

II.C.2.2.2 Bescanvi H/D seguit per MS

En els últims anys el desenvolupament de l'espectrometria de masses ha permès monitoritzar el plegament de proteïnes mitjançant la tècnica de bescanvi H/D d'una manera ràpida i senzilla. L'espectrometria de masses ens permet treballar amb un gran nombre de mostres, en poc temps i usant quantitats mínimes de proteïna. El principal inconvenient, comparat amb la RMN, és que, en principi, no ens dóna una informació detallada a nivell atòmic, sinó una informació global de la molècula, tot i que si es combina amb la proteòlisi sí que pot donar informació detallada (Mandell i col, 1998)

II.C.2.2.2.1 Bescanvi H/D seguit per ESI MS

A l'espectrometria de masses electrospai (ESI MS) la mostra que s'utilitza és volatilitzada a l'interior d'un tub capil·lar que està sotmès a un voltatge alt (20kv), formant-se un esprai de gotes fines carregades que formaran ions en fase gasosa. Aquests ions són introduïts a l'espectròmetre de masses que té un buit molt alt (Fenn i col., 1989) i es produeix una generació contínua d'ions amb càrregues múltiples del tipus $[M+nH]^{n+}$, on M és la massa molecular i n correspon al número de càrrega. A partir de les sèries de $[M+nH]^{n+}$ es pot determinar M amb una precisió molt alta (0.01%) fent servir un algoritme senzill (Mann i col., 1989).

La generació contínua d'ions permet que el sistema es pugui acoblar a un altre sistema de fraccionament de la mostra en continu, com un cromatògraf o una electroforesi capil·lar, donant lloc als aparells de cromatografia líquida-espectrometria de masses (LC-MS) o als aparells d'electroforesi capil·lar-espectrometria de masses (CE-MS).

El bescanvi H/D s'ha monitoritzat per RMN per a fer un seguiment del plegament de proteïnes, però això també es pot realitzar per espectrometria de masses. Usant la mateixa aproximació que en el cas de la RMN (*pulse-labelling*) podem identificar les poblacions d'intermediaris presents en cada punt del plegament en funció del nombre de deuteris incorporats. La massa del pic a l'espectre de masses ens permet determinar el nombre de deuteris que conté aquella població i la intensitat relativa dels pics ens dóna la proporció entre les diferents poblacions. Les dades obtingudes per ESI-MS i per RMN són, per tant, complementàries.

En el cas del lisozim, la informació obtinguda per RMN (Radford i col., 1992) i ESI-MS (Miranker i col., 1993) va permetre identificar el seu camí de plegament. L'ESI-MS també s'ha aplicat a l'estudi d'interaccions proteïna -proteïna: Per a determinar el paper de les chaperones en el plegament proteic es van realitzar estudis de bescanvi amb el complex GroEL/ α -lactalbúmina, que van mostrar que la protecció vers el bescanvi que presentava la α -lactalbúmina unida al GroEL era semblant a la del seu estat *molten globule*, tant pel que fa al nombre d'hidrògens protegits com a la distribució de poblacions (Robinson i col., 1994).

II.C.2.2.2.2 Bescanvi H/D seguit per MALDI-TOF MS

L'espectrometria de masses MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) és una tècnica que permet la determinació ràpida i acurada de la massa molecular de pèptids, proteïnes, carbohidrats, àcids nucleics, polímers sintètics i altres productes naturals de masses moleculars fins i tot superiors a 100 KDa.

L'espectrometria de masses MALDI-TOF consta, bàsicament, de tres etapes (Figura 9):

PREPARACIÓ DE LA MOSTRA
La mostra es barreja amb un excés d'un compost anomenat matriu -generalment un àcid orgànic dèbil- sobre una plaqueta metàl·lica, i un cop evaporat s'introdueix a l'espectròmetre de masses. La matriu es prepara a una concentració d'uns 5-10 g/L amb aigua desionitzada o bé amb una barreja de solvent orgànic-aigua. La relació molar òptima analit/matriu per a la producció d'ions és de 100:1 a 50000:1.
IONITZACIÓ
La mostra és seguidament irradiada per un làser, que normalment emet a l'UV (per ex. els làsers de N ₂ emeten a 337 nm). L'energia del làser és absorbida preferencialment per les molècules de la matriu, que són excitades i la seva posterior relaxació tèrmica porta a l'evaporació de la matriu i a la transferència de l'analit a la fase gasosa sense fragmentar-lo. La matriu actua també com a agent protonant, jugant un paper essencial en la ionització de l'analit. Abans de l'aparició dels MALDI les mostres eren irradiades directament amb el làser, sense la presència de la matriu, això provocava una fragmentació de la majoria de les molècules; només es podia aplicar a molècules de baix pes molecular.
DETECCIÓ
Quan els ions ja es troben a la fase gasosa cal emprar un analitzador de masses per a adquirir l'espectre. L'analitzador usat més freqüentment en l'espectrometria de masses MALDI és el de temps de vol (TOF), que presenta el modus lineal com a configuració més senzilla: Els feixos d'ions són accelerats amb una energia cinètica fixa a través d'un potencial elèctric, passant després per una regió lliure de camp elèctric on la velocitat que adquireixen els ions és proporcional a la seva massa. Al final d'aquesta regió lliure de camp elèctric se situa el detector que produeix un senyal cada cop que arriba un grup d'ions. La diferència entre el temps inicial, que és comú a tots els ions, i el temps d'arribada (que és proporcional al paràmetre massa/càrrega (m/z)) és emprat per calcular la massa de cada ió (Hillenkamp i col., 1991).

El MALDI-TOF MS es pot emprar igual que l'ESI-MS per al seguiment de les reaccions de bescanvi H/D. A diferència de l'ESI-MS no és quantitatiu, però té altres avantatges: presenta una elevada tolerància a impureses (sals o altres contaminants), la qual cosa permet obtenir mesures del bescanvi H/D en funció de la concentració de desnaturalitzant i poder donar així, una mesura de

l'estabilitat global de la proteïna; i és fàcilment automatitzable. També ens permet treballar amb mostres no purificades o directament amb sobrenedants de cultiu.

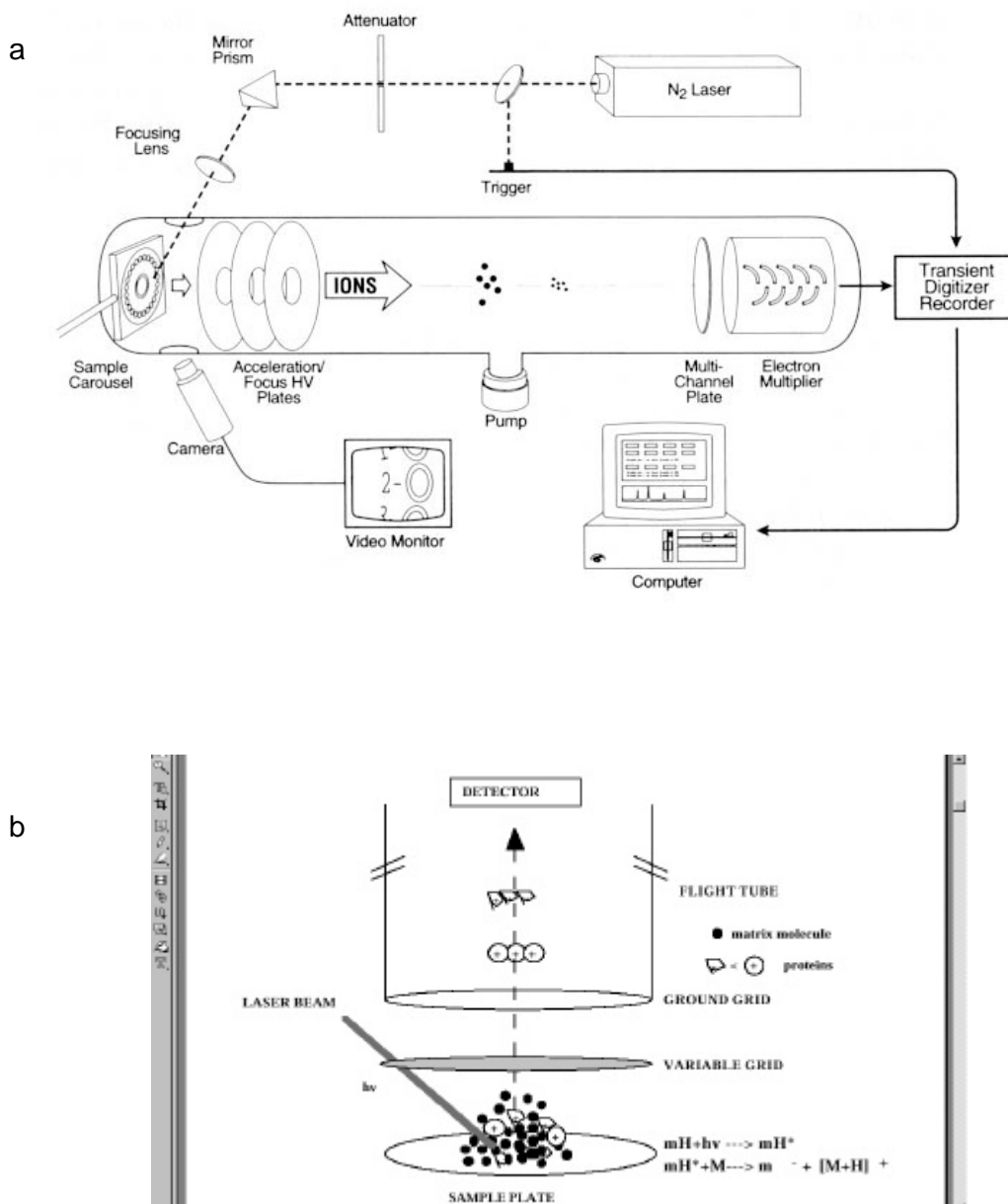


Figura 9. Esquema de funcionament d'un espectròmetre de masses MALDI-TOF en modus lineal. 9a Esquema general dels components d'un MALDI-TOF MS. 9b Ionització de la mostra per irradiació amb el làser. M indica la mostra i m la matriu.

El SUPREX (Stability of Unpurified Proteins from Rates of H/D EXchange) és una tècnica que ens permet dur a terme un triatge ràpid de l'estabilitat d'un gran nombre de proteïnes, mitjançant el bescanvi H/D i l'espectrometria de masses MALDI-TOF (Ghaemmaghami i col., 2000). Ens permet realitzar els experiments de bescanvi directament en llisats de cultius per dilució en tampó deuterat que conté concentracions variables d'agent desnaturalitzant, i en funció del nombre de deuteris incorporats es pot extreure informació sobre l'estabilitat conformacional de la proteïna. A causa de la permeabilitat vers el D₂O i la urea de la membrana, també es poden realitzar els

experiments *in vivo*, mitjançant un creixement cel.lular en dues etapes: una primera etapa de creixement i producció de la proteïna recombinant en un medi amb H₂O i una segona etapa on les cèl.lules són centrifugades i ressuspeses en un medi que conté D₂O. En aquesta segona etapa la proteïna és deuterada en funció del seu grau de desplegament i posteriorment el cultiu és llisat i analitzat per MALDI-TOF (Ghaemmaghami i Oas, 2001). Altres estudis realitzats amb proteïnes purificades, per exemple, els realitzats amb el domini d'activació de la CPA i mutants d'aquest, han permès observar que hi ha una correlació entre el nombre de protons protegits vers el bescanvi i la seva estabilitat conformacional estudiada per mètodes clàssics (Villanueva i col., 2000).

II.C.3 El procés de plegament de les proteïnes petites riques en ponts disulfur

El plegament de les proteïnes petites riques en ponts disulfur està conduït principalment per la formació dels ponts disulfur i per tant, difereix de la resta de proteïnes, on les interaccions no-covalents tenen un paper fonamental.

Els estudis de replegament oxidatiu i de desplegament realitzats amb el PCI (Chang i col., 1994), la hirudina (Chatrenet i Chang, 1993), l'EGF (Chang, 1995), el TAP (Chang, 1996) i la RNasaA (Chang, 1999) han demostrat que el mecanisme de plegament d'aquestes proteïnes es pot descompondre en dues etapes: una primera etapa de formació de ponts disulfur de manera no específica, coneguda com a empaquetament, que mena cap a l'aparició de les formes *scrambled* (molècules amb tots els ponts disulfurs formats, però amb l'aparellament no natiu) i una segona etapa de consolidació on aquestes formes *scrambled* es reordenen per tal d'adquirir la forma nativa. Tot i l'existència d'aquest mecanisme general, es poden diferenciar dos grups de proteïnes en funció del tipus d'intermediaris observats al llarg del plegament: un primer grup on s'observa una gran heterogeneïtat d'intermediaris i un segon grup on hi ha una presència d'intermediaris preferentment amb ponts nadius.

Taula 3. Classificació de les proteïnes petites riques en ponts disulfur en funció del tipus de mecanisme de desplegament en presència de reductor.

Tipus de desplegament en presència de reductor	
Tot-o-res	Seqüencial
PCI	EGF
Hirudina	LCI ^a
TAP	BPTI

^a El plegament *in vitro* del LCI té lloc a través d'intermediaris estables que presenten 1 pont disulfur menys que la forma nativa (igual que l'EGF i el BPTI), la qual cosa sembla indicar que el seu desplegament en presència de reductor serà de tipus seqüencial, tot i que encara no s'ha demostrat.

Les proteïnes del primer grup presenten un mecanisme de desplegament en presència de reductor del tipus tot-o-res. La reducció dels ponts disulfur es produeix ensems i en el plegament oxidatiu s'observa la presència d'una elevada diversitat de formes amb I i II ponts disulfur i de formes *scrambled* (Chang i col., 2000a). Això suggereix que els ponts disulfur d'aquestes proteïnes estan estabilitzats cooperativament i concertada i que les interaccions natives no-covalents no dirigeixen la primera part del seu plegament.

Les proteïnes del segon grup presenten un mecanisme de desplegament seqüencial en presència de reductor, on s'observa la presència d'un intermediari estable que conté ponts disulfurs corresponents a la forma nativa. Aquest intermediari també rep el nom de trampa cinètica. En el plegament oxidatiu també s'observa una acumulació d'aquest intermediari amb ponts disulfur nadius, tot i que també hi ha una elevada heterogeneïtat de formes amb menys ponts disulfur i de formes *scrambled* (Chang i col., 2000a). En aquest cas sembla que els ponts disulfur no estan estabilitzats d'una manera concertada i que les interaccions no-covalents que estabilitzen la forma nativa tenen un paper actiu en el procés de plegament, conduint a la formació d'espècies amb ponts disulfurs nadius. El BPTI representa un cas extrem dins d'aquest grup. Tant el plegament oxidatiu com el desplegament del BPTI es produeixen a través d'un nombre limitat d'intermediaris de I i II ponts disulfurs que contenen majoritàriament ponts nadius. Això fa que la heterogeneïtat d'aquests intermediaris sigui molt més reduïda i que no s'observi la presència de formes *scrambled* (Weissman i Kim, 1991; Creighton, 1992).

II.C.3.1 El plegament de l inhibidor de carboxipeptidasa de patata

El mecanisme de plegament del PCI és un exponent del plegament de les proteïnes del primer grup; la hirudina i el TAP presenten un plegament molt semblant.

Els estudis realitzats en el nostre grup de recerca han deixat palès que el plegament del PCI té lloc a través de dues etapes (Chang i col., 1994). A l'etapa inicial o empaquetament es produeix la formació no específica de ponts disulfur que condueix a l'acumulació de formes *scrambled* (Figura 10). Aquest procés es caracteritza per un corrent seqüencial i irreversible que parteix del PCI reduït i que progressa a través d'isòmers de I i II ponts disulfur fins a arribar a les formes *scrambled*. Mitjançant la combinació de les tècniques de RP-HPLC i espectrometria de masses MALDI-TOF s'han aconseguit determinar 23 fraccions amb configuracions no natives, de les 75 possibles combinacions. També s'ha observat que en aquest estadi la composició dels intermediaris de plegament no es veu afectada per l'addició d'agents redox; és a dir, que la naturalesa i proporció entre les formes amb I i II ponts disulfur no està influenciada per la cinètica del procés. Tampoc s'observa cap efecte en presència d'agents desnaturalitzants, la qual cosa suggereix que les interaccions no covalents no participen de manera activa en aquesta fase inicial d'empaquetament no específic del PCI.

A l'etapa final o consolidació les formes *scrambled* es reorganitzen per a donar lloc a la forma nativa. En aquest procés cal la presència de grups tiol que actuïn com a catalitzadors de la reacció. Durant la primera etapa de plegament les formes amb 0, I i II ponts disulfur (que presenten grups tiol lliures) actuaven com a catalitzadors, però en el moment en què tots els ponts disulfur s'han format, les formes *scrambled* s'acumulen i queden atrapades, salvant que s'addicionin tiols externs.

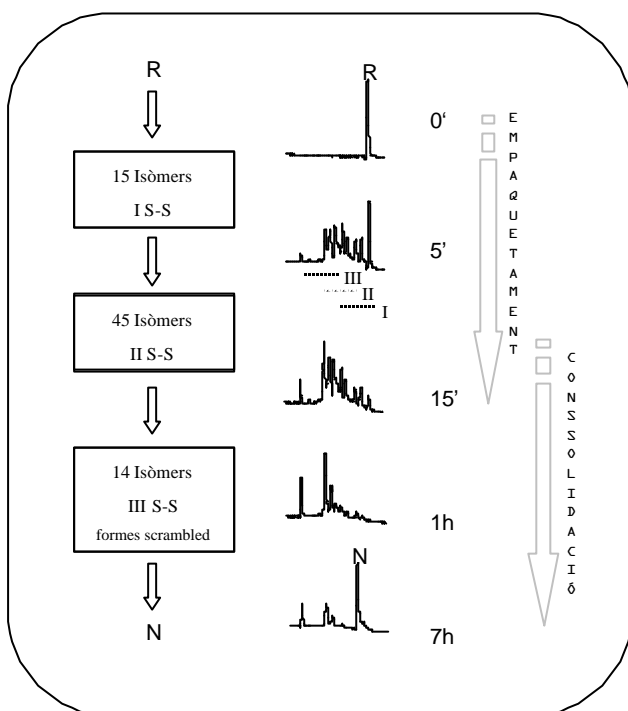


Figura 10. Esquema del plegament del PCI en presència de Cys-Cys. En el centre de la figura es mostren els cromatogrames de RP-HPLC de les variants conformacionals del PCI capturades en medi àcid durant el procés de replegament oxidatiu. R, N, I, II i III corresponen a la forma reduïda, la forma nativa i a les espècies amb 1, dos i 3 ponts disulfur del PCI, respectivament.

Des del punt de vista cinètic, el procés de consolidació és el factor limitant del plegament del PCI. En aquesta etapa sí s'observa un efecte dels agents desnaturalitzants, que afecten la quantitat de forma nativa que es produeix i alteren la proporció entre les formes *scrambled* que hi ha en equilibri.

II.C.3.2 El plegament del factor de creixement epidèrmic (EGF)

Els estudis de plegament oxidatiu *in vitro* realitzats amb l'EGF han mostrat que aquesta proteïna presenta un plegament més complex que el PCI i constitueix un exemple de les proteïnes que contenen trapes cinètiques en el seu plegament.

El replegament oxidatiu de l'EGF reduït té lloc a través d'una població important d'intermediaris amb un pont disulfur, que s'acumulen ràpidament en forma d'un únic intermediari estable de II ponts disulfur (Chang i col, 2001). Els intermediaris amb I pont disulfur són molt heterogenis, es troben en equilibri entre si i no contenen ponts nadius de manera predominant; en canvi, hi ha un

intermediari de II ponts disulfur que conté ambdós ponts nadius i representa la major trampa cinètica dins el plegament de l'EGF (Figura 11).

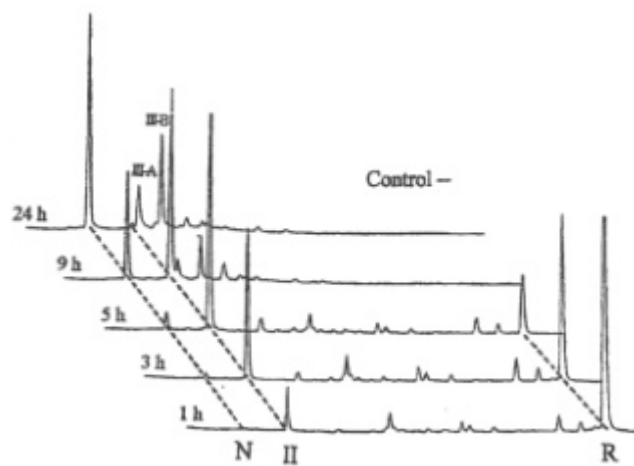


Figura 11. Replegament oxidatiu de l'EGF *in vitro* en absència de tiols externs. Els cromatogrames de RP-HPLC mostren les variants conformacionals de l'EGF capturades en medi àcid durant el procés de replegament oxidatiu. R, N, II, IIIa i IIIb corresponen a la forma reduïda, la forma nativa, a l'intermediari estable de dos ponts disulfur i a dues formes scrambled de l'EGF, respectivament.

El pas d'aquest intermediari estable de II ponts a la forma nativa no té lloc de manera directa mitjançant la formació del tercer pont, com passa en el cas dels BPTI (Weissman i Kim, 1991); sinó que es duu a terme a través d'una reorganització estructural que dóna lloc a la formació d'espècies *scrambled* que contenen principalment ponts no nadius (Chang i col., 1995). La presència d'aquestes espècies *scrambled* també és un tret diferencial entre el plegament de l'EGF i el del BPTI. Finalment, aquestes espècies *scrambled* reorganitzen els seus ponts disulfur i passen a la forma nativa, la qual cosa constitueix el segon pas limitant del plegament de l'EGF.

III-Objectius

Des d'un punt de vista global l'objectiu d'aquest treball de recerca és l'estudi de la producció recombinant per expressió heteròloga i del procés de plegament de la proteïna inhibidora de carboxipeptidasa de patata (PCI) i de les seves proformes com a paradigma de les proteïnes petites riques en ponts disulfur; així com el desenvolupament de noves tècniques que ens permetin seguir el procés de plegament d'aquest tipus de proteïnes.

Dins de cada un dels treballs que conformen aquesta tesi es van proposar uns objectius específics:

⇒ Desenvolupament d'un nou sistema d'expressió heteròloga del PCI en flascó, que presenti un nivell alt de producció proteica que ens permeti obtenir proteïna suficient per a realitzar els estudis funcionals, estructurals i de plegament, necessaris per a la caracterització de la proteïna o de les possibles variants que es puguin generar.

⇒ Producció preparativa i purificació del precursor del PCI a partir del sistema optimitzat en el primer treball. Estudi del paper que juguen les proseqüències N i C-terminals del PCI sobre la cinètica i l'eficiència del procés de plegament de la proteïna madura *in vitro* i *in vivo* en *Escherichia coli*. Caracterització estructural de la pro-proteïna amb l'extensió N-terminal.

⇒ Caracterització del procés de plegament proteic de les proteïnes petites riques en ponts disulfur: Ús del bescanvi D/H seguit per espectrometria de masses MALDI-TOF per a una monitorització ràpida del plegament de proteïnes model i per a la caracterització de l'estabilitat dels intermediaris de plegament.