de proteïna recuperada, és important també recuperar-la en bones condicions. A aquest respecte cal comentar que la separació de les proteïnes en un medi que conté dissolvents orgànics pot desnaturalitzar-les parcialment, efecte a vegades potenciat quan es treballa a pH molt àcid. En el nostre cas hem observat, amb proteases pancreàtiques, que aquestes sofreixen una certa pèrdua d'activitat enzimàtica, reversible si la cromatografia ha estat realitzada a pH

intermedi i si les proteïnes són sotmeses a una diàlisi exhaustiva amb posterioritat a l'elució de la columna.

L'obtenció de segment d'activació per HPLC ha aportat a la metodologia clàssica dues avantatges i una desavantatge. Aquesta darrera fa referència a la limitació en la quantitat de mostra injectada a la columna, limitació que afecta a molts tipus de separacions per HPLC sempre que es compari amb els mètodes clàssics. Les dues avantatges són el millor rendiment de la cromatografia d'alta pressió i la millor inhibició del procés d'activació de la PCPA (el que permet una millor definició dels productes) que s'obté gràcies a la baixada de pH i a la ràpida cromatografia. Amb aquest sistema la homogeneïtat del segment obtingut és molt millor que en el clàssic, evitant-se degradacions erràtiques i mal controlades.

L'estratègia escollida en les cromatografies analítiques i preparatives de pèptids per HPLC al llarg d'aquesta Tesi no difereix substancialment de la que actualment apliquen laboratoris avançats en aquest terreny, llevat de certes modificacions metodològiques. Així, és important la selecció de la concentració de TFA al 0,05% en la barreja eluent a comptes de 0,1% (la més habitual) ja que hem observat que permet una resolució equivalent als pèptids, però allarga la vida de la columna al treballar a pH menys baix. També és important la utilització d'un sistema de doble detecció a 280-295 i 214 nm, que permet una primera caracterització dels pèptids separats, indicant quins contenen i quins no contenen aminoàcids aromàtics. Aquesta primera caracterització resulta de valuosa ajuda en les posteriors anàlisis d'aminoàcids i en la comparació de *patterns* cromatogràfics complexes. La utilització alternativa de 280-295 nm permet la identificació selectiva de pèptids que contenen Tyr i/o Trp, respectivament, procediment novedós en aquest camp.

La cromatografia de barreges molt complexes de pèptids (p.e. el producte de digestions triptiques de proteïnes de més de 300 residus) no permet generalment resoldre la totalitat dels pèptids de manera

individual. L'aplicació de gradients molt suaus pot col·laborar en la resolució d'algunes fraccions, però si les diferències en temps de retenció dels pics són relativament molt petites, és més econòmic i més ràpid procedir a una recromatografia de la barreja heterogènia. Hem observat que la recuperació mitjana de pèptids recromatografiats (71%) és suficientment bona com per a recomanar l'adopció d'aquest mètode, especialment en els casos de pèptids de temps de retenció molt llargs.

Quan vam intentar posar a punt un mètode d'anàlisi d'aminoàcids que ens permetés aprofitar la tecnologia d'HPLC i complementar adequadament els mètodes de microseqüenciació emprats tinguérem en compte els requisits generals que, segons Chang et al. (1983), ha de complir un mètode de derivatització pre-columna: (i) derivatització homogènia per a tots els aminoàcids; (ii) reproduïbilitat a la derivatització; (iii) estabilitat dels derivats obtinguts. Al nostre entendre, aquests requisits no estaven plenament satisfets en el mètode original (Chang et al., 1982) que ens proposàrem optimitzar, puix que observarem, al aplicar-lo, certs problemes d'homogeneïtat i reproduïbilitat en la derivatització. El mètode de Chang no permetia, a més, la determinació de Trp, encara que aquest no és un problema inherent al mètode de derivatització, sinó que és el resultat de l'adopció de la metodologia, gairebé universal, d'hidròlisi amb àcid clorhídric.

Es pot considerar que les millores aportades al mètode, pel que respecta als problemes abans citats, han estat satisfactòries, i que s'ha dissenyat una metodologia d'hidròlisi amb àcid p-toluensulfònic que és plenament compatible amb la de derivatització i que permet l'anàlisi quantitativa directa de residus triptòfan. Aquesta anàlisi directa és ràpida, sensible, reproduïble, i més convenient que les medicions espectrofotomètriques habituals i que les determinacions de Trp prèvia conversió a derivats reduïts o oxidats com, per exemple, la kinurenina (Inglis et al., 1979).

La possibilitat d'aplicació de diversos gradients cromatogràfics permet adaptar-se a les necessitats de cada mostra a analitzar. Així, per una anàlisi de rutina de mostres de composició ja coneguda o

prevista és convenient utilitzar el gradient ràpid, que permet obtenir els resultats quantitativament en un temps molt curt, 25 min. Amb mostres de composició desconeguda o molt descompensada es pot triar un gradient de major resolució i temps intermedis d'anàlisi (35 min), mentre que, en els casos extrems d'anàlisi de mostres molt complexes cal utilitzar gradients més lents (75 minuts), com en el cas de l'anàlisi d'aminoàcids en fluids biològics. Cal però, no oblidar que existeixen altres mètodes actuals d'anàlisi d'aminoàcids que també ofereixen la possibilitat d'anàlisi de mostres biològiques (Godel et al., 1984; Cohen et al., 1986).

La derivatització pre-columna permet estalviar la pèrdua de sensibilitat que es produeix normalment en els mètodes post-columna a causa de la dilució de la mostra a la càmera de barreja de sortida de columna. No obstant aquesta avantatge, cal recordar que el mètode sofreix també certes limitacions en la sensibilitat, que són principalment el producte de contaminacions dels reactius d'hidròlisi o de les dissolucions emprades a la derivatització. Aquestes contaminacions es veuran magnificades com més petita sigui la quantitat de mostra de què es disposa, i particularment si aquesta procedeix directament d'un efluent cromatogràfic. Cal treballar, per tant, pel damunt del límit de sensibilitat aconsellat per a obtenir resultats quantitativament correctes sempre que es pugui, puix que aquest (100 pmols per al nostre mètode) s'ha determinat a partir de proteïnes patró purificades.

La reproduïbilitat general calculada per aquest mètode optimitzat per nosaltres és perfectament comparable amb la que s'obté amb altres mètodes, ja siguin els clàssics de bescanvi iònic amb derivatització post-columna amb ninhidrina (Moore i Stein, 1963) o els més moderns de derivatització post-columna amb o-fatalaldehid (Bohlen i Schroeder, 1982).

No podem tampoc oblidar que la metodologia aquí explicada està subjecta a certs problemes derivats de la seva aplicació molt continuada o d'un hipotètic elevat nombre de mostres a analitzar. En efecte, la columna emprada tendeix a sofrir una pujada continuada de la pressió de

treball quan el nombre d'anàlisis en una mateixa sèrie o el nombre de sèries analitzades és elevat. Aquest podria ser el símptoma d'una certa insolubilització del reactiu de derivatització en el cap de columna, amb la conseqüent formació de petits precipitats, o podria ser un problema derivat de l'ús de fosfat com amortidor que també precipitaria en barrejar-se amb l'acetonitril en el rentat de la columna. Sigui com sigui, és necessari procedir a rentats periòdics i exhaustius de la columna. Amb aquest objecte, i a fi d'eliminar qualsevol traça de sals, en acabar cada sèrie d'anàlisi hem adoptat el procediment de sotmetre-la a llargs rentats amb aigua (10-15 volums) abans de passar-hi la quantitat de solvent orgànic exent de sals aconsellada per a obtenir un bon rentat final. Així mateix, quan el nombre de mostres a analitzar comporta l'anàlisi ininterrompuda durant més de 12 hores de mostres derivatitzades, és convenient intercalar un gradient de rentat, en absència de sals, cada 6-10 hores de funcionament.

El mètode aquí presentat no pateix els problemes reconeguts amb altres, com el de l'o-ftalaldehid, de manca de reacció amb els residus prolina i poca estabilitat dels derivats amb tots als aminoàcids, ni els problemes de rendiments no quantitius que s'obtenen amb els mètodes de conversió a PTH-aminoàcids, que fan que els seus autors els presentin normalment com mètodes de "separació" i no com mètodes de "quantitatització" (Kolbe et al., 1985); Meuth i Fox, 1986). Es també cert, però, que darrerament la tecnologia en aquest camp ofereix constant evolució, com ho demostren, per exemple, l'estensió del mètode del OPA a iminoàcids (Cooper et al., 1984) o el nou mètode de determinació de PTC-aminoàcids (Bidlingmeyer et al., 1984; Cohen et al., 1986), el qual sembla que és capaç de resoldre la major part de problemes que aquí s'han comentat.

ESTUDIS SOBRE LES PROCARBOXIPEPTIDASES A DE PÀNCREAS DE PORC

Aquests estudis han tingut dues vertents: una d'estructural, que ha comprès la determinació de la identitat entre les dues formes de PCPA presents al pàncreas de porc i la deducció de la seqüència d'aminoàcids de la regió del segment d'activació, i una de funcional que, tenint també a veure amb el capítol d'identitat entre les dues PCPA, s'ha dirigit fonamentalment a l'estudi dels aspectes relacionats amb el procés d'activació del zimògen.

Els resultats de les comparacions dels mapes peptídics triptics de la PCPA II i de la PCPA I-m, fets tant per cromatografia en capa prima com per HPLC, permeten concloure que la identitat de les dues proteïnes és gairebé absoluta. Tot i així, la total identitat entre ambdues proteïnes només podrà ser afirmada si es duen a terme estudis de seqüència. Amb anterioritat a aquest treball no s'havia intentat en cap moment fer un estudi comparatiu de l'estructura de les subunitats PCPA presents en les diverses formes oligomèriques, donant-se sempre per suposat que es tractava de la mateixa proteïna, present en diversos nivells d'associació. Tant sols, en alguns treballs s'havien presentat dades no massa conclouents sobre la semblança de les composicions d'aminoàcids dels protòmers de PCPA en l'espècie bovina (Freisheim et al., 1967a; Uren i Neurath, 1972). Relativament parlant, fins i tot hi havien més dades en relació amb aquest tema que feien referència a les PCPA de pàncreas de porc. Les anàlisis d'aminoàcids de Kobayashi et al. (1978) i els mapes peptídics obtinguts per Martínez (1980) indicaven que el més probable era que es tractés d'una mateixa proteïna, associada o no amb la PPE. Si a aquestes dades se'ls hi adjunten les aquí presentades, no és aventurat afirmar que han de quedar pocs dubtes sobre aquest particular.

Lògicament, si es tracta de la mateixa proteïna, és d'esperar que la identitat pugui referir-se per igual a porcions de la mateixa. En concret, els estudis fets en aquesta Tesi amb els segments d'activació aïllats de cada una de les formes de PCPA porcina concorden amb la identitat observada per als zimògens.

Entre la PCPA porcina monomèrica i el corresponent protòmer aïllat del complex binari (PCPA I-m) s'observa, no obstant la identitat estructural, lleugeres diferències quantitatives, que no qualitatives, pel que respecta al procés de generació d'activitat per acció de la tripsina sobre el zimògen. Aquestes diferències són probablement degudes al mètode utilitzat per a la separació de les subunitats, a resultes del qual és possible que la PCPA I-m quedi parcialment desnaturalitzada. Malhauradament, no hem pogut emprar amb les nostres proteïnes el mètode de Puigserver i Desnuelle (1975) que permet obtenir les subunitats en estat natiu.

La capacitat inhibidora que la PPE presenta sobre l'activitat intrínseca de la PCPA es va utilitzar com una altra sonda per estudiar la identitat de comportaments entre les dues formes de PCPA. Aquests estudis, que van donar resultats que concordaven amb la idea general, van servir a l'hora per fer un intent de quantificar la intensitat de la interacció entre les dues subunitats del complex binari. Com ja es comenta a l'apartat corresponent (III.6.3) els càlculs s'han fet a partir d'unes aproximacions teòriques sobre la quantitat d'espècie lliure i els valors obtinguts han de ser avaluats a la llum d'aquesta consideració. Tot i així, tot sembla indicar que la interacció és forta i que la constant d'associació deduïda (aprox. 10^8 M^{-1}) es correspon força amb la realitat. Per altra banda, Puigserver i Desnuelle (1977) ja parlaven d'una constant d'aquest ordre per al complex binari S5 de bou. Aquesta interacció entre les dues subunitats té lloc segurament a través de regions corresponents als enzims actius, com sembla poder deduir-se de l'observada interacció entre CPA i PPE (San Segundo, 1982) en pàncreas de porc i d'una observació similar en pàncreas de bou entre la CPA i la subunitat II (Behnke et al., 1970), així com del fet que les subunitats segueixin unides després de l'activació del complex ternari de bou (Kerfelec et al., 1985). Si això fos cert, el segment d'activació quedaria exclòs com a zona de contacte entre subunitats. Experiments més recents (Vilanova et al., 1985), tot i que no posen en dubte aquesta consideració, apunten la possibilitat que el saA també col·labori directament a la interacció, tal i com les electroforesis en gels d'urea

transversal presentades en aquest darrer treball citat indiquen.

El segment d'activació de la PCPA de pàncreas de porc ha estat el primer en ser aïllat d'aquesta mena de proenzimes i el primer del que se'n ha deduït l'estructura primària mitjançant anàlisi per degradació d'Edman; anteriorment es coneixia la seqüència corresponent al proenzima de rata, deduïda a partir de la seqüència de bases del cDNA (Quinto et al., 1982). L'estructura primària del pèptid d'activació ha estat obtinguda per solapament de les seqüències dels pèptids producte de digestions enzimàtiques, no havent-se pogut utilitzar en cap cas pèptids producte de trencaments químics. Aquest fet és el resultat de la resistència mostrada pel segment al tractament amb reactius químics, el que suggereix que la cadena polipeptídica sofreix agregació en presència d'elevades concentracions d'àcids orgànics i a baix pH, el que dificulta l'accessibilitat als punts de trencament. No es pot excloure la possibilitat que el trencament químic més cercat, per l'enllaç Trp₃₇-Asp₃₈ sigui resistent als reactius o metodologia emprats degut a la seva naturalesa o als residus i conformació que l'envolten

D'entre els tractaments enzimàtics aplicats, tripsina, proteïnasa V-8 de *Staphylococcus Aureus* i pepsina, només el primer va ser aplicat al proenzim i al enzim originals, per tal d'obtenir pèptids diferencials que, lògicament, havien de pertànyer al saA. Aquestes dues darreres espècies són molt més asequibles que el propi saA i són per tant una bona font de pèptids, encara que la raó darrera del seu ús radiqui en la baixa recuperació d'algun pèptid quan es partia de segment aïllat.

El fet d'emprar la seqüència del saA de rata, prèviament coneguda, com a base per a l'alineament de la seqüència del saA de porc, tot i que va resultar altament aclaridor i beneficiós a la llarga, va provocar a la vegada una assumpció errònia en la distribució d'alguns pèptids tríptics. Efectivament, si s'observen les dues seqüències presentades a la Figura III.41, es pot comprovar que hi ha una coincidència exacta de situació de residus Lys i Arg pel que respecta als 7 primers pèptids tríptics possibles. No succeeix així amb els dos darrers que, gràcies a un canvi en la posició dels aminoàcids bàsics, canvien la seva llargada. D'aquesta manera, els pèptids tríptics 8 i 9 (segons l'ordre de

disposició des de l'extrem N-ter) que en rata tenen, respectivament, 25 i 9 aminoàcids, es converteixen en porc en dos de, respectivament, 9 i 25 aminoàcids. Aquesta diferència tant simple, a l'ajuntar-se amb una tant alta coincidència pel que respecta als pèptids anteriors, va provocar no poques confusions en el definitiu alineament dels pèptids C-terminal, clarament establerta finalment al sumar-hi les dades dels trencaments pepsínic i de V-8.

El saA presenta una zona molt rica en prolines, situada entre els residus 40 i 54, amb un total de 5 residus Pro. Es ben sabut que la degradació seqüencial d'Edman presenta precissament la seva eficiència més baixa amb enllaços Pro-X, que donen normalment trencaments parcials i provoquen l'alliberament de dobles de feniltiohidantoïnes en els cicles successius. Donada la concentració de les prolines en una zona molt determinada del saA, l'obtenció de la seqüència d'aquesta regió va ser la que va presentar més problemes, requerint l'acumulació d'un nombre considerable de dades de diversos trencaments per establir finalment l'alineament i els solapaments definitius.

Els solapaments obtinguts són, en general, suficients, excepció feta de la posició 70, on només consta d'un residu. No obstant això, al ser aquest residu una tirosina, l'única del segment, i en estar unívocament demostrada per anàlisi d'aminoàcids l'existència de Tyr en els dos pèptids en qüestió, no han de quedar gaire dubtes sobre la bondat d'aquest solapament.

Al no disposar de dades directes sobre la seqüència C-terminal del saA no podem afirmar amb total seguretat que la seqüència que aquí es presenta constitueixi la totalitat del saA i que l'aminoàcid que s'uneix amb el que aquí es presenta com a C-ter al proenzim sigui el residu N-ter de la CPA. Cal recordar, però, que l'elevada homologia que aquesta seqüència manté amb la corresponent a pàncreas de rata, que arriba fins al punt de no oferir, en els 94 residus seqüenciats, la presència de cap delecció ni de cap inclusió, i només d'unes poques substitucions, és una garantia suficient per suposar que no hi han residus "extra" a pàncreas de porc. Si fos així, aquests estarien justament localitzats a l'extrem C-terminal com a perllongació de la seqüència presentada, possibilitat

que ens inclinem a considerar com a poc probable. No obstant aquestes consideracions, és cert que només la seqüenciació de la zona que uneix segment i enzim actiu pot demostrar inequívocament quina de les dues opcions apuntades és la vertadera. Lògicament, si es pretén dur a terme aquests experiments, caldrà disposar de digestions diferencials d'enzima i de proenzima amb proteïnases diferents de la tripsina.

Els estudis conformacionals inicials de predicció d'estructura secundària i d'espectroscòpia de RMN, ultra reforçar en el primer cas l'evidència d'homologia entre els saA de rata i de porc, han servit per a comprovar una altra vegada que el segment aïllat adopta una conformació de proteïna globular, amb un elevat contingut en hèlix α , i amb una considerable estabilitat front a variacions en les condicions ambientals, el que està plenament d'acord amb anteriors consideracions (San Segundo et al., 1982; Avilés et al., 1982). Aquestes característiques conformacionals estan d'acord amb la resistència del segment a la degradació proteolítica i obren la porta a estudis sobre la seva possible funcionalitat una vegada segregat de l'enzima, possibilitat ja apuntada en estudis teòrics i funcionals realitzats amb el segment aïllat (Vilanova, 1987).

Es coneixen amb detall els processos d'activació que tenen lloc amb determinades proproteases, com les serina-proproteïnases pancreàtiques o el pepsinògen. En general, però, el coneixement sobre aquest particular sol ser, però, escàs, i es limita a estudis sobre la generació d'activitat, sense aprofundir a nivell molecular. Les procarboxipeptidases estan incloses dins d'aquest segon grup de zimògens, ja que poca cosa es coneix respecte del seu procés d'activació. La idea que fins ara es té mecanisme d'activació proteolític de la PCPA de pàncreas de bou, la més estudiada, és ben escàs, i d'aquí que l'estudi corresponent a les formes de pàncreas de porc no ha pogut gaudir de cap model al que fer referència ni amb el que comparar-lo. Recentment, però, un estudi fet amb les PCPA bovines adopta una metodologia semblant a la que es discuteix en aquesta Tesi (Chapus et al., 1987).

Les antigues hipòtesis que feien referència a l'activació de les PCPAs de bou, i que consideraven la prèvia activació de la denominada subunitat II com a pas indispensable per a la generació d'activitat de la subunitat precursora de la CPA (Brown et al., 1963; Uren i Neurath, 1972) no semblen tenir una aplicació general a l'espècie porcina si es considera la presència en aquesta espècie d'una forma monomèrica, activable directament per la tripsina. No obstant això, hem observat que l'estructura quaternària té un clar efecte sobre el procés de generació d'activitat després de l'atac de la tripsina, evidenciant-se altra vegada que les serina-proteïnases unides a la PCPA (la PPE en pàncreas de porc) col.laboren en el procés d'activació triptica.

Diverses poden ser les explicacions per l'observada diferència de comportament de les dues PCPAs quant a la generació d'activitat es refereix, depenent que es tinguin en compte únicament consideracions conformacionals o que es compti amb el protagonisme actiu de la PE. El que sembla més probable és que la relativa inhibició inicial observada a la PCPA I en relació amb la PCPA II sigui deguda a que, a digestions poc exhaustives, el complex ternari format pels productes inicials, és a dir, CPA, PE i saA, sigui suficientment compacte com per a impedir un accés còmode del substrat al centre actiu de la CPA. En canvi, la superior activitat de la PCPA I a temps intermedis pot ser deguda a la col.laboració de la PE en la degradació del segment d'activació primari, doncs està comprovat que la clau de la total expressió de l'activitat carboxipeptidasa A està en la degradació per l'extrem C-terminal del pèptid producte immediat del primer atac triptic.

Diversos autors han fet referència a processos de generació d'activitat per formes monomèriques naturals (Lacko i Neurath, 1970) o artificials de PCPA (Freisheim et al., 1967b). Sobretot en aquest darrer cas s'observa una semblança important en la forma de la corba, bifàsica, encara que els autors adjudiquen aquest fenomen a factors no presents en els nostres experiments, la qual cosa ens fa pensar en la inexactitud de les seves conclusions. De fet, l'explicació que nosaltres proposem per tals observacions té relació amb la cinètica de degradació seqüencial del pèptid primari o saA complet, que, com els experiments de

seguiment de l'activació per HPLC o per electroforesi confirmen, és el factor que té més influència en la generació d'activitat. En els treballs citats no es feien altres tipus d'experiments de seguiment de l'activació que la mesura d'activitats CPA.

Pel que respecta al complex binari, la hipòtesi de Uren i Neurath (1972) referent al complex SS de pàncreas de bou, que suposa que la formació de CPA $_{\alpha}$ ve produïda per l'acció de la quimotripsina (o subunitat II activada), hauria de ser revisada si s'observés que, a l'igual que en el cas del porc o de rata, l'aminoàcid que precedeix a la Ala $_1$ de la seqüència de la CPA és un residu bàsic (Arg en el nostre cas). Si fos així, aquest enllaç que uniria el saA i la CPA seria del tipus Arg-Ala, que no és atacat per la quimotripsina, el que exclouria la possible acció primària d'aquesta proteïnasa en l'activació de la PCPA SS. De fet, aquesta hipòtesi no ha estat tinguda mai en compte en les PCPA de porc, puix que la pròpia forma monomèrica natural és ja directament activable per tripsina sola.

Els experiments que aquí resulten novedosos respecte a altres treballs en que també s'estudiava el procés d'activació, és a dir, el seguiment del mateix per electroforesi en diversos medis, el seguiment analític i preparatiu per HPLC i els estudis d'inhibició duts a terme amb els pèptids generats al llarg de l'activació i aïllats, han permès identificar les espècies generades i establir, a partir de la cinètica de transformacions de les mateixes i de les dades de capacitat d'interacció pèptids-CPAs i de generació d'activitat, una hipòtesi de mecanisme general d'activació per a la forma monomèrica. Aquesta hipòtesi es nodreix de fets comprovats, com l'acció hidrolítica de la tripsina a diferents fases, i de proposicions temptatives, com les que fan referència a la col.laboració directa que la CPA podria tenir en el procés de degradació dels pèptids generats. Sigui com sigui, és un fet comprovat que la generació d'activitat està íntimament relacionada amb la desaparició paulatina del medi del segment primari, observació que no havia estat mai formulada clarament en anteriors estudis d'activació de PCPAs que, en canvi feien molt d'èmfasi en la importància de l'aparició de CPA $_{\alpha}$ i la seva transformació en CPA β .

La degradació seqüencial dels primers residus de l'extrem N-terminal de fragments generats al llarg de l'activació han permès observar que l'escurçament del segment d'activació primari es produeix, mentre encara s'observa una inhibició important de l'activitat CPA, pel extrem C-terminal. La hipòtesi de trencament seqüencial presentada guarda bona relació amb prediccions conformacionals pel que respecta a llocs situats en la superfície i per tant accessibles a l'atac protolític.

El procés d'activació que s'ha discutit aquí guarda poca relació amb altres processos d'activació de zimògens coneguts. També està molt lluny dels definits per les serina-proteïnases pancreàtiques, on només es perden pocs residus aminoàcids, i es diferencia del corresponent al pepsinògen, no solament en la llargada del pèptid perdut, sino en els agents activadors (el mateix pepsinògen en un cas, la tripsina en l'altre), i no pot comparar-se amb el corresponent a una proteïnasa com la proteïnasa estreptococal, que perd un pèptid d'aproximadament 100 residus, en ser molt poques les dades de que es disposa sobre aquesta proteïna.

V. CONCLUSIONS

1.- S'ha dissenyat un sistema d'anàlisi i aïllament de procarboxipeptidases i carboxipeptidases pancreàtiques per HPLC, basat en la utilització de columnes de fase reversa i gradients de piperazina 10mM - acetonitril a pH 6,5. Aquest sistema és idoni per a l'anàlisi de quantitats reduïdes de mostra.

La recuperació de procarboxipeptidases i carboxipeptidases pancreàtiques després d'una cromatografia en columnes de fase reversa està sotmesa als següents condicionants:

a) La cromatografia ha de ser feta a pH intermedi; el pes molecular i el caràcter acídic d'aquestes proteïnes impedeix la seva recuperació en condicions de pH baix.

b) La recuperació cromatogràfica disminueix en augmentar el temps de retenció. Es aconsellable dissenyar gradients que permetin l'elució de les mostres entre els 10 i els 15 minuts quan es treballa amb columnes de fase reversa.

c) Cal treballar, sempre que sigui possible, en absència de sals, puix que la força iònica afecta negativament la recuperació.

2.- S'ha dissenyat un sistema d'aïllament preparatiu del segment d'activació de la procarboxipeptidasa A i dels seus fragments per HPLC que permet escurçar substancialment el temps d'obtenció i millorar la inhibició de l'acció de la tripsina, i que ofereix un millor rendiment que el mètode d'obtenció amb columnes de bescanvi iònic.

3.- El seguiment cromatogràfic a 214 i a 280 - 295 nm permet detectar selectivament aquells pèptids que contenen residus tirosina o triptòfan, respectivament, en una barreja inicial complexa. Aquesta detecció selectiva pot fer-se extensiva als pèptids que contenen histidina mitjançant aplicació d'aliquotes de les fraccions cromatogràfiques a capes primes de poliamida o sílica i detecció per mètodes de tinció específics.

4.- Hem observat que la recuperació mitja de pèptids sotmesos a recromatografia per HPLC en suports de fase reversa de C-18 i porus

estret és del 71%. Aquesta recuperació és menor quant més llarg, acídic i hidrofòbic sigui el pèptid.

5.- S'ha posat a punt un mètode d'anàlisi d'aminoàcids per derivatització pre-columna amb clorur de Dabsil i HPLC de fase reversa. L'estudi d'una àmplia gamma de condicions de derivatització i cromatografia, entre les que s'inclouen les concentracions de clorur de Dabsil, de la solució amortidora i del solvent orgànic, el pH de la reacció i les condicions del gradient ha permès millorar substancialment la homogeneïtat i el rendiment del procés. El temps d'anàlisi estàndard és de 25 minuts i 100 pmols la quantitat estàndard de mostra requerida.

Aquest mètode pot ser estès, mitjançant modificacions del gradient, a l'anàlisi de mostres complexes d'aminoàcids no proteïnogènics, tant naturals com modificats químicament. La hidròlisi prèvia de les mostres amb àcid p-toluensulfònic permet la detecció i quantitatització dels residus triptòfan de manera simultània a la resta d'aminoàcids.

La reproduïbilitat del mètode és comparable a la d'altres mètodes d'anàlisi d'aminoàcids per HPLC, sent la desviació estàndard relativa del 1,3% pel que respecta al sistema cromatogràfic, i del 2,1% quan s'hi afegeix la variabilitat deguda al procés de dabsilació.

6.- La procarboxipeptidasa A monomèrica natural i la subunitat procarboxipeptidasa A aïllada a partir del complex binari amb la proproteïnasa E són idèntiques quant a pes molecular, llargada del segment d'activació i mapes peptídics seguits tant per capa prima com per HPLC. En absència d'estudis complets de seqüència no es pot, però, afirmar l'absoluta identitat de les seves estructures primàries.

7.- El comportament de la subunitat procarboxipeptidasa A aïllada a partir del complex binari front l'activació triptica és, des d'un punt de vista qualitatiu, igual al que presenta el monòmer natural. Aquesta observació recolça la conclusió anterior.

8.- S'ha comprovat que la constant d'associació entre les subunitats PCPA i PPE és de l'ordre de 10^8 M^{-1} ; si es considera que la

proteïnasa E és un inhibidor de l'activitat residual de la procarboxipeptidasa A, es pot calcular una constant d'inhibició de l'ordre 10^{-7} M.

9.- S'ha deduït l'estructura primària del segment d'activació de la procarboxipeptidasa A monomèrica de pàncreas de porc per degradació seqüencial automàtica i manual del zimògen sencer i de fragments del segment d'activació obtinguts mitjançant digestió digerits amb tripsina, proteïnasa V-8 i pepsina i separació per HPLC.

El segment d'activació està constituït per 94 residus aminoàcids amb una elevada proporció de residus àcídics (18%) i hidrofòbics (48%). La seva seqüència presenta una forta homologia amb la corresponent al mateix segment en pàncreas de rata, especialment en les regions 3-38, 44-57 i 72-84, amb 94%, 92% i 100% d'homologia, respectivament. Es també remarcable l'absència de residus cisteïna en ambdós segments i la concentració de residus prolina en la seva regió central.

10.- Les prediccions d'estructura secundària i els estudis conformationals fets mitjançant ressonància magnètica nuclear confirmen que el segment d'activació aïllat presenta una estructura globular compacta, rica en hèlix α . Concretament, es preveu l'existència de dues regions extremes riques en hèlix α i una regió central amb diversos girs β .

11.- L'estructura quaternària afecta notablement el procés d'activació triptica de les procarboxipeptidases A, de manera que la presència de la proteïnasa E produeix en un principi una inhibició i posteriorment una acceleració relatives en la generació d'activitat carboxipeptidasa A. Aquest fenomen es dona probablement com a resultat conjunt d'efectes conformationals en el segment d'activació i de la col.laboració de la subunitat PPE en el seu procés de degradació.

12.- L'aparició, per efecte de l'activació triptica, d'un fragment d'activació primari que conté el segment d'activació sencer, és immediata en les dues formes de procarboxipeptidasa A porcina. La

posterior degradació d'aquest fragment primari és més ràpida en el complex binari.

13.- El seguiment del procés d'activació triptica de la procarboxipeptidasa A per HPLC i per tècniques electroforètiques permet observar un clar paral·lelisme entre la desaparició del fragment d'activació primari i l'aparició d'activitat peptidàsica de la carboxipeptidasa A. L'expressió de l'activitat depèn doncs, principalment, de la degradació del fragment d'activació primari. També hem establert que la conversió paral·lela de la forma α de la carboxipeptidasa A en la forma β no té pràcticament conseqüències en la generació de la seva activitat.

14.-El fragment d'activació primari és el que posseeix una més elevada capacitat d'inhibició de l'enzim actiu, en comparació amb altres fragments de menor llargada generats durant l'activació. Estudis d'interacció CPA-fragments seguits per electroforesi en gradient d'urea permeten comprovar l'observació anterior.

15.- La degradació inicial i intermèdia del segment d'activació es produeix per la seva regió C-terminal. L'extrem N-terminal només és accessible a l'atac per la tripsina quan el segment d'activació ha estat considerablement escurçat per l'altre extrem, fenomen probablement acompanyat per una relaxament de la conformació. Els trencaments triptics proposats temptativament per explicar la seqüencialitat del procés són congruents amb la situació dels punts de tall en zones accessibles de la molècula, considerades així a partir d'aproximacions hipotètiques sobre la seva estructura terciària. La pròpia carboxipeptidasa A podria col·laborar en la degradació seqüencial del seu segment d'activació.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abita, J.P., Moulin, A., Lazdunski, M., Hoge, G., Palasciano, G., Brasca, A. i Tiscornia, D. (1973) *FEBS Lett.* **34**, 251-257
- Al-Janabi, J., Hartsuck, J.A. i Tang, J. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 4628-4632
- Allan, B.J., Keller, P.J. i Neurath, H. (1964) *Biochemistry* **3**, 40-43
- Allen, G., (1982) "Sequencing of Proteins and Peptides" (Ed. Elsevier-North Holland, N.Y.), pp. 146-160
- Ambler, (1965) *Biochem. J.* **96**, 32P
- Ames, G.F. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 634-644
- Anfinsen, C.B. (1966) *Harvey Lect.* **61**, 95
- Anson, M.L. (1935) *Science* **81**, 467
- Anson, M.L. (1937) *J. Gen. Physiol.* **20**, 663
- Auer, H.E. i Glick, D.M. (1984) *Biochemistry* **23**, 2735-2739
- Avery, N.C. i Light, N. (1985) *J. Chromatogr.* **328**, 347-352
- Avilés, F.X., San Segundo, B., Vilanova, M., Cuchillo, C.M. i Turner, C. (1982) *Febs. Lett.* **149**, 257-260
- Avilés, F.X. Vendrell, J., Burgos, F.J., Turner, C., Cary, P.D. i Crane-Robinson, C. (1984) *Biochem. Soc. Trans* **13**, 344-345
- Avilés, F.X., Vendrell, J., Burgos, F.J., Soriano, F. i Méndez, E. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **130**, 97-103
- Avilés, F.X., Vilanova, M., Vendrell, J., Cuchillo, C.M. i Méndez, E. (1987), enviat per publicació
- Barber D., Sanchez-Monge, R., Garcia-Olmedo, F., Salcedo, G. i Méndez, E. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **873**, 147-151
- Barrett, A.J. (1980) *Feder. Proceedings* **39**, 9-14
- Bazzone, T.L. i Vallee, B.L. (1976) *Biochemistry* **15**, 1868-1875
- Behnke, W.D., Teller, D.C., Wade, R.D. i Neurath, H. (1970) *Biochemistry* **9**, 4189-4200
- Bennet, H.P.J., Browne, C.A. i Solomon, J. (1980) *J. Liq. Chromatogr.* **3**, 1353-1359

- Benson, J.R. i Hare, D.E. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 619
- Bettelheim, F.R. i Neurath, H. (1955) *J. Biol. Chem.* 212, 241
- Bieth, J.A. (1983) *J. Chromatogr.* 255, 219-238
- Bieth, J.A. i Wermuth, C.G. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 53, 383-390
- Bieth, J.A., Spiess, B. i Wermuth, C.G. (1974) *Biochem. Med.* 11, 350-357
- Blackburn, S. (1976) a *Enzyme structure and function* (ed. Marcel Dekker, N.Y.) Vol. 3, p. 169
- Blobel, G. i Dobberstein, B. (1975a) *J. Cell Biol.* 67, 835-851
- Blobel, G. i Dobberstein, B. (1975b) *J. Cell Biol.* 67, 852-862
- Blobel, G. i Sabatini, D.D. (1971) a *Biomembranes* Ed. Manson, L.A. (Plenum Press, N.Y.) Vol. 2, pp. 193-195
- Blocklerhurst, K. i Kierstan, M.P.J. (1973) *Nature, New Biol.* 242, 167-173
- Bohlen, P. i Schroeder, P. (1982) *Anal. Biochem.* 126, 144-152
- Bradshaw, R.A., Walsh, K.A. i Neurath, H. (1971) *Biochemistry* 10, 938-972
- Breddam, K. (1986) *Carlsberg Res. Comm.* 51, 83-128
- Bridgen, K.J. (1976) *Biochemistry* 15, 3600-3604
- Brown, J.R., Cox, D.J., Greenshields, R.N., Walsh, H., Yamasaki, M., i Neurath, H. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 1554-1562
- Brown, J.R., Greenshields, R.N., Yamasaki, M. i Neurath, H. (1963a) *Biochemistry* 2, 867-876
- Brown, J.R., Yamasaki, M. i Neurath, H. (1963b) *Biochemistry* 2, 877-886
- Burgos, F.J. (1984) *Tesina de Llicenciatura*. Univ. Autònoma de Barcelona
- Bustin, M. i Conway-Jacobs, A. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 615-620
- Campbell, I.D., Dobson, C.M., Williams, R., J.P. i Zavier, A.V. (1973) *J. Mag. Res.* 11, 172-181

- Carpenter, F.H. (1967) a *Methods in Enzymology* Vol. XI, p. 237
- Case, R.M. (1978) *Biol. Rev.* 53, 211-354
- Cohen, K.A., Schollenberg, K., Benedek, K., Larger, B.L., Grego, B.
i Hearn, M.T.V. (1984) *Anal. Biochem.* 140, 223-235
- Cox, D.J., Bovard, F.C., Bargetzi, J.P., Walsh, K.A. i Neurath, H. (1976)
Biochemistry 3, 44-47
- Creighton, T.E. (1979) *J. Mol. Biol.* 129, 235-264
- Crestfield, A.M., Stein, W.H. i Moore, S. (1964) *J. Biol. Chem.* 238,
2413-2420
- Cooper, J.D.H., Lewis, M.T. i Turnell, D.C. (1984) *J. Chromatogr.* 285,
484-489
- Chaiken, I.M. i Hough, C.J. (1980) *Anal. Biochem.* 107, 11-16
- Chang, J.Y., Creaser, E.H., Bentley, K.W. (1976) *Biochem. J.* 153,
607-611
- Chang, J.Y. (1981) *Biochem. J.* 199, 557-564
- Chang, J.Y., Knecht, R. i Braun, D.G. (1981) *Biochem. J.* 199,
547-555
- Chang, J.Y., Knecht, R. i Braun, D.G. (1982) *Biochem. J.* 203,
803-806
- Chang, J.Y., Knecht, R. i Braun, D.G. (1983) *Methods Enzymol.* 91,
41-48
- Chapus, C., Kerfelec, B., Foglizzo, E. i Bonicel, J. (1987) *Eur. J.
Biochem.* en premsa.
- Davie, E.W. i Fujikawa, K. (1975) *Annu. Rev. Biochem.* 44, 799-829
- Chou, P.Y. i Fasman, G.D. (1978) *Adv. Enzymol.* 47, 45-141
- Chou, P.Y. i Fasman, G.D. (1979) *Biophys. J.* 26, 365-383
- Davie, E.W., Fujikawa, K., Legaz, M.E. i Kato, H. (1975) a *Proteases
and Biological Control*, eds. Reich, E., Rifkin, D.B. i Shaw, E.
(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.),
Vol. 2, pp. 65-77
- Davie, E.W. i Neurath, H. (1955) *J. Biol. Chem.* 212, 515

- Desnuelle, P. (1960) *Enzymes* 4, 107
- Doolittle, R.F. (1981) *Science* 214, 149-159
- Drapeau, G.R. (1977) *Methods Enzymol.* 57, 189-191
- Dixon, M. i Webb, E.B. (1979) "The Enzymes" 3^a Ed. Longman Group Ltd. (London)
- Dunlap III, C.E., Gentleman, J i Lowney, L.L. (1978) *J. Chromatogr.* 160, 191-198
- Dykes, C.W. i Kay, J. (1975) *Biochem. J.* 153, 141-144
- Edman, P. (1950) *Acta Chem. Scand.* 4, 283-293
- Edman, P. i Begg, G. (1967) *Eur. J. Biochem.* 1, 80-91
- Edman, P. i Henschen, M. (1975) a *Protein Sequence Determination* ed. Needleman, S.B. (Springer Verlag, Berlin, Heilderberg, N.Y.) pp. 232-279
- Efimov, A.V. (1984) *FEBS Lett.* 166, 33-38
- Feinstein, G., Kupfer, A. i Sokolowsky, M. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 50, 1020-1026
- Fernlund, P., Stenflo, J. i Tufvesson, A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5889-5892
- Folk, J.E. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3541
- Folk, J.E., Piez, K.A., Carrol, W.R. i Gladner, J.A. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2272-2277
- Folk, J.E. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3895-3898
- Folk, J.E. i Schirmer, E.W. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3884-3894
- Folk, J.E. i Schirmer, E.W. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 181-192
- Fontana, A. (1972) a *Methods in Enzymology* Vol. 25, pp. 419-423
- Freer, S.T., Kraut, J., Robertus, J.D., Wright, H.T. i Xuang, N.H. (1970) *Biochemistry* 9, 1997-2009
- Freisheim, J.H., Walsh, K.A. i Neurath, H. (1967a) *Biochemistry* 10, 3010-3019
- Freisheim, J.H., Walsh, K.A. i Neurath, H. (1967b) *Biochemistry* 10, 3020-3028

- Fruton, J.S. (1974) *Accounts Chem. Res.* 7, 241-246
- Fullmer, C.S. i Wasserman, R.H. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 7208-7212
- Funakoshi, T.S., Shogi, R. Yokohama, H. i Kubota, Y. (1983) *Pharm. Bull* 33, 198-203
- Gardell, S.J., Craik, C.S., Hilbert, D., Urdea, M.S. i Rutter, W.J. (1985) *Nature* 317, 551-555
- Genescà, E. (1985) *Tesina de Llicenciatura Univ. Autònoma de Barcelona*
- Geneste, P. i Bender, M.L. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 683-685
- Gerber, G.E., Anderegg, R.J., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Biemann, K, i Khorana, H.G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 227-231
- Gertler, A. i Hoffman, T. (1970) *Comp. J. Biochem.* 48, 384-386
- Gertler, A., Walsh, K.A. i Neurath, H. (1974) *Biochemistry* 13, 1302-1310
- Glazer, A.N., Delange, R.J. i Sigman, D.S. *Chemical Modification of Proteins*, eds. Work, T.S. i Work, E. (ed. Elsevier-North Holland, Amsterdam)
- Glick, D.M., Auer, H.E., Rich, D.H., Kawai, M. i Kamath, A. (1986) *Biochemistry* 25, 1858-1864
- Gratecos, D., Guy, O., Roverfy, M. i Desnuelle, P. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 175, 82-96
- Gray, W.R. (1972) *Methods Enzymol.* 23, 121-138
- Gross, E. i Witkop, B. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 1510-1511
- Grossman, A. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.* 78B, 1-13
- Gurley, L.R., Valdez, J.G., Prentice, D.A., Dale, W.D. (1933) *Anal. Biochem.* 129, 132-144
- Hallenbeck, P.C. i Mueller, R.D. (1984) *Anal. Biochem.* 138, 189-195
- Hancock, W.S., Bishop, C.A., Prestidge, R.L., Harding, D.R.K. i Hearn, M.T.V. (1978) *J. Chromatogr.* 153, 395
- Hare, P.E. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 3
- Hartley, B.S. (1960) *Annu. Rev. Biochem.* 29, 45

- Hartley, B.S. (1970) *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 257, 77-83
- Hashimoto, F., Tsuneyoshi, H., Kanbayashi, M., Yoshida, K. i Sugano, H. (1983) *Anal. Biochem.* 129, 192-199
- Hasilik, A. i Neufeld, E. (1980) *J. Biol. Chem.* 256, 9937-9943
- Hass, G.M. i Ryan, C.A. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* 97, 1481-1486
- Hayashi, R., Aibara, S. i Hata, T. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 212, 359-361
- Hayashi, R. i Hata, T. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 263, 673-678
- Hawk, G. L. (ed.) (1978) *Biological Biomedical Applications of Liquid Chromatography* (Marcel Dekker, N.Y.) Chromatographic Science Series, Vol. 10
- Heinrikson, R.L. i Meredith, S.C. (1984) *Anal. Biochem.* 136, 65-74
- Hopp, T.P. i Woods, K.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3824-3828
- Houmard, J. i Drapeau, G.R. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3506-3509
- Huang, H.V., Bond, M.W., Hunkapiller, M.W. i Hood, L.E., (1983) *Methods Enzymol.* 91, 319-324
- Hughes, G.J. i Wilson, K.J. (1983) a *Methods of Biochemical Analysis* ed. Glick, D. (John Wiley & Sons Inc. N.Y.) Vol. 29, pp. 59-135
- Hughes, G.J. i Wilson, K.J. (1982) *J. Chromatogr.* 242, 337-346
- Hughes, G.J., Winterhalter, K.H., Boller, E. i Wilson, K.J. (1982) *J. Chromatogr.* 235, 417-426
- Hugli, T.E. (1975) a *Proteases and Biological Control* eds. Reich, E., Rifkin, D.B. i Shaw, E. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), Vol. 2, pp. 273-290
- James, M.N.G. (1980) *Can. J. Biochem.* 58, 251-271
- Jamieson, J.D. (1975) a *Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology & Pathology* eds. Weissmann, G. i Clairborne, R. (H.P. Publishing Co. N.Y.) pp. 143-152
- Jeppsson, J.O. i Sjöquist, J. (1967) *Anal. Biochem.* 18, 264-269
- Johnson, P. i Stockmal, V.B. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 94, 697-703

- Jones, B.N., Paabo, S. i Stein, S. (1981) *J. Liq. Chromatogr.* 4, 565-585
- Kassell, B. i Kay, J. (1973) *Science* 180, 1022-1027
- Katayama, K., Ericsson, L.H., Enfield, D.L., Walsh, K.A., Neurath, H., Davie, E.W. i Titani, K. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4990-4994
- Kay, J. i Kassell, B. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6661
- Kedenburg, C.P. (1971) *Anal. Biochem.* 40, 35-42
- Keil-Dlouha, V., Zlyber, N., Imhoff, J.M., Tang, N.T., i Keil, B. (1971) *FEBS Lett.* 16, 291-295
- Keller, P.J., Cohen, E. i Neurath, H. (1956) *J. Biol. Chem.* 223, 457-467
- Keller, P.J., Cohen, E. i Neurath, H. (1958) *J. Biol. Chem.* 230, 905-915
- Kerfelec, B., Chapus, C. i Puigserver, A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 121, 162-167
- Kerfelec, B., Chapus, C. i Puigserver, A. (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 515-519
- Kerr, M.A., Walsh, K.A. i Neurath, H. (1976) *Biochemistry* 15, 5566-5570
- Kim, W.J. i White, T. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 242, 441-445
- Kizuki, K., Kamada, M., Ikekeita, M. i Moriya, H. (1982) *Chem. Pharm. Bull* 30, 3354-3361
- Kobayashi, R., Kobayashi, Y. i Hirs, C.H.W. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5526-5530
- Kobayashi, R., Kobayashi, Y. i Hirs, C.H.W. (1981a) *J. Biol. Chem.* 256, 2460-2465
- Kobayashi, Y., Kobayashi, R. i Hirs, C.H.W. (1981b) *J. Biol. Chem.* 256, 2466-2470
- Koga, D. i Hayashi, K. (1976) *J. Biochem.* 79, 549-558
- Koide, A. i Yoshizawa, M. (1981a) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 100, 1091-1098
- Koide, A., Yoshizawa, M. i Kurachi, J. (1981b) *Eur. J. Biochem.* 117, 383-388

- Kraehenbuhl, J.P., Racine, L. i Jamieson, J.D. (1977) *J. Cell Biol.* 72, 406-423
- Kreil, G. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* 50, 317-348
- Kühne, W.F. (1876) *Verhandlungen des Heidelb. Naturhist. Med. Vereinn, N.A.* p.2
- Kunitz, M i Northrop, J.H. (1933) *J. Gen. Physiol.* 18, 433
- Kyte, J. i Rodríguez, H. (1983) *Anal. Biochem.* 133, 515-522
- Lacko, A.G. i Neurath, H. (1970) *Biochemistry* 9, 4680-4690
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685
- Laemmli, U.K. (1975) a *Proteases and Biological Control* eds. Reich, E., Rifkin, D.B. i Shaw, E. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.), Vol. 2, pp. 661-676
- Lewis, R.V., Fallon, A., Stein, S., Gibson, K.D. i Udenfriend, S. (1980) *Anal. Biochem.* 104, 153-159
- Light, A., Frater, R., Kummel, J.R. i Smith, E.L. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 12, 1276
- Lindestrom-Lang, K.H. i Ottessen, M. (1949) *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* 26, 403-442
- Lipscomb, W.N., Hartsuck, J.A., Reke, G.N., Quioco, F.A., Bethge, P.H., Ludwig, M.N., Steitz, T.A., Muirhead, H. i Coppola, T.C. (1968) *Brookhaven Symp. Biol.* 21, 24-29
- Liljas, A. i Rossman, M.G. (1974) *Annu. Rev. Biochem.* 43, 475-507
- Liu, T.Y., i Chang, Y.H. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2842-2848
- Liu, T.Y. i Elliot, S.D. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 1138-1147
- Lively, M.O. i Walsh, H, (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 9488-9495
- Lodish, H.F., Kong, N., Snider, M. i Strousger, J.A.M. (1983) *Nature (London)* 304, 80-83
- López, J.L., Mateo, P.L., Cortijo, M., Vilanova, M., Munoz, A. i Avilés, F.X. (1984) *Biochem. Soc. Trans.* 13, 343-344
- Magnusson, S., Petersen, T.E., Sottrup-Jensen, L. i Claeys, H. (1975) a *Proteases and Biological Control* eds. Reich, E., Rifkin, D.B. i Shaw, E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor,

- N.Y.) Vol. 2, 123-149
- Mahoney, W.C. i Hermodson, M.A. (1979) *Biochemistry* 18, 3810-3814
- Mahoney, W.C. i Hermodson, M.A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11199-11203
- Malcolm, A.D.B. (1978) *Nature* 275, 90-91
- Mallory, P.A. i Travis, J. (1975) *Biochemistry* 14, 722-730
- Marciniszyn, J., Huang, J.S., Hartsuck, J.A. i Tang, J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 7095-7102
- Maroux, S., Baratti, J. i Desnuelle, P. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5031-50399
- Martínez, M.C. (1980) Tesi Doctoral. Univ. Autònoma de Barcelona
- Martínez, M.C., Avilés, F.X., San Segundo, B. i Cuchillo, C.M. (1981) *Biochem. J.* 197, 141-147
- Martínez, M.C., Nieuwenhuysen, P., Clauwaert, J. i Cuchillo, C.M. (1983) *Biochem. J.* 215, 23-27
- McDonald, R., Swift, G.H., Quinto, C., Swain, W., Pictet, R.L., Nikovits, W. i Rutter, W.J. (1982) *Biochemistry* 21, 1453-1463
- McFarlane, R.G. (1964) *Nature* 202, 498-499
- McPhie, P. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4277-4281
- McPhie, P. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 56, 789-792
- Merkushev, E.B., Simakhina, N.D. i Koveschnikova, G.M. (1980) *Synthesis* 486-487
- Meyer, D.I., Krause, E. i Dobberstein, B. (1982) *Nature* 297, 647-650
- Miller, D.D., Horbett, T.A. i Teller, D.C. (1971) *Biochemistry* 10, 4641-4648
- Moore, S. i Stein, W.H. (1963) *Methods Enzymol.* 6, 819
- Müller-Eberhard, H.J. (1975) *Annu. Rev. Biochem.* 44, 697-724
- Needleman, S.B. (1970) *Protein Sequence Determination* (Chapman & Hall Ltd., London)
- Neurath, H. (1975) a *Proteases and Biological Control* eds, Reich, E., Rifkins, D.B. i Shaw, E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring

- Harbor, N.Y.) Vol. 2, pp. 51-64
- Neurath, H. (1980) a *Protein Folding* ed. Jaenick, R. (Elsevier, North Holland, New York) p. 501
- Neurath, H. (1984) *Science* 224, 350-357
- Neurath, H. i Walsh, K.A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3825-3832
- Olsen, B.R., Berg, R.A., Kishida, Y. i Prockop, D.J. (1973) *Science* 182, 825-829
- Ottesen, M. (1967) *Annu. Rev. Biochem.* 36, 55-76
- Palade, G. (1975) *Science* 189, 347-358
- Pangburn, M.K. i Walsh, K.A. (1975) *Biochemistry* 14, 4050-4054
- Pearson, J.D., Lin, N.T. i Regnier, F.E. (1982) *Anal. Biochem.* 124, 217-230
- Petra, P.H., Bradshaw, R.A., Walsh, K.A. i Neurath, H. (1969) *Biochemistry* 8, 2762
- Petrides, P.E., Jones, R.T. i Bohlen, P. (1980) *Anal. Biochem.* 105, 383-388
- Pongor, S. i Szalay, A.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 366-370
- Puigserver, A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 438, 514-521
- Puigserver A., Vangoyeau, G. i Desnuelle, P. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 276, 519-530
- Puigserver, A. i Desnuelle, P. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2442-2445
- Puigserver, A. i Desnuelle, P. (1977) *Biochemistry* 16, 2497-2501
- Quinto C., Quiroga, M., Swain, W.F., Nikovits, W.C., Standring, D.N., Pictet, R.L., Valenzuela, P. i Rutter, W.J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 31-35
- Quioco, F.A. i Lipscomb, W.N. (1971) *Adv. Prot. Chem.* 25, 1-14
- Reeck, G.R. i Neurath, H. (1972) *Biochemistry* 11, 3947-3955
- Rees, D.C. i Lipscomb, W.N. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78,

5455-5459

- Rees, D.C. i Lipscomb, W.N. (1982) *J. Mol. Biol.* 160, 475-498
- Regnier, F.E. (1983) *Methods Enzymol.* 91, 137-190
- Riordan, J.F., Sokolowsky, M. i Vallee, B.L. (1967) *Biochemistry* 6, 3609-3617
- Riordan, J.F. i Giese, R.W. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 31
- Robel, E. (1973) *Anal. Biochem.* 51, 137-143
- Rubenstein, M., Rubenstein, S., Familletti, P.C., Miller, R.S., Waldman, A.A. i Pestka, S. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76, 640-644
- Runsen, D.J. (1981) (1981) *Maintaining and Troubleshooting HPLC systems* (Wiley, N.Y.) pp.83-90
- Sabés, M. (1987) *Tesi Doctoral* Universitat Autònoma de Barcelona
- Sanny, C.G., Hartsuck, J.A. i Tang, J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2635-2639
- San Segundo, B. (1982) *Tesi Doctoral* Univ. Autònoma de Barcelona
- San Segundo, B., Martínez, M.C., Vilanova, M., Cuchillo, C.M. i Avilés, F.X. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 707, 74-80
- Scheele, G.A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 5375-5385
- Scheele, G.A., Bartelt, D. i Bieger, W. (1981) *Gastroenterology* 80, 461-473
- Scheele, G. A. i Jacoby, R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2005-2009
- Schimke, R.T. i Doyle, D. (1970) *Annu. Rev. Biochem.* 39, 929-976
- Shields, D. i Blobel, G.C. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2059-2063
- Schwert, G.W. i Takenaka, Y. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 16, 570-576
- Serra, M.A., comunicació personal
- Siekevitz, P. i Palade, G.E. (1960) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 619-627

- Sigler, P.B., Blow, D.M., Matthews, B.W. i Hendreson, R. (1968) *J. Mol. Biol* 35, 143-164
- Simpson, R.J., Neuberger, M.R. i Liu, T.Y. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1936-1940
- Soby, L.M. i Johnson, P. (1981) *Anal. Biochem.* 113, 149-153
- Stein, S., Bohlen, P., Stone, J., Dairman, W. i Udenfriend, S. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 203
- Steiner, D.F., Kemmler, W., Tager, H.S. i Peterson, J.D. (1974) *Fed. Proc. Fdn. Am. Socs. Biol.* 33, 2105-2115
- Steiner, D.F., Kemmler, W., Tager, H.S., Rubenstein, A.H., Lenmark, A. i Zublke, H. (1975) a *Proteases and Biological Control* eds. Reich, E., Rifkins, D.B. i Shaw, E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring arbor, N.Y.) Vol. 2, pp. 531-549
- Stepanov, V.M., Baratova, L.A., Pugacheva, I.B., Belyanova, L.P., Revina, L.P. i Timokhina, E.A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 54, 1164-1170
- Stephens, R.E. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 116-126
- Stroud, R.M., Krieger, M., Koeppe, R.E., Kossiakoff, A.A. i Chambers, J.L. (1975) a *Proteases and Biological Control* eds. Reich, E., Rifkins, D.B. i Shaw, E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.) Vol. 2, pp. 33-50
- Swank, R.J. i Munkes, K.D. (1971) *Anal. Biochem.* 39, 462-477
- Takogi, T. i Doolittle, R.F. (1971) *Biochemistry* 13, 750-756
- Takogi, T. i Doolittle, R.F. (1975) *Biochemistry* 13, 750-756
- Tang, J. (1976) *Trends in Biochem. Sci.* 1, 205-208
- Tapuhi, Y., Schmidt, D.E., Lindner, W. i Karger, B.L. (1981) *Anal. Biochem.* 115, 123-129
- Tedeschi, H., James, J.M. i Anthony, W. (1963) *J. Cell Biol.* 18, 503
- Titani, K., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. i Neurath, H. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1666-1670
- Titani, K., Sasagawa, T., Resing, K. i Walsh, K.A. (1982) *Anal. Biochem.* 123, 408-412
- Titani, K., Sasagawa, T., Woodbury, R.G., Ericsson, L.H., Dorsam, H.,

- Kraemer, M., Neurath, H. i Zwilling, R. (1983) *Biochemistry* 22, 1459-1465
- Urdea, M.J. i Legg, J.I. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11868-11874
- Uren, J.R. i Neurath, H. (1972) *Biochemistry* 11, 4483-4492
- Ury, R. i Wold, F. (1977) *Science* 198, 890-896
- Vendrell, J. (1981) *Tesina de Llicenciatura*. Univ. Autònoma de Barcelona
- Vendrell, J., Avilés, F.X., San Segundo, B. i Cuchillo, C.M. (1982) *Biochem. J.* 205, 449-452
- Vendrell, J. i Avilés, F.X. (1986) *J. Chromatogr.* 356, 420-422
- Vendrell, J. i Avilés, F.X. (1986) *J. Chromatogr.* 358, 401-413
- Vendrell, J., Avilés, F.X., Genescà, E., San Segundo, B., Soriano, F. i Méndez, E. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141, 517-523
- Venot, N., Sciaky, M., Puigserver, A., Desnuelle, P. i Laurent, G. (1986) *Eur. J. Biochem.* 157, 91-99
- Vilanova, M. (1981) *Tesina de Llicenciatura*. Univ. Autònoma de Barcelona
- Vilanova, M., Vendrell, J., López, M.T., Cuchillo, C.M. i Avilés, F.X. (1985) *Biochem. J.* 229, 605-609
- Vilanova, M., Burgos, F.J., Cuchillo, C.M. i Avilés, F.X. (1985) *FEBS Lett.* 191, 273-277
- Vilanova, M. (1987) *Tesi Doctoral* Univ. Autònoma de Barcelona
- Visser, L. i Blout, E.R. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 268, 257-260
- Waldschmidt-Leitz, E. i Purr, A. (1929) *Ber. Deut. Chem. Ges.* 62, 2217
- Wallén, P. i Wiman, B. (1975) a *Proteases and Biological Control* eds. Reich, E., Rifkins, D.B. i Shaw, E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.) Vol. 2, pp. 291-303
- Walsh, K.A. (1975) a *Proteases and Biological Control* eds. Reich, E., Rifkins, D.B. i Shaw, E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.) Vol. 2, pp. 1-11
- Walsh, K.A., Ericsson, L.H. i Neurath, H. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 1339

- Walter, P., Ibrahimi, I. i Blobel, G. (1981) *J. Cell Biol.* 87, 545-550
- Walter, P. i Blobel, G. (1982) *Nature* 299, 691-698
- Warren, F.V. i Bidligneyer, B.A. (1985) *J. Liq. Chromatogr.* 8, 619-634
- Weber, K. i Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412
- Webster, P.D., Black, D., Mianz, D.L. i Singh, M. (1977) *Gastroenterology* 73, 1434-1449
- Wicker, C. i Puigserver, A. (1981) *FEBS Lett.* 128, 13-16
- Wilson, K.J., Wieringen, E., Klausner, S., Berchtold, M.W. i Hughes, G.J. (1982) *J. Chromatogr.* 237, 407-416
- Wittman-Liebold, B., Graffunder, H. i Kohls, H. (1976) *Anal. Biochem.* 75, 621-633
- Wittman-Liebold, B. i Kimura, M. (1984) a *Methods in Molecular Biology* ed. Walker, J.M. Vol. 1. Cap. 25
- Wodak, S.J. i Jamin, J. (1981) *Biochemistry* 20, 6544-6552
- Wold, F. i Moldave, K. (eds.) (1984) *Posttranslational Modifications, Parts A & B (Methods Enzymol. Vols. 106-107)*, Academic Press, N.Y.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, W.P. i Hancock, R. (1981) *Anal. Biochem.* 118, 197-203
- Wright, H.T., Kraut, J. i Wilcox, P.E. (1968) *J. Mol. Biol.* 37, 363
- Wuepper, K.D. (1972) a *Inflammation: Mechanisms and Control* eds. Lepow, I.H. i Ward, P.A. (Academic Press, N.Y.) p. 93
- Wu, C.H., Donovan, C.B. i Wu, G.Y. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 10482-10484
- Wun, T.-C., Ossowski, L. i Reich, E. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7262-7268
- Yang, C.Y. i Wakil, S.J. (1984) *Anal. Biochem.* 137, 54-57
- Yamasaki, M., Brown, J.R., Cox, D.J., Greenshields, R.N., Wade, R.D. i Neurath, H. (1963) *Biochemistry* 2, 859-866
- Yoneda, T. (1980) *Comp. Biochem. Physiol.* 67B, 81-86
- Zelicson, R., Eilam-Rubin, G. i Kulka, R.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6115-6120

1774

1775

1776

1777

1778

1779

1780

1781

1782

1783

1784

1785

1786

1787

1788

1789

1790

"Le secret d'être ennuyant c'est de tout dire"

Voltaire