



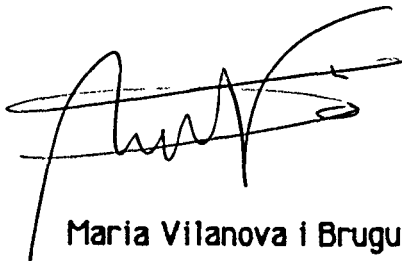
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**ESTUDIS SOBRE LA CONFORMACIÓ DEL SEGMENT
D'ACTIVACIÓ DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A PORCINA I
LA SEVA RELACIÓ AMB PROTEÏNES FIXADORES DE Ca^{2+} DE
LA FAMÍLIA EF-HAND.**



Tesi presentada per a adquirir el grau de Doctor en Ciències Químiques per MARIA VILANOVA i BRUGUES, llicenciada en Ciències Químiques.

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



Maria Vilanova i Brugués



Dr. F.X. Avilés i Puigvert

Bellaterra 7 de gener del 1987

M8.- PREDICCIÓ DE L'ESTRUCTURA SECUNDÀRIA DE PROTEÏNES.

Es conegut que l'estructura secundària i terciària de les proteïnes queda fixada per la seva seqüència d'aminoàcids. A partir d'aquesta base s'han elaborat una sèrie de mètodes que permeten, des d'un punt de vista teòric, predir el plegament secundari d'una proteïna a partir de la seva seqüència d'aminoàcids.

Hi ha diferents mètodes per fer prediccions d'aquesta estructura. En aquest treball es van emprar els de Chou i Fasman (167,168) i Garnier(169) per predir l'estructura secundària del segment d'activació de la PCPA-II i comparar-la amb prediccions d'estructura secundària de determinades proteïnes que pertanyen a la família de les proteïnes EFhand A la vegada, es van elaborar perfils hidrofòbics segons dades de Kyte i Doolittle (170) i Sweet i Eisenberg (171) i un perfil hidrofílic segons dades de Hopp i Woods (172), a fi de recolzar i obtenir informació addicional de les comparacions esmentades abans per les prediccions d'estructura secundària.

Tots aquests perfils i prediccions esmentats es van dur a terme mitjançant l'ús d'un programa escrit per Pongor & Szalay (173) en llenguatge Pascal i per un microordinador Apple II e.

El programa permet fer les prediccions d'estructura secundària esmentades dibuixant perfils de probabilitat de formació d'hèlix- α , plegament β i gir- β en funció de la seqüència d'aminoàcids. De la mateixa manera dibuixa els perfils hidrofòbics i hidrofílics. Aquests perfils poden correspondre a una única proteïna o bé ésser la predicció resultant d'una mitjana de proteïnes (com a màxim 9 seqüències). A la vegada,

el programa permet comparar numèricament les prediccions de proteïnes diferents mitjançant un coeficient de correlació R. Aquest coeficient es pot definir com una mesura de similitud entre dos perfils estructurals. Si considerem que $P_{j,1}$ i $P_{j,2}$ són dos valors que especifiquen una determinada propensió estructural de l'aminoàcid j en les seqüències 1 i 2, respectivament, R es pot escriure:

$$R = \frac{\sum P_{j,1} \times P_{j,2}}{\sqrt{\sum P_{j,1}^2 \times P_{j,2}^2}}$$

Aquesta equació és anàloga a la que es faria servir per calcular el coeficient de correlació linial entre els paràmetres $P_{j,1}$ i $P_{j,2}$.

Els valors de P_j poden ésser paràmetres de Chou-Fasman per P_α, P_β , o P_t o bé els paràmetres de qualsevol altre mètode predictiu. Els autors, Pongor & Szalay donen el valor de $R > 0.2$ per aquelles proteïnes homòlogues correctament alineades; $R = 1$ per a dues seqüències idèntiques ; $R \approx 0$ per a dues seqüències no relacionades i $R = -1$ si els perfils estructurals estan anticorrelacionats.

Malgrat que els autors donen un valor de $R > 0.2$ com a umbral per poder dir si dues o més seqüències són homòlogues, recomanen que es faci una escala pròpia per a cada grup de proteïnes a comparar. Així, en el nostre cas es van calcular els valors de R de dos fragments del segment d'activació, seqüències 3-34 i 55-84, que anomenen asA I i asA II, respectivament, respecte a una sèrie de seqüències conegudes com a fixadores de Ca^{2+} que pertanyen a les següents proteïnes de la família EF

hand: lloc I i II de la proteïna intestinal fixadora de Ca^{2+} obtinguda de bou (abreu. b-ICaBP), lloc III i IV de la troponina C de pollastre (abreu. p-TNC), lloc II i III de la parvalbúmina de carpa (abreu. c-PVA) i lloc I i II de la S-100a bovina (abreu. b-S100a). A més, es va fer la mitjana de totes aquestes seqüències i es va trobar el valor de R d'aquesta mitjana respecte a asA I i asA II.

Tots els mètodes predictius esmentats amb excepció del de Garnier treballen assignant a cada aminoàcid un valor de probabilitat de la propietat corresponent estudiada pel mètode concret. Aquest valor de probabilitat es troba fent la mitjana dels valors presentats per un nombre senar d'aminoàcids (3,5,7...etc) i assignant aquest valor a l'aminoàcid central del pèptid estudiat (pels 20 aas. s'han assignat valors de cada paràmetre, P_{α} , P_{β} , P_t , hidrofobicitat i hidrofilitat, segons els autors). El fet que es triï un tri, penta, heptapèptid,...etc. depèn de cada usuari del programa. En el nostre cas es van triar tripèptids ja que es va trobar que els perfils així obtinguts s'ajustaven millor a perfils publicats d'aquestes proteïnes.

El mètode de Garnier, en canvi, presenta un caràcter direccional, és a dir, a cada aminoàcid se li assigna un valor que és la mitjana dels valors assignats als vuit aas. a la dreta i l'esquerra del considerat, però, aquest valor dels aas. varia segons la seva proximitat o llunyania de l'aminoàcid considerat (169). Segons Pongor & Szalay (173) aquest mètode predictiu és el que proporciona resultats més acurats i amb un % més elevat d'incert sobretot quan es calculen coeficients de correlació entre probabilitats de formació d'estructura secundària en dues seqüències o grups de seqüències.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

APARTAT A

**ANÀLISI DE LA CONTRIBUCIÓ DEL saA EN LES PROPIETATS
DE LES PCPAs PORCINES**

Donades les dificultats inicials d'obtenció de saA homogeni i en gran quantitat, i mentre es desenvolupaven mètodes d'aïllament (veure apartat RB.1, 2 i 3) es va començar per estudiar certes propietats conformacionals del saA dins de la PCPA i la seva influència en les propietats estructurals i funcionals d'aquest proenzim. Aquests estudis, encara que no constitueixen el nucli fonamental de la tesi, van resultar interessants per si mateixos i de gran ajut en la posterior caracterització estructural i funcional del saA. Per aquestes raons els incloem en el present apartat.

RA.1.- Estudis d'associació de PCPA-II, PCPB, PPE i dels seus fragments triptics per electroforesi en gradient d'urea

L'electroforesi en gradients transversals d'urea és una tècnica senzilla però que ens va permetre d'obtenir informació sobre la naturalesa i propietats del plegament conformacional del saA dins de la PCPA. A més, ens va subministrar informació sobre la interacció saA-CPA, sobre la interacció PCPA-PPE així com sobre altres aspectes estructurals i funcionals de les procarboxipeptidases porcines.

Concretament, es van analitzar mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida que contenen un gradient d'urea (0-9M) transversal a la direcció de migració, mostres de PCPA-II, PCPA-I, PCPB, complexos artificials d'aquestes proteïnes i digerits triptics suaus, també d'elles, que contenien saA complexat a CPA.

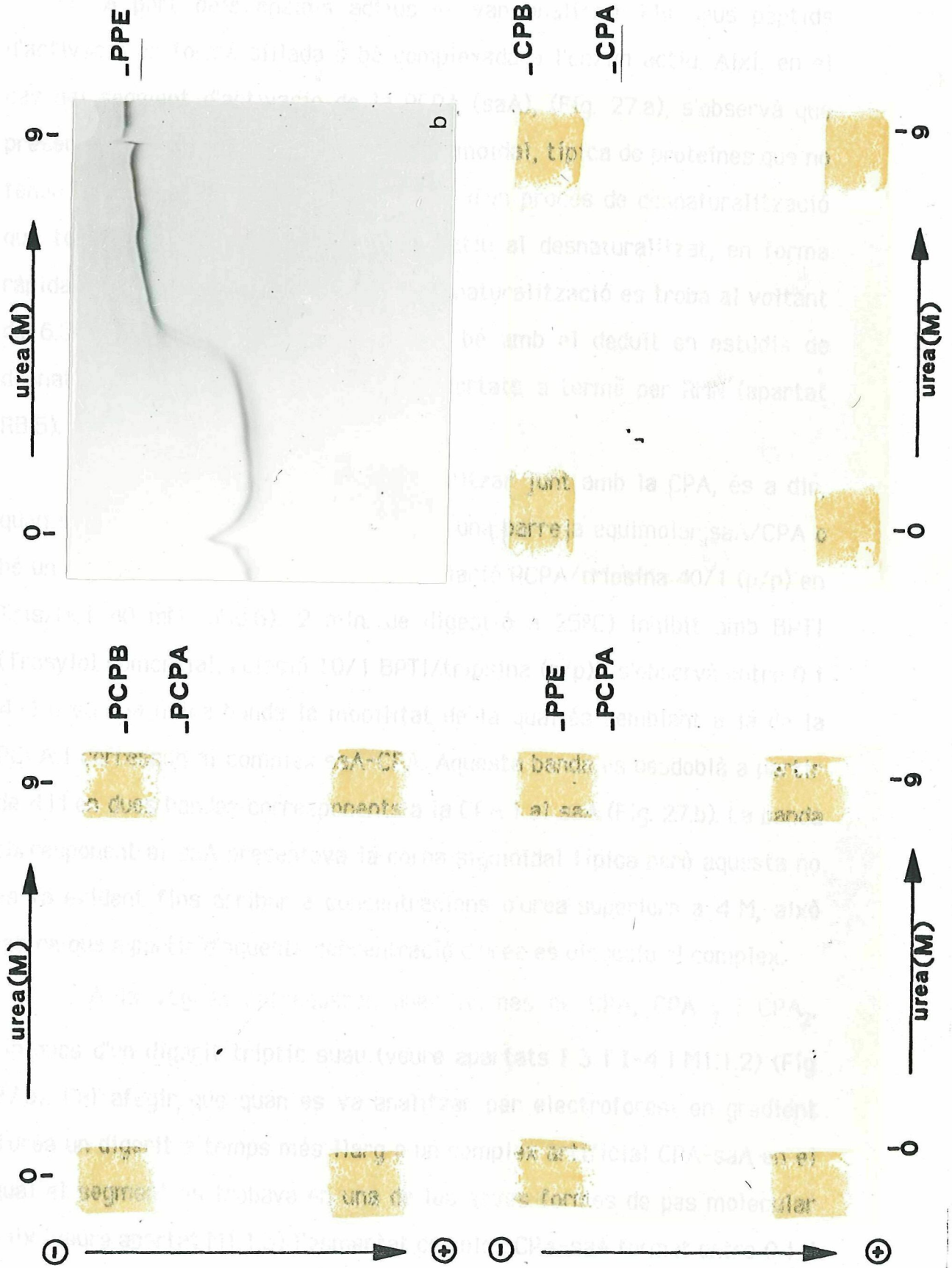
Els resultats obtinguts indiquen que la PCPA monomèrica presenta en aquests gels una única banda contínua (Fig 26.a). Aixó es indicatiu

que no sofreix cap desplegament ni canvi conformacional dins del marge de concentracions d'urea estudiat. El contrari succeix en el cas de la PCPB la qual a 6.5 M urea presenta una transició electroforètica (Fig 26.a) probablement deguda a un desplegament parcial de la proteïna ja que la disminució de mobilitat és relativament petita. També s'observa una transició i aquesta vegada molt pronunciada en el cas de la PPE (Fig 26.b). La disminució de mobilitat es produeix al voltant de 4.5 M urea, i probablement es deguda a un desplegament de la proteïna ja que aquest fenomen ha estat observat per altres serin-proteïnases tals com el quimotripsinogen A (134).

Quan es va analitzar mitjançant aquesta tècnica el complex binari de la PCPA amb la PPE (PCPA-I), s'obtingué una única banda electroforètica entre 0 i 5.7 M la qual es desdoblà en dues a partir d'aquesta concentració d'urea, bandes que corresponen a cada una de les subunitats de l'esmentat complex. Quan l'electroforesi es va repetir amb un complex binari artificial, preparat en Tris/HCl 40 mM (pH 8.6), s'obtingué un pattern idèntic (Fig 26.c) que evidenciava la identitat entre aquest i el complex binari natural ja suggerida en experiments cinètics i de trencament proteolític d'ambdós tipus de complexos, portats a terme en el nostre laboratori (100).

En analitzar els enzims actius, CPA i CPB, no s'observà cap transició electroforètica (Fig. 26.d), ambdós presentaren una única banda contínua, senyal que no sofreixen desplegament en el marge esmentat de concentracions d'urea. Aquest fet en el cas de la CPB suggereix que la transició observada pel proenzim, PCPB, pot atribuir-se al segment d'activació del mateix.

Figura 26.- Comportament electroforètic en gels de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea (0-9M) de les procarboxipeptidases i carboxipeptidases de pàncreas porcí. (a) formes monomèriques de la PCPA i PCPB, ambdós aplicades al mateix gel. (b) PPE aïllada. (c) complex artificial entre PCPA-II i PPE, equivalent al complex binari natural (d) CPA i CPB aplicades al mateix gel.

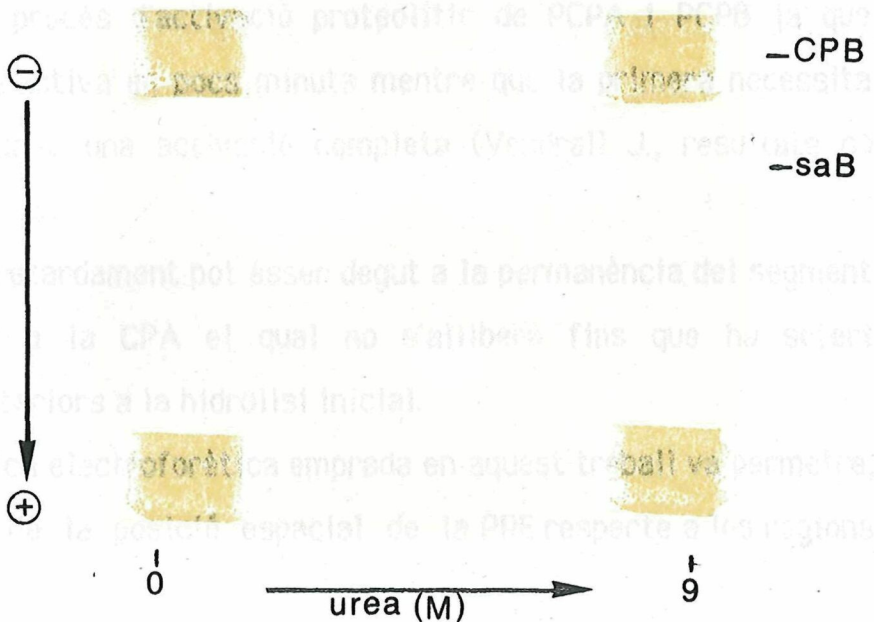
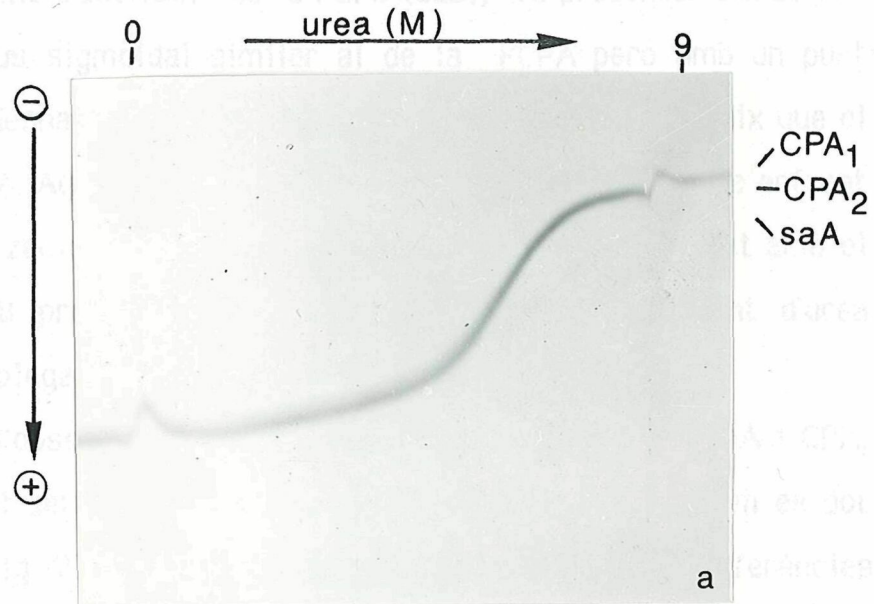
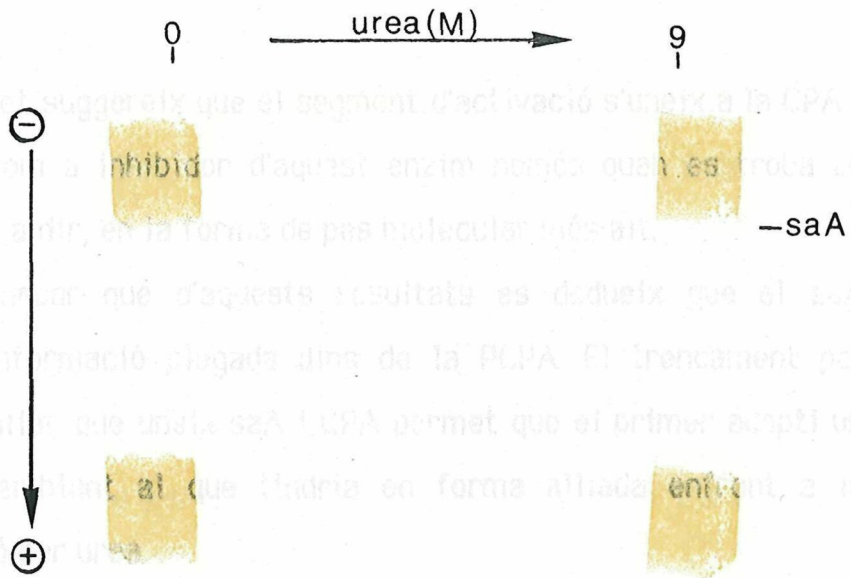


A part dels enzims actius es van analitzar els seus pèptids d'activació en forma aïllada o bé complexada a l'enzim actiu. Així, en el cas del segment d'activació de la PCPA (saA), (Fig. 27.a), s'observà que presentava una banda electroforètica sigmoïdal, típica de proteïnes que no tenen ponts disulfur (134), i indicativa d'un procés de desnaturalització que té lloc en un sol pas, de l'estat natiu al desnaturalitzat, en forma ràpida (174). El punt d'inflexió de la desnaturalització es troba al voltant de 6.5 M urea, valor que es correspon bé amb el deduït en estudis de desnaturalització per urea, paral·lels, portats a terme per RMN (apartat RB.5).

Quan aquest segment es va analitzar junt amb la CPA, és a dir, quan es va aplicar al gel d'electroforesi una barreja equimolar saA/CPA o bé un digerit triptic suau de la PCPA (relació PCPA/tripsina 40/1 (p/p) en Tris/HCl 40 mM (pH8.6), 2 min. de digestió a 25°C) inhibit amb BPTI (Trasyol comercial, relació 10/1 BPTI/tripsina (p/p)), s'observà entre 0 i 4 M urea una única banda la mobilitat de la qual és semblant a la de la PCPA i correspon al complex saA-CPA. Aquesta banda es desdoblà a partir de 4 M en dues bandes corresponents a la CPA i al saA (Fig. 27.b). La banda corresponent al saA presentava la corba sigmoïdal típica però aquesta no es fa evident fins arribar a concentracions d'urea superiors a 4 M, això indica que a partir d'aquesta concentració d'urea es dissocia el complex.

A la vegada aparegueren dues formes de CPA, CPA₁ i CPA₂, típiques d'un digerit triptic suau (veure apartats I 3 i I-4 i M1.1.2) (Fig 27.b). Cal afegir que quan es va analitzar per electroforesi en gradient d'urea un digerit a temps més llarg o un complex artificial CPA-saA en el qual el segment es trobava en una de les seves formes de pes molecular baix (veure apartat M1.1.3) l'esmentat complex CPA-saA format entre 0 i 4 M urea no s'observà.

Figura 27.- Comportament electroforètic en gels de poliacrilamida amb gradient d'urea (0-9M) dels fragments resultants de la digestió triptica controlada de PCPA i PCPB (a) saA (b) complex equimolar d'una barreja de CPA (formes A₁ i A₂) i saA (c) complex equimolar de CPB i saB.



Aquest fet suggereix que el segment d'activació s'uneix a la CPA i per tant actua com a inhibidor d'aquest enzim només quan es troba en forma intacta, és a dir, en la forma de pes molecular més alt.

Cal remarcar que d'aquests resultats es dedueix que el saA presenta una conformació plegada dins de la PCPA. El trencament per proteòlisi de l'enllaç que uneix saA i CPA permet que el primer adopti un comportament semblant al que tindria en forma aïllada enfront a la desnaturalització per urea.

El segment d'activació de la PCPB (saB), va presentar també una transició de tipus sigmoidal similar al de la PCPA però amb un punt d'inflexió de la desnaturalització a 5 M urea, punt que és més baix que el presentat per saA. Aquest fet suggereix que saB és menys estable enfront a la desnaturalització per urea que saA, circumstància congruent amb el fet que la PCPB presenta una transició al llarg del gradient d'urea atribuïble al desplegament del segment d'activació (Fig. 26.a)

També s'observà que, al contrari del que passa entre saA i CPA, asB no s'uneix al seu enzim actiu, ni en absència d'urea, tal com es pot observar en la Fig. 27c. Aquest fet pot ajudar a explicar les diferències existents en el procés d'activació proteolític de PCPA i PCPB ja que aquesta última s'activa en pocs minuts mentre que la primera necessita hores per arribar a una activació completa (Vendrell J., resultats no publicats).

Aquest retardament pot ésser degut a la permanència del segment d'activació unit a la CPA el qual no s'allibera fins que ha sofert trencaments posteriors a la hidròlisi inicial.

La tècnica electroforètica emprada en aquest treball va permetre, també, l'estudi de la posició espacial de la PPE respecte a les regions

funcionals de la PCPA. Quan s'introduí en el gel d'electroforesi un complex artificial a relació molar 1/1 de CPA₁ i PE (Fig 28.a) s'observà un comportament anàleg al del complex artificial PCPA-PPE i al del natural o PCPA-I, que suggeria una unió forta entre les regions enzimàtiques actives d'amdós proenzims. A la vegada, en analitzar una barreja equimolar de PPE i saA (Fig 28.b), es va observar que es forma complex entre 0 i 2 M urea, complex que es dissocia per sobre d'aquesta concentració d'urea en les dues formes components, PPE i saA.

A partir d'aquests resultats es pot afirmar que la unió entre PPE i PCPA té lloc principalment per la zona de l'enzim actiu (CPA) ja que el complex format CPA-PE és molt fort. De totes formes el saA de PCPA també participa, però de forma més feble, en la interacció amb la PPE. Aquesta interacció saA-PPE pot alterar la conformació d'aquest o la seva accessibilitat a l'atac per part de la tripsina, afectant d'aquesta manera el procés d'activació proteolítica de la PCPA. Cal aquí fer esment dels resultats que es presentaran en l'apartat RA.3 on s'estudia la cinètica de pèrdua de Zn²⁺ per part dels proenzims i de l'enzim actiu o CPA per acció de l'ortofenantrolina . Segons aquests resultats la forma dimèrica presenta una dificultat més gran per inactivar-se per acció de l'agent quelant la qual cosa s'atribueix al major grau de bloqueig imposat al centre actiu pel fet que aquest proenzim presenti estructura quaternària.

En la bibliografia es troben referències que els complexos oligomèrics de la PCPA de diferents espècies influeixen clarament el procés d'activació triptica de la PCPA(90,100).

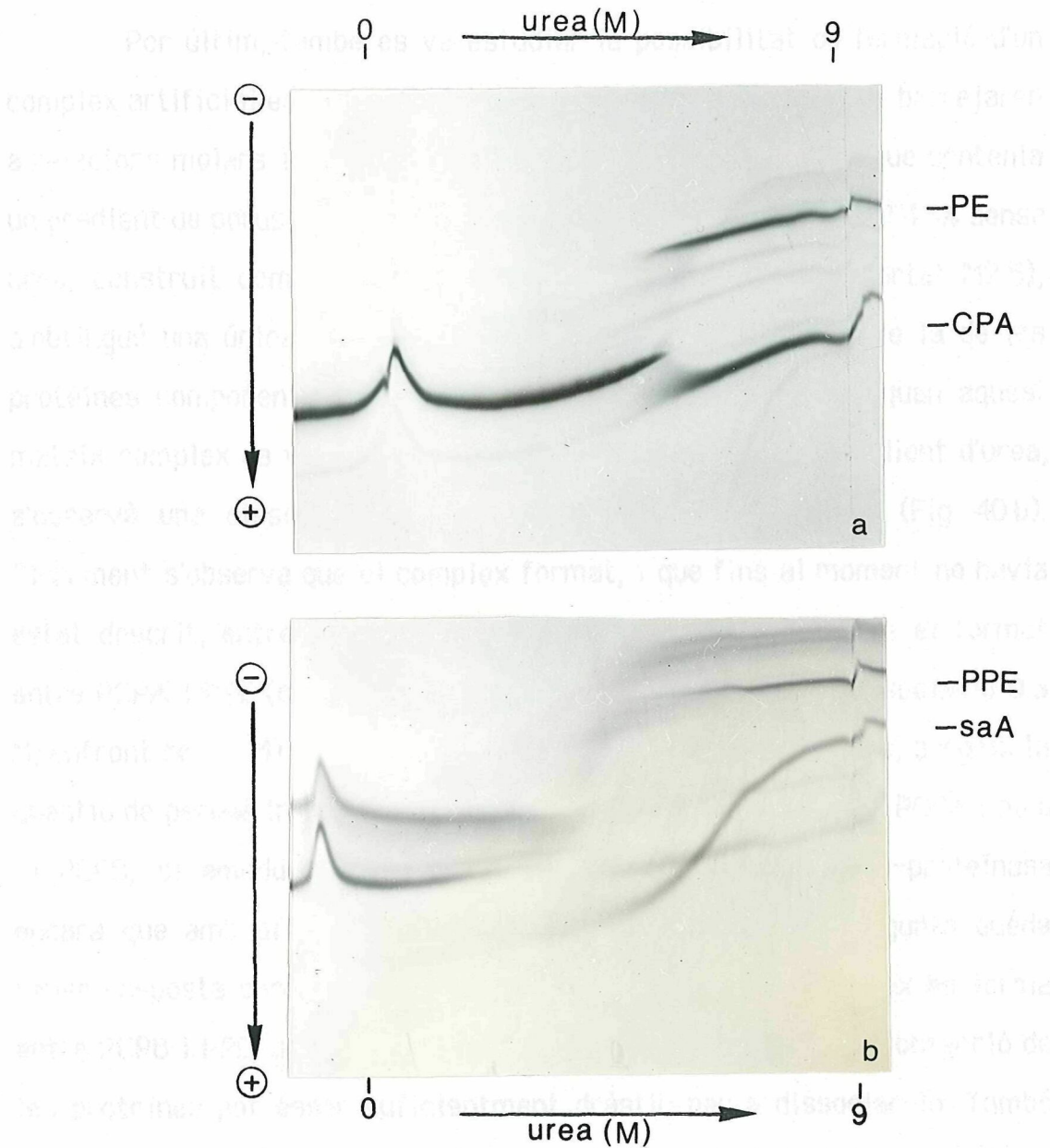


Figura 28.- Comportament electroforètic en gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea (0-9M) dels complexos de PPE o PE amb els fragment tríptics de la PCPR. (a) Complex artificial de CPA₁ i PE a relació equimolar (b) Complex artificial de PPE amb saA a relació equimolar.

Per últim, també es va estudiar la possibilitat de formació d'un complex artificial entre la PCPB i PPE. Així, quan PCPB i PPE es barrejaren a relacions molars 1/1 i s'aplicaren en un gel d'electroforesi que contenia un gradient de porus, és a dir, un gradient d'acrilamida del 7.5 al 15% sense urea, construït com si es tractés d'un gradient d'urea (apartat M2.5), s'obtingué una única banda de mobilitat clarament diferent de la de les proteïnes components de la barreja (Fig. 29.a). No obstant, quan aquest mateix complex es va analitzar en un gel que contenia un gradient d'urea, s'observà una dissociació de les subunitats a 0.5 M urea (Fig 40.b). Clarament s'observa que el complex format, i que fins al moment no havia estat descrit, entre PCPB i PPE, és molt menys estable que el format entre PCPA i PPE (concentració d'urea necessària per a la dissociació 0.5 M, enfront de 5.7 M). Malgrat que aquesta unió és molt més feble, sorgeix la qüestió de perquè in vivo, la PPE només es troba associada a la PCPA i no a la PCPB, si ambdues tenen capacitat d'unio d'aquesta serin-proteïna encara que amb afinitats diferents. Fins al moment, la pregunta queda sense resposta però cal tenir en compte que, si bé el complex es forma entre PCPB i PPE, aquesta unió és feble i que el propi procés d'obtenció de les proteïnes pot ésser suficientment dràstic per a dissociar-lo. També existeix la possibilitat que la síntesi proteïca de PPE sigui inferior a la de la PCPA+PCPB la qual cosa afavoriria la formació preferent del complex amb afinitat més elevada.

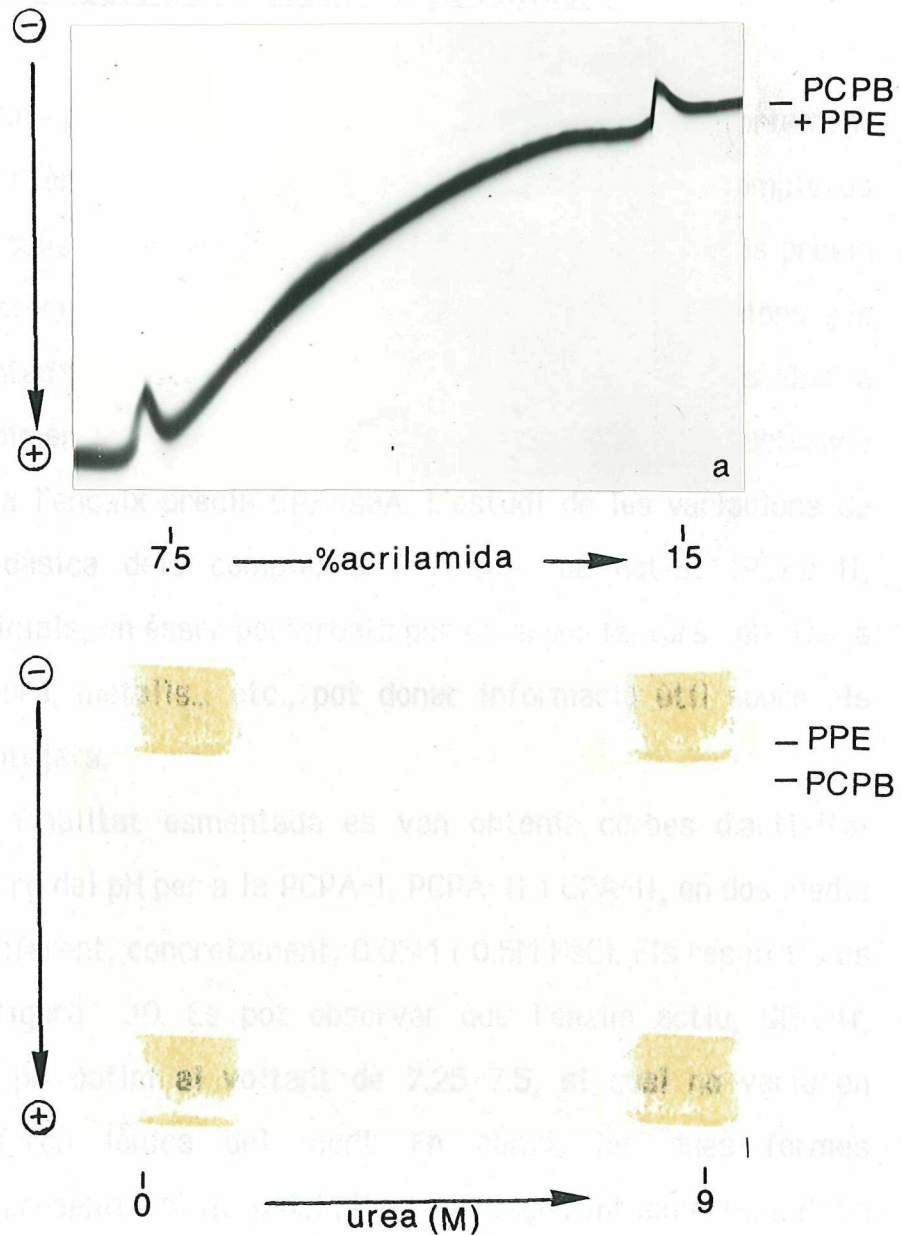


Figura 29.- Comportament electroforètic en gels en gradient transversal de poliacrilamida (7.5-15%) i gradient d'urea (0-9M) d'un complex a relació molar entre PCPB i PPE (a) gel en gradient de poliacrilamida (b) gel en gradient d'urea.

RA.2.- Corbes d'activitat de PCPA-I, PCPA-II i CPA al llarg del pH, i en medis de diferent força iònica.

L'activitat peptidàsica de la CPA porcina resulta fortament inhibida per la presència del saA, bé en el proenzim natiu bé en complexos artificials d'ambdues proteïnes, segons es va demostrar en estudis previs del nostre laboratori (18). Malgrat que es desconeixen les condicions que modulen l'esmentada inhibició es pot suposar que aquesta es deu a l'estructura tridimensional del saA (molècula fortament estructurada segons (105)) i a l'encaix precís CPA-saA. L'estudi de les variacions de l'activitat peptidàsica dels complexos CPA-saA, bé nadius (PCPA-II, PCPA-I) bé artificials, en ésser pertorbats per diversos factors : pH, força iònica, temperatura, metalls... etc., pot donar informació útil sobre els interrogants plantejats.

Amb la finalitat esmentada es van obtenir corbes d'activitat peptidàsica al llarg del pH per a la PCPA-I, PCPA-II i CPA-II, en dos medis de força iònica diferent, concretament, 0.05M i 0.5M NaCl. Els resultats es mostren en la figura 30. Es pot observar que l'enzim actiu, CPA-II, presenta el seu pH òptim al voltant de 7.25-7.5, el qual no varia en augmentar la força iònica del medi. En canvi, les dues formes proenzimàtiques presenten al llarg del pH un desplaçament del màxim de la corba d'activitat d'una unitat, concretament de 6.0 a 7.0 en passar d'una concentració salina baixa a una d'elevada.

El fet que zimogen i enzim actiu presentin un pH òptim diferent a baixa força iònica ja havia estat descrit per al zimogen binari (PCPA-S5) de la CPA de pàncreas de bou (85). Les diferències observades es van atribuir a un canvi conformacional en la reactivitat del Glu-270 del centre actiu, provocat pel procés d'activació.

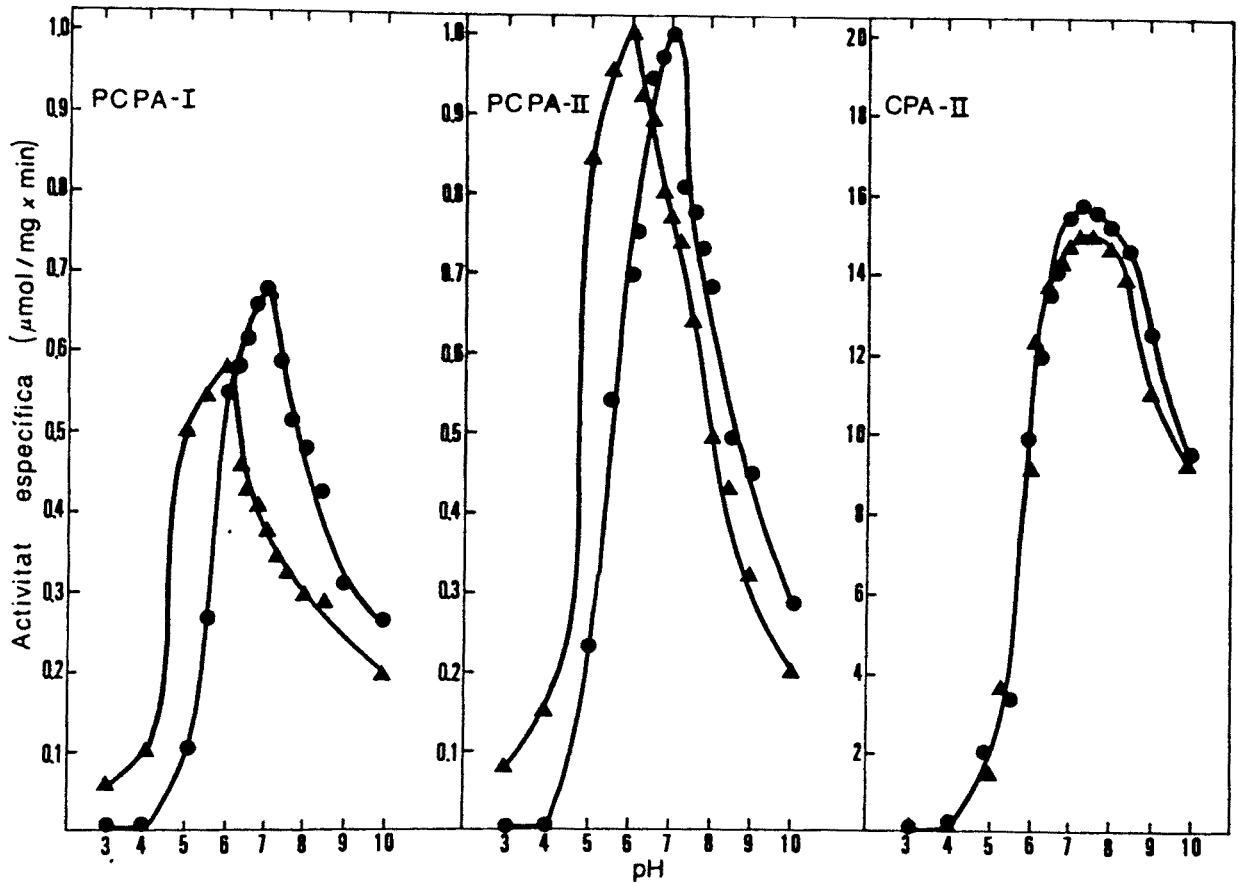


Figura 30.- Corbes d'activitat específica de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II en funció del pH. Per a cada proteïna es van obtenir corbes a dues forces iòniques, 0.5M NaCl (●—●) i 0.05M NaCl(▲—▲). Substrat emprat: HPA a 1 mM; tampó acetat 25 mM, Mes 25 mM, Tris 25mM; temperatura 25°C.

No obstant, en aquest treball sobre la PCPA bovina no s'observà que el pH òptim d'activitat del proenzim s'acostés al de l'enzim actiu en incrementar la força iònica del medi, tal com s'observa en el nostre cas amb els proenzims de porc. Una possible explicació de la variació del pH òptim del proenzim en augmentar la força iònica consisteix en el fet que l'increment d'aquesta podria desplaçar el saA dins de la PCPA, allunyant-lo del centre actiu de la CPA i, per tant, modificant la reactivitat del Glu-270, fenomen que no passaria amb la PCPA de pàncreas de bou.

Els resultats obtinguts en aquest experiment suggereixen que el segment d'activació unit a l'enzim actiu no és un domini estructural rígid sinó que presenta una certa mobilitat reponsible dels canvis observats en variar la força iònica del medi. Cal tenir en compte però que els experiments cinètics han estat realitzats en condicions de substrat no saturants. Aquest fet i el caràcter no-Michaelià de les cinètiques de trencament de l'HPA per les CPAs de mamífers (77,85) obliga a tenir una certa precaució en les hipòtesis i conclusions que es puguin emetre a partir dels resultats obtinguts. Cal però afegir que resultats preliminars obtinguts en el nostre laboratori en un marge molt ampli de concentracions d'HPA confirmen els resultats aquí presentats (Serra M.A., resultats no publicats).

RA.3.- Cinètica de pèrdua de Zn²⁺ de la PCPA-I, PCPA-II i CPA-II, segons la força iònica del medi.

Tal com ja s'ha descrit en la introducció d'aquesta Tesi, la carboxipeptidasa A és un metalloenzim que conté Zn²⁺ en el centre actiu, metall que és essencial per a la seva activitat enzimàtica.

Aquest metall es pot segrestar mitjançant l'addició d'un agent quelant, la 1-10 fenantrolina (abreu. O-P), fenomen que va acompanyat d'una pèrdua d'activitat enzimàtica (175,176). Es creu que l'acció segrestant d'aquest agent quelant té lloc per penetració d'aquest en el centre actiu de l'enzim (176). Una acció similar s'observà sobre l'activitat residual de les PCPAs bovines.

Amb la finalitat d'estudiar l'efecte de la força iònica sobre l'accessibilitat de l'O-P al centre actiu de la CPA-II, PCPA-II, i PCPA-I porcines es va observar el procés d'inhibició d'aquestes proteïnes en afegir O-P 0.5 mM al medi, en tres concentracions de NaCl: 0.05 M, 0.5 M i 3 M.

Els resultats es mostren en la Figura 31 on es pot observar que la velocitat d'inactivació de la CPA és tan ràpida que pràcticament és independent de la força iònica del medi, mentre que per als proenzims la inactivació és més ràpida en augmentar la força iònica. També s'observa que la CPA s'inactiva més ràpidament i de forma més accentuada que la PCPA-II i aquesta, a la vegada, més que la PCPA-I, independentment de la força iònica del medi.

La variació de la capacitat de l'O-P per inhibir les espècies estudiades segons la força iònica del medi es pot deure al grau de bloqueig que el segment d'activació faci sobre l'entrada de l'inhibidor al centre actiu. En augmentar la força iònica el segment d'activació pot separar-se de l'enzim actiu facilitant l'entrada de l'agent quelant. Aquest resultat

també recolza la hipòtesi de la mobilitat del segment d'activació quan es troba unit a l'enzim actiu.

El fet que la PCPA-I (complex binari) s'inhibeixi més lentament que la PCPA-II (monòmer) es pot deure a la major rigidesa conformacional imposada al segment d'activació a causa de l'existència de l'estructura quaternària en el proenzim. Cal tenir en compte, tal com s'ha demostrat en l'apartat RA.1, que es produeix una unió directa entre el segment d'activació i la propeptasa E en el complex binari o PCPA-I.

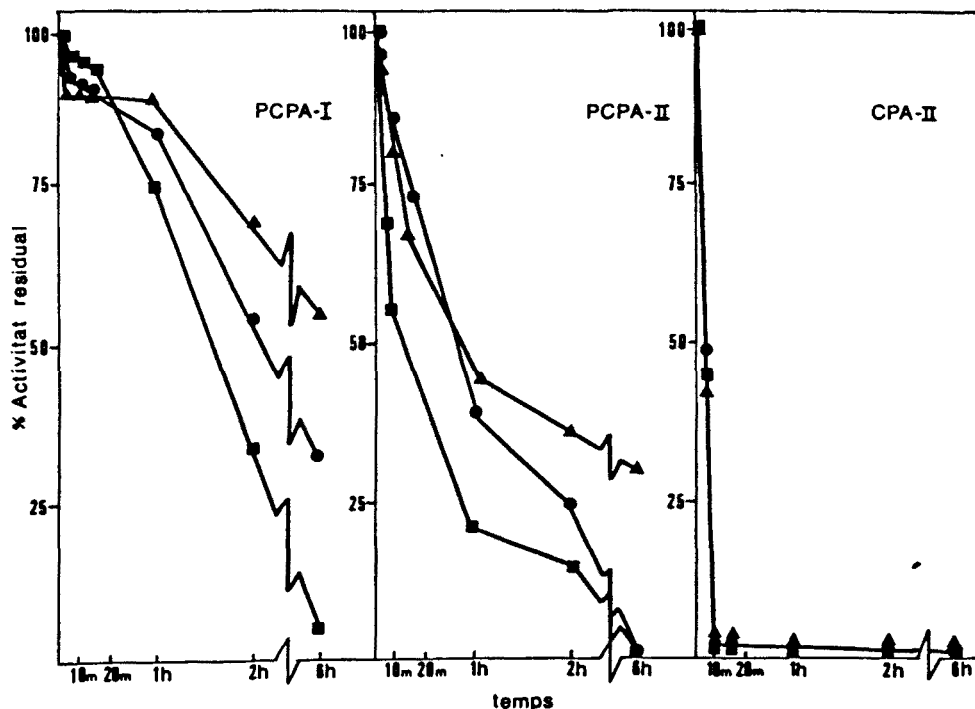


Figura 31.- Cinètica de pèrdua de Zn^{2+} per acció de la 1-10 fenantrolina sobre mostres de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II. Els resultats s'han expressat en % d'activitat residual respecte a la mesura d'activitat inicial (abans d'afegir l'agent quelant) en funció del temps. Per cada mostra es van seguir les cinètiques a tres forces iòniques: (\blacktriangle — \blacktriangle) 0.05M NaCl, (\bullet — \bullet) 0.5M NaCl i (\blacksquare — \blacksquare) 3M NaCl.

RA.4.- Activació de la PCPA-II per acció de la tripsina, segons la força iònica del medi.

Es va estudiar el procés d'activació triptica de la PCPA-II a diferents forces iòniques i es mesurà l'aparició de l'activitat peptidàsica. Els resultats es van comparar amb els obtinguts en mesurar l'activitat que presenta una barreja equimolar (1/1) reassociada de CPA-saA, en el mateix marge de concentracions de sal. Cal recordar que el segment d'activació actua com un potent inhibidor de l'activitat de la CPA (18). Els resultats obtinguts es mostren en la Fig 32. Com es pot observar, a mesura que augmenta la força iònica el procés d'activació triptica de la PCPA-II es veu facilitat, mentre que l'activitat de la CPA-II només augmenta lleugerament i encara a forces iòniques molt elevades (d'1 a 2 M NaCl). A més, s'observa que l'activitat del complex CPA-saA s'acosta a la de la CPA sola en augmentar la força iònica, indicant una pèrdua de la capacitat inhibidora d'aquest segment.

El fet que l'activació triptica de la PCPA resulti facilitada a alta força iònica es pot deure al fet que el segment d'activació es troba més allunyat del centre actiu quedant la regió peptídica que l'uneix a l'enzim actiu més accessible a la tripsina. Aquest fet és congruent amb la probable pèrdua de la capacitat inhibidora del segment d'activació quan es forma el complex CPA-saA a força iònica elevada.

El resultat experimental presentat aquí junt amb els resultats dels apartats RA2 i 3, suggereixen que el saA no és un domini estructural rígid o unit rígidament a la CPA dins de la PCPA sinó que presenta una mobilitat responsable dels canvis observats en variar la força iònica del medi.

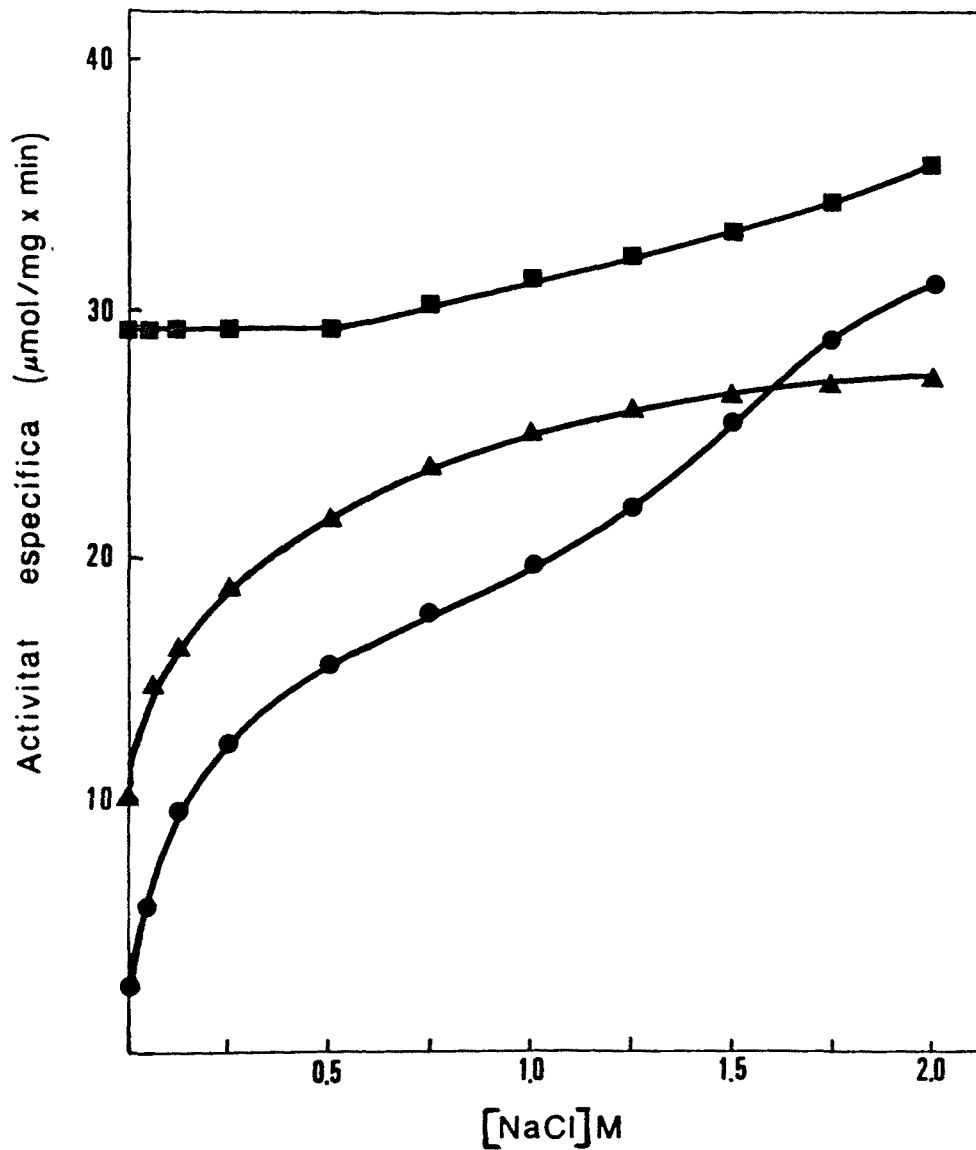


Figura 32.- Procés d'activació trípica de PCPA-II a diferents forces iòniques mesurat per aparició d'activitat peptidàsica a les dues hores de l'addició de la tripsina (●—●). Comparació amb la variació de l'activitat peptidàsica de CPA-II (■—■) i d'un complex CPA-II/safl a relació equimolar (▲—▲) en les mateixes condicions de força iònica.

RA.5.- Variació de l'activitat de PCPA-I, PCPA-II i CPA en augmentar la temperatura i modificant la força iònica del medi.

Es va estudiar també l'efecte de la temperatura, a dues forces iòniques 0.05 M i 0.5 M en NaCl, sobre mostres de PCPA-I, PCPA-II i CPA, mesurant l'activitat peptidàsica tal com s'explica en l'apartat M3.2.2. En la Figura 33 es mostren les corbes d'activitat específica obtingudes. Tal com es pot observar l'enzim actiu va presentar la mateixa estabilitat enfront a la desnaturalització tèrmica a força iònica alta que a força iònica baixa. Aquest resultat experimental sembla discrepar dels trobats posteriorment i que es descriuen en l'apartat següent on sembla ésser que la força iònica baixa estabilitza aquest enzim enfront de la desnaturalització tèrmica. La no coincidència entre ambdós resultats pot ésser deguda a les diferents condicions experimentals i al fet que en aquest cas es mesura directament l'efecte de la temperatura sobre l'activitat enzimàtica mentre que en els altres es mesura la capacitat de renaturalització d'aquestes proteïnes, capacitat que es pot veure dificultada per la presència de força iònica elevada. Cal tenir present que l'efecte de la temperatura en la velocitat de reacció enzimàtica pot ésser degut a diferents causes, no tan sols a un efecte sobre l'estabilitat de l'enzim, sinó també a un efecte sobre la velocitat de trencament del complex enzim-substracte determinat pel calor de reacció de l'activació, a un efecte sobre els pHs dels grups funcionals a causa d'una alteració dels seus pK_a s determinada per la calor d'ionització....etc. (177).

Quan s'observà el comportament dels proenzims, es veié que aquests es comportaven diferent de l'enzim actiu ja que presentaven una major estabilitat a força iònica baixa que a alta.

Una possible explicació d'aquest comportament, malgrat que les mesures de la influència de la temperatura sobre la velocitat de reacció enzimàtica són molt complexes (177), pot raure en el fet que el segment d'activació a força iònica alta se separa de l'enzim i per tant aquest perd estabilitat. L'efecte és més marcat en el cas de la forma monomèrica que en el complex binari, probablement per la major rigidesa presentada pel segment imposada dins de l'estructura quaternària.

Tot l'exposat fins al moment sembla recolzar el fet, ja esmentat en els anteriors apartats, que el segment d'activació presenta una mobilitat conformacional dins del proenzim, responsable del seu comportament en variar les condicions del medi.

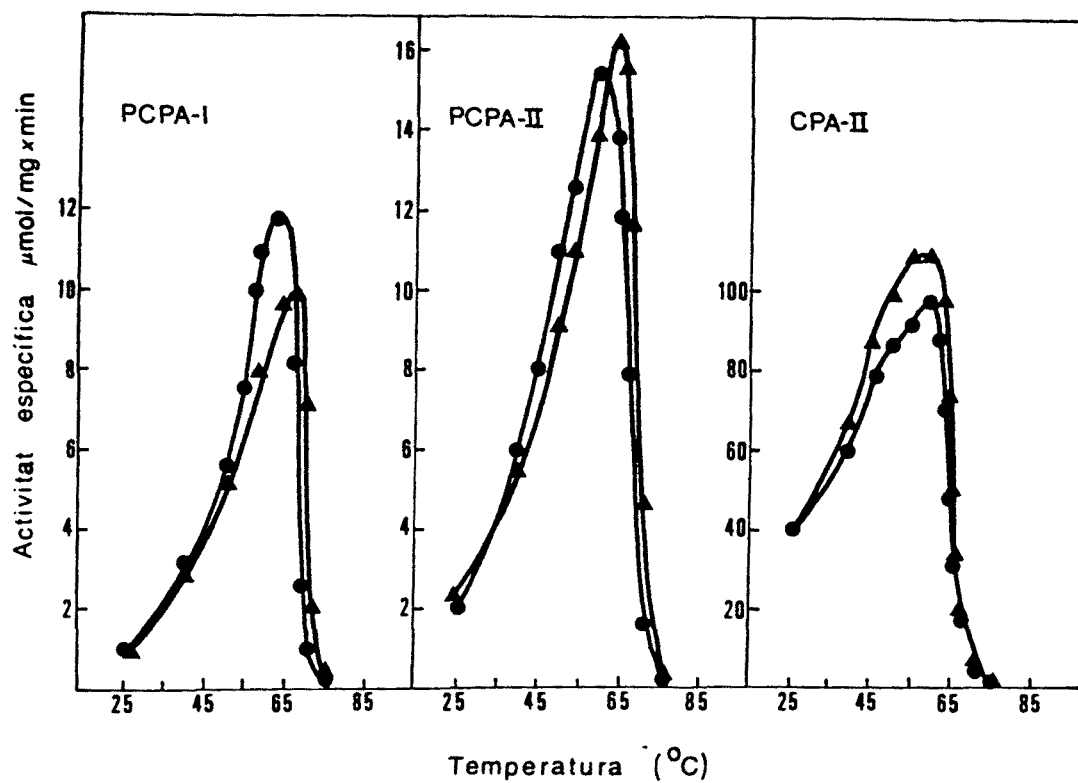


Figura 33.- Corbes d'activitat específica de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II enfront de la temperatura. Per a cada proteïna es va mesurar la corba d'activitat a dues forces iòniques, 0.5M NaCl (●—●) i 0.05M NaCl (▲—▲).

RA6.- Estudis de renaturalització de PCPA-II, CPA-II i del saA, després d'èsser sotmesos a temperatura elevada, variant les condicions del medi.

Els estudis previs de pertorbació de PCPA i CPA per la urea, canvis de pH i força iònica, temperatura, agents quelants i proteòlisi, suggereixen que el saA a dins del proenzim presenta una conformació flexible i una localització mòbil. Podria succeir, però, que alguns dels comportaments observats en els anteriors experiments estiguin modulats pel fet que el saA, i amb ell la PCPA, canviïn de conformació de manera quasi irreversible en presència dels efectors esmentats. Es va creure per tant convenient d'investigar la capacitat dels saA per a renaturalitzar-se, escollint per aquest experiment un dels agents pertorbadors que sol donar lloc, més freqüentment, a canvis irreversibles en algunes proteïnes: l'increment de temperatura. Cal recordar que el saA conté l'extrem N-terminal de la proteïna, l'extrem per on aquesta comença a plegar-se en ésser sintetitzada sobre el ribosoma. A més, el saA no conté ponts disulfur ni cisteïnes que es puguin oxidar o reduir interferint en la renaturalització. Per tant, i si durant la desnaturalització tèrmica no hi ha processos d'agregació concurrents, o modificacions químiques de la proteïna, caldria esperar que el saA fos renaturalitzable. El mateix es podria esperar de la PCPA, encara que pel fet de posseir diversos dominis estructurals i ésser una proteïna molt més gran hi ha més possibilitat que les interferències esmentades tinguin lloc. La CPA podria tenir, a més dels problemes esmentats per a la PCPA, els derivats del fet que ha perdut la regió d'inici del seu plegament (el saA).

Cal també afegir que els estudis de renaturalització aquí presentats es van realitzar de forma coordinada i simultània amb els estudis de calorimetria d'escombrat diferencial (DSC) que es descriuen en l'apartat següent. Això explica que es busquessin unes condicions de treball concretes, que fossin adients a ambdós tipus d'experiments. En la pràctica, per la major simplicitat i menor cost dels estudis de renaturalització puntuals respecte als de DSC, els primers es van fer depenents dels segons. La finalitat principal dels mateixos fou assajar les condicions més adients per a obtenir uns experiments de DSC idonis (no agregació, reversibilitat, T_m escalades,...etc). Per tant, quan unes condicions del medi resultaven òptimes per a DSC ja no se'n buscaven més.

Per estudiar la renaturalització del saA es va mesurar la pèrdua de la seva capacitat per inhibir la CPA (en barrejar-se a relació equimolar) després d'ésser escalfat a una temperatura determinada i refredat. En el cas dels estudis de renaturalització de PCPA i CPA es van mesurar simplement les activitats intrínseques d'ambdues proteïnes després d'ésser sotmeses al tractament esmentat. Els detalls experimentals es descriuen a M3.3.

Els estudis de renaturalització tèrmica del saA es van realitzar a dos pHs diferents 7.5 (tampó fosfat) i pH 9.0 (tampó pirofosfat). En escollir aquest segon pH lleugerament alcalí s'intentà de trobar el límit superior de pH en què el saA encara fos renaturalitzable i, a més, aconseguir una certa desestabilització d'aquest que permetés obtenir una T_m inferior a les trobades en altres condicions. Les mesures de renaturalització i les de DSC assajades (veure RA.7) indiquen, però, que no es va assolir aquest segon objectiu.

De fet, per DSC es va evidenciar que fins i tot a pH 11.5 el saA és notablement termoestable i presenta una desnaturalització tèrmica reversible. Ara bé, tant a pH 9.0 com a pH 11.5 es va observar que en les condicions concretes d'assaig de DSC una part del saA (5-30%) no és renaturalitzable. Pensant en la possibilitat que part del segment d'activació sofrís oxidacions o agregacions responsables d'aquesta desnaturalització irreversible parcial, es van fer també estudis de renaturalització en presència de dos potencials inhibidors d'aquests fenòmens, el DTT i la urea.

Cal dir que es van escollir unes condicions d'estudi (velocitat d'increment de temperatura, tampons...etc.) semblants a les posteriorment emprades en els experiments de DSC (apartat RA.7) a fi de poder establir correlacions. En la Figura 34 es mostren els resultats d'aquest estudi. Tal com es pot observar quan el saA es va sotmetre a una pujada gradual de temperatura des de 25°C fins a 85°C a raó de 2.25°C/min i es deixà 1 min a aquesta temperatura, la renaturalització fou molt bona en tots els casos, tant en tampó fosfat (pH 7.5) com en tampó pirofosfat (pH 9.0), oscil·lant la recuperació de capacitat inhibidora entre un 80 i un 100%. Les diferents condicions assajades s'indiquen en el peu de figura. En canvi, quan el segment va romandre durant 30 min. a 85°C, la renaturalització fou depenent del pH en què es trobava la mostra. Així, en els casos corresponents al tampó fosfat (pH 7.5) la renaturalització màxima es donà en el cas A, essent només d'un 23%. Sembla ésser que quan més baixa és la força iònica, millor és la renaturalització, no quedant clar l'efecte del DTT ni de l'urea. En el cas del tampó pirofosfat (pH 9.0) la renaturalització oscil·là d'un 16 a un 86%, depenent dels casos, indicant clarament que a pH 9.0 aquesta és millor que a pH 7.5. No es pot afirmar que la baixa força iònica, el DTT i la urea tinguin algun efecte sobre aquesta.

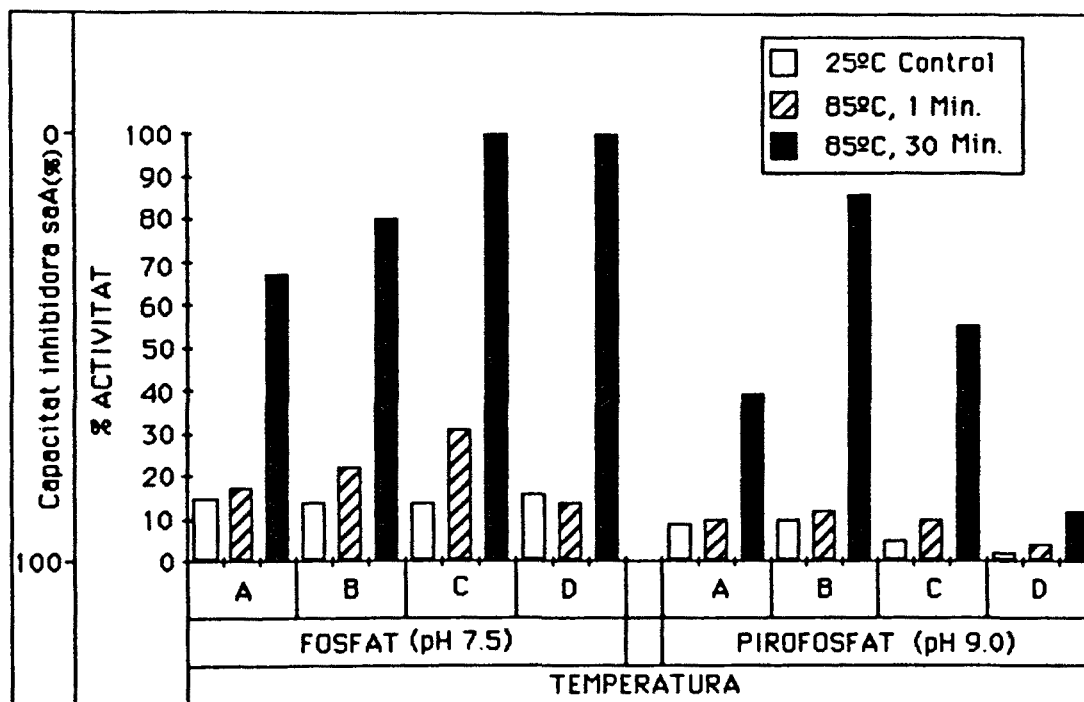


Figura 34.- Histograma representatiu de la capacitat de renaturalització del saA. Els resultats s'han expressat en % d'activitat CPA romanent després d'afegir sobre aquest enzim el saA renaturalitzat a una relació equimolar. El segment d'activació es va desnaturar per pujada gradual de temperatura a raó de 2.25°C/min des de 25°C fins a 85°C i mantenint 1 min o 30 min. aquestes condicions. La renaturalització es va fer en bany de gel. El control a 25°C consisteix en la mesura de l'activitat CPA romanent d'un complex a relació molar CPA-saA en el qual el segment no ha sofert cap escalfament. Les diferents condicions assajades són:

- A) Fosfat o Pirofosfat 5 mM, DTT 0.1 mM (pH 7.5 o pH 9.0).
- B) Fosfat o Pirofosfat 5 mM, urea 2M (pH 7.5 o pH 9.0).
- C) Fosfat o Pirofosfat 20 mM, NaCl 0.05M, DTT 0.1 mM (pH 7.5 o pH 9.0).
- D) Fosfat o Pirofosfat 20 mM, NaCl 0.05M, urea 2M (pH 7.5 o pH 9.0).

Quan es va estudiar la renaturalització de la PCPA i de la CPA, sigui mitjançant anàlisi puntual, sigui per DSC, es va evidenciar que en la majoria de condicions aquestes dues proteïnes es desnaturalitzen irreversiblement de forma parcial o de forma total. A causa d'aquesta situació l'anàlisi de renaturalització es va fer extensiva a moltes més condicions de força iònica, pH i presència d'antioxidants o de desagregants. En la taula 3 de l'apartat M3.3 s'indica la majoria de condicions assajades mitjançant estudis de renaturalització puntual de PCPA i CPA.

De tots aquests múltiples experiments i dels seus resultats, que no es descriuen aquí, s'extreuen algunes conclusions que a continuació esmentarem:

- La cinètica de pujada de temperatura de desnaturalització escollida i el temps de manteniment de la mostra a aquesta temperatura, són importantíssims en el grau de renaturalització de PCPA i CPA. Es van assajar tres sistemes diferents: a) pujada gradual de temperatura a 2.25°C/min. (condicions semblants a les de DSC) i retirada de mostres sobre la marxa, b) idèntica pujada gradual fins a la temperatura desitjada mantenint la mostra a aquesta temperatura durant 1 min. i extracció de part d'ella, seguida de nova pujada gradual fins a la següent temperatura triada, c) pujada sobtada fins a la temperatura desitjada (aprox 1 min. en tots els casos) i extracció d'alíquotes de la mostra a diferents temps de manteniment a aquesta temperatura. El mètode c), en general, és el que ha donat lloc a dades més repetitives i a recuperació d'activitat més elevada perquè es redueix el temps d'escalfament.

- Les condicions de fosfat (pH 6.5-7.5) són molt millors que les de pirofosfat (pH 9.0) per a la renaturalització de la PCPA i de la CPA.

Quan es van sotmetre les mostres en tampó fosfat a la T_m (obtinguda per DSC), durant 1 min. seguit de refredament, tant la PCPA com la CPA recuperen d'un 40-80% de la seva activitat. En canvi, quan l'experiment es va fer en tampó pirofosfat, la recuperació de l'activitat de la PCPA no passà del 30-40% mentre que la CPA no es renaturalitzà en absolut.

- La baixa força iònica millora la T_m i la renaturalització. Aquest efecte, en alguns casos, pot estar relacionat amb el fet que a baixa força iònica s'evita l'agregació de les proteïnes. Els estudis coordinats de DSC suggereixen que en tampó fosfat la desnaturalització de la CPA va acompanyada d'agregació quan s'afegeix en el medi NaCl 50 mM, mentre que en les mateixes condicions salines però en tampó pirofosfat es produeix l'agregació tant de la CPA com de la PCPA durant la desnaturalització.

- La presència de DTT 0.1 mM afavoreix clarament la renaturalització de PCPA i CPA respecte a la proteïna sola o en presència de DTT 0.5 o 1 mM.

- La urea 2M millora lleugerament la renaturalització, sobretot quan es treballa en tampó pirofosfat, i encara més si s'hi afegeix DTT 0.1 mM al medi.

Com a exemple dels diferents resultats obtinguts, en les Figures 35 i 36 es presenta la variació de la capacitat de la CPA i de la PCPA per a recuperar la seva activitat després d'ésser mantingudes a diferents temperatures durant diferents temps i ésser, tot seguit, refredades. En aquest cas s'ha escollit un experiment realitzat en una de les condicions més favorables per a la renaturalització: tampó fosfat (pH 7.5) a baixa força iònica (1mM).

Una de les conclusions que s'extreuen d'aquests resultats presentats és que si la CPA o la PCPA es mantenen a alta temperatura durant un temps llarg (p.e. 5-30 min.) queden desnaturalitzades irreversiblement encara que es trobin en una de les condicions més favorables per a la recuperació d'activitat. Això ens porta a suposar que en els experiments de DSC, que es realitzen amb increments de temperatura no superiors a 2-2.5°C/min. (i que per tant requereixen 20-25 min. per a passar de 25 a 85°C), difícilment s'observarà renaturalització quan s'analitzin les proteïnes esmentades. Malgrat aquest comportament, creiem que no es pot assegurar que les PCPA i CPA presentin una desnaturalització tèrmica irreversible, ja que de fet es renaturalitzen considerablement quan se sotmeten a altes temperatures durant temps curts, 1-2 min., temps més que suficient per a desplegar la proteïna.

Creiem per tant que, en certa manera, es poden considerar aquestes proteïnes com de desnaturalització reversible encara que posteriorment altres fenòmens paral·lels (agregació, trencament S-S, oxidacions...etc) impedeixin la seva renaturalització quan tenen temps d'actuar. Això justificaria l'aplicació de mètodes matemàtics de deconvolució a les corbes de DSC de PCPA i CPA realitzades en aquestes condicions.

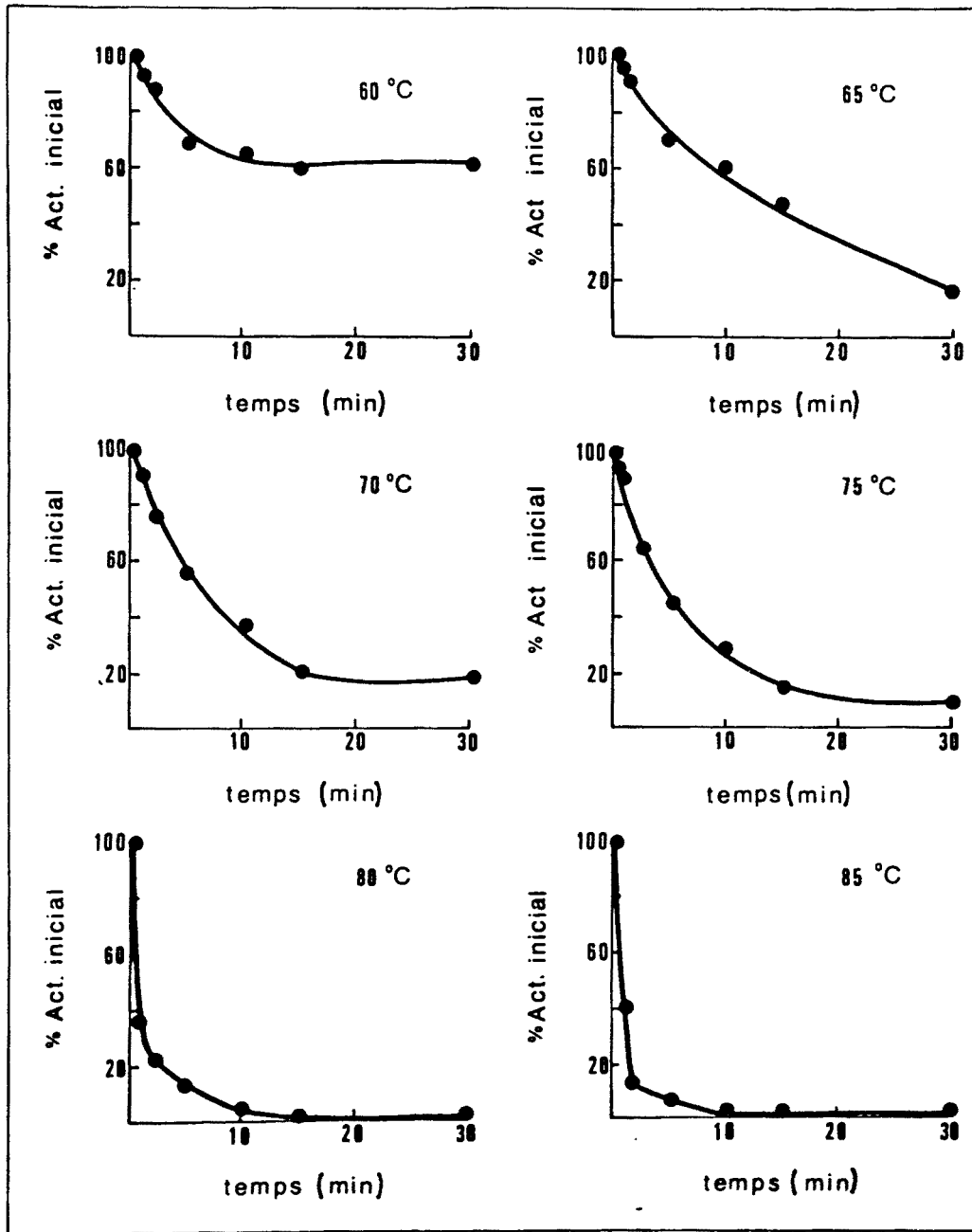


Figura 35.- Cinètiques de desnaturalització i renaturalització de CPA a diferents temperatures en tampó $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 1 mM, Zn^{2+} 10^{-5}M (pH 7.5). Els resultats s'han expressat en % d'activitat que recupera l'enzim en ésser refredat després d'ésser sotmès a les temperatures indicades i a temps creixents. En cada cas es va trigar aproximadament 1 min. en assolir la temperatura desitjada.

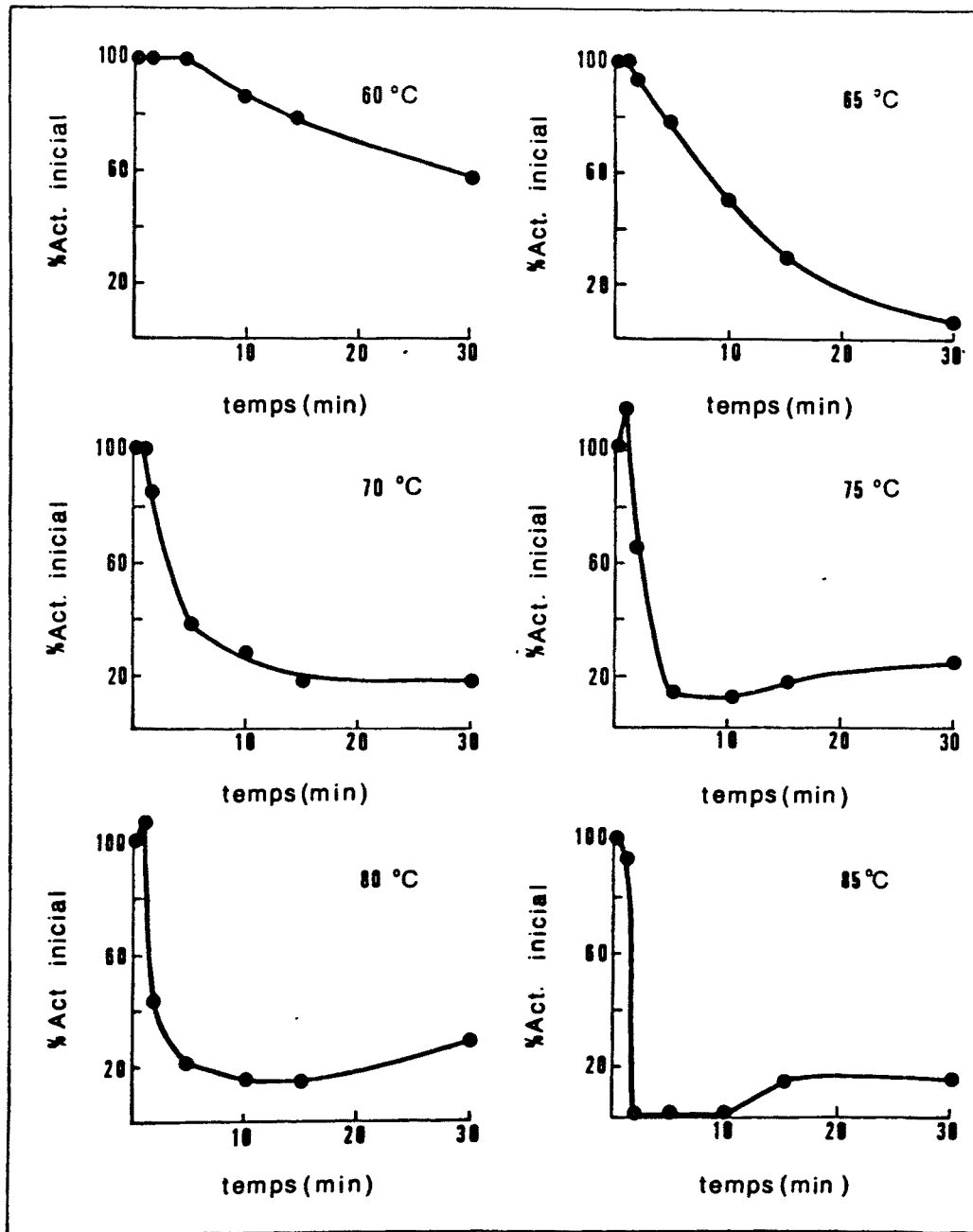


Figura 36.- Cinètiques de desnaturalització i renaturalització de PCPR a diferents temperatures en tampó NaH_2PO_4 1 mM, $\text{Zn } 10^{-6}$ M (pH 7.5). Els resultats s'han expressat en % d'activitat intrínseca que recupera el proenzim en ésser refredat després d'ésser sotmès a les temperatures indicades i a temps creixents. En cada cas es va trigar aproximadament 1 min. en assolir la temperatura desitjada.

RA.7.- Estudis de calorimetria diferencial de PCPA-II, CPA i saA.

Els experiments de calorimetria diferencial d'escombrat (DSC) de CPA, PCPA-II i saA es van portar a terme en dos tampons diferents, fosfat sòdic a pH 7.5 i pirofosfat sòdic a pH 9.0 , a diferents condicions de força iònica del medi, i seguint el protocol descrit en l'apartat M6.2.

Cal advertir de bon començament que a partir de les corbes de DSC, i mitjançant la seva repetició sobre una mostra ja desnaturalitzada, es va observar que la desnaturalització tèrmica de l'enzim actiu i del proenzim és irreversible en totes les condicions experimentals provades, mentre que el segment d'activació presenta un procés reversible, particularment en presència de β -mercaptoetanol (veure Fig. 39, corbes de reescalfament). Aquest fet ja era esperable si es tenen en compte els estudis de desnaturalització i renaturalització efectuats amb aquestes proteïnes i seguits per mesures cinètiques que es presenten en l'anterior apartat.

En la figura 37 es presenten diferents corbes de transició per a la PCPA-II, obtingudes en les condicions de força iònica que s'indiquen en el peu de figura. Així mateix, en la Fig. 38 es presenta el mateix tipus d'observacions per a l'enzim actiu, CPA-II. De l'anàlisi d'aquestes corbes es pot deduir l'entalpia específica de desplegament de cada proteïna en les condicions experimentals en què es troba. Aquests valors indiquen que sota unes mateixes condicions experimentals, siguin quines siguin, en tots els casos la PCPA presenta una entalpia específica de desplegament més gran que la CPA (veure taula 4). Aquest fet indica una clara estabilització del proenzim per part del segment d'activació, fet que ja s'ha trobat en altres proenzims com és el cas del pepsinogen (178).

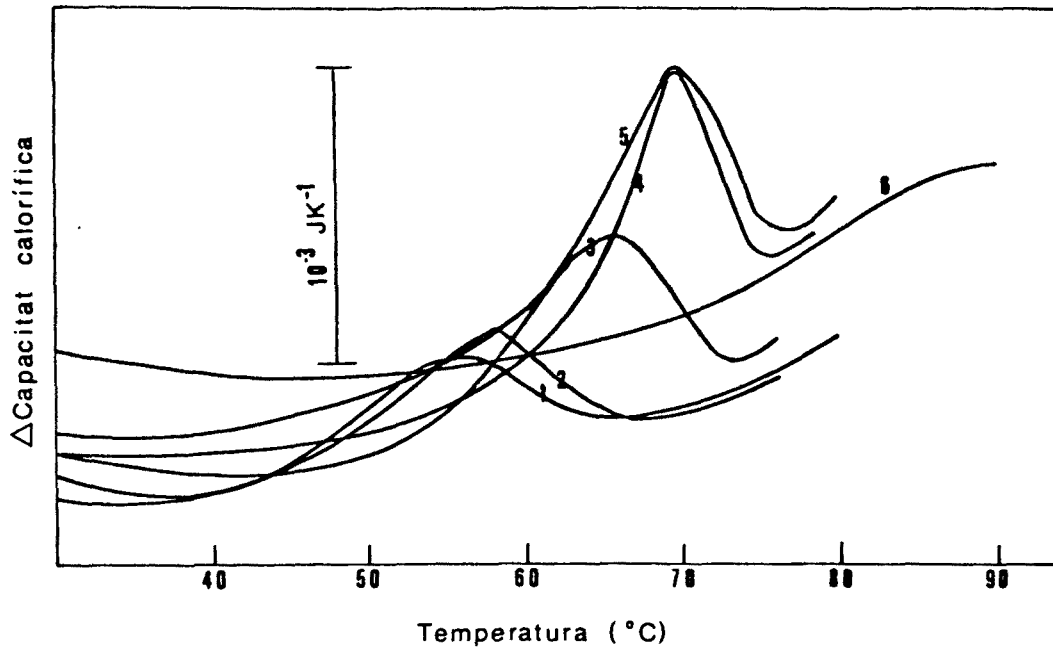


Figura 37.- Registre microcalorimètric de la capacitat calorífica diferencial de PCPA-II al llarg de la temperatura en les següents condicions:

- (1) Pirofosfat 20 mM, NaCl 0.5M (pH 9.0).
- (2) Pirofosfat 5 mM, (pH 9.0).
- (3) Pirofosfat 1 mM, (pH 9.0).
- (4) NaH_2PO_4 1 mM, (pH 7.5).
- (5) NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0.5M (pH 7.5).
- (6) Línia base, pirofosfat 5 mM (pH 9.0).

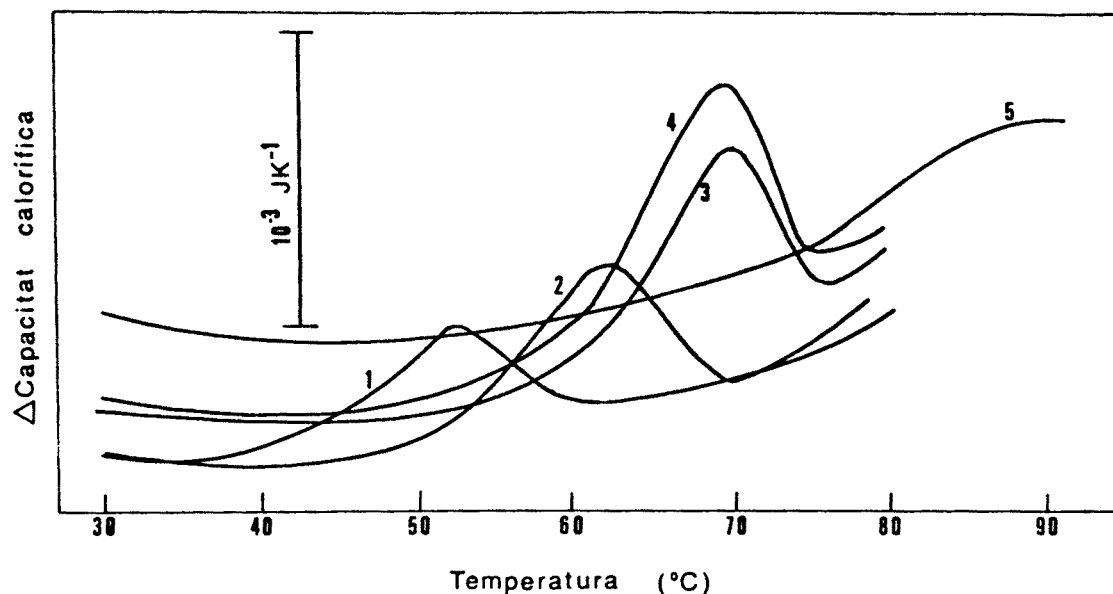


Figura 38.- Registre microcalorimètric de la capacitat calorífica diferencial de CPA-II al llarg de la temperatura en les següents condicions:

- (1) Pirofosfat 5 mM, (pH 9.0).
- (2) Pirofosfat 1 mM, (pH 9.0).
- (3) NaH_2PO_4 5 mM, (pH 7.5).
- (4) NaH_2PO_4 1 mM, (pH 7.5).
- (5) Línia base, pirofosfat 5 mM (pH 9.0).

En les figs. 37 i 38 es pot veure que l'estabilitat enfront de la desnaturalització tèrmica de PCPA i CPA és dependent del pH. A pH 7.5, tant la PCPA com la CPA presenten el mateix valor de temperatura mitja de fusió, T_m , al voltant de 70°C (veure taula 4) mentre que a pH 9.0 el valor de T_m és més gran per al proenzim que per a l'enzim actiu, però sempre inferior a 70°C. A partir d'aquestes corbes també s'observa que l'efecte de la força iònica és dependent del pH en què es fa l'experiment. Així, a pH 7.5 l'efecte es menyspreable. En canvi, a pH 9.0 els valors de T_m disminueixen en augmentar la força iònica (veure Taula 4) essent un efecte més marcat en el cas de la CPA que en el de la PCPA.

Proteïna	50 mM NaCl			50 mM NaCl		
	1 mM P (pH 7.5)	5 mM P (pH 7.5)	20 mM P (pH 7.5)	1 mM PP (pH 9.0)	5 mM PP (pH 9.0)	20 mM PP (pH 9.0)
T_m (°C)	70.6	70.5	70.0	65.7	58.3	54.9
PCPA						
ΔH (Jg ⁻¹)	19.2	21.4	24.6	20.7	16.0	14.4
CPA						
T_m (°C)	69.3	70.0	----	62.0	53.1	----
ΔH (Jg ⁻¹)	18.2	17.5	----	15.2	12.0	----
saA						
T_m (°C)	----	88.5	----	----	87.2	----
ΔH (Jg ⁻¹)	----	31.8	----	----	26.7	----

Taula 4.- Paràmetres de desnaturalització tèrmica obtinguts per microcalorimetria. P=tampó fosfat, PP=tampó pirofosfat. Marge d'incertesa $\Delta H = \pm 10\%$; $T_m = \pm 0.1$ °C.

En la figura 39 es presenten les corbes de DSC obtingudes per al saA en les condicions que s'indiquen al peu de figura. Un fet molt important que es dedueix de la comparació d'aquestes corbes amb les del proenzim i l'enzim actiu és que el segment d'activació presenta, siguin quines siguin les condicions del medi, valors de T_m d'un 10-20% superiors als presentats per l'enzim o el proenzim. Fins i tot a pH 11.5 el valor de T_m obtingut és molt alt, al voltant de 81.5 °C, mentre que en aquestes condicions de pH tant la PCPA com la CPA es troben completament desnaturalitzades a temperatura ambient. Es clar, per tant, que el segment d'activació aïllat presenta una termoestabilitat clarament superior a la del seu precursor. Aquest fet revela l'existència d'una conformació més estable per ell quan es troba aïllat que quan es troba unit a l'enzim actiu formant el proenzim, o bé una desnaturalització anòmla en aquesta última situació.

L'entalpia calorimètrica de desplegament tant per l'enzim actiu com pel proenzim sembla ésser una funció lineal de la T_m , indicant un valor de ΔC_p de desplegament aparentment més alt en el cas del proenzim. Es pot calcular l'entalpia teòrica o de Van't Hoff d'aquestes transicions per diferents camins. A partir d'aquest valor es pot calcular la relació entre l'entalpia calorimètrica experimental i l'entalpia de Van't Hoff. Segons Privalov (178) aquesta relació $\Delta H_{cal} / \Delta H_{VH}$ indica el nombre d'unitats de desnaturalització independents a la proteïna, el nombre de dominis estructurals, particularment quan el procés de desnaturalització és reversible.

Per PCPA, CPA i saA aïllat, aquesta relació donà valors entre 2 i 3, 1 i 2, i al voltant d'1, respectivament. Aquests valors, malgrat la irreversibilitat del procés de desnaturalització de l'enzim actiu i del proenzim, en les condicions d'estudi emprades, semblen indicar l'existència de 3 i 2 dominis estructurals pel proenzim i l'enzim actiu, respectivament. En canvi, el segment d'activació presenta un procés de desnaturalització completament reversible incloent un únic domini estructural. Aquesta última conclusió és força congruent amb la reduïda dimensió de saA i amb la hipòtesi que més tard exposarem sobre la seva conformació i relació estructural amb les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand (veure apartat RB.7)

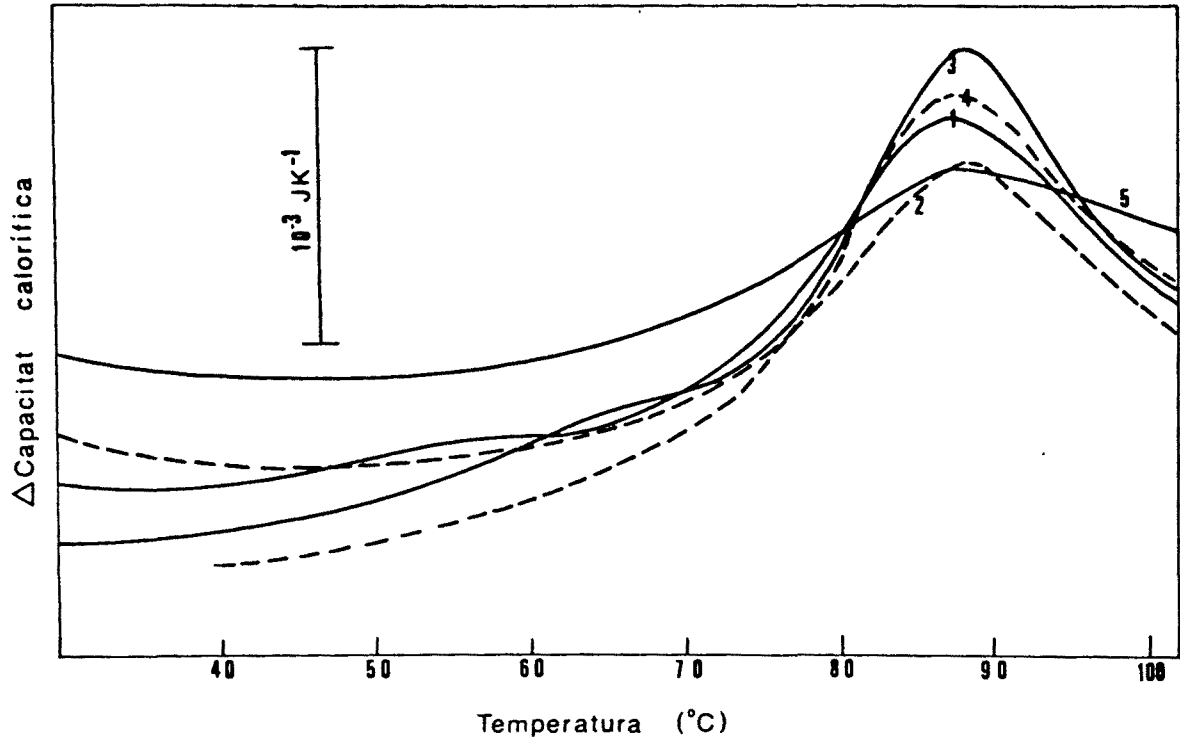


Figura 39.- Registre microcalorimètric de la capacitat calorífica diferencial del salf al llarg de la temperatura, en les següents condicions:

- (1) Pirofosfat 5 mM (pH 9.0).
- (2) Reescalfament de (1).
- (3) NaH_2PO_4 5 mM (pH 7.5) en presència de 0.1 mM β -mercaptoetanol.
- (4) Reescalfament de (3).
- (5) Línia base, pirofosfat 5 mM (pH 9.0).

APARTAT B

**ESTUDI CONFORMACIONAL DEL saA AÏLLAT. ANÀLISI DE LES
HOMOLOGIES QUE PRESENTA AMB PROTEÏNES FIXADORES DE CA²⁺
DEL TIPUS EF-HAND.**

RB.1.-Comparació dels diferents mètodes d'obtenció del saA a partir de PCPA-II.

En l'apartat M1.1.2 es descriu el mètode emprat de forma rutinària en el nostre laboratori per a l'obtenció del segment d'activació de la PCPA-II. Aquest mètode proporciona un rendiment baix així com un segment d'activació heterogeni tal com es pot veure en la Fig 17 on es presenta una anàlisi electroforètica de diferents preparacions d'aquest.

Per poder augmentar el rendiment de l'obtenció i per aconseguir una homogeneïtat en aquesta es van provar tres mètodes alternatius per separar CPA de saA (i fraccions d'aquests) a partir d'un digerit tríptic de PCPA-II. El primer d'aquests mètodes va consistir en sotmetre el digerit de PCPA-II a una cromatografia en CM-Sepharose a pH 3.5 (apartat M1.1.4). L'objectiu de treballar en aquestes condicions fou evitar que la tripsina activant, un cop acabada la digestió, seguís actuant sobre el saA primari format i pogués generar l'heterogeneïtat abans esmentada, ja que per sota de pH 4.0 aquesta proteasa no és activa. Així, s'introduí en la columna equilibrada amb formiat amònic a pH 3.5 un digerit tríptic de la PCPA-II fet en condicions estàndard (apartat M1.1.2) el qual s'ajustà a pH 3.5 en acabar el temps de digestió. Mitjançant l'aplicació d'un gradient de NaCl (també a pH 3.5) es va obtenir un perfil cromatogràfic amb un únic pic, en el qual no hi havia cap mena de separació entre la CPA i saA.

No obstant quan s'analitzà per electroforesi una mostra d'aquest únic pic, s'obtingué una banda de CPA i una única banda de saA. Semblava doncs que s'havia aconseguit d'eliminar l'heterogeneïtat del segment, però calia poder-lo separar de la CPA. Per això i recordant que el mètode tradicional d'obtenció requereix la presència d'urea es repetí la

cromatografia a pH 3.5 en presència d'urea 9M. En aquestes condicions tampoc s'aconseguí una separació dels dos fragments triptics, CPA i saA, i es va abandonar el mètode.

En canvi, s'obtingué més èxit quan s'emprà l'electroforesi preparativa, segon mètode alternatiu que es descriu en detall en l'apartat M2.6. Es trià aquesta tècnica perquè sempre que s'analitzava un digerit triptic acabat d'obtenir, per electroforesi d'urea bàsica (mètode de Creighton, apartat M2.3) o per electroforesi en presència d'urea i SDS (mètode de Hashimoto i col., apartat M2.2) s'obtenia un segment d'activació homogeni i de pes molecular alt. Es pensà doncs que aquesta tècnica portada a nivell preparatiu podria solucionar el problema de l'obtenció del segment d'activació. Es trià el mètode de Creighton (electroforesi d'acrilamida en presència d'urea 7M) ja que en les condicions en què es porta a terme la tripsina corre cap al càtode mentre que el segment d'activació i la CPA ho fan cap a l'ànode. Això permet d'eliminar la possibilitat de contaminacions de tripsina que poguessin ésser responsables de l'heterogeneïtat observada.

En la figura 40 es mostra l'eluit del gel d'electroforesi obtingut en introduir en el mateix un digerit triptic de PCPA-II preparat segons les condicions estàndard. Tal com es pot observar, s'obtingué una separació clara entre els diferents components del digerit. El pic 2 correspon al saA aïllat, i s'obté un rendiment del 50%, molt superior a l'obtingut emprant la cromatografia de bescanvi iònic clàssica la qual dóna un rendiment al voltant del 15%. Es també interessant d'indicar que una vegada eliminada la urea s'analitzà aquest segment per electroforesi analítica i es comprovà que presentava una única banda corresponent a la seva forma de pes molecular alt (veure Fig. 17). Aquesta tècnica, per tant, permet d'obtenir un saA homogeni amb un rendiment acceptable.

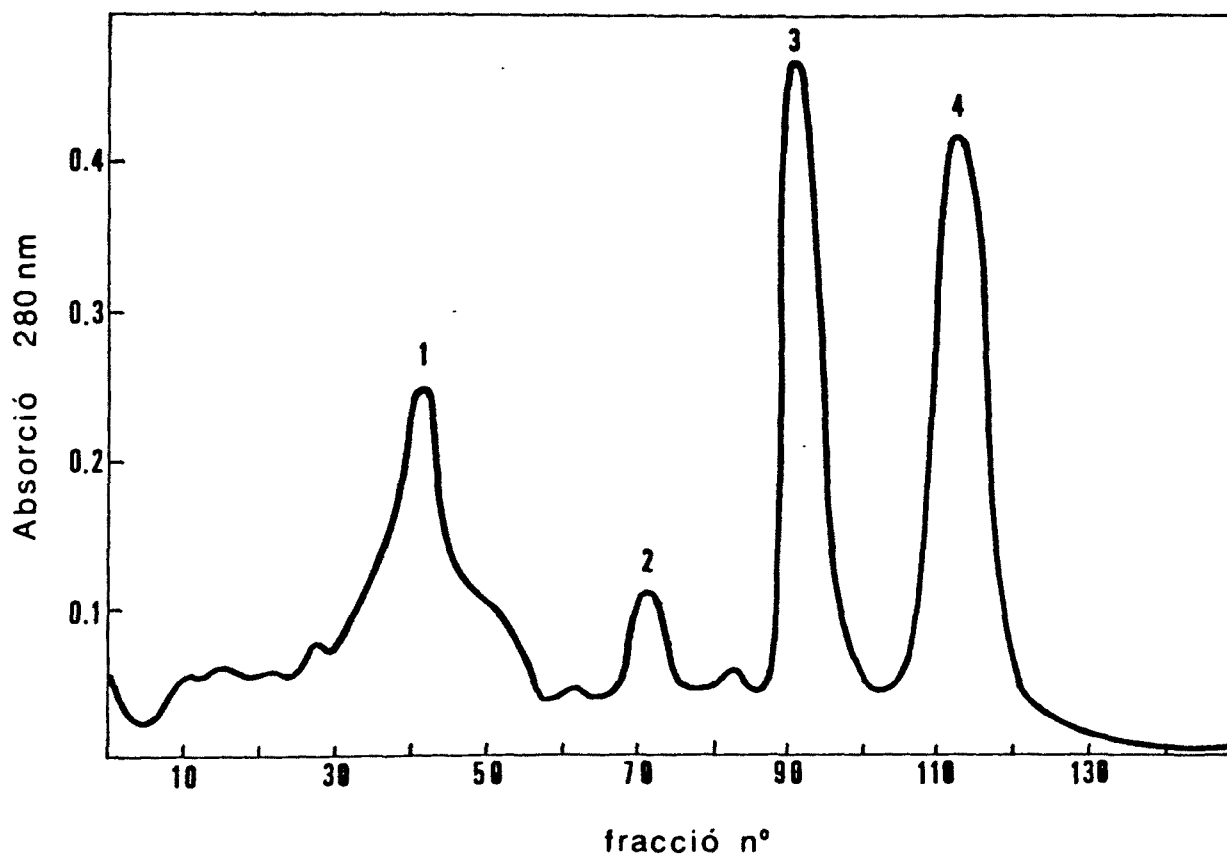


Figura 40.- Electroferograma d'un digerit de PCPA-II amb tripsina, inhibit amb STI, obtingut d'un gel d'electroforesi preparativa de poliacrillamida en urea 7M (pH 8.6). Pic (1): Inhibidor de tripsina de soja. Pic (2): saR. Pic (3): CPA₂. Pic (4): CPA₁.

No obstant, aquest mètode preparatiu presenta un greu inconvenient de tipus tècnic: l'elaboració del gel d'electroforesi preparatiu i més concretament del canal d'elució (veure Fig. 19 i 20) és difícil, depenent l'èxit de l'obtenció del segment d'activació de la seva construcció. En determinats casos, sense una explicació clara del perquè, es produeix un col.lapsa del canal que arruïna el procediment. Per tant, aquest és un factor limitant de l'ús d'aquesta tècnica.

Per últim, la tercera tècnica alternativa emprada, va ésser la que va proporcionar un èxit més gran en l'obtenció del segment. Amb ella es van assolir rendiments d'obtenció acceptables, entre un 30 i un 40%, així com un segment homogeni. A més és una tècnica fàcilment reproduïble, i que permet portar a terme l'obtenció en un termini de temps més curt que les anteriorment descrites. Aquesta tècnica és la cromatografia líquida d'alta pressió en un suport de fase reversa (C4) d'un digerit triptic de PCPA-II, i elució a pH baix (pH 2.5) amb un gradient de dissolvent orgànic. Tal com s'indica en l'apartat M1.2 es van provar tota una sèrie de gradients d'elució amb acetonitril, resultant com a més ràpids i efectius els que segueixen una corba segons la qual el % d'acetonitril puja molt ràpidament al començament del gradient i s'alenteix després. Aquests gradients tan ràpids presentaven però l'inconvenient de proporcionar un pic de saA que contenia restes de tripsina fet que provocava la posterior generació d'heterogeneïtat en el saA obtingut. Per evitar aquest problema va caldre alentir la cromatografia. Dels dos gradients descrits en l'apartat M1.2.1, el primer, el més ràpid, presentava els problemes esmentats, el segon, malgrat que consumeix una mica més de temps, proporcionà un segment homogeni i evità que aquest surtís barrejat amb la tripsina activant.

En la figura 30 es mostra el cromatograma obtingut fent servir aquest segon gradient en el qual el % d'acetonitril no puja tan ràpidament com en el primer descrit.

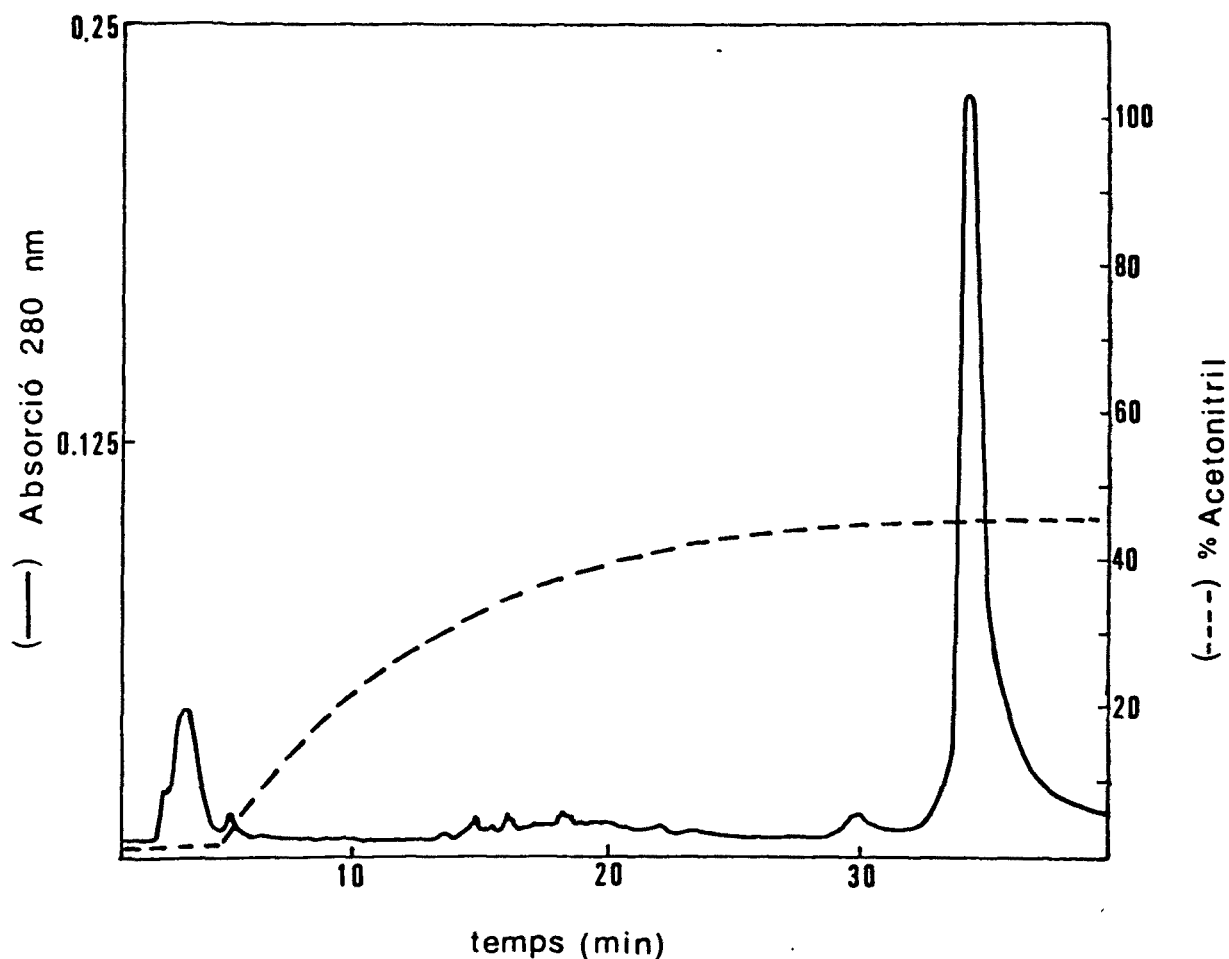


Figura 41.- Cromatografia líquida d'alta pressió per a l'obtenció de sarr. En aquest experiment es van digerir 2 mg. de PCPR-II dissolta en tampó NaH_2PO_4 20 mM, Zn^{2+} 10^{-6} M (pH 5.8), amb 50 $\mu\text{gr.}$ de tripsina. El digerit es va aplicar directament a la columna (C4-Ultrapore-Beckman) equilibrada amb 0.1% TFA (pH 2.5). La proteïnes es van eluir amb un gradient d'acetonitril.

Tal com es pot observar, el temps que es triga a obtenir el segment d'activació és de 35 min. després d'haver injectat el digerit triptic de PCPA-II. Aquest termini tan curt de temps permet de fer múltiples injeccions al llarg d'una jornada de treball i, malgrat que en cada una d'elles només es poden introduir com a màxim 2 mg. de proteïna total a la columna de la mida de l'emprada (0.45x7cm.), es pot obtenir al final del dia uns 6 mg. de saA. Aquesta quantitat és molt notable sobretot si es compara amb les altres tècniques emprades, sigui l'obtenció típica o bé les descrites en aquest apartat. Fent servir la cromatografia de bescanvi iònic o bé l'electroforesi preparativa calen 5 dies de treball per arribar a obtenir una quantitat de segment similar.

Malgrat els avantatges clars de la cromatografia líquida d'alta pressió en l'obtenció del segment, es va presentar un inconvenient greu. La introducció d'una proteïna en una columna de fase reversa, sigui pel caràcter de la pròpia columna, altament hidrofòbic, sigui per la presència de dissolvents orgànics en el gradient o pel baix pH en el qual es treballa (pH 2.5), pot provocar en la mateixa un canvi conformacional irreversible. En el nostre cas aquest fet es veu agreujat pel caràcter altament hidrofòbic del saA que genera una interacció molt forta amb la columna. Així, el saA obtingut per aquest mètode presenta una solubilitat més baixa que l'obtingut pels altres mètodes descrits. Aquesta manca de solubilitat és atribuïble a una no renaturalització total del segment un cop eluït de la columna, eliminat el dissolvent orgànic i ajustat el pH entre 8 i 9, condicions en les quals se sap que aquest segment presenta la màxima solubilitat. Fins que no es millori el procediment per desagregar o renaturalitzar el saA, l'ús d'aquesta tècnica preparativa per HPLC queda limitat, sobretot si per estudis posteriors cal treballar a

concentracions de saA elevades o bé quan cal treballar amb tècniques que requereixen una conformació nativa de la proteïna com són moltes de les emprades en aquesta Tesi.

De tot l'expressat es pot deduir que, si bé les tècniques descrites presenten avantatges, cal tenir molt compte en el seu ús segons el tipus de treball que es vulgui portar a terme posteriorment amb el saA. Al llarg de tot el treball presentat aquí es va fer servir saA obtingut pel mètode tradicional o per alguna tècnica descrita en aquest apartat segons el tipus d'experiment a realitzar.

RB.2.- Millores aconseguides en el procés de fraccionament de les diferents formes del saA aïllat de la PCPA-II.

Quan ha calgut treballar amb un saA d'una sola banda, natiu i d'alta solubilitat, i cap de les tècniques descrites a l'anterior apartat era adequada per a obtenir-lo es va intentar d'aconseguir un fraccionament de les diferents formes presentades pel saA en una preparació heterogènia.

Aquesta separació es va aconseguir de forma parcial mitjançant una cromatografia en DEAE-Sepharose a pH 9.0 (veure M1.1.3). En la fig. 42 es mostra el cromatograma obtingut d'una columna d'aquest tipus en la qual s'introduí una barreja de les formes A, B, C, D i E del segment d'activació (veure Fig 17). Mitjançant aquest tipus de cromatografia s'aconseguí de separar les bandes A i B de les C, D i E, és a dir, les de pes molecular aparent més gran de les de pes molecular aparent més baix (segons indica l'electroforesi de la figura 17)

No es pot descartar que les diferents bandes observades en cada un dels dos pics cromatogràfics corresponguin a formes conformacionals diferents d'una mateixa molècula de segment d'activació, i que per això no es puguin separar per cromatografia. A més en l'electroforesi d'urea SDS (mètode de Hashimoto i col., apartat M2.2) apareixen molt properes (veure Fig 17). En el cas de l'atre tipus d'electroforesi (mètode de Creighton, apartat M2.3) feta servir per analitzar el segment d'activació, la presència d'urea en el medi, sobretot a la concentració emprada (7M), pot jugar un paper important en l'estructura d'aquest segment generant multiplicitat de conformacions, ja que com hem vist en l'apartat RA.1 el punt mig de la seva desnaturalització per urea es troba a 6.5M urea.

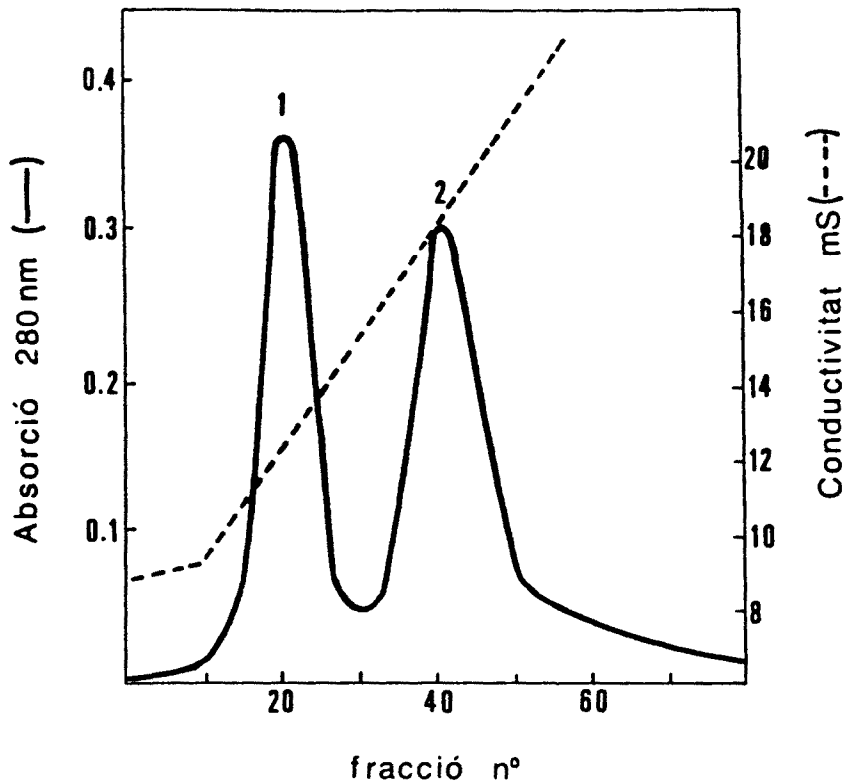


Figura 42.- Cromatografia en DEAE-Sepharose (pH 9.0) per a la separació de les diferents formes del saR. El pic (1) conté les formes corresponents a les bandes electroforètiques C, D i E mentre que el pic (2) conté les bandes A i B.

Cal tenir en compte que si bé aquesta cromatografia permet de disminuir la multiplicitat generada en l'obtenció del saA, també provoca una pèrdua d'aquest ja que el rendiment del procés és del 50%. Aquesta pèrdua de segment en la purificació, unida al baix rendiment presentat pel propi procés d'obtenció fa que sigui molt costosa la preparació d'un segment homogeni.

Es important indicar que en la preparació prèvia de saA heterogeni per cromatografia en DEAE-Sepharose en urea 7M d'un digerit triptic de PCPA-II (veure apartat M1.1.2), no sempre s'obté un conjunt de formes A,B,C,D i E, sinó que d'una preparació a una altra hem observat la formació preferent d'una o altra forma (sobretot A, B o D). A més, si el pic cromatogràfic de saA obtingut es col·lecta en dues o tres fraccions consecutives, es pot aconseguir una preparació de saA molt enriquida en una de les fraccions, que de vegades ha resultat, fins i tot, homogènia. Això ha simplificat moltes vegades el fraccionament final del saA per cromatografia en DEAE-Sepharose a pH 9.0.

RB.3.- Estudi dels canvis conformacionals que poden presentar les diferents formes moleculars del saA.

Donades les dificultats per obtenir saA homogeni mitjançant tècniques realment preparatives i no agressives, en un moment de la Tesi es va plantejar la conveniència d'analitzar les diferències estructurals entre les formes A,B,C,D i E d'ell, a fi de conèixer si en alguns estudis era correcte d'emprar barreges d'elles. Cabia la possibilitat que aquestes formes correspongessin a subpoblacions conformacionals diferents o bé presentessin diferències seqüencials.

A partir del mètode tradicional de cromatografia en DEAE-Sepharosa/urea 7M, o dels mètodes alternatius descrits en els apartats RB.1 i RB.2 es van obtenir preparacions de totes les formes esmentades de saA, les quals van ésser analitzades. Les formes A,B,C,D i E van ésser analitzades mitjançant anàlisi d'aminoàcids i seqüenciació N-terminal segons el mètode d'Edman automàtic (Vendrell J., resultats no publicats), mentre que les més abundants, la B i la D, van ésser també analitzades per RMN de protó a 500 MHz.

Sorprenentment l'anàlisi d'aminoàcids i la degradació automàtica d'Edman no van indicar diferències apreciables en la composició total i N-terminal, respectivament, de les diferents formes.

En tots els casos es va trobar la seqüència Lys-Glu-Asp en l'extrem N-terminal dels diferents saA la qual cosa indica que totes les formes tenen l'esmentat extrem intacte. Cap la possibilitat que els diferents segments es diferenciïn en la regió C-terminal, però aquesta anàlisi era difícil, i no es va fer. En aquest sentit es va plantejar la hipòtesi que les diferents formes de saA fossin provocades per l'acció de la tripsina o carboxipeptidasa, o per acció combinada d'ambdues proteases,

sobre l'extrem C-terminal del saA. Cal recordar que la CPA és capaç de trencar el residu C-terminal del seu inhibidor extret de patates (10,76) malgrat que és un residu de Gly molt poc favorable per a l'acció de la proteasa. En aquest contexte per al saA es proposa que la forma A conté del residu 1 al 96 (és a dir conté dos aas. de la regió CPA), la B (majoritària) conté del residu 1 al 94, i la resta provenen d'aquesta per escapçament del seu C-terminal.

Es important de ressaltar que estudis d'electroforesi bidimensional en gradient d'urea (Vendrell J., Vilanova M., resultats preliminars) indiquen que totes les formes esmentades de saA presenten una transició eletroforètica similar i sigmoïdal. D'aquests resultats es dedueix que totes presenten una conformació plegada i probablement molt semblant.

Com ja s'ha esmentat abans, les formes B i D (les més abundants) van ésser també analitzades per RMN de protó (500 MHz), seguint el protocol descrit a l'apartat M4.3.2. Els espectres de RMN d'aquestes formes de saA es comparen en la Figura 43 amb l'espectre d'una barreja d'elles que conté les formes A, B i D a fi d'observar possibles diferències conformacionals. Es pot observar que els de les formes B i D pures són molt similars entre si i amb el de la fracció no purificada. Observant la regió aromàtica a baix camp es pot veure en tots els casos la mateixa distribució de ressonàncies.

Els desplaçaments químics dels protons C2 de les tres histidines i els dels protons C 3,5 i C 2,6 de la tirosina es mantenen invariables en tots tres espectres. Tal vegada l'única diferència possible entre ells es troba en la regió aromàtica de residus no titrables (Phe i Trp).

Per altra banda, observant la regió de camps alts, en tots els espectres de la Figura 43, apareixen no menys de 7 ressonàncies de metil desplaçades per corrents d'anell. El desplaçament químic d'aquestes ressonàncies és exactament el mateix en totes les formes analitzades. Tota aquesta sèrie d'observacions indiquen el manteniment de l'estructura bàsica del saA sigui quina sigui la seva composició de formes.

Si suposem que l'activació triptica de la PCPA dóna lloc a diferents saA per un trencament múltiple en la regió d'activació, heterogeneïtat que podria ésser augmentada per l'acció posterior de la CPA, es pot concloure a partir d'aquests resultats que malgrat que les diferents formes poden presentar diferent seqüència C-terminal, aquestes diferències no són suficients per provocar un canvi conformacional visible per ressonància magnètica nuclear.

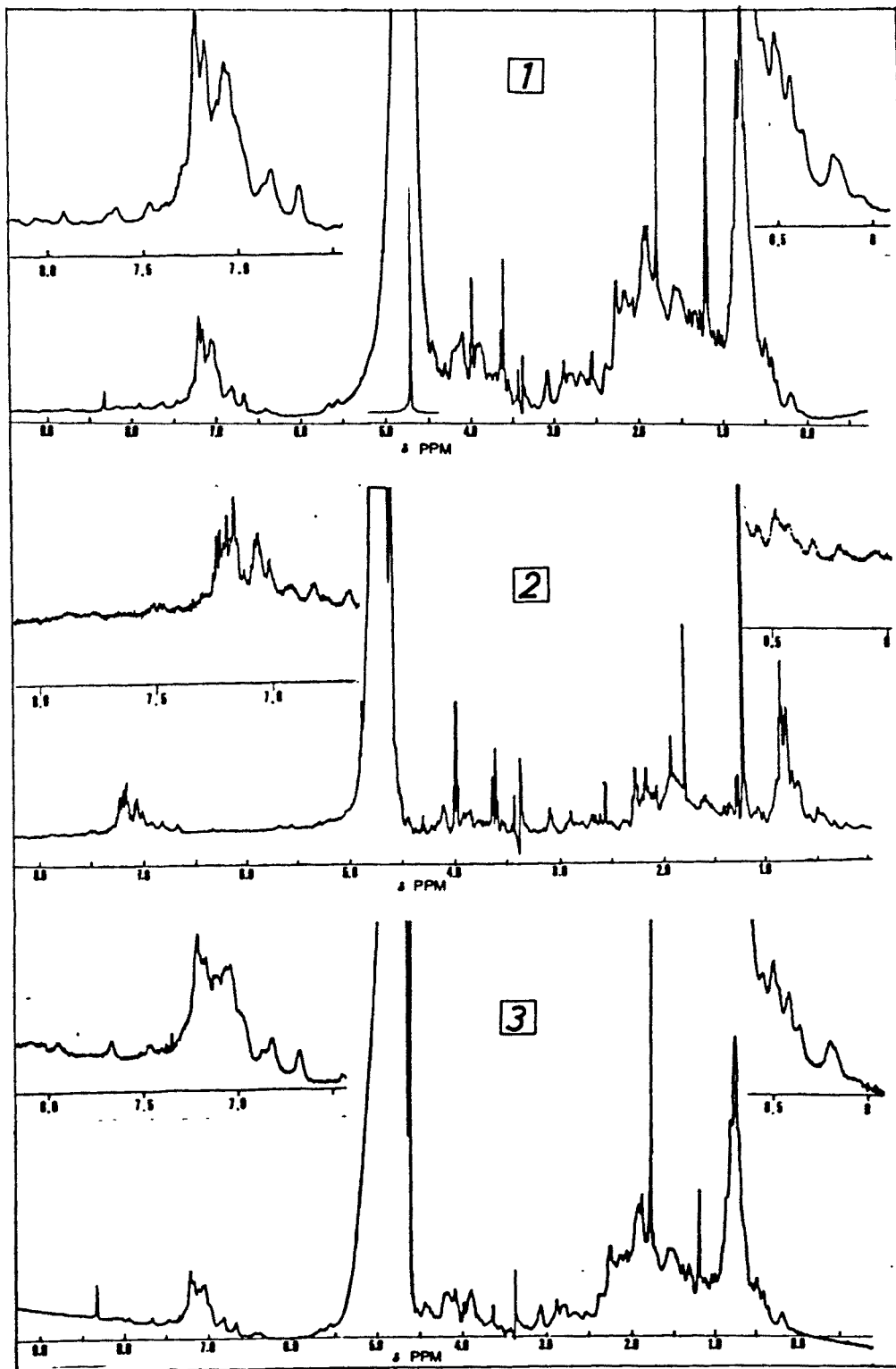


Figura 43.- Comparació dels espectres de RMN de protó a 500 MHz de les diferents formes del safl. (1) Forma B (2) Forma D (3) Barreja de formes A, B i D. Mostres dissoltes en $^2\text{H}_2\text{O}$ a pH 6.5 i 25°C . A cada espectre es presenten ampliaades les regions de camps alt i baix.

RB.4.- Titració de la tirosina del saA mitjançant espectroscòpia de diferència i de quarta derivada a l'UV.

Tal com s'especifica en l'apartat M4.2.1 es va seguir la titració alcalina de l'única tirosina del saA mitjançant espectroscòpia de diferència a l'ultraviolat. A la fig. 53.a es mostra la corba sigmoïdal que s'obtingué en representar la banda espectral que apareix a 295 nm, atribuïble a l'aparició de tirosinat, al llarg de la titració. A partir d'aquesta corba es va deduir un valor de pK_a de 11.8 per a la tirosina del saA. Aquest valor de pK_a tan alt indica que la tirosina es troba interioritzada o bé que està formant un pont d'hidrogen amb algun altre residu de la proteïna.

A la vegada aquesta titració alcalina es va seguir per espectroscòpia de quarta derivada. En la Fig. 45 es mostra l'espectre d'absorció del segment d'activació i el de quarta derivada indicant-se els paràmetres que es van seguir al llarg de la titració. Fent servir la informació obtinguda per Padrós i col. (143) sobre el compost model AcTyrOEt/AcTrpA a relació molar de 4/1, respectivament, tal com s'explica en l'apartat M4.2, aplicada al nostre cas, es pot arribar a les següents conclusions. La posició de λ_1 a 292 nm o a longituds d'ona superiors és característica del triptòfan amb poca influència de la tirosina. Com es pot observar en la Fig. 44.b, λ_1 es manté al llarg de tota la titració a longituds d'ona superiors a 292 nm. la qual cosa indica que els triptòfans de la proteïna es troben en tot moment en un entorn hidrofòbic.

La posició de λ_2 és característica de la tirosina la qual no varia (Fig 44.c) al llarg del pH. Això indica que la tirosina no sofreix canvis en el seu entorn al llarg de la titració.

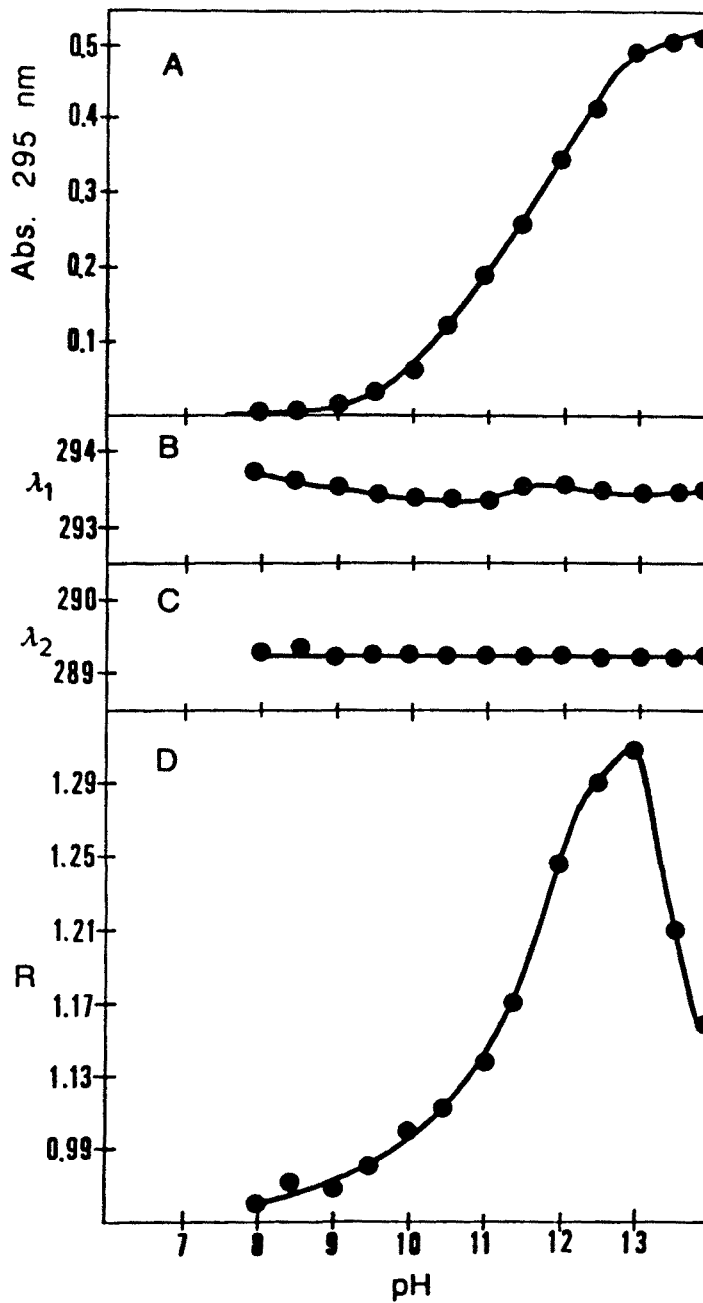


Figura 44.- Titració alcalina en l'UV del safl aïllat. Representació en funció del pH dels: (A) valors d'absorbància a 295 nm. obtinguts dels espectres de diferència. (B) valors de λ_1 obtinguts dels espectres de quarta derivada. (C) valors de λ_2 obtinguts dels espectres de quarta derivada. (D) valors del paràmetre R calculat a partir dels espectres de quarta derivada.

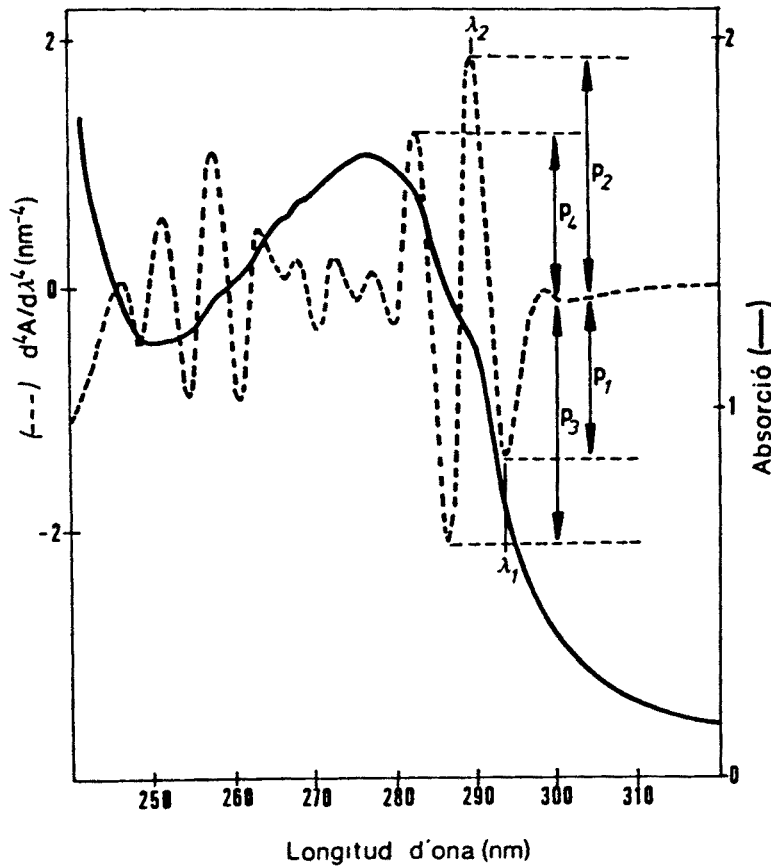


Figura 45.- Espectres d'absorció i de quarta derivada del saR. El paràmetre R correspon al quocient $(p_1 + p_2)/(p_3 + p_4)$.

Per últim, en representar el valor de R (Fig44.d) s'observa que aquest augmenta des de pH 8.0 fins a pH 13 indicant una desaparició de tirosina cap a tirosinat i servint, per tant, com a mesura per a deduir un valor de pK_a d'aquest residu. El pK_a trobat és de 11.8 idèntic al trobat en representar el pic a 295 nm de l'espectre de diferència. A partir de pH 13 els valors de R baixen fins a estabilitzar-se en un valor que pot correspondre a l'efecte espectral provinent només del triptòfan ja que en aquest pH la tirosina es troba tota en forma de tirosinat i per tant no contribueix a la variació dels pics de l'espectre de quarta derivada.

RB.5.- Estudis de ressonància magnètica nuclear del saA aïllat.

Quan es va enregistrar l'espectre de RMN de protó a pH intermedi del saA, seguint les condicions descrites en l'apartat M4.3 es van observar tota una sèrie de característiques que confirmen el fet que es tracta d'una proteïna de tipus globular tal com s'havia descrit en treballs previs portats a terme en el nostre laboratori (105). Algunes d'aquestes característiques són les que a continuació es descriuen i que es poden observar en la figura 46 on es mostra l'espectre de RMN del segment d'activació a pH 6.5.

Fixant-nos en les zones de l'espectre de més facil estudi que són les corresponents als residus aromàtics que apareixen a camps baixos i les ressonàncies dels grups metil desplaçades per corrents d'anell que apareixen a camps alts (entre 0 i 1 ppm) es veu clarament que aquesta proteïna es troba estructurada. En base a la seva posició espectral, agudeses, desplaçaments amb el pH, deuteració, iodació i altres consideracions, es va fer una preassignació de ressonàncies per a la Tyr i les tres His (I, II i III) del saA, particularment per les ressonàncies corresponents als protons C2 d'histidines que creiem es troben en la regió de 7.5-8.5 ppm (Fig 46). És també important indicar que anomenem amb IV una ressonància apartada de les altres tres que per la seva posició espectral i propietats podria correspondre a un altre protó C2 de His. Ja que en la seqüència de saA només es troben 3 His cal pensar que aquesta ressonància correspon a un protó C4 d'una de les tres His (desplaçat de la seva posició normal) o bé que prové d'algun altre residu aromàtic (Phe, Trp, p.e.) o bé que la seqüència del saA de la PCPA de porc conté una His més de les determinades.

Les ressonàncies dels protons C2 de les tres histidines del segment d'activació apareixen clarament diferenciades, presentant cada una d'elles un desplaçament químic determinat. A pH 6.5 la histidina que anomenem I en la Fig. 46 presenta un δ de 8.14 ppm., la que anomenem II un δ de 8.04 ppm. i la que anomenem III un δ de 7.96 ppm. Es requereixen però més experiments per assignar específicament aquestes ressonàncies que anomenem I, II i III, a residus concrets de la seqüència. Per altra banda, les ressonàncies dels protons C 3,5 i C 2,6 de l'única tirosina del segment d'activació apareixen a 6.8 ppm. i 6.94 ppm., respectivament. Aquests valors de desplaçament químic són diferents dels que presentarien els protons d'histidines i tirosines que es trobessin en una proteïna en cabdell estadístic (148,179). Per últim, també cal fixar-se en la zona de 5.0 a 6.7 ppm. de l'espectre on apareixen una sèrie de ressonàncies que es podrien assignar a protons de carbonis α . Aquestes ressonàncies podrien estar allunyades de la seva posició habitual (4.5-5.0 ppm) per efectes de corrents d'anell.

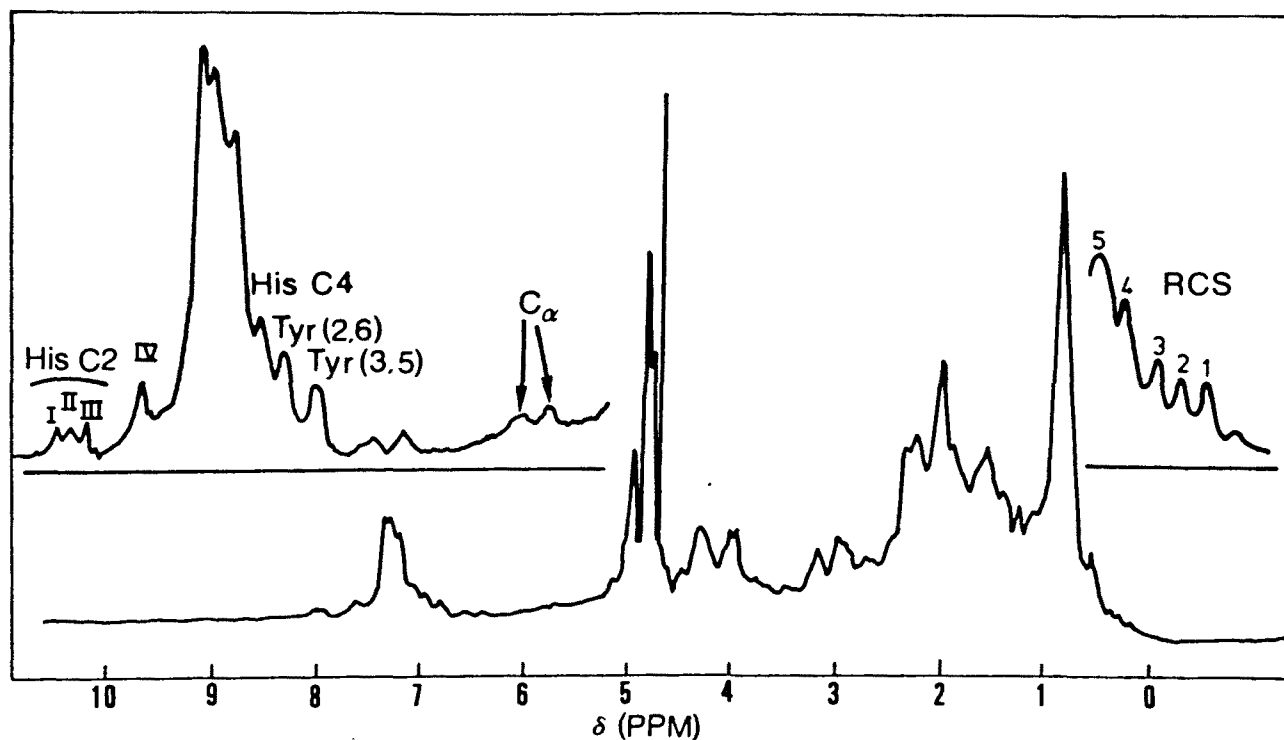


Figura 46.- Espectre de ressonància magnètica nuclear de ^1H a 270 MHz del saR, en $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 6.5, 25°C i a 5 mg/ml. Es mostren les zones de camps alt i baix ampliaades i s'indica una possible assignació de ressonàncies. RCS = ressonàncies desplaçades per corrents d'anell.

RB.5.1.- Efecte de força iònica i del pH.

La conformació globular del segment d'activació sembla que es manté des de pH 5.7 a pH 13.0, almenys des del punt de vista de l'estudi efectuat per RMN, ja que totes les característiques de globularitat esmentades en l'anterior apartat es van mantenir en aquest marge de pH. Entre pH 3.0 i 5.7 aquest estudi no es va poder portar a terme a causa de l'agregació macroscòpica de la proteïna probablement provocada per la seva neutralització isoelectrica. Per sota de pH 3.5 el segment d'activació va presentar una solubilitat intermèdia però en aquestes condicions havia perdut una part important de la seva estructura, fet evidenciat pel desplaçament de les ressonàncies abans esmentades cap a posicions de cabdell estadístic. L'estructura és perfectament recuperable augmentant el pH fins a la neutralitat o a pH bàsic.

A qualsevol dels pHs estudiats, un augment en la concentració de sal del medi, des de 20 mM fins a 1 M NaCl, no va contribuir a l'estructuració del segment. Es més, l'addició de sal a concentració superior a 0.1M va provocar una certa agregació d'aquest sobretot quan el pH era proper al punt isoelectric, eixamplant aquesta regió de precipitació. Aquest fenomen pot ésser causat per l'elevat contingut en residus acídics i apolars del saA (\approx 50%) (18), i al fet que es pot trobar un percentatge elevat dels últims en la superfície de la proteïna a fi d'interaccionar amb la CPA. A pH intermedi el gran nombre d'interaccions apolars internes pot ésser suficient per a mantenir la proteïna perfectament estructurada en absència de sal. Ara bé, quan el pH baixa o augmenta la força iònica es perd la càrrega dels nombrosos residus acídics la qual cosa pot alterar la distribució de càrrega en la superfície, desplegant el segment d'activació i promovent la seva agregació.

RB.5.2.- Titració d'histidines.

Els canvis en el pH provoquen canvis en les ressonàncies de residus específics tals com His i Tyr. Així, les ressonàncies dels protons C2 de les tres His del segment d'activació presenten un desplaçament químic depenent del pH, el seguiment del qual va permetre el càlcul del seu pK_a .

Les corbes de titració de saA (Fig 47) no es van poder seguir experimentalment per sota de pH 5.7 a causa de la ja esmentada manca de solubilitat d'aquesta proteïna. A part, cal tenir en compte que per sota de pH 4.0 el segment es troba desestructurat fent-se les tres ressonàncies en un sol pic. Malgrat aquesta manca d'informació en la regió de pHs baixos, les corbes experimentals es van analitzar mitjançant un tractament matemàtic de regressió no lineal i es van trobar els següents valors de pK_a : 6.49, 6.43 i 6.40 per a les His I, II i III (Fig 47), respectivament. Per altra part, l'aplicació dels mateixos mètodes d'anàlisi a la ressonància problemàtica que anomenem IV i a la del protó C4 d'una possible Histidina que apareix al voltant de 7 ppm (Fig 46) dona pK_a s de 6.5 i 6.58, respectivament. La proximitat entre els valors de pK_a de tots els protons C2 de les 3 histidines estudiades fa difícil de poder aparellar aquest valor trobat per al protó C4 amb algun d'ells. Cal per això, emprar mètodes de pertorbació com el NOE.

La similitud entre els valors de pK_a de les diferents histidines i la seva proximitat al valor presentat per histidines de proteïnes en cabdell estadístic, pK_a 6.5, suggereix que aquests residus en el saA es troben en embolcalls similars, probablement en la superfície de la proteïna.

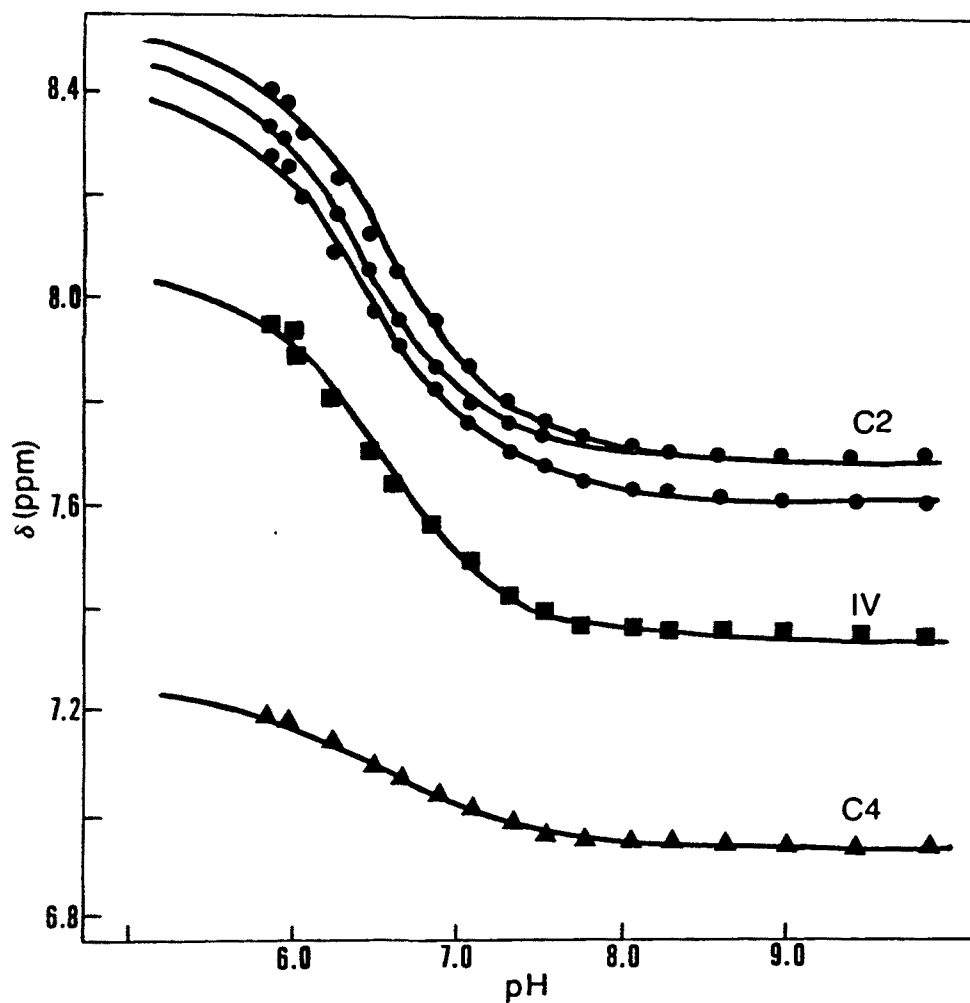


Figura 47.- Corbes de titració al llarg del pH de les resonàncies dels probables protons C2 i C4 de les histidines dels saA, així com de la resonància anomenada IV. El pH es va variar per addició de KOH deuterat i no s'ha corregit per la presència de D_2O ni per efecte salí.

RB.5.3.- Titració de la tirosina.

De la mateixa manera que es va seguir la variació dels desplaçaments químics de les ressonàncies dels protons de les histidines del saA segons el pH del medi, també es va poder seguir les dels protons C3,5 i C2,6 de la tirosina. En la Fig. 48 es mostren les corbes sigmoïdals presentades per aquests protons de les quals se'n pot deduir mitjançant un tractament matemàtic anàleg al de l'apartat anterior un valor de pK_a molt alt, superior a 11.8, el qual està d'acord amb el trobat per espectroscòpia de diferència a l'ultraviolat i per espectroscòpia de quarta derivada (apartat RB.4). Aquest valor tant alt de pK_a corrobora la hipòtesi que el residu de tirosina es troba interioritzat o bé que forma un pont d'hidrogen amb algun altre residu.

El desplaçament cap a camps més alts sofert per les ressonàncies de la tirosina després de la seva titració va permetre d'observar l'existència de ressonàncies amples amagades sota el pic dels protons C3,5 i C2,6 a pH intermedi. Aquestes ressonàncies encara no s'han assignat però es creu que podrien pertànyer a protons de Phe i Trp o fins i tot a protons de carbonis α molt desplaçats.

RB.5.4.- Titració de RCS.

En efectuar la titració del saA s'observaren també canvis en la part de camps alts de l'espectre de RMN. Així, les esmentades ressonàncies de metil desplaçades per corrents d'anell que apareixen en la zona de 0 a 0.6 ppm van presentar un desplaçament químic dependent del pH tal com es mostra en la fig 49.

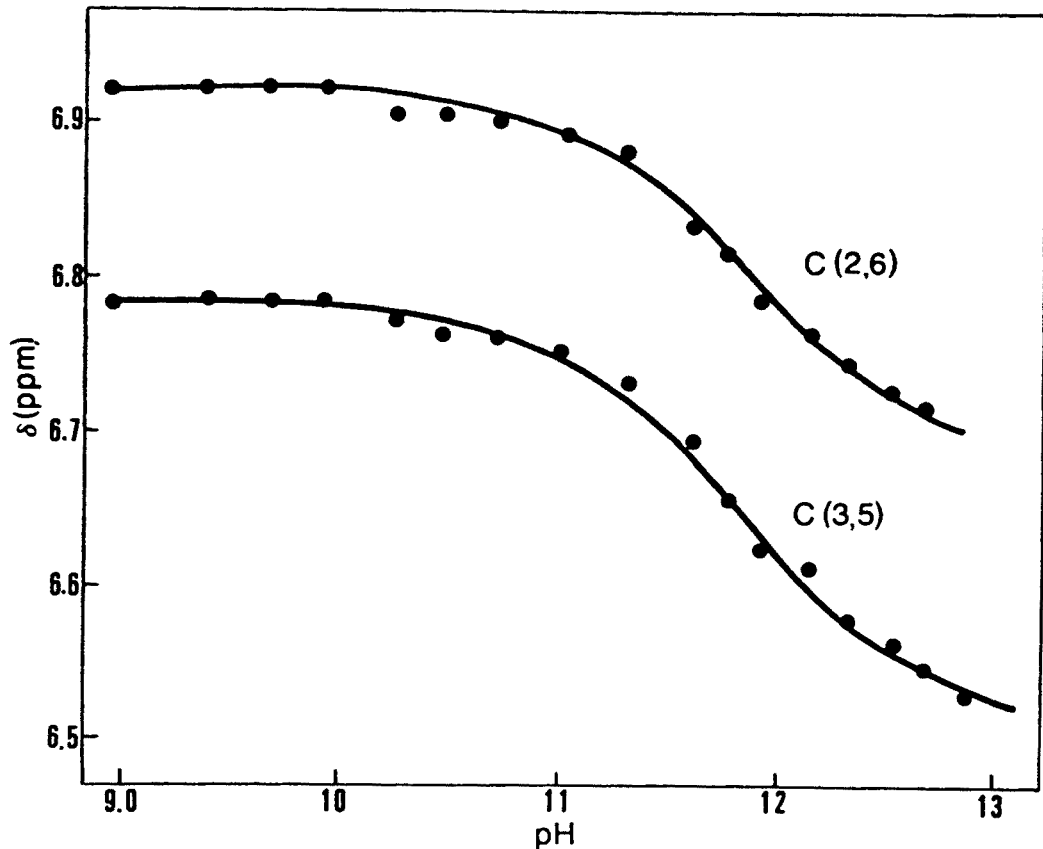


Figura 48.- Corbes de titració al llarg del pH de les resonàncies dels protons C (3,5) i C (2,6) de l'única tirosina del saR. Mateixes condicions experimentals que en la figura anterior.

Algunes d'aquestes resonàncies, concretament les assignades als RCS 1, 3 i 4 de la Fig. 46, van presentar una titració la representació de la qual dóna una doble sigmoïdal. Cada una de les sigmoïdes es troba relacionada amb algun residu de His o Tyr. Aquest comportament suggereix veïnatges d'aquests residus a certs residus apolars i l'existència de relacions espacials complicades pels metils responsables dels RCS 1,3 i 4.

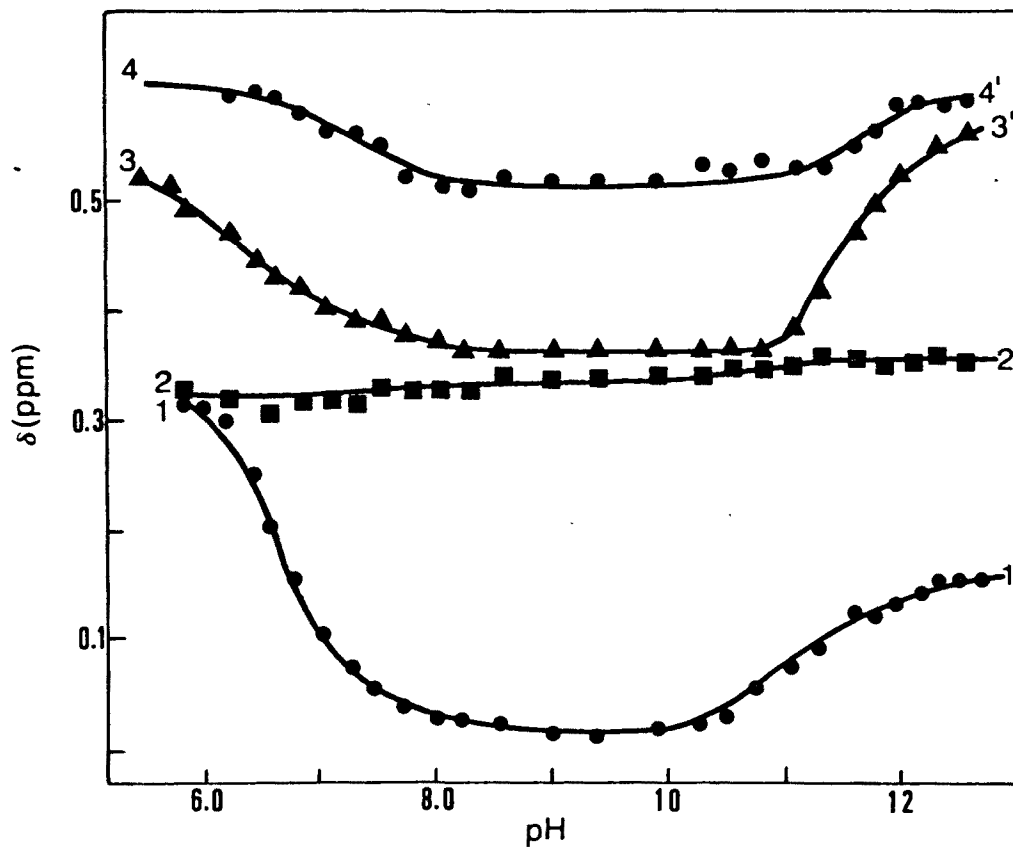


Figura 49.- Corbes de titració al llarg del pH de les ressonàncies dels protons dels grups metil desplaçades per corrents d'anell. Mateixes condicions experimentals que en la figura 47 anterior.

Quan es van calcular els valors de pK_a mitjançant l'anàlisi de regressió no lineal per a les transicions que presenten aquestes ressonàncies a pH baix, es van trobar per totes elles valors propers a 6.5, similars als valors presentats per les ressonàncies de les histidines. Aquesta proximitat en els valors de pK_a d'unes i altres ressonàncies dificulta el seu possible aparellament. Cal dur a terme altres estudis de perturbació per resoldre aquest problema.

RB.5.5.- Bescanvi de protons -NH.

L'anàlisi de l'espectre de RMN del saA a intervals curts després de la seva dissolució en 2H_2O a pH 6.5 i 25°C va indicar la desaparició gradual d'alguna de les ressonàncies a camps baixos probablement atribuïbles a protons NH d'His, Trp o de l'esquelet polipeptídic. En la Fig. 50 es mostra la zona aromàtica a camps baixos de l'espectre de RMN del segment d'activació enregistrat a diferents temps després de la seva dissolució en 2H_2O . Es pot estimar al voltant de 15-20 protons NH de bescanvi lent dels quals 5 són molt resistents al bescanvi per deuteri. Aquest nombre de bescanviabls lents és molt petit si es té en compte que el saA conté no menys de 50 a 60 NH de la cadena polipeptídica de possible bescanvi lent ja que formen part d'hèlix- α (105), conformació que dificulta el bescanvi tal com s'ha observat en altres proteïnes globulars (180). Aquest fet suggereix que el saA presenta una estructura plegada amb un grau de mobilitat conformacional elevat. Aquesta propietat també pot trobar-se en altres proteïnes que manquen de ponts disulfur o en tenen pocs, tals com les histones (181) i el plasminògen (182).

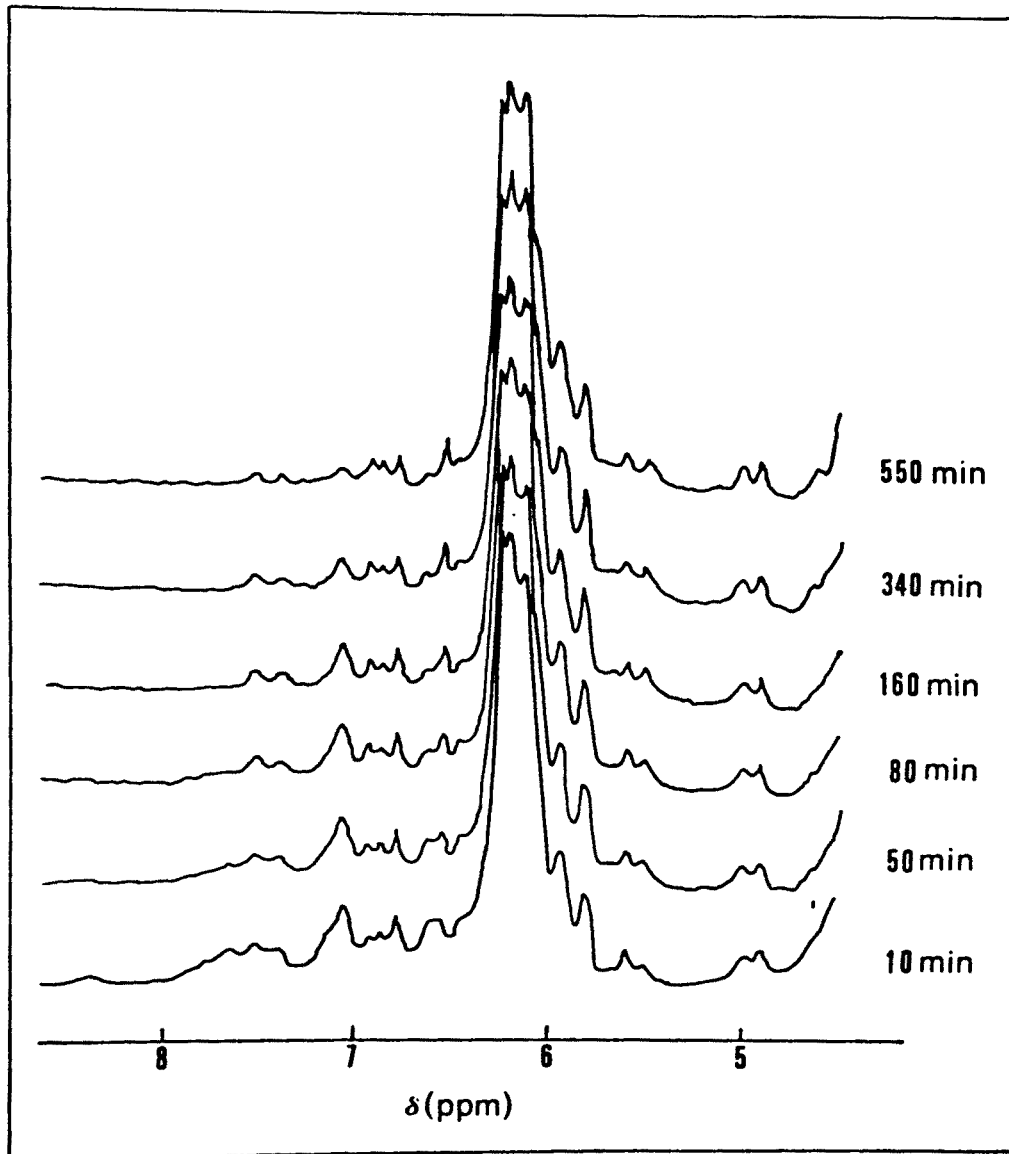


Figura 50.- Cinètica de bescanvi de protons -NH del safl. La proteïna es va dissoldre en $^2\text{H}_2\text{O}$ (pH 6.7) i s'enregistraren els espectres de RMN en els temps indicats en la figura. L'experiment va ésser realitzat a 25°C.

Cal recordar en aquest punt la hipòtesi de la mobilitat conformacional del segment d'activació ja proposada en els resultats dels apartats RA.2, 3, 4 i 5 d'aquesta Tesi, encara que aquests resultats fan referència al segment d'activació unit al proenzim. Quan aquest segment s'allibera de la PCPA, és possible que canviï la seva estructura, tal com ho evidencien els resultats de calorimetria presentats en l'apartat RA.7, però mantenint aquest grau de mobilitat elevada responsable de l'elevat bescanvi de -NH descrit.

També es va observar que la velocitat de bescanvi de -NH del saA es manté quan la concentració de sal del medi augmenta des de 0 fins a 1 M NaCl, a pH 6.5 i 25°C. Aquest fet indica que la força iònica del medi no afecta la conformació del segment d'activació. Aquest comportament és, en certa manera, contrari al descrit per altres proteïnes altament carregades de mida similar i sense ponts disulfur (183,184).

Aquest resultat podria confirmar el canvi de conformació proposat pel saA quan s'allibera de la PCPA en cas que es demostrï que la variació en les propietats de la PCPA en augmentar la força iònica del medi és exclusivament deguda al seu segment d'activació i no al complex saA/CPA.

RB.5.6.- Deuteració d'histidines.

El bescanvi isotòpic d'hidrogen per deuteri en els protons C2 dels tres residus d'histidina del saA va presentar una cinètica fortament depenent de la temperatura i del pH tal com es mostra en la Fig 51. L'observació de les corresponents ressonàncies en l'espectre de RMN va indicar que a 25°C i pH 8.5 la deuteració progressa molt lentament i a una velocitat notablement inferior pel residu d'histidina I (vida mitja més

gran de 10 dies) respecte als d'Histidina II i III.

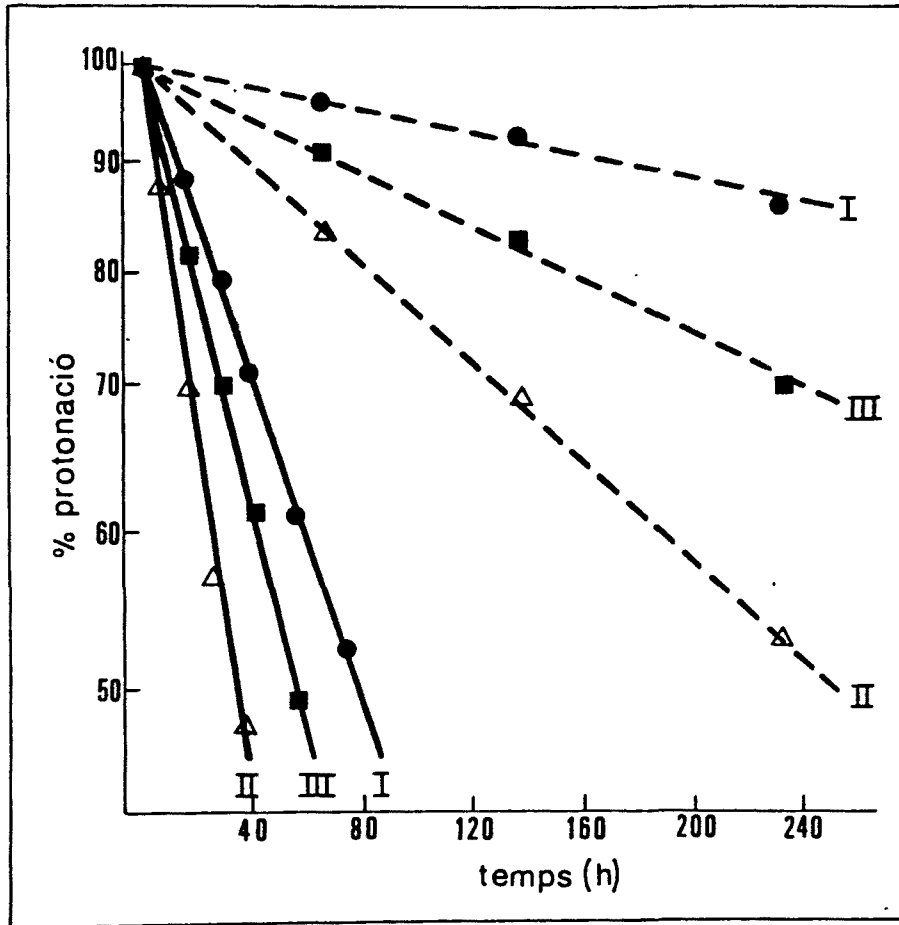


Figura 51.- Bescanvi per deuteri dels protons C2 dels residus histidina del safl. Proteïna a 5 mg./ml. en tampó fosfat sòdic (pH 8.5) i a 25 °C (----), o a pH 6.5 i 40°C (—). S'ha representat de forma semilogarítmica la variació de l'àrea de cada resonància enfront del temps. (●) Histidina I, (Δ) Histidina II, (■) Histidina III.

Quan la temperatura s'incrementà fins a 50°C i el pH s'ajustà a 7.3, la deuteració va tenir lloc tan ràpidament que s'observà una desaparició completa de les ressonàncies dels protons C2 de les histidines en menys de 30 min. Es pot obtenir un comportament intermedi si el pH s'ajusta a 6.5 i la temperatura es manté a 40°C. En aquestes condicions es va observar una velocitat de deuteració diferent per als protons C2 de les 3 histidines, amb una vida mitja de 35, 57 i 78 hores per His II, His III i His I, respectivament, tal com es pot deduir de la Fig. 51.

Es ben conegut que la deuteració dels residus d'histidina és dependent del pH, i és afavorida a pHs elevats (185). Els resultats obtinguts en aquest cas semblen indicar que les histidines del saA són molt més sensibles a l'increment de temperatura que a canvis de pH del medi dins del marge estudiat. Això pot ésser degut a l'esmentat caracter flexible atribuït al saA. Per altre banda, la baixa velocitat de bescanvi isotòpic indica una possible localització interior d'aquests residus d'histidina. No obstant, això es contradiu amb els seus pK_a , els quals tal com ja s'ha explicat en l'apartat RB.5.2 semblen indicar que es tracta d'histidines en posicions superficials de la molècula.

RB.5.7.- Desnaturalització per urea.

Quan al saA a pH 6.5 se li va afegir urea a concentracions compreses entre 0.25 i 2 M, s'observaren una sèrie de canvis en l'espectre de RMN. Concretament, les ressonàncies dels protons C2 de les His, la ressonància IV i el RCS-1 van sofrir canvis apreciables en les seves posicions espectrals tal com s'indica en la Figura 52. No obstant, per a obtenir canvis grans en les posicions espectrals i en l'àrea d'aquestes ressonàncies així com en la resta de l'espectre, va caldre augmentar la concentració d'urea fins a 4-8 M. A 8 M urea desapareixeren la majoria de les ressonàncies de RCS, aixó és una clara indicació del desplegament del segment d'activació. A pH 7.5 van caldre concentracions d'urea més grans per promoure unes pertorbacions espectrals similars tal com s'observa en la Fig 53. Es interessant de notar el gran eixamplament sofert per les ressonàncies dels protons C2 de les His a 4 M urea així com el continu desplaçament de la ressonància del RCS-1 a camps més baixos a concentracions d'urea entre 0 i 4M i a pH 6.5.

En vista dels canvis espectrals observats cal preguntar-se quines poden ésser-ne les causes al llarg del procés de desnaturalització. En aquest punt és convenient recordar els resultats obtinguts en l'estudi del procés de desnaturalització del saA per urea, seguit per electroforesi en gradient d'aquest agent desnaturalitzant (apartat RA.1). Aquests resultats indicaven que el procés té lloc en un únic pas, de l'estat natiu al desnaturalitzat, de forma ràpida. Si tenim present aquest fet, podem eliminar la possibilitat que les diferències espectrals observades siguin degudes a l'existència de la proteïna en diferents estats de desplegament, explicació proposada per determinats autors en altres proteïnes (181,184).

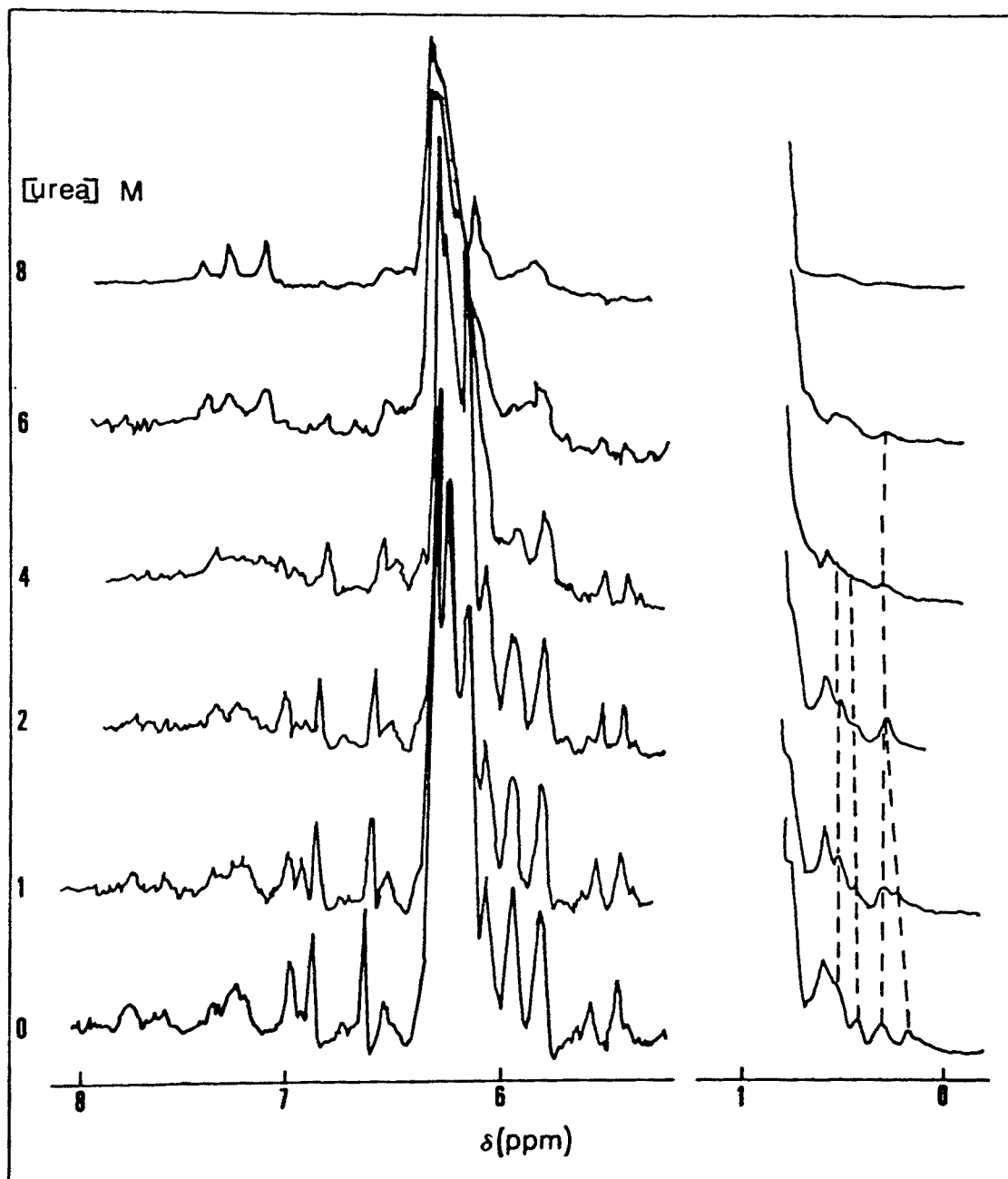


Figura 52.- Efecte de l'addició d'urea sobre l'espectre de RMN del saH a pH 6.5 i 25°C. En la figura es mostren les zones de camp baix corresponents a les ressonàncies dels residus aromàtics i de camp alt corresponents als RCS.

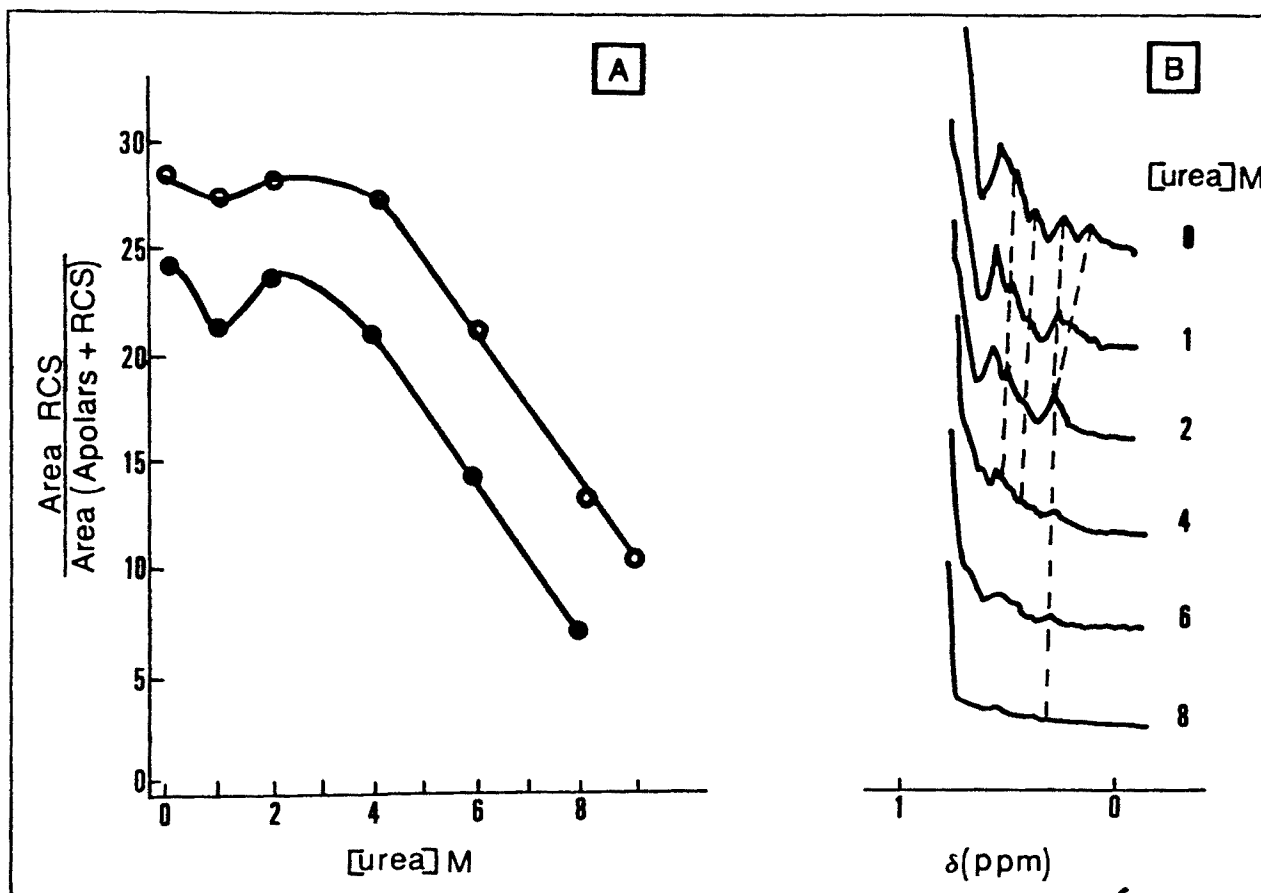


Figura 53.- Efectes de la desnaturalització per urea sobre l'espectre de RMN del saR. (A) Representació del percentatge de l'àrea de RCS respecte a l'àrea de totes les resonàncies apolars enfront de la concentració d'urea a pH 6.5 (●) i pH 7.5 (○). (B) Canvis en la posició espectral i en l'àrea de les resonàncies dels RCS en augmentar la concentració d'urea a pH 6.5.

A la vegada, es fa difícil pensar en un desplegament de la proteïna per regions ja que els experiments de calorimetria (apartat 10) ens indiquen que aquest segment presenta un únic domini estructural.

No obstant, hi ha referències bibliogràfiques (181) d'estudis de desnaturalització tèrmica seguits per RMN, efectuats amb altres proteïnes com són les histones H1 i H5, en els quals aquests desplaçaments dels RCS cap a camps més baixos, en progressar la desnaturalització, s'interpreten assignant un grau de mobilitat elevada a les cadenes laterals dels aminoàcids components d'aquestes proteïnes. Aquesta mobilitat s'incrementa en progressar la desnaturalització. Una explicació similar podria ésser vàlida per al segment d'activació si tenim en compte que ambdós tipus de proteïnes presenten característiques de mida i contingut en α -hèlix similars així com carència de ponts disulfur.

Segons els experiments presentats aquí, la resistència del saA enfront de la desnaturalització per urea és més elevada a pH 7.5 que a pH 6.5. El punt mig es troba entre 6-7 M i entre 5-6 M, respectivament. El fet que un pH inferior disminueixi l'estabilitat enfront de la desnaturalització per urea pot ésser degut al fet que aquest segment perd estabilitat en acostar-se cap al seu pI, tal com ja s'ha comentat anteriorment. El punt mig de la desnaturalització a pH 7.5 coincideix bé amb el deduït per electroforesi en gradient d'urea, el qual es troba a 6.5 M urea.

Si comparem els resultats de desnaturalització per urea presentats aquí, junt amb els obtinguts per electroforesi en gradient d'urea, amb els resultats de desnaturalització tèrmica obtinguts per calorimetria diferencial d'escombrat, els quals estan d'acord amb estudis previs de desnaturalització tèrmica seguida per RMN i portats a terme en

el nostre laboratori (105), s'observa clarament una major resistència del saA enfront a la desnaturalització tèrmica que enfront a la desnaturalització per urea en comparació amb altres proteïnes.

Una possible explicació d'aquest fet podria raure en la major capacitat de la urea, respecte a la temperatura, per trencar les interaccions hidrofòbiques que en el cas del saA són molt importants pel seu elevat contingut en aminoàcids hidrofòbics. No s'han trobat, però, referències en la bibliografia que permetin una estimació quantitativa senzilla sobre quin tipus d'interaccions o enllaços (hidrofòbiques, pont d'hidrogen, iònics...) es veuen més afectats per un o altre agent desnaturalitzant.

Un punt important a tenir en compte és que s'ha observat un comportament similar del saA al d'un grup de proteïnes amb les quals es creu que aquest segment està estructuralment relacionat, com es demostrarà en els apartats RB. 7, 8, 9 i 10. Aquest grup de proteïnes són les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand. Com exemple podem esmentar la calmodulina sobre la qual s'han fet estudis de desnaturalització tèrmica i desnaturalització per urea seguits per RMN, i s'ha observat que manté la seva estructura fins i tot a temperatures de 90°C, i en canvi a concentracions d'urea superiors a 6 M aquesta estructura es perd (114). Clarament s'observa una major resistència a la desnaturalització tèrmica que a la desnaturalització per urea, igual que en el nostre cas.

RB.5.8.- Iodació d'histidines i tirosina.

En la Fig. 54 es mostren els canvis espectrals observats en l'espectre de RMN del saA després de l'addició de $I_2 + IK$ a pH 9.0. Quan la concentració de reactiu es baixa, per exemple de 2 equivalents de I_2 per mol de proteïna no es va observar cap canvi spectral important en el saA. No obstant, quan aquesta concentració va arribar a 8 mols de I_2 /mol de proteïna es va poder observar una modificació parcial de les ressonàncies dels protons C2 i C4 de les histidines així com de les ressonàncies dels protons de la tirosina. En aquestes condicions també s'observà un canvi clar en el "pattern" dels RCS que decreixen en intensitat, la qual cosa és indicativa de modificació de l'estructura terciària de la proteïna. Aquest canvi pot ésser degut a un desplegament del saA.

Aquests resultats experimentals suggereixen que tant les histidines com la tirosina presenten una localització intermèdia entre un residu superficial i un d'enterrat dins l'estructura proteica, ja que la seva modificació s'aconsegueix a una concentració de reactiu intermedia i superior a relacions equimolars. Això està en contradicció amb els experiments de deuteració d'histidines (apartat RB.5.6) i titració de tirosina (apartats Rb.5.3 i RB.4) els quals tal com s'ha esmentat abans semblen indicar una localització interior. Aquesta discrepància en els resultats podria explicar-se per la flexibilitat conformacional que presenta aquesta proteïna la qual pot afavorir l'arribada de reactiu modificador (I^+) fins als residus encara que estiguin interioritzats.

La dificultat de iodació de la tirosina també pot ésser deguda al baix percentatge de tirosina reactiva, és a dir, en forma de tirosinat, tal

com es pot deduir del seu pK_a , malgrat que el pH en què es fa la reacció de iodació és de 9.0.

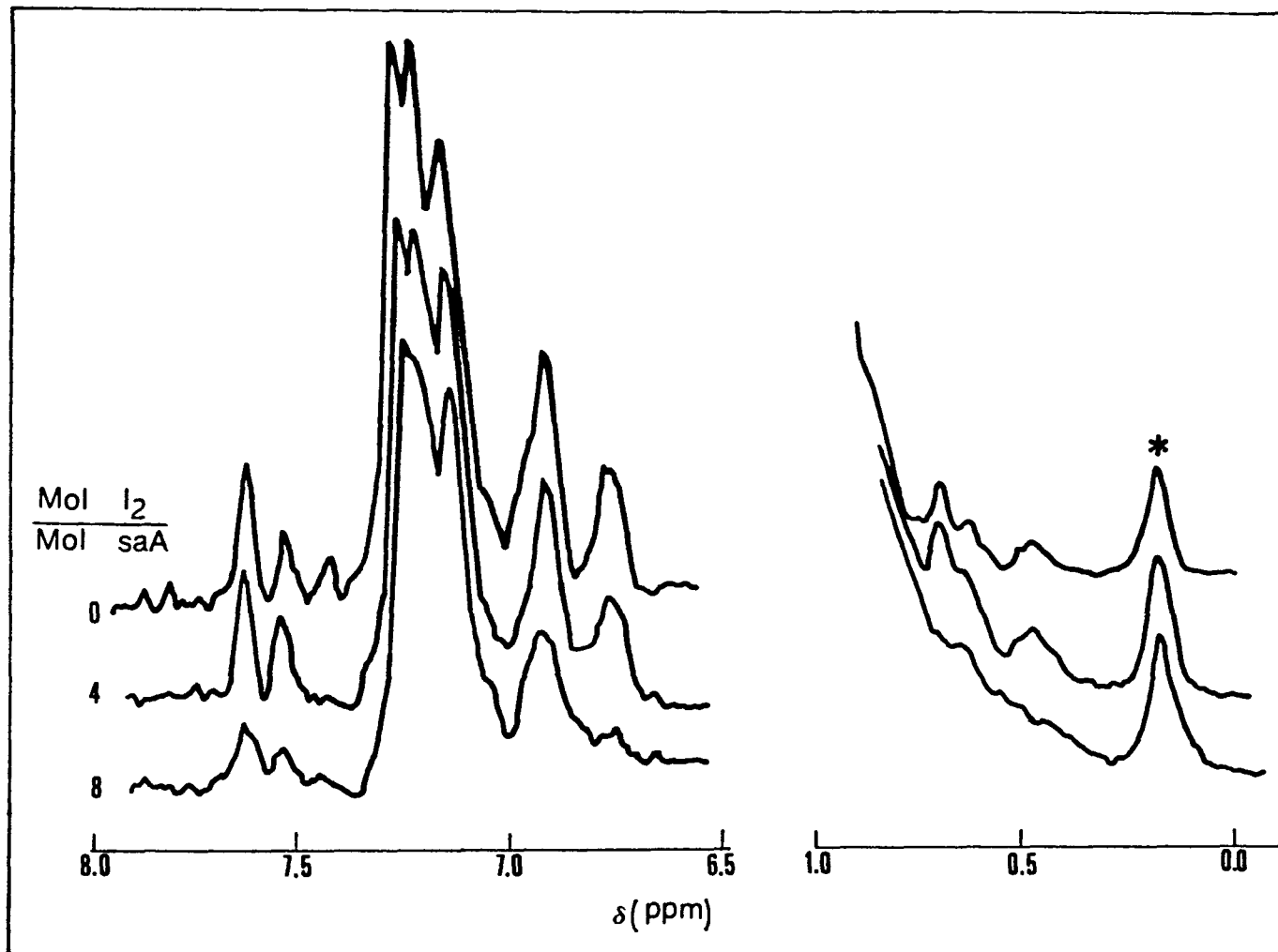


Figura 54.- Efecte de la iodació en l'espectre de RMN del saA. La proteïna a 5 mg./ ml. en tetraborat sòdic 10 mM (pH 9.0) es va tractar amb quantitats creixents de I₂, des de relacions molars I₂/saA de 0 fins a 8. (*) indica pic de contaminació sota el qual es troba el RCS 1.

RB.5.9.- Experiments de pertorbació NOE.

Es van observar efectes de pertorbació nuclear Overhauser (nuclear Overhauser enhancement o NOE) quan es van irradiar les ressonàncies de saA corresponents als metils desplaçats per corrents d'anell o "ring-current-shifts" (RCS). Aquests efectes es mostren en la Fig 55. Aparentment, els efectes NOE observats no són purs sinó barrejats en alguns d'aquests experiments, probablement per la dificultat d'irradiar una única ressonància sense afectar les adjacents, particularment en el cas dels RCS 3 i 4. No obstant, quan es van comparar els efectes NOE realitzant els espectres a dos pHs, concretament 7.3 i 11.8, es va poder arribar a assignar en alguns casos relacions espacials entre aquest RCS i determinats residus aromàtics. Tal com es mostra en els espectres A i A' de la Fig 55, quan es va irradiar les ressonàncies RCS-1 i 1' aparegueren senyals NOE a 7.1-7.4 ppm en la regió aromàtica no titrable, és a dir, probablement corresponents a ressonàncies de fenilalanines o triptòfan. Tampoc es pot eliminar una possible pertorbació d'un residu d'histidina ja que va aparèixer un senyal localitzat a 7.15 ppm posició atribuïda als protons C4 d'histidines.

Per altra banda, en els espectres B i B' de la Fig. 55 es mostren els senyals NOE que van aparèixer en irradiar els RCS 2 i 2'. Aquests senyals corresponen als protons C 3-5 i C 2-6 de la tirosina així com a la regió de residus no titrables (Phe i Trp). Els senyals NOE en la posició dels protons de la tirosina que es van obtenir en irradiar el RCS-2 no poden provenir d'una irradiació residual dels pics adjacents ja que aquest senyal no es va obtenir en irradiar els RCS 1, 3 i 4. D'aquest experiment es pot deduir clarament que l'única tirosina del saA es troba propera a un grup metil d'un residu apolar fins al moment desconegut el qual genera el RCS

2, i per tant aquest residu aromàtic és el responsable de la ressonància del metil a camps alts. Sorprenentment, aquest RCS 2 és l'únic que no va sofrir canvis espectrals importants quan es va titrar la tirosina (veure Fig 49). Aquest comportament no té fins al moment una explicació òbvia i fàcil.

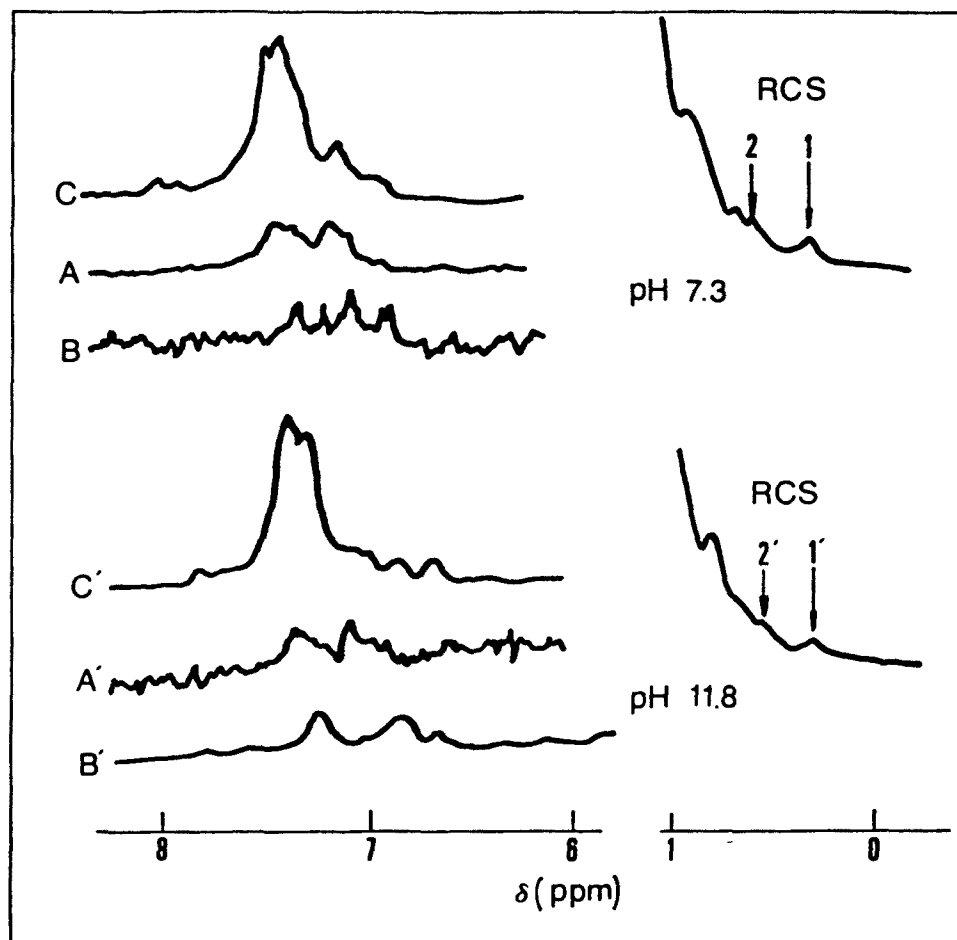


Figura 55.- Espectres de diferència de NOE del saR a dos pHs diferents: 7.3 i 11.8. A i A' corresponen a la irradiació del RCS 1 i 1', respectivament, mentre que B i B' corresponen a la irradiació dels RCS 2 i 2', respectivament. C i C' corresponen a l'espectre de RMN de la zona aromàtica a pH 7.3 i 11.8, respectivament.

Quan es va irradiar els RCS 3,3' i 4,4' es van obtenir senyals NOE no clars. Concretament en irradiar RCS-3 o RCS-4 van aparèixer senyals en la regió de residus aromàtics no titrables. No obstant, quan es van irradiar aquestes mateixes ressonàncies estant el saA a pH elevat (RCS 3' i 4') els senyals que es van obtenir foren similars als obtinguts en irradiar el RCS 1' i 2'. Aquests resultats indiquen una naturalesa complexa dels RCS 3,3' i 4,4'. Probablement aquestes bandes de RMN contenen més d'una ressonància amb un comportament enfront del pH diferent. És possible que algunes d'aquestes ressonàncies sorgeixin d'altres grups metil o metilè veïns del grup metil del mateix residu apolar que provoca el RCS 1,1' i RCS 2,2', els quals estan pertorbats pel mateix residu aromàtic.

Cal però realitzar més experiments i probablement un estudi amb un espectròmetre de RMN més potent o millor mitjançant RMN-2D (NOESY que evita els problemes de difusió de spins de la RMN-1D) per poder aclarir aquestes ambigüitats.

RB.6.- Variació de l'activitat de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II en augmentar la concentració de Ca^{2+} del medi.

Com s'indica més extensament a l'apartat següent, en un moment determinat es va plantejar la possible relació estructural i funcional del saA amb les proteïnes fixadores de Ca^{2+} (tipus EF-hand). Un dels experiments dissenyats per investigar aquesta relació va consistir a observar l'efecte del Ca^{2+} sobre l'activitat peptidàsica de la PCPA-I, PCPA-II i CPA-II.

En mesurar l'activitat específica dels enzims en estudi en presència de concentracions creixents de Ca^{2+} seguint el protocol especificat en l'apartat M3.4 es va obtenir una gràfica tal com la de la Fig. 56 en la qual es representa el % d'activitat específica inicial enfront de la concentració de Ca^{2+} del medi.

Com es pot observar el Ca^{2+} no va produir cap efecte en l'activitat enzimàtica de la PCPA-I i PCPA-II fins que va arribar a una concentració de 10^{-2} M. Per sobre d'aquest valor s'observà un gran augment de l'activitat enzimàtica. Aquest augment d'activitat enzimàtica es pot explicar per una transconformació o desplegament del saA o bé per un allunyament d'aquest de la regió de l'enzim actiu que deixa el seu centre actiu més accessible al substrat, fenomen potser similar a l'observat en els apartats RA.2, 3, 4 i 5. Ara bé, si es tractés tan sols d'un efecte de força iònica, que afeblís la unió saA/CPA, s'obtindria el mateix resultat en repetir l'experiment amb concentracions creixents de NaCl. Quan això es va portar a terme s'observà un lleuger augment de l'activitat específica a concentracions elevades de NaCl però molt inferior a l'observat en el cas del Ca^{2+} .

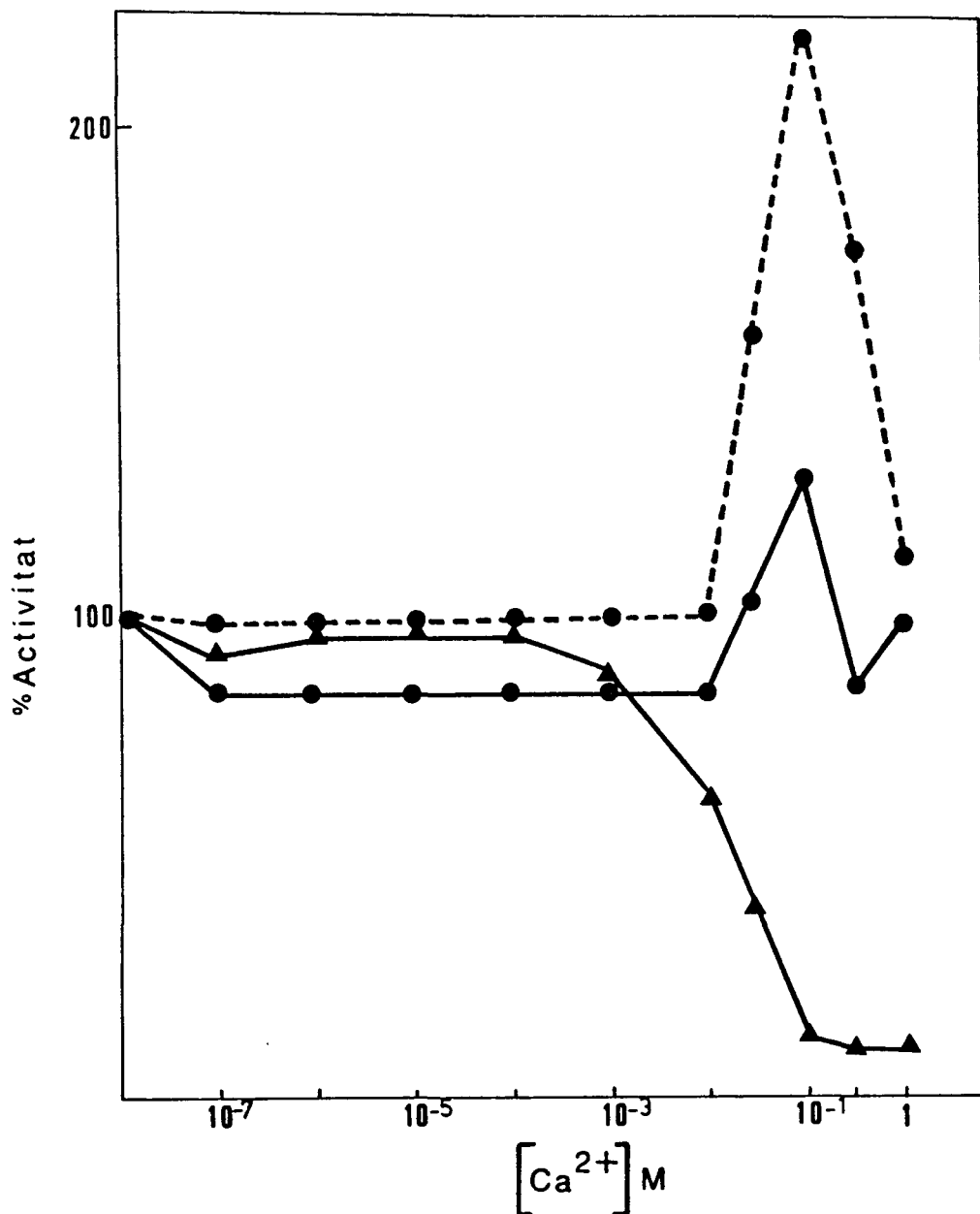


Figura 56.- Variació d'activitat carboxipeptidàsica per PCPA-I (●—●), PCPA-II (●---●) i CPA-II (▲—▲) en funció de la concentració de Ca²⁺ del medi. Els resultats s'expressen en % d'activitat de la mostra respecte a la mateixa mostra sense Ca²⁺. Tampó de dissolució de mostres Tris/HCl 25 mM, NaCl 0.5M (pH 7.5). Temps d'incubació de l'enzim amb el metall, 1 hora. Temperatura 40°C. Substrat emprat: Bz-Gly-L-Phe.

Cal pensar que aquest metall divalent pugui tenir algun altre efecte en aquestes proteïnes, tal vegada modificant la conformació del saA. Es també interessant de ressaltar que està descrit que determinats metalls divalents acceleren la cinètica d'activació proteolítica en certes procarboxipeptidases pancreàtiques (49,55,91) probablement per unió a la regió que es degrada en aquest procés, el segment d'activació.

Si es té en compte que les activitats específiques en condicions estàndard de PCPA-I, PCPA-II i CPA-II són d'1.5, 2.5 i 37, respectivament, en observar la Figura 56 es dedueix que l'augment d'activitat dels proenzims a concentracions de metall elevades va donar lloc a valors d'activitat específica del mateix ordre que els obtinguts per CPA en les mateixes condicions. Això és degut al fet que la corba presentada per l'enzim actiu, indica una clara inactivació d'aquest pel sobre d'1 mM Ca^{2+} , i permet la igualació dels valors d'activitat dels proenzims i de l'enzim actiu.

La inactivació provocada en la CPA pel Ca^{2+} pot ésser deguda a una substitució del Zn^{2+} del centre actiu, essencial per a l'activitat enzimàtica, per aquest metall, o bé per fixació en algun altre punt de la molècula com pot ésser un segon lloc de fixació de Zn^{2+} postulat per aquestes proteïnes (45,48). Una inactivació del mateix tipus es va observar per aquest enzim quan es repetí l'experiment emprant Zn^{2+} en lloc de Ca^{2+} (resultats no presentats). Aquest procés d'inactivació provocat pel Zn^{2+} es dona també en un metalloenzim estructuralment relacionat amb la CPA com és la termolisina (186).

RB.7.- Comparació de les estructures primària i secundària del saA amb les de proteïnes fixadores de Ca²⁺ (tipus EF-hand).

Al llarg de l'estudi i caracterització estructural del segment d'activació aïllat de la PCPA-II presentat fins al moment, es va constatar que aquesta proteïna gaudia d'unes característiques estructurals i d'un comportament enfront de determinats agents pertorbadors que recordaven les característiques i el comportament d'un grup de proteïnes fixadores de Ca²⁺, concretament les que pertanyen a la família EF-hand. Aquestes observacions junt amb algunes de les característiques dels resultats que es descriuen en l'apartat anterior va provocar l'inici del darrer grup de treballs presentats en aquesta Tesi en els quals es pretén demostrar les similituds i diferències entre ambdós grups de proteïnes, treballs que a continuació es descriuen amb detall.

Cal recordar que a la família de proteïnes fixadores de Ca²⁺, tipus EF-hand, pertanyen diverses proteïnes de localització molt general, encarregades de transmetre a altres proteïnes o sistemes biològics senyals d'inici o de terminació d'importants processos modulats pel Ca²⁺: contracció i relaxació muscular, activació de diverses quinases, proteòlisis.. etc.. També pertanyen a aquest grup d'altres proteïnes la funció de les quals encara no es coneix. D'entre totes elles sobresurten la calmodulina (CAL), parvalbúmina (PVA), troponina C (TNC), proteïna intestinal fixadora de Ca²⁺ (ICaBP), S-100..etc.

Un cop resolta l'estructura primària del segment d'activació en el nostre laboratori (106), es van localitzar dues regions de 32 aas. cada una, concretament els residus compresos entre les posicions 3-34 i els compresos entre les posicions 55-84, les quals presenten una seqüència

similar als llocs de fixació de Ca^{2+} de les proteïnes que pertanyen a la família de les EF-hand.

En la Figura 57 es mostra una comparació de les seqüències esmentades del saA amb les seqüències dels llocs de fixació de Ca^{2+} d'algunes proteïnes que pertanyen a la família EF-hand. Cal tenir en compte que en el cas del segment d'activació es van fer algunes delecions a fi de poder aconseguir un millor ajust, tal com també han fet altres autors per altres proteïnes de l'esmentada família (107,108,109). A la vegada, en la Figura 57 es presenta una seqüència model, esquemàtica, de la regió fixadora de Ca^{2+} d'aquestes proteïnes. Aquesta regió es compon d'uns 29 aas., fixant-se el Ca^{2+} en els aas. del centre d'aquesta seqüència.

Concretament els grups encarregats d'unir el Ca^{2+} corresponen a residus amb cadenes laterals que contenen oxigen, grups que es simbolitzen amb les lletres X, Y, Z, -Y, -X, -Z i que ocupen els vèrtexs d'un octaedre per a coordinar-se amb el metall. L'estructura secundària d'aquesta regió fixadora de Ca^{2+} està formada per la seqüència hèlix- α / "loop" (gir- β)/hèlix α , del N cap al C-terminal, corresponent el "loop" als llocs de fixació de Ca^{2+} flanquejats per dos plegaments en α -hèlix. Tal com es pot observar els proposats llocs de fixació de Ca^{2+} del segment d'activació compleixen alguns dels requeriments descrits per a les EF-hand (veure apartat I.6). Així, el lloc comprès del residu 4 al 34 que anomenem abreujadament saA I, conté sis residus amb capacitat per a coordinar Ca^{2+} , en posicions apropiades, és a dir, ocupant els vèrtexs X,Y,Z,-Y,-X,-Z. El lloc comprès del residu 55 al 84 o abreujadament saA II, conté només tres d'aquests residus però, tal com està descrit per altres proteïnes de la família EF-hand (108), les altres posicions poden estar ocupades per altres residus tals com la glicina més una molècula d'aigua o per un oxigen de l'esquelet polipeptídic.

	1 2 3 4 5 6 7 8 9	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1	2 3 4 5 6 7 8 9
	n n n n	X Y Z -Y -X -Z	n n n n
saA I (res 3-34)	D ^H FV G Q ^V L R ^H	S ^V V ^O D ^E A ^O V ^O K ^V K ^E	D ^H E D ^H E L Q ^H
saA II (res 55-84)	S ^O D ^O A ^V K ^V F ^L	^A E ^H G ^I R ^Y T ^I M ^I E ^O	^V O ^L L ^L D ^E E
b-ICaBP I	E L K G I F E K Y	^A A K E G D N Q L S K E E	L K L L L Q T E
b-ICaBP II	T L D E L F E E L	D K N G D G E V S F E E	F Q V L V K K I
p-TNC III	E L A D C F R I F	D K N A D G F I D I E E	L G E I L R A T
p-TNC IV	D I E D L M K D S	D K N N D G R I D F D E	F L K H M E G V
c-PVA II	D V K K A F A I I	D Q D K S G F I E E D E	L K L F L Q N F
c-PVA III	E T K F F L K A G	D S D G D G K I G V D E	F T A L V K A -
b-S100a I	T L I N V F H A H	^G S K E G D K Y L S K K E	L K E L L Q T E
b-S100a II	A V D K V M K E L	^K D E D G D G E V D F Q E	Y V V L Y A A L

Figura 57.- Comparació de les dues regions de la seqüència del saA que es proposa estan estructuralment relacionades amb les seqüències de les regions fixadores de Ca^{2+} de diferents proteïnes de la família EF-hand. Els llocs de coordinació del Ca^{2+} . S'indiquen amb les lletres X, Y, Z, -Y, -X, -Z. Els llocs marcats amb una "n" indiquen residus hidrofòbics altament conservats. Els residus encerclats en saA I i saA II són els que coincideixen amb residus típics de l'estructura EF-hand. Les seqüències de les proteïnes emprades per comparar es van obtenir de (108) i (109). ICaBP = proteïna intestinal fixadora de Ca^{2+} ; TNC = troponina C; PVA = parvalbúmina. Els prefixos "b", "p" i "c" indiquen l'espècie a què pertany la proteïna, així b=boví, p=pollastre i c=carpa.

Aquest és el cas, per exemple del lloc I de fixació de la TNC de conill on en la posició Z s'hi troba una glicina i el cas del lloc I de l'ICaBP que en la posició X conté alanina. Dos residus molt ben conservats en aquesta família de proteïnes són el glutàmic que es troba en la posició -Z del "loop" i la isoleucina situada entre els llocs -Y i -X també del "loop". En el cas d'asA I, el glutàmic es troba en la posició correcta així com la isoleucina en asA II. La leucina de la posició 26 de l'asA I (primer "n" en l'hèlix C-terminal del lloc I) és un residu que coincideix en aquesta posició en tots els llocs senars de les EF-hand (I,III o els seus equivalents com és el cas del lloc II de la parvalbúmina). En canvi, el residu de glicina de la posició 5 del "loop" malgrat ésser un residu molt ben conservat no es troba en cap dels llocs del saA. Hi ha exemples però de proteïnes d'aquesta família en què aquest residu tampoc s'hi troba, tal com és el cas del lloc I de l'ICaBP i el lloc I de la S 100a.

El grau d'identitat seqüencial entre els llocs asA-I i asA-II i els llocs corresponents en les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand presentades en la Figura 57 varia d'un 10 a un 21%, valor que si bé és baix és molt proper al que es troba entre algunes d'aquestes proteïnes entre si, les quals presenten un 20% d'identitat seqüencial mitja.

L'homologia entre els llocs de fixació de Ca^{2+} en el segment d'activació i els de les proteïnes de la família EF-hand es veié molt més clara quan es van fer prediccions de l'estructura secundària per diferents mètodes tals com els de Chou i Fasman (167,168) i Garnier (169), emprant el programa de Pongor i Szalay (173) tal com s'especifica en l'apartat M8. Cal recordar que si hi ha una relació estructural-evolutiva entre aquestes famílies han de presentar semblances conformacionals, ja que la conformació sol variar menys que la seqüència,

al llarg de l'evolució.

En la figura 58 es presenten les prediccions fetes pel primer dels mètodes predictius esmentats i en la Figura 59 les fetes pel segon. Les probabilitats de formació d'hèlix- α i de gir- β de les regions fixadores de Ca^{2+} del segment d'activació sencer es comparen amb les probabilitats equivalents mitjanes calculades a partir de les regions equivalents de diferents representants de la família EF-hand. Concretament, es calculà la mitjana de les probabilitats conformacionals per a cada posició de les seqüències corresponents als llocs de fixació de Ca^{2+} senars o equivalents (I, III o II en el cas de la parvalbúmina) de les proteïnes presentades en la Figura 57 (29 residus). Aquesta probabilitat mitjana dels llocs senars es va fer coincidir en el gràfic amb el fragment asA I. Es va fer el mateix amb els llocs parells (II, IV o III en la parvalbúmina) els quals es compararen amb asA II. Tal com es pot observar en les figures 58 i 59 la coincidència és elevada i es pot observar clarament la seqüència estructural típica de les proteïnes d'aquesta família, hèlix- α - "loop" amb gir β - hèlix- α .

Fent servir aquest mateix programa predictiu (173), es van comparar de forma anàloga a les prediccions d'estructura secundària abans explicades, els perfils d'hidrofobicitat calculats segons els paràmetres de Kyte-Doolittle (170) i Sweet-Eisenberg (171) i el perfil d'hidrofilicitat calculat segons els paràmetres de Hopp-Woods (172) del saA i de les proteïnes de la família EF-hand presentades en la Figura 57.

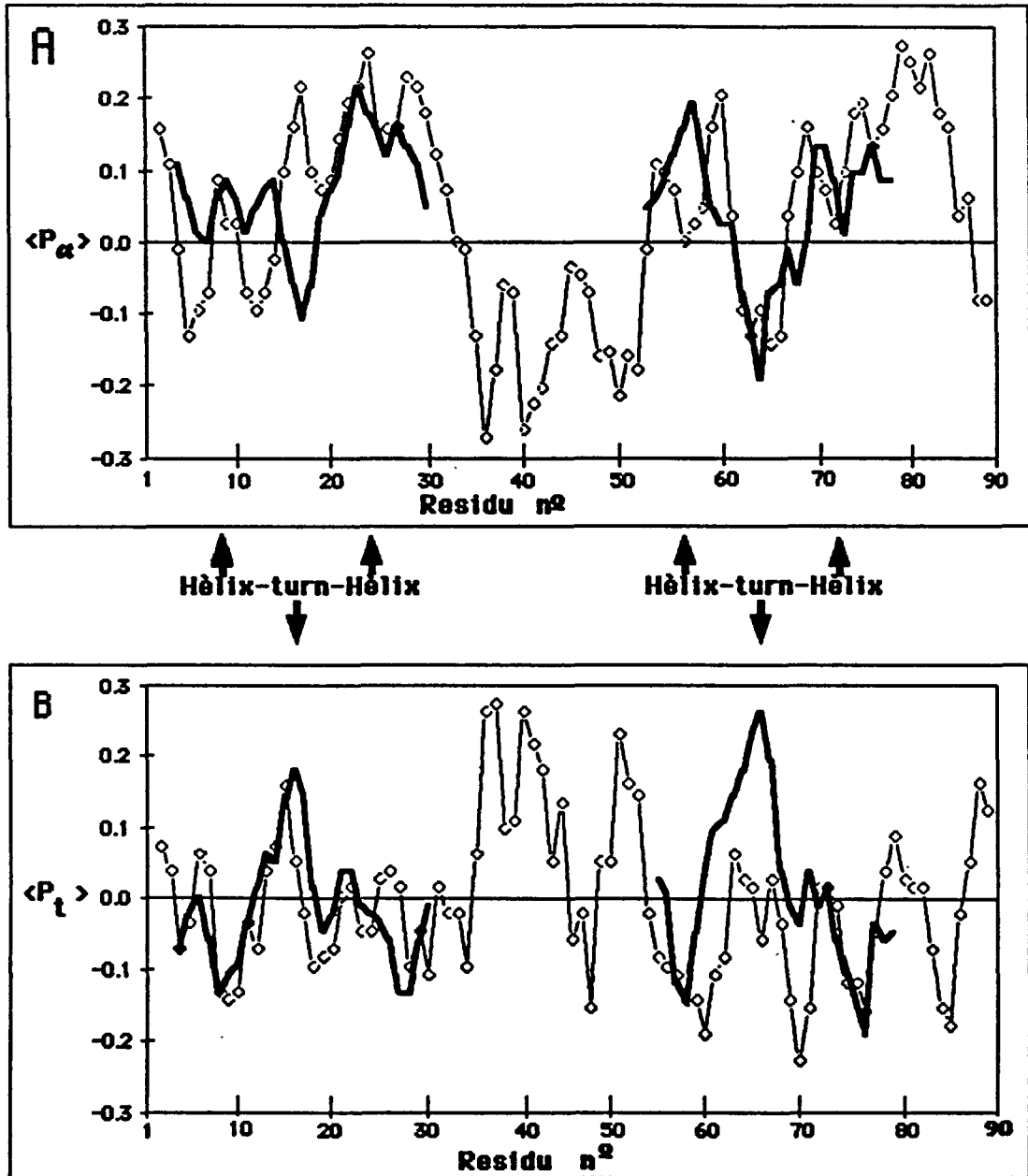


Figura 58.- Comparació dels perfils de probabilitat de formació d'hèlix- α (A) i gir- β (B), segons el mètode de Chou-Fasman per saR (\diamond - \diamond) i una seqüència mitjana (—) elaborada a partir del grup de proteïnes de la família EF-hand de la Fig 57, tal com s'indica en el text i en l'apartat 18.

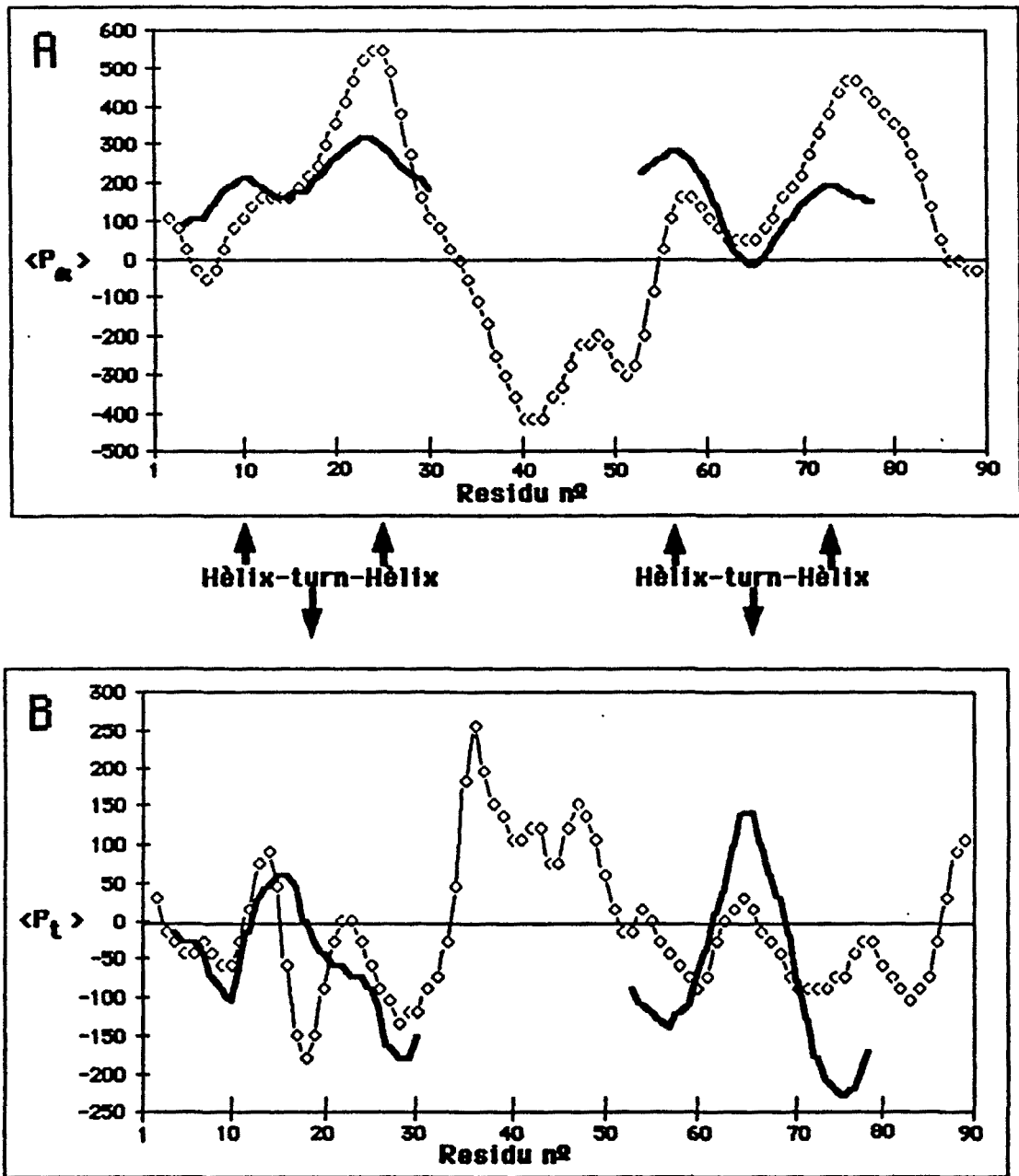


Figura 59.- Comparació dels perfils de probabilitat de formació d'hèlix- α (A) i gir- β (B), segons el mètode de Garnier per saR ($\diamond-\diamond$) i una seqüència mitjana (—) elaborada a partir del grup de proteïnes de la família EF-hand de la Fig 57, tal com s'indica en el text i en l'apartat 118.

Aquests perfils es mostren en les Figures 60 i 61. Es pot observar que en els dos perfils hidrofòbics així com en el hidrofílic hi ha una coincidència notable entre saA i la predicció mitjana de les proteïnes de la família EF-hand (sempre comparant saA I amb la mitjana dels llocs senars o equivalents i saA II amb la mitjana dels llocs parells o equivalents), sobretot per al lloc saA I. Cal recordar que aquest lloc presenta per comparació directa de seqüències una homologia molt gran en totes les posicions de coordinació de Ca^{2+} , és a dir, en els vèrtexs X,Y,Z,-Y,-X,-Z, amb les proteïnes d'aquesta família.

Si comparem en aquesta posició (saA I) el perfil hidrofílic (Fig. 61) amb les prediccions de probabilitat de formació de gir β (Figs. 58 i 59) es pot observar una coincidència, quant a posició seqüencial, d'un màxim d'hidrofilicitat amb el màxim de probabilitat de formació del gir β del "loop". Aquesta coincidència indica que aquest gir probablement es troba localitzat en la superfície de la proteïna. Es confirma aquí, una vegada més, el coneixement general que es té sobre la localització superficial d'aquest tipus d'estructura secundària en proteïnes. En el cas de saA II aquesta coincidència no és tant clara, encara que la màxima probabilitat de localització del gir β sembla coincidir amb un mínim d'hidrofobicitat (Fig. 60).

Encara que aquests perfils hidrofòbics i hidrofílic no són un mètode predictiu directe de l'estructura secundària d'una proteïna, permeten d'obtenir una confirmació addicional sobre la relació conformacional dels llocs del saA proposats com a potencials fixadors de Ca^{2+} i les proteïnes EF-hand. De no ésser així, la distribució d'aminoàcids hidrofòbics i hidrofílics no coincidiria amb la presentada per les proteïnes de la família EF-hand en un grau tant apreciable.

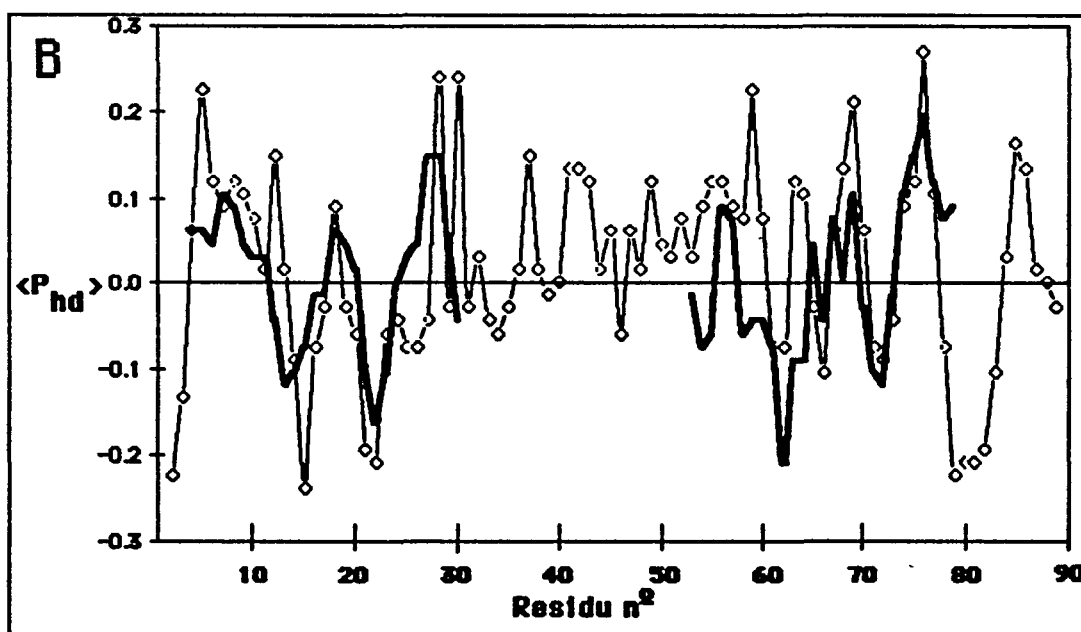
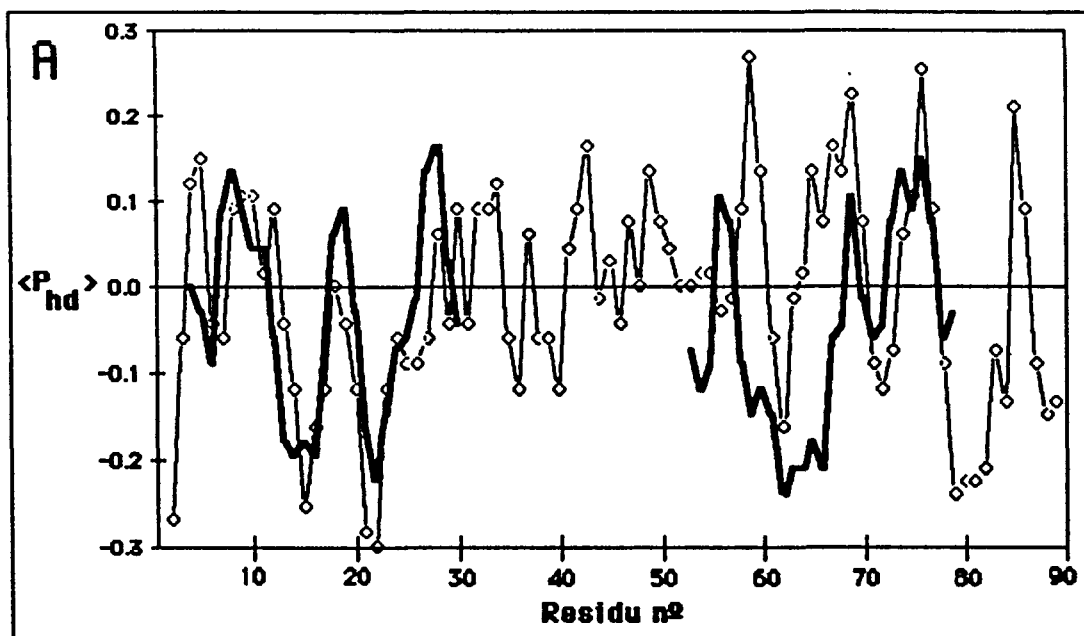


Figura 60.- Comparació dels perfils d'hidrofobicitat calculats segons els paràmetres de Sweet-Eisenberg (A) i Kyte-Doolittle (B) per saR (\diamond - \diamond) i una seqüència mitjana (—) de proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand, tal com es va fer en les figures 58 i 59.

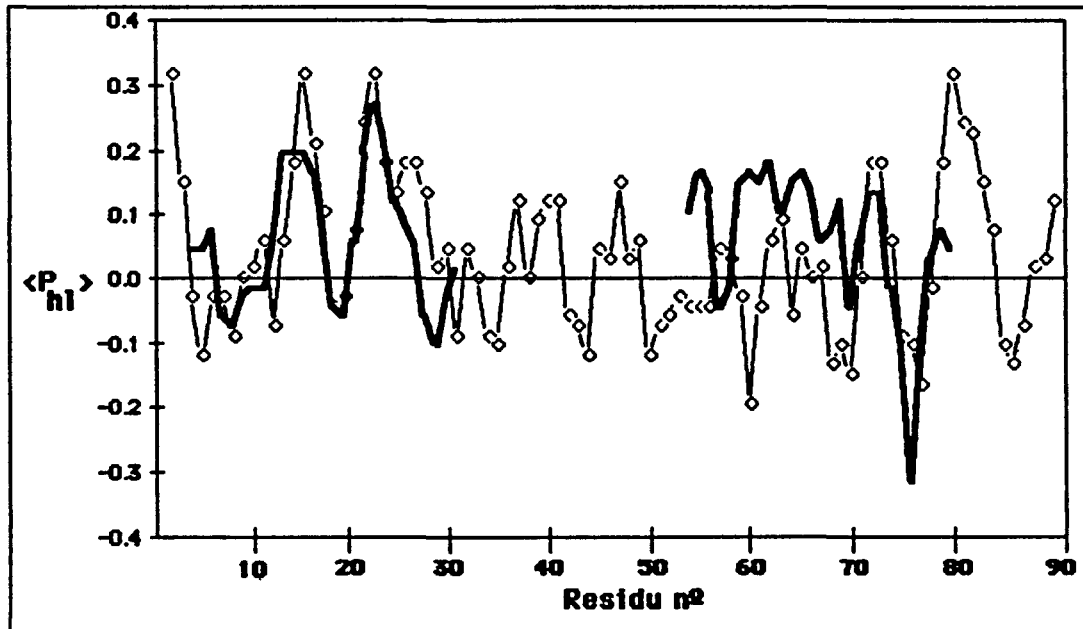


Figura 61.- Comparació del perfil d'hidrofilicitat calculat segons els paràmetres de Hopp-Woods per saR (\diamond — \diamond) i una seqüència mitjana (—) de proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand, anàlogament com es va fer en el cas de les figures 58 i 59.

Per a quantificar el grau d'homologia conformacional, el programa de Pongor i Szalay (173), permet de calcular un coeficient de correlació R el qual és una mesura del grau d'identitat estructural entre dues seqüències o entre una seqüència i una mitjana de seqüències, tal com s'explica en l'apartat M8. Els autors donen valors de $R > 0.2$ com a indicatius de seqüències homòlogues. En les taules 3 i 4 es presenten els valors dels coeficients de correlació trobats en comparar les seqüències saA I i saA II amb les seqüències d'altres llocs de fixació de Ca^{2+} de proteïnes de la família EF-hand, concretament les de la Figura 57, emprant els paràmetres de P_{α} i P_t dels mètodes de Chou-Fasman (167,168) i Garnier (169), respectivament. Així mateix les taules presenten una columna en la qual els valors de R corresponen a la comparació de les probabilitats conformacionals de cada proteïna amb la mitjana de les seqüències dels vuit llocs de fixació de Ca^{2+} de les proteïnes de la família EF-hand triades (Fig 57). Aquests és per tant un control intern.

Com es pot observar en la taula 5, on es mostren els coeficients de correlació obtinguts segons el mètode de Garnier (169), aquests oscil·len des de 0.36 fins a 0.95, indicant un grau d'homologia molt elevat, sobretot quan es compara saA I i saA II amb la mitjana de les probabilitats de les vuit seqüències.

Els valors de R calculats segons els paràmetres de Chou-Fasman (taula 6) són inferiors als trobats en el cas anterior, però, molt pocs d'ells són inferiors a 0.2. Cal remarcar que Pongor i Szalay (173) consideren que la utilització del mètode de Garnier en la comparació proporciona uns valors de R més acurats i amb un grau d'incert més gran que la utilització del de Chou-Fasman.

Seqüències	R_{α}			R_t		
	saA I	saA II	Mitja	saA I	saA II	Mitja
saA I	1.0000	0.8317	0.7501	1.0000	0.8412	0.5502
saA II	0.8317	1.0000	0.9223	0.5983	1.0000	0.9245
b-ICaBP I	0.8046	0.8783	0.9582	0.5748	0.8412	0.8829
b-ICaBP II	0.3633	0.6823	0.8679	0.3098	0.8176	0.9071
p-TNC III	0.7965	0.8128	0.8879	0.6536	0.6179	0.7330
p-TNC IV	0.6679	0.9012	0.8694	0.4011	0.7870	0.9050
c-PYA II	0.7647	0.8028	0.9217	0.3497	0.7030	0.7603
c-PYA III	0.4791	0.7596	0.7074	0.3962	0.7632	0.9187
b-S100a I	0.9442	0.9468	0.8896	0.8162	0.8769	0.8580
b-S100a II	0.3683	0.6550	0.8379	0.3808	0.9027	0.8873

Taula 5.- Coeficients de correlació (R) trobats per a les proteïnes indicades en la taula (seqüència de 29 aas. de la regió fixadora de Ca^{2+}) emprant els paràmetres de Garnier per a la probabilitat de formació d'hèlix- α (R_{α}) i gir- β (R_t), segons el mètode de Pongor-Szalay (173). Els valors que es troben sota la columna "mitja" corresponen a la comparació de les probabilitats conformacionals de cada seqüència amb una mitjana de les probabilitats conformacionals de vuit seqüències de proteïnes EF-hand (Fig. 57).

Es curiós observar el fet que els valors dels coeficients de correlació de les taules 5 i 6 obtinguts en comparar saA I amb les seqüències especificades, generalment són mes alts quan la comparació es fa amb una seqüència corresponent a un lloc senar (I, III o el seu equivalent en la parvalbúmina, II) que quan es fa amb un lloc parell. Aquest fet pot indicar una major identitat estructural de saA I amb els corresponents "llocs I" que amb els "llocs II". El mateix s'observa per saA II però com es lògic al revés.

Seqüències	R_{α}			R_t		
	saA I	saA II	Mitja	saA I	saA II	Mitja
saA I	1.0000	0.0619	0.3223	1.0000	0.2712	0.4923
saA II	0.0619	1.0000	0.3269	0.2712	1.0000	0.3629
b-ICaBP I	0.3399	0.1708	0.5527	0.2954	0.1005	0.5085
b-ICaBP II	0.1656	0.2737	0.6571	0.3517	0.3464	0.9085
p-TNC III	0.0304	0.2415	0.5545	0.4626	0.3906	0.7392
p-TNC IV	0.2359	0.2468	0.7386	0.4377	0.2472	0.8524
c-PVA II	0.2910	0.3104	0.6432	0.4559	0.5659	0.8099
c-PVA III	0.0902	-0.0572	0.6308	0.1923	0.1381	0.8067
b-S100aI	0.3766	0.0754	0.4703	0.6591	0.2493	0.7739
b-S100aII	0.0408	0.3470	0.6527	0.2935	0.2559	0.8569

Taula 6.- Coeficients de correlació (R) trobats per a les proteïnes indicades en la taula (seqüència de 29 aas. de la regió fixadora de Ca^{2+}) emprant els paràmetres de Chou i Fasman per a la probabilitat de formació d'hèlix- α (R_{α}) i gir- β (R_t), segons el mètode de Pongor-Szalay (173). Els valors que es troben sota la columna "mitja" corresponen a la comparació de les probabilitats conformacionals de cada seqüència amb una mitjana de les probabilitats conformacionals de vuit seqüències de proteïnes EF-hand (Fig. 57).

Aquesta observació és consistent amb el mecanisme evolutiu proposat per a les proteïnes de la família EF-hand (187) i que es presenta en la fig. 62. Segons Desplan i col. (187) l'origen de les proteïnes d'aquesta família amb quatre llocs de fixació de Ca^{2+} es va produir per una doble duplicació gènica. Es va partir d'una molècula amb un únic lloc de fixació

de Ca^{2+} la qual es va duplicar (presentant després una evolució diferent els llocs I i II) o es va fusionar amb alguna altra regió amb la mateixa funció però d'origen diferent per evolució convergent. Una duplicació d'aquesta segona molècula amb dos llocs de fixació de Ca^{2+} dona lloc a les proteïnes d'aquesta família amb quatre llocs d'unió de Ca^{2+} . Per tant, és lògic que el lloc I i el III siguin homòlegs igual que els llocs II i IV.

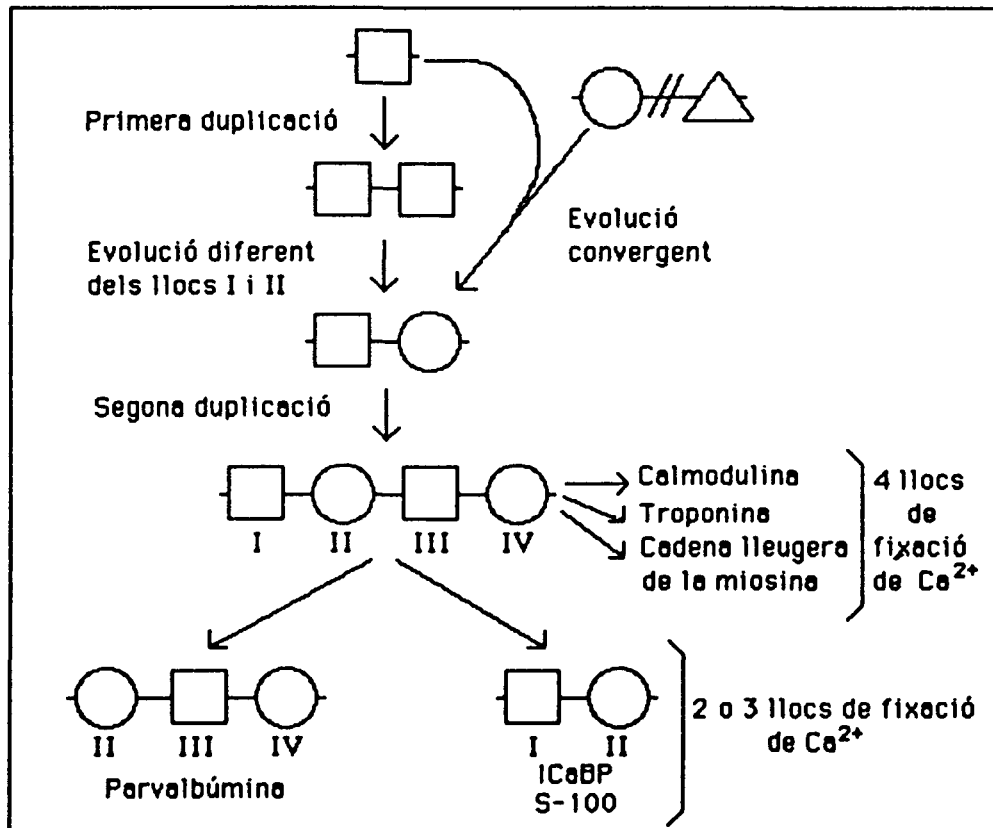


Figura 62.- Model proposat per a l'evolució de les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand. I, II, III i IV representen els llocs de fixació de Ca^{2+} .

Seqüències	$R_{\text{Kyte-Doolittle}}$			$R_{\text{Sweet-Eisenberg}}$		
	saA I	saA II	Mitja	saA I	saA II	Mitja
saA I	1.0000	-0.0900	0.2316	1.0000	0.0608	0.4245
saA II	-0.0900	1.0000	0.4384	0.0608	1.0000	0.3120
b-ICaBP I	0.1406	-0.0913	0.2053	0.3332	-0.0531	0.5432
b-ICaBP II	0.1976	0.5303	0.8492	0.3037	0.3848	0.8855
p-TNC III	0.1020	0.3000	0.7753	0.3657	0.3625	0.7813
p-TNC IV	0.2443	0.1175	0.7930	0.2724	0.1942	0.8694
c-PVA II	0.3155	0.4633	0.6562	0.4764	0.3135	0.7558
c-PVA III	0.0753	0.5063	0.7855	0.1745	0.3720	0.8172
b-S100a I	0.0640	0.3389	0.5971	0.4030	0.1479	0.6826
b-S100a II	0.1030	0.2503	0.7599	0.2582	0.2224	0.8306

Seqüències	$R_{\text{Hopp-Woods}}$		
	saA I	saA II	Mitja
saA I	1.0000	0.0697	0.4543
saA II	0.0647	1.0000	0.3582
b-ICaBP I	0.4359	-0.0710	0.5941
b-ICaBP II	0.2143	0.4157	0.8385
p-TNC III	0.2883	0.3941	0.8169
p-TNC IV	0.2969	0.2668	0.8754
c-PVA II	0.5154	0.2379	0.6881
c-PVA III	0.2806	0.5031	0.8437
b-S100a I	0.5150	0.2680	0.5646
b-S100a II	0.2059	0.1916	0.8065

Taula 7.- Coeficients de correlació (R) trobats per a les proteïnes indicades en la taula (seqüència de 29 aas. de la regió fixadora de Ca^{2+}) emprant els paràmetres de Kyte-Doolittle, Sweet-Eisenberg i Hopp-Woods per a la probabilitat de localització de regions hidrofòbiques i hidrofíliques, segons el mètode de Pongor-Szalay (173). Els valors que es troben sota la columna "mitja" corresponen a la comparació de les probabilitats conformacionals de cada seqüència amb una mitjana de les probabilitats conformacionals de vuit seqüències de proteïnes EF-hand (Fig. 57).

Els valors de R calculats emprant les dades de hidrofobicitat de Kyte-Doolittle i Sweet-Eisenberg així com els calculats emprant les dades d'hidrofilicitat de Hopp-Woods es presenten en la taula 7. Com es pot observar, aquests valors són semblants per a tots els mètodes emprats essent però més baixos que els obtinguts en el cas de l'ús dels paràmetres de Garnier. Cal remarcar però que en la major part dels casos els valors són superiors a 0.2.

Fins al moment, totes les proves presentades de la relació estructural del saA amb les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand, i que es descriuen en aquest apartat, no ens demostren que el segment d'activació de la PCPA-II uneixi el metall en qüestió. Per això es va plantejar una sèrie d'experiments que ens ho poguessin demostrar, els quals es descriuen a continuació.

RB.8.- Fixació de Ca^{2+} i Tb^{3+} al saA seguida per espectroscòpia de fluorescència.

Està descrit per a la família EF-hand de proteïnes fixadores de Ca^{2+} , que la fixació d'aquest metall incrementa la fluorescència intrínseca de la proteïna. En el cas del segment d'activació es va provar mitjançant estudis de fluorescència si aquest metall provocava el mateix efecte, seguint el protocol descrit en l'apartat M4.4.1. Els resultats indicaren una unió feble de Ca^{2+} , la qual provoca un increment lleuger de la banda de fluorescència pròpia de la proteïna, mesurada a 340 nm (excitant a 235 nm.). Per observar aquest increment va caldre però, arribar a relacions de metall/proteïna de 10^2 - 10^4 . A partir d'aquests resultats es va estimar una constant de dissociació de $K_d \approx 10^{-2}$ M a pH 6.4 i 8.3, en 10 mM Bis-Tris o Tris/HCl, respectivament.

En l'experiment anterior es van provar dos pHs perquè està descrit per algunes proteïnes de la família EF-hand, tals com les S-100, que la fixació del metall és dependent del pH (122). Malgrat això el saA no va presentar fixació del metall a concentracions baixes d'aquest, tal com succeeix per a les EF-hand, proteïnes que presenten constants de dissociació pel Ca^{2+} de l'ordre de 10^{-4} - 10^{-6} M (108). Per tant, podem concloure que el saA malgrat estar relacionat estructuralment amb les proteïnes de la família EF-hand, no fixa Ca^{2+} , almenys amb la mateixa afinitat que ho fan les proteïnes amb les quals es vol comparar.

Està descrit que una de les propietats de les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família de les EF-hand és que l'àtom o àtoms de Ca^{2+} que presenten poden ésser substituïts per lantànids i concretament per Tb^{3+} (116,118).

Aquest metall presenta propietats fluorescents les quals es veuen extraordinàriament incrementades quan s'uneix a la proteïna. A fi d'explorar aquesta propietat en el saA es van portar a terme titracions d'aquest amb Tb^{3+} mesurant la intensitat de fluorescència a 545 nm. (λ ext. 235 nm) i a 488 nm. (λ ext. 260 o 280 nm.). En la Figura 63.A es mostren les corbes de titració del saA amb aquest metall, en tres condicions diferents de força iònica, enregistrant la intensitat de fluorescència a 545 nm. Quan el saA es titrà amb Tb^{3+} en presència de 10 mM Bis-Tris (pH 6.4) va aparèixer un increment clar de la banda de fluorescència d'aquest catió fins que s'arribà a una relació molar de 2-2.25, Tb^{3+} /proteïna. En aquestes condicions la corba de titració presentava dues fases les quals encara es van veure més nitidament quan s'excità a 280 o 260 nm., i s'enregistrà la intensitat de fluorescència a 488 nm, tal com es pot apreciar en les Figures 63 B i C. Els dos components d'aquesta corba es van poder assignar, en primera aproximació, a dos llocs de fixació de metall, un d'ells d'afinitat més gran que l'altre.

Continuant la titració amb Tb^{3+} , quan s'arribà a relacions molars superiors a 3/1, Tb^{3+} /saA, s'observà un altre increment en la intensitat de fluorescència, suggerint la fixació d'un tercer àtom de metall.

Cal tenir en compte però que les mesures de fluorescència en aquesta regió presentaren una gran variabilitat d'una mostra a l'altra, suggerint que la unió d'aquest tercer àtom de Tb^{3+} provoca una agregació de la proteïna, ja que a la vegada s'observà un augment en el pic de dispersió de la llum. Aquesta fixació d'un tercer àtom de Tb^{3+} ha estat també descrita per a altres proteïnes d'aquesta família, tals com la ICaBP (116,120), la CAL (188) i la PVA (189), quedant eliminada la fixació d'aquest quan en el medi s'hi troba Ca^{2+} .

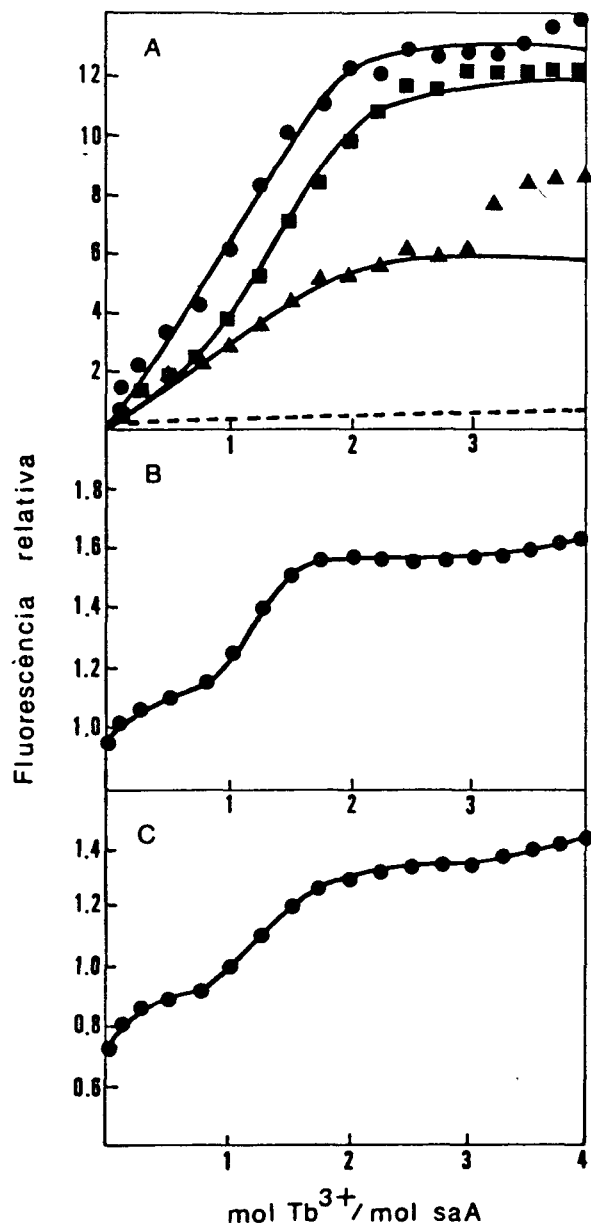


Figura 63.- Corbes de titració amb Tb^{3+} del saA seguides per fluorescència (A) λ_{ext} 235 nm., λ_{em} 545 nm. (B) λ_{ext} 260 nm., λ_{em} 488 nm. (C) λ_{ext} 280 nm, λ_{em} 488 nm.; (●—●) saA a $8 \times 10^{-6}M$ en Bis-tris 10 mM (pH 6.4); (▲—▲) saA a $8 \times 10^{-6}M$ en Bis-Tris 10 mM, KCl 0.1M (pH 6.4); (■—■) saA a $8 \times 10^{-6}M$ en Bis-Tris 10 mM, Ca^{2+} 1mM (pH 6.4). En la Figura (A) la línia contínua correspon a la corba teòrica calculada a partir dels punts experimentals tal com s'indica en el text. (----) Bis-Tris 10 mM + Tb^{3+} .

En la Figura 63.A es mostra la corba de titració del segment d'activació amb Tb^{3+} en el mateix tampó anterior però en presència de Ca^{2+} 1 mM, posant-se en evidència l'eliminació d'aquest tercer lloc de fixació del metall. Aquest fet, a la vegada, suggereix que el Ca^{2+} pot unir-se a aquest tercer lloc suprimint l'agregació de la proteïna, tal com succeeix en altres proteïnes d'aquesta família.

Quan la titració amb Tb^{3+} es portà a terme en el tampó fins ara descrit però en presència de KCl 0.1 M (Fig. 63.A), és a dir, a una força iònica més elevada que la descrita abans, s'observà una titració clara encara que amb una intensitat de fluorescència aproximadament del 50% de l'observada abans en presència de Bis-Tris 10 mM (pH 6.4). Aquest fet també ha estat descrit per altres proteïnes d'aquesta família indicant que el K^+ pot actuar com a competidor del Ca^{2+} o del Tb^{3+} (122,190) o bé provocar petits canvis conformacionals en el saA per augment de la força iònica, canvis que dificultarien l'augment de la fluorescència del Tb^{3+} unit.

Suposant que els dos llocs postulats com a fixadors de Tb^{3+} en el saA són independents es va fer una anàlisi de les dades de fixació fent servir l'equació d'Adair-Klotz i un programa d'ajust de corbes basat en el mètode de Gauss-Newton, tal com han fet Haiech et al. (154) i Chiba et al. (118). Es van poder estimar les següents constants de dissociació per a la unió dels àtoms de Tb^{3+} : $K'_{d1} = 0.8 \mu M$ i $K'_{d2} = 6.4 \mu M$, a baixa força iònica i $K'_{d1} = 1.2 \mu M$ i $K'_{d2} = 7.3 \mu M$, a força iònica més elevada (KCl 0.1 M). Les corbes teòriques calculades tal com s'indica abans es mostren en la figura 63. A junt amb els punts experimentals. Els valors de les constants de dissociació es van correspondre bé amb els trobats per a la unió del Tb^{3+} als llocs d'alta i baixa afinitat d'altres proteïnes fixadores de Ca^{2+} (108,116,118).

Donat que el Ca^{2+} s'uneix feblement al saA es va intentar observar el seu efecte sobre la fluorescència d'un complex $\text{Tb}^{3+}/\text{saA}$ a relació molar 2/1. En la fig. 64.A es mostren els resultats d'una titració amb Ca^{2+} de l'esmentat complex. S'observà que per a revertir la fluorescència del Tb^{3+} i només fins a la que presenta el complex $\text{Tb}^{3+}/\text{saA}$ a relació molar d'1/1, van ésser necessàries concentracions de Ca^{2+} de l'ordre de 7×10^{-3} M. Aquest resultat ens torna a reafirmar que si bé el Ca^{2+} s'uneix a aquesta proteïna ho fa amb una afinitat molt inferior al Tb^{3+} , i li és molt difícil desplaçar-lo.

El mateix tipus d'experiment es va portar a terme amb altres divalents tals com el Cd^{2+} i el Mg^{2+} ja que en la bibliografia es troben referències que aquests metalls poden substituir el Tb^{3+} i el Ca^{2+} (115,191,192,193)). En la Fig 64.B es mostra la titració en el cas del Cd^{2+} i en la Fig. 64.C en el cas del Mg^{2+} . Com es pot observar, el Cd^{2+} té un efecte semblant al Ca^{2+} , encara que més profund ja que sembla que pot desplaçar 2 àtoms de Tb^{3+} , mentre que el Mg^{2+} pràcticament no altera la fluorescència del complex original $\text{Tb}^{3+}/\text{saA}$ (2/1). Poc es pot dir sobre l'efecte d'un i altre divalent ja que com en el cas del Ca^{2+} calen concentracions molt elevades per substituir el Tb^{3+} . En la bibliografia es troben referències diverses sobre l'efecte competidor o no que determinats divalents poden tenir envers el Ca^{2+} fixat per les proteïnes de la família EF-hand (115, 191, 192, 193).

Es també important d'indicar que es va observar que el Tb^{3+} pràcticament no sofreix perturbacions en la seva fluorescència quan s'afegeix sobre la PCPA-II, en diferents condicions de força iònica del medi i en un ample marge de concentracions de catió divalent afegit.

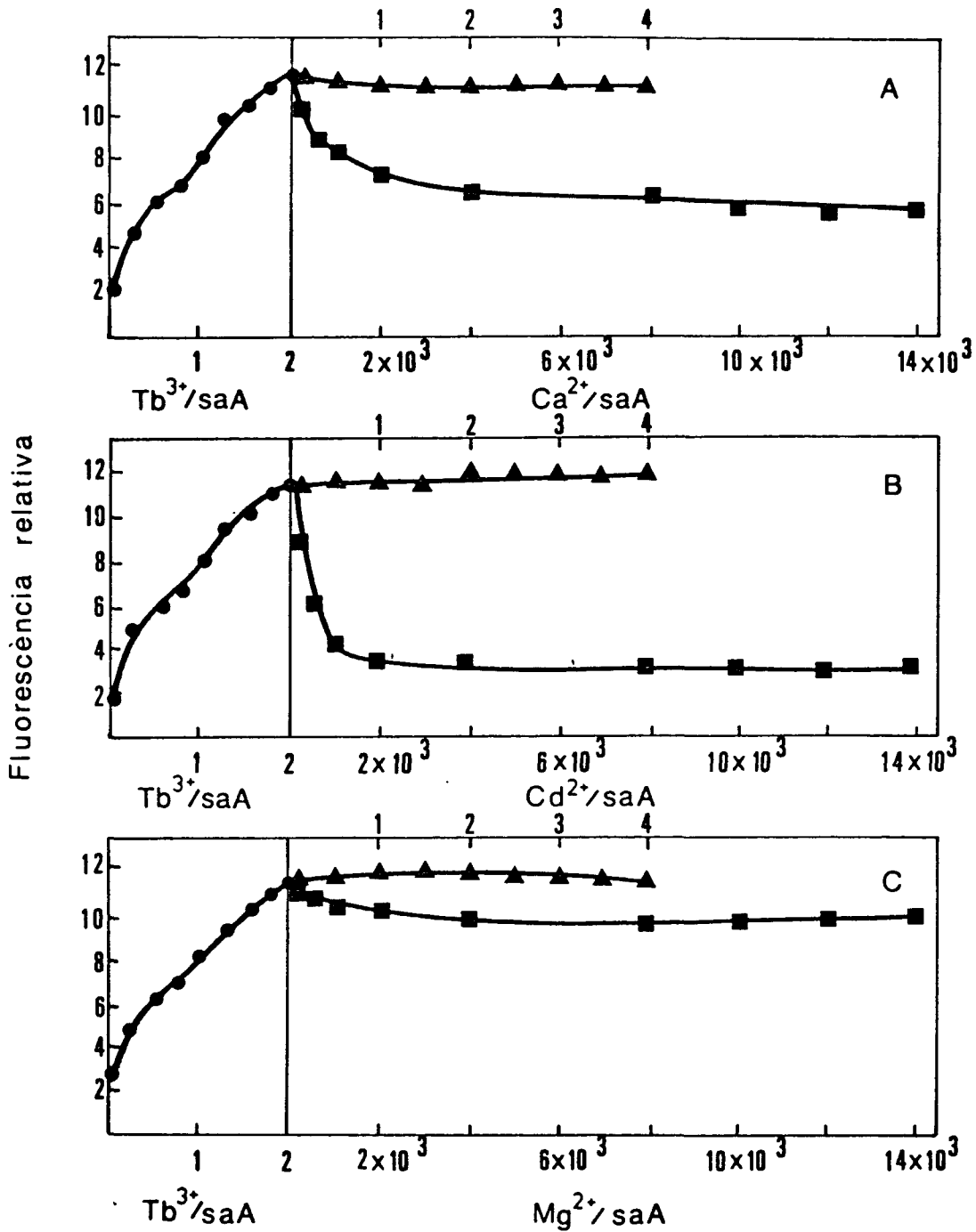


Figura 64.- Reversió de la fluorescència del complex Tb³⁺/saA a relació molar 2/1 (●—●) per diferents metalls. (A) Ca²⁺ (B) Cd²⁺ (C) Mg²⁺; (▲—▲) intent de reversió a relacions molars metall/saA baixes, fins a 4/1; (■—■) intent de reversió a relacions molars metall/saA elevades.

Aquesta observació sembla indicar que els dos llocs de fixació de Tb^{3+} en el saA són inaccesibles al metall o bé estan deformats quan el saA està unit a la PCPA. Aquest resultat reforça els indicis que la conformació del saA és diferent dins de la PCPA que fora d'ella. Per altra part, aquest resultat sembla indicar que els efectes provocats pel Ca^{2+} sobre l'activitat enzimàtica de la PCPA-II i PCPA-I, descrits en l'apartat RB.6, no poden ésser deguts a una fixació del metall al saA dins del proenzim. Queda per tant per explicar la influència del Ca^{2+} sobre l'activitat dels proenzims.

RB.9.- Fixació de Ca^{2+} i Tb^{3+} al saA seguida per calorimetria de reacció.

Quan es produeix una interacció entre un lligand i una proteïna, en la majoria dels casos, s'absorbeix o desprèn calor que pot mesurar-se si es disposa dels instruments idonis. En el nostre cas, es va seguir la fixació de Ca^{2+} i Tb^{3+} al saA mitjançant calorimetria discontinua de reacció (veure apartat M6.1).

En primer lloc cal fer esment que es va efectuar una titració del saA amb Ca^{2+} i que no es va observar cap senyal de despreniment o absorció de calor. Una vegada més sembla doncs que la unió d'aquest metall al saA és molt feble o no detectable per les tècniques emprades. En canvi sí que s'observà una clara perturbació calorimètrica en afegir Tb^{3+} sobre saA.

En la Figura 65 es mostra la corba de fixació de Tb^{3+} al saA obtinguda per representació dels valors d'entalpia de cada addició de metall enfront de la concentració de Tb^{3+} . Com es pot observar, la corba arriba a un replà el qual coincideix amb la saturació de la proteïna pel lligand. D'aquest replà es va poder deduir, en primera aproximació, un valor d'entalpia de saturació, ΔH_{max} , el qual es va fer servir per calcular la fracció de saturació mitjançant la relació $\Delta H/\Delta H_{\text{max}}$ i obtenir així la concentració de lligand unit i per diferència la de lligand lliure a cada concentració de lligand total utilitzada. A partir de la concentració de lligand lliure i dels valors d'entalpia de cada punt es va fer un ajust per mínims quadrats d' $1/\Delta H$ enfront de $1/[\text{L}]_{\text{lliure}}$ tal com s'indica en l'apartat M6.1.

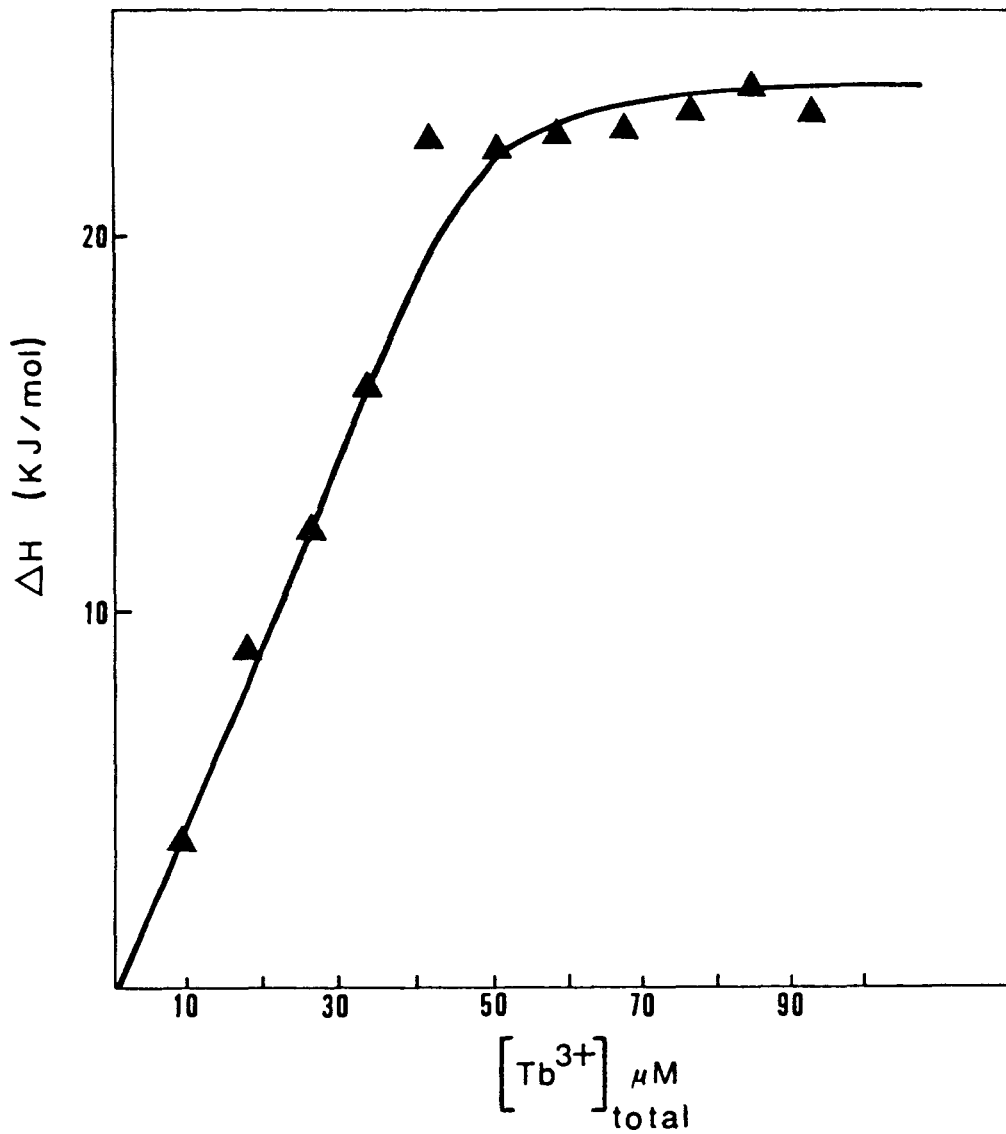


Figura 65.- Entalpia de reacció del Tb^{3+} amb el saA en funció de la concentració total de metall adicionada (Δ) punts experimentals (—) corba teòrica calculada tal com s'indica en el text. Condicions: 25°C, saA $4.59 \times 10^{-5} M$, tampó Bis-Tris/HCl 10 mM (pH 6.4).

De tot aquest tractament matemàtic s'arribà, en el nostre cas, a un valor d'entalpia del procés de titració amb Tb^{3+} de 24,8 KJ/mol de proteïna i a una constant de dissociació d'1 μ M. Es va obtenir una única constant de dissociació ja que la corba experimental obtinguda i el tractament matemàtic abans explicat semblen indicar un únic lloc de fixació del metall. El valor deduït per a la constant de dissociació per Tb^{3+} coincideix acceptablement amb el trobat pel lloc d'alta afinitat descrit en els experiments de fluorescència presentats en l'anterior apartat.

Les discrepàncies observades entre una i altra tècnica es poden explicar pel fet que algunes fixacions de metall poden ésser tèrmicament silencioses, tal com s'ha trobat per algunes proteïnes de la família EF-hand (194), o bé, perquè, la fixació del metall pot anar acompanyada d'un canvi conformacional la calor de transformació del qual sigui d'igual magnitud al degut a la fixació però de signe oposat, donant com a resultat un calor net nul.

A partir dels valors de la constant de dissociació i de l'entalpia de la titració es van calcular altres paràmetres termodinàmics del procés. Així, el valor d'energia lliure ΔG^0 , calculat a partir de l'equació $\Delta G^0 = -2.3 RT \log K$, és de -34.19 KJ/mol. Així mateix, el canvi d'entropia del procés es va calcular mitjançant $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, i es va trobar un valor de -197,75 J/mol x grau. Tots aquests valors dels paràmetres termodinàmics del procés de titració del saA amb Tb^{3+} es resumeixen a continuació en la taula 8.

	ΔG (KJ/mol)	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/molxgrau)
saA (25°C) + Tb^{3+} Bis-Tris 10 mM (pH 6.5)	-34.19	24.80	-197.75

Taula 8.- Paràmetres termodinàmics de la unió del Tb^{3+} al saA.

Com es pot deduir del valor d'entalpia, la titració és endotèrmica. En la bibliografia es troben referències que la fixació de Ca^{2+} a les proteïnes de la família EF-hand pot ésser un procés endo o exotèrmic depenent de la proteïna en qüestió, o bé de les condicions experimentals, i de la presència en el medi d'algun altre divalent diferent del Ca^{2+} (194,195). Fins al moment, aquest estudi calorimètric de fixació de Tb^{3+} al saA és preliminar i no es coneixen encara les variacions que pot provocar un canvi en les condicions del medi sobre els paràmetres termodinàmics del sistema.

Per últim cal fer esment que disposem d'observacions preliminars que indiquen que l'addició de Ca^{2+} o Tb^{3+} a la PCPA-II no produeix cap absorció o alliberament de calor, almenys utilitzant la tècnica microcalorimètrica aquí descrita. Sembla doncs que el saA podria presentar els llocs de fixació de metalls divalents amagats o deformats dins de la PCPA. Aquest resultat és pràcticament idèntic a l'extret dels experiments de titració de saA i PCPA amb Tb^{3+} seguits per fluorescència (veure apartat RB.8), i reforça de nou la possibilitat que el saA presenti una conformació diferent aïllat que dins de la PCPA.

RB.10.- Tinció específica per a proteïnes fixadores de Ca^{2+} .

Les proteïnes fixadores de Ca^{2+} que pertanyen a la família de les EF-hand, formen un complex característic amb el colorant "Stains-all" desplaçant la banda d'absorció del mateix de 575 nm a 620-640 nm (banda J) (127). La formació d'aquest complex és útil per a identificar proteïnes que pertanyen a l'esmentada família (127,128).

En la figura 66.A es mostra l'absorció a 640 nm de complexos de Stains-all amb el saA comparada amb l'absorció dels formats amb proteïnes patró: calmodulina (CAL) com a patró de la família EF-hand i l'albumina de sèrum boví (BSA) com a patró d'una proteïna no fixadora de Ca^{2+} . Com es pot observar en la figura, el saA es va comportar com una proteïna fixadora de Ca^{2+} , presentant un màxim d'absorció a 625 nm., que augmentà en augmentar la concentració de proteïna fins a 4 µgr/ml, màxim que també dona la calmodulina. Quan s'augmentà més la concentració de proteïna aquests màxims disminuïren, apareixent una banda a 490 nm.

Es pot veure clarament la diferència entre els complexos formats pels membres d'aquesta família de proteïnes fixadores de Ca^{2+} i altres tipus de proteïnes mitjançant l'obtenció d'espectres de diferència, tals com els de la fig. 66.B, enregistrats enfront de colorant sol. El segment d'activació i la calmodulina van presentar un espectre similar amb un màxim d'absorció centrat entre 620-640 nm mentre que la BSA va presentar un màxim a 490 nm.

El fet que el saA formi els mateixos complexos amb aquest colorant que les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand és una prova que aquesta proteïna presenta una relació estructural amb elles malgrat que no s'ha pogut detectar una fixació clara de Ca^{2+} .

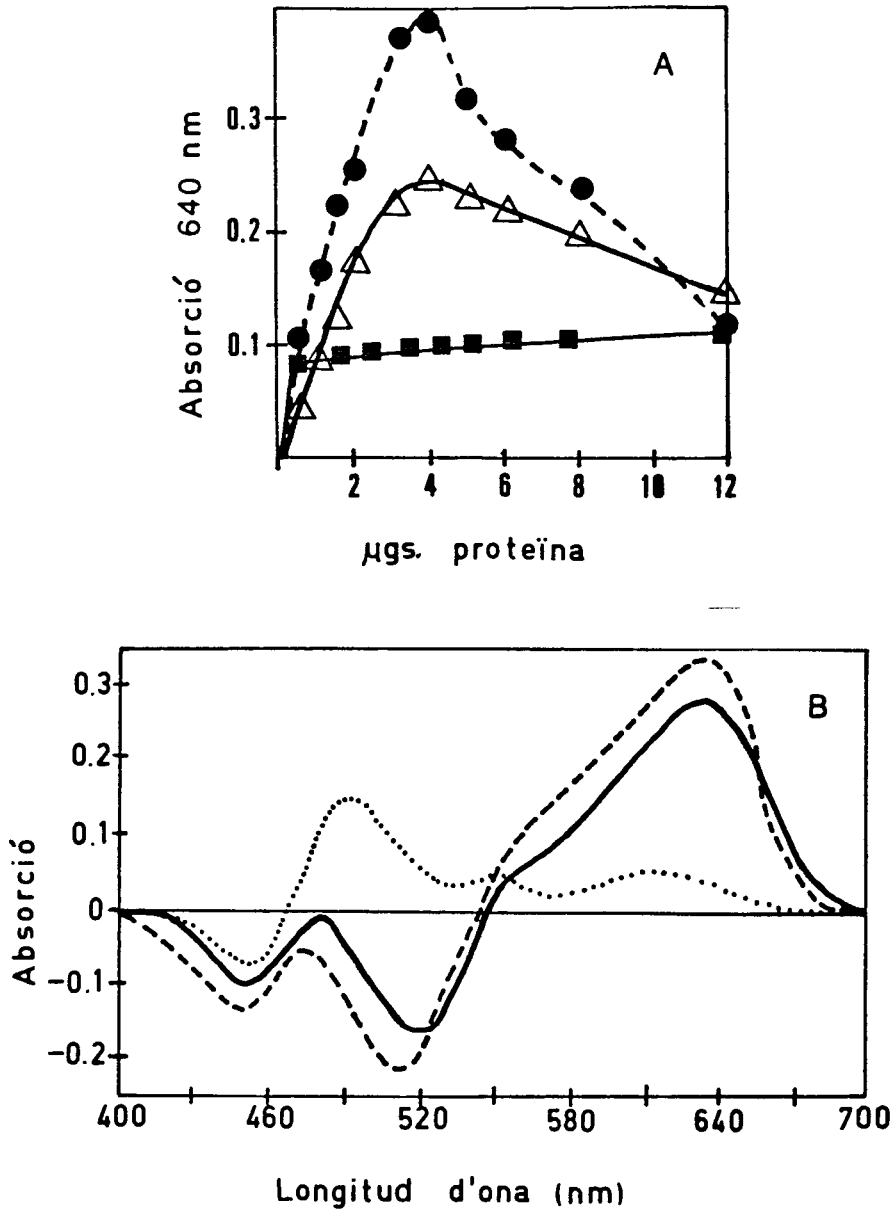


Figura 66.- (A) Increment de l'absorció a 640 nm. del "Stains-all" al 0.001%, en presència de quantitats creixents de CAL (• - •), saR (Δ — Δ) i BSA (■ — ■).

(B) Espectres de diferència dels complexos de "Stains-all" al 0.001% amb CAL (----), saR (—) i BSA (.....) a 4 µgr/ml. de proteïna, enfront de colorant sol. Condicions generals del medi: Tris/HCl 10 mM (pH 8.8), formamida 0.1%, 25°C.

Cal però eliminar la possibilitat que el saA sigui una sialoglicoproteïna o una fosfoproteïna les quals se sap que donen lloc a complexos amb les mateixes propietats espectrals que les EF-hand (127). Per això, es va fer ús del fet que el Ca^{2+} i altres metalls divalents substitutius poden eliminar la banda centrada a 620-640 nm que formen les proteïnes EF-hand amb el "Stains-all"(128). Si aquest fet té lloc en el cas del saA es podrà eliminar la possibilitat que es tracti d'una fosfo o sialoglicoproteïna. Amb aquesta finalitat es van formar els complexos del segment d'activació amb Stains-all en presència d'etilenglicol al 30%, ja que està descrit que en aquestes condicions l'addició del metall no provoca l'agregació del colorant (128), fet que dificultaria l'observació de la formació del complex.

En la Figura 67 es mostren els espectres d'absorció de BSA, CAL i saA acomplexades amb Stains-all, en presència d'etilenglicol al 30%. Com es pot observar el segment d'activació i la CAL van donar un tipus d'espectre molt similar i diferent del presentat per la BSA. En enregistrar aquests mateixos espectres en presència de concentracions creixents de metall divalent, es va trobar que tant el Ca^{2+} com el Tb^{3+} aconseguiren eliminar la banda centrada a 620-640 nm però va caldre 10 vegades més Ca^{2+} que Tb^{3+} perquè desaparegués l'esmentada banda, tant en el cas del saA (Figs. 68 B i 69 B) com de la CAL (Figs. 68 A i 69 A), emprada com a patró. Segons aquest resultat, podem excloure la possibilitat que es tracti d'una fosfo o sialoglicoproteïna, corroborant l'afirmació abans esmentada que el saA és una proteïna estructuralment relacionada amb les de la família d'EF-hand.

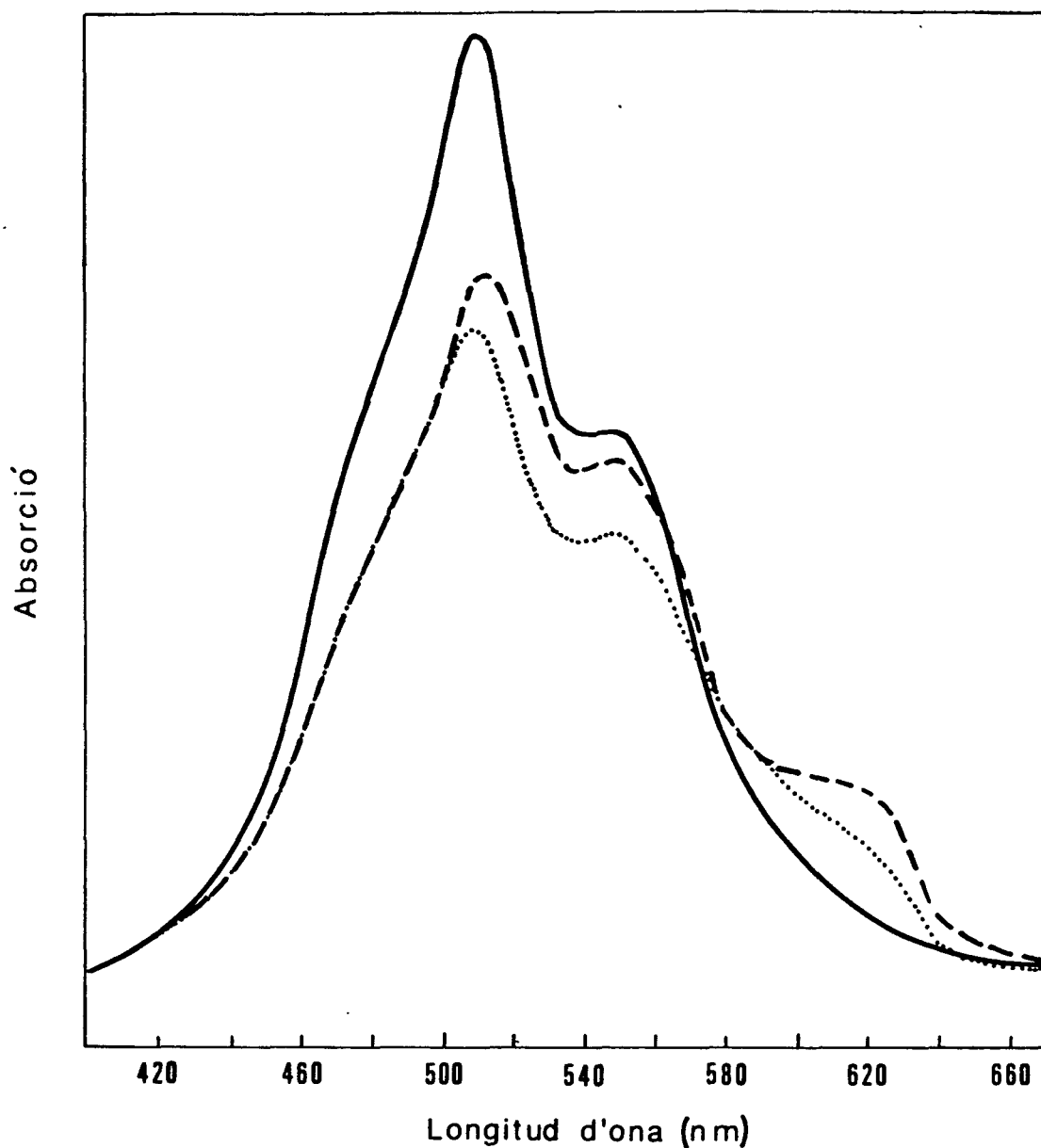


Figura 67.- Comparació dels espectres d'absorció dels complexos Stains-all (0.001%) amb CAL (----), asA (---) i BSA (—) a 8 µg/ml de proteïna en Tris/HCl 10 mM (pH 8.8) i en presència d'etilenglicol al 30%.

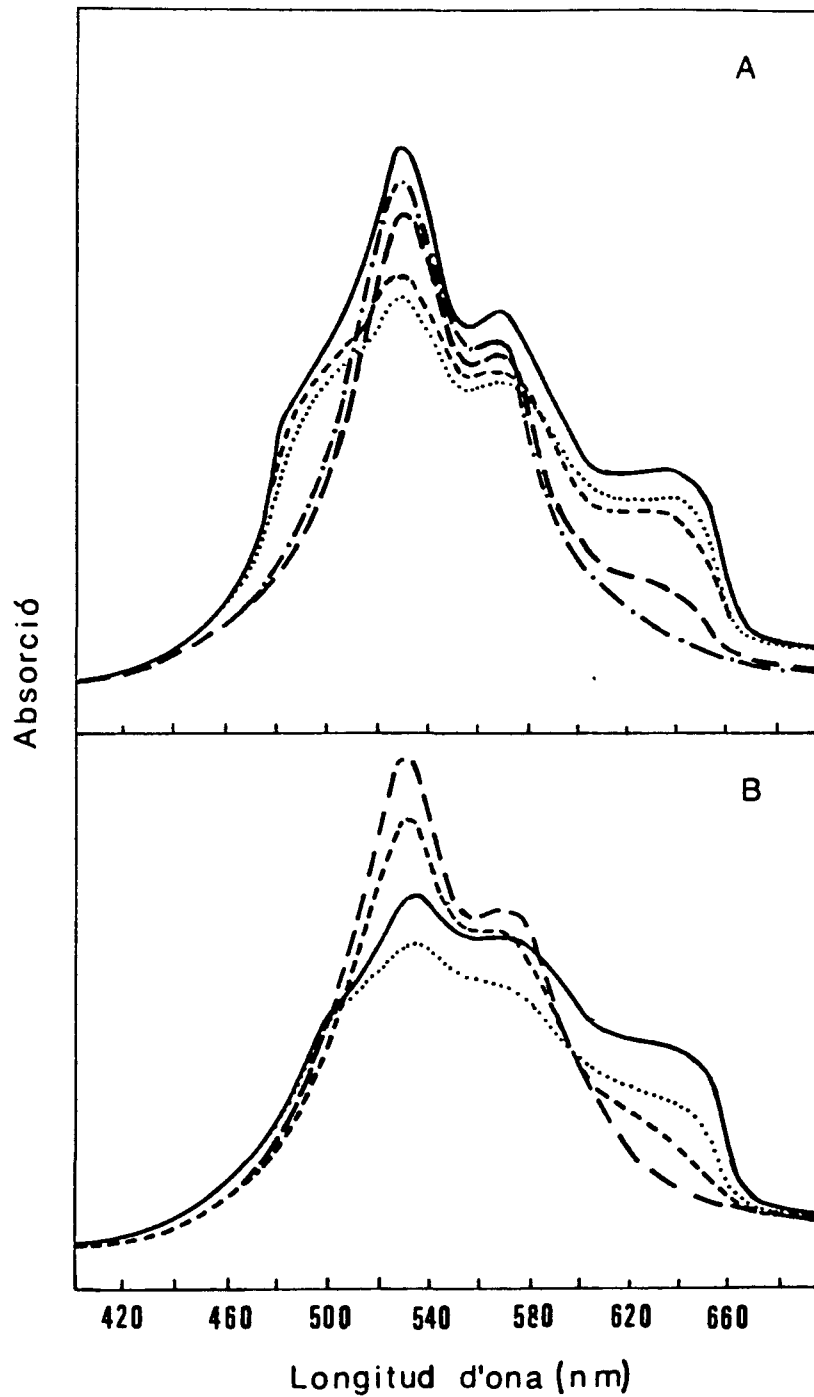


Figura 68.- Efecte del Ca^{2+} sobre els espectres d'absorció dels complexos "Stains-all" amb CAL (A) i saR (B); (—) sense metall; (---) amb Ca^{2+} 0.1 mM; (----) amb Ca^{2+} 1 mM; (— —) amb Ca^{2+} 10 mM; (-·-·-) amb Ca^{2+} 100mM. La concentració de proteïna fou en tots els casos de 8 $\mu\text{g./ml}$.

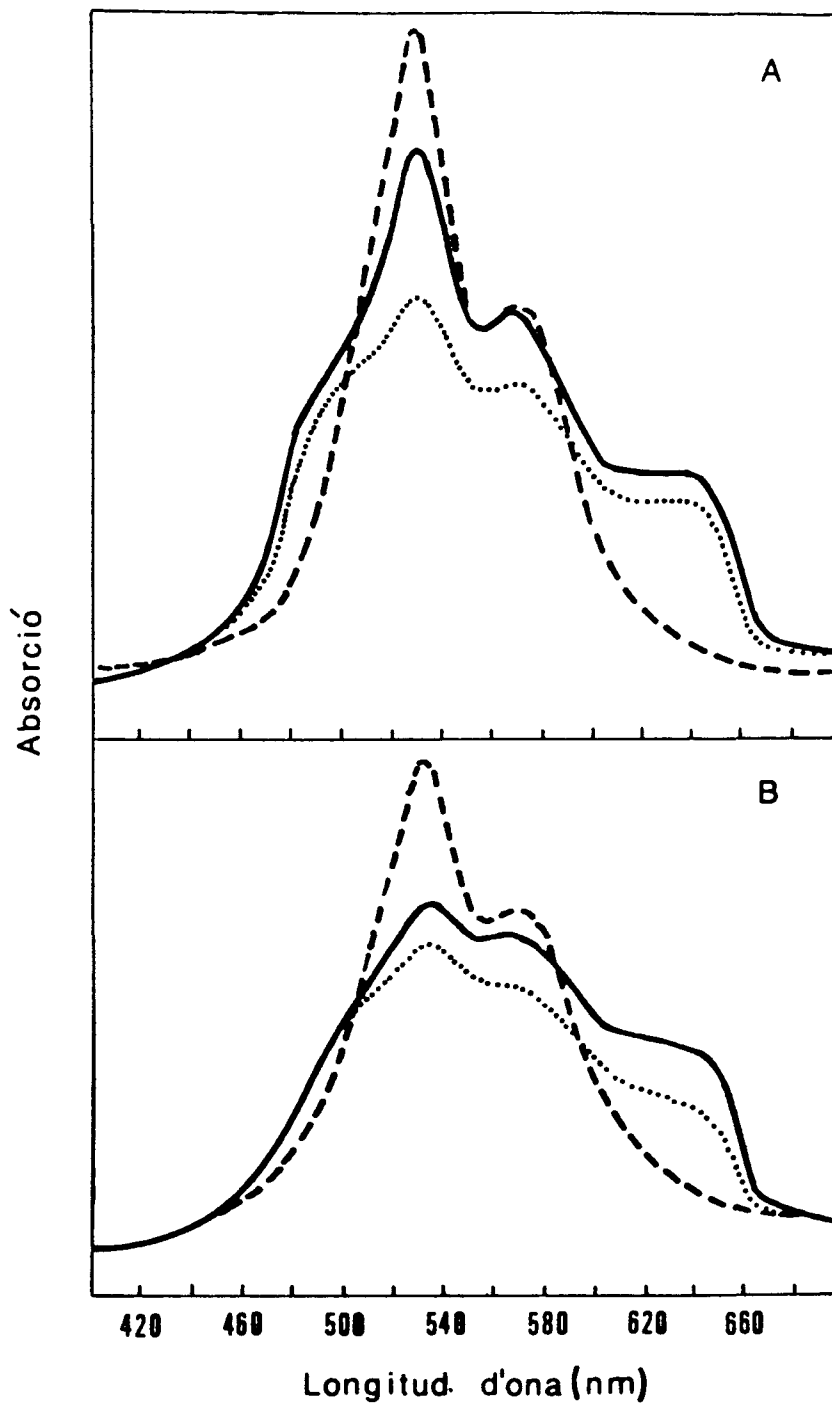


Figura 69.- Efecte del Tb^{3+} sobre els espectres d'absorció dels complexos "Stains-all" amb CAL (A) i saA (B); (—) sense metall; (---) amb Tb^{3+} 0.1 mM; (----) amb Tb^{3+} 1 mM. La concentració de proteïna fou en tots els casos de 8 µg./ml.

Un últim punt important que cal esmentar és que quan la tinció amb "Stains-all" es va repetir amb la PCPA-II, precursora del saA, no s'observà la banda típica de les EF-hand, al voltant de 620-640 nm.. Aquest resultat una vegada més corrobora la hipòtesi que el saA quan s'allibera de la PCPA precursora canvia de conformació adquirint tota la sèrie de propietats descrites que el relacionen amb les proteïnes de la família EF-hand, propietats que no té o com a mínim no manifesta abans d'alliberar-se.

DISCUSSIÓ GENERAL

L'objectiu principal inicial d'aquesta Tesi fou continuar la caracterització estructural del segment d'activació aïllat de la procarboxipeptidasa A, tasca ja endegada al nostre laboratori (18), amb la finalitat última (i per ara llunyana) de comprendre el mecanisme mitjançant el qual aquest segment produeix la inhibició de l'enzim actiu.

Simultàniament el coneixement profund de la interacció segment d'activació-carboxipeptidasa A i de la inhibició d'aquesta podria ajudar a comprendre millor el mecanisme que permet que les procarboxipeptidases A de pàncreas de porc sofreixin activació proteolítica. Aquests proenzims porcins pel fet de presentar una forma monomèrica, de la qual es va poder aïllar el seu segment d'activació, ofereixen clares facilitats en la seva caracterització, respecte a les formes homòlogues d'altres espècies. Cal recordar que la majoria de procarboxipeptidases A de pàncreas de diferents mamífers presenten estructura quaternària que dificulta el seu estudi (41-55).

Cal dir que es coneixen pocs casos de segments d'activació de proenzims la funcionalitat secundària dels quals sigui coneguda (14-17). A més, no s'ha aconseguit d'aïllar cap segment d'activació de les procarboxipeptidases pancreàtiques a part del que és objecte d'estudi en aquest treball. Això fa que no s'hagi pogut investigar directament amb ells i que, per tant, no es conegui si aquests segments un cop alliberats del proenzim presenten una funció específica, secundària, a més de la d'inhibir el proenzim. Aquesta pregunta sorgeix de forma immediata en el cas del saA si es té en compte que conté 94 residus. La seva síntesi sembla un dispendi energètic excessiu si la seva única finalitat és la d'inhibir la PCPA. Existeix la possibilitat que una vegada alliberat del proenzim per proteòlisi limitada, el saA o fragments d'ell tinguin una funció

secundària en l'aparell digestiu (p.e. hormonal, transportadora..etc.), fet comprovat per a altres proteïnes (14-17), o bé que serveixi de senyal per inhibir la síntesi o secreció de nou proenzim (16). També és possible que el saA sigui conseqüència d'un fenomen evolutiu sobtat (p.e. una trasposició gènica) que hagi tingut èxit evolutivament degut pel seus avantatges funcionals malgrat el seu cost.

En treballs previs efectuats en el nostre laboratori es demostrava clarament que aquest segment constitueix un domini estructural amb funcionalitat pròpia dins de la PCPA (18,105), actuant com a inhibidor competitiu de la CPA. Amb els resultats presentats en aquesta Tesi s'aporten evidències que la conformació d'aquest segment (i potser la seva funció) no és la mateixa quan es troba unit a l'enzim actiu formant el proenzim que quan s'aïlla d'aquest. Només cal recordar els resultats de desnaturalització tèrmica i desnaturalització per urea d'ambdues proteïnes, PCPA i saA.

El fet que aquest segment no es comporti igual en una que en l'altra situació pot ésser perquè sofreixi un canvi conformacional que li confereixi unes característiques particulars. Cal recordar que existeixen exemples de sistemes en els quals la proteòlisi limitada a més d'eliminar una obstrucció del centre actiu d'un enzim, pot induir-li un canvi conformacional que el faci més actiu (4,12). Aquest canvi conformacional podria molt bé afectar a la vegada el segment d'activació i l'enzim actiu, canviant les propietats d'un i altre.

Quan es va anar caracteritzant aquest segment d'activació es va trobar que presentava en la seva estructura una absència total de cisteïnes (i per tant de ponts disulfur), un elevat contingut d'aminoàcids àcids i hidrofòbics, particularment fenilalanines, així com un elevat contingut en

hèlix- α (18). Tot això fa que presenti espectres d'absorció i de dicroisme circular a l'ultraviolat semblants als presentats per un grup de proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand. A la vegada s'observà que el saA presenta una elevada resistència a la degradació triptica ja que en el propi procés d'obtenció apareix com a proteïna d'alt pes molecular, malgrat tenir en la seva seqüència molts enllaços peptídics susceptibles a l'atac per la tripsina. Aquesta resistència s'accentua pel saA aïllat quan en el medi s'hi afegeix Tb^{3+} (Vendrell J., resultats no publicats). Aquest segment presenta també una elevada termoestabilitat. Tota aquesta sèrie de característiques esmentades són típiques de les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand.

Un cop es va conèixer la seqüència del saA s'observà que s'hi troben dues regions seqüencialment homòlogues a les regions fixadores de Ca^{2+} de les proteïnes EF-hand. A part de l'homologia seqüencial s'ha trobat un grau d'homologia encara més elevat quant a la seva potencialitat de formació d'estructura secundària. Així, les prediccions d'aquesta, efectuades per diferents mètodes, indiquen clarament que en les regions postulades com a fixadores de Ca^{2+} es presenta la típica estructura de l'EF-hand, és a dir, la seqüència hèlix- α -“loop” (gir- β)-hèlix- α .

Tot això va fer pensar que el segment d'activació de la PCPA podria estar relacionat estructuralment i funcionalment amb les proteïnes d'aquesta família EF-hand. Malgrat totes les característiques comunes esmentades, no s'ha pogut demostrar la principal, la fixació clara de Ca^{2+} .

En canvi sí que es van trobar tota una sèrie de propietats específiques de les proteïnes d'aquesta família tals com són la fixació de Tb^{3+} , substituïnt el Ca^{2+} , amb una afinitat més elevada i la formació de complexos particulars amb el colorant Stains-all.

De tots aquests resultats podem deduir, per tant, que si bé el segment d'activació aïllat de la PCPA monomèrica de pàncreas de porc no forma part de la família EF-hand de proteïnes fixadores de Ca^{2+} , sí que hi està estructural i evolutivament relacionat. Ambdós tipus de proteïnes probablement tenen un origen evolutiu comú.

Cal tenir en compte que entre els mecanisme evolutius més freqüents es troben la duplicació i fusió gènica (12). S'ha demostrat que determinades proteases que presenten alguna altra funció a part de la proteolítica s'han originat per fusió de dos gens que codifiquen per a cada una de les funcions corresponents de la proteïna. Com a exemple clar podem esmentar una proteasa neutra, intracel·lular, depenent de Ca^{2+} , composta per dues subunitats, de les quals la primera presenta 4 dominis estructurals (196). D'aquests dominis, l'anomenat II és una tiol-proteïnasa del mateix tipus que la papaïna i el domini anomenat IV és una proteïna fixadora de Ca^{2+} homòloga a la calmodulina. Dels dos altres dominis no es coneix fins al moment la seva funció..

La subunitat que presenta els 4 dominis estructurals s'ha demostrat a partir d'estudis del gen que la codifica, que s'ha originat per fusió gènica de les 4 seqüències polinucleotídiques que codifiquen els 4 polipèptids que donen lloc a cada unitat funcional (196). A més, en estudiar l'estructura genòmica del domini IV, la regió fixadora de Ca^{2+} , s'ha vist que conté quatre exons, que codifiquen estructures tipus EF-hand, els quals estan separats per introns normalment localitzats en les regions plegades en hèlix- α . Aquesta estructura del gen es consistent amb una duplicació gènica tal com s'ha proposat per les proteïnes de la família EF-hand (187), encara que alguns gens de les proteïnes d'aquesta família no permeten una explicació tan simple ni una coincidència tan elevada

entre unitat funcional i organització dels exons, com la subunitat IV de la proteïna descrita.

En el cas del saA de la PCPA es pot pensar que ha succeït un fet similar, fusionant-se el gen que codifica la regió amb activitat proteolítica (gen de la carboxipeptidasa A) amb el gen que codifica una regió proteica amb capacitat fixadora de Ca^{2+} (gen del segment d'activació). Tal vegada, la proteïna ancestral producte d'aquesta fusió va presentar unes propietats avantatjoses que van afavorir la fixació evolutiva de la fusió: propietats tals com la inhibició primerenca de l'activitat de la CPA i control d'aquesta inhibició per fixació de Ca^{2+} a la regió fusionada amb facilitació de la seva degradació per acció d'altres proteases. Cal no oblidar que el Ca^{2+} és un efector típic de proteases i de sistemes regulats per proteòlisi limitada: serin-proteïnases pancreàtiques, factors de coagulació de la sang, etc. (6-8). De fet, en altres procarboxipeptidases diferents de la porcina (49,55,91), i particularment la de "dogfish" (49), s'ha observat que la presència de Ca^{2+} accelera espectacularment la seva activació proteolítica.

De totes maneres, aquesta funció fixadora de Ca^{2+} podria quedar totalment emmascarada en formar-se la unió CPA-saA, vegada degut al canvi conformacional sofert per aquest últim a fi d'adaptar-se al centre actiu de l'enzim. També és possible que s'hagin produït reordenacions genòmiques o mutacions puntuals que hagin alterat la capacitat fixadora de Ca^{2+} per part d'aquesta proteïna, capacitat que només recuperaria en part en alliberarse de l'enzim actiu.

Fins al moment, no es coneix l'estructura del gen que codifica el saA de la PCPA de pàncreas de porc, però sí el de la PCPA de pàncreas de rata (94). Donada l'elevada homologia entre una i altra seqüència podem

pensar que els resultats trobats per una d'elles poden ésser perfectament aplicables a l'altra. Bé doncs, quan s'estudia la possible relació unitat funcional-organització dels exons en el gen de la PCPA de pàncreas de rata no coincideix el nombre de les regions postulades com a fixadores de Ca^{2+} en el saA amb el nombre i límit dels exons definits (94). Concretament, en la regió pre i proenzimàtica es troben tres exons, dels quals el primer inclou el pèptid senyal i quatre residus de la seqüència propeptídica. El segon exó conté la regió que va del residu 4 al 34 del propèptid i el tercer conté la resta del propèptid a més de 18 aas. de la regió activa o carboxipeptidasa A. Si recordem que les seqüències proposades com a fixadores de Ca^{2+} van del residu 4 al 34 (asA I) i del 55 al 84 (asA II), clarament s'observa que només la primera regió fixadora de Ca^{2+} del saA coincideix exactament amb els exons definits.

De tota manera cal tornar a recordar que algunes de les proteïnes de la família EF-hand tampoc presenten una estructura gènica en exons fàcil de relacionar amb les unitats funcionals o dominis fixadors de Ca^{2+} d'aquestes (197). Concretament i perquè serveixi d'exemple, en la figura 70 es presenta un esquema comparatiu de la correspondència trobada entre unitat funcional i distribució d'intron en el gen de la calmodulina i en el gen que codifica per a la regió pre i proenzimàtica de la PCPA de pàncreas de rata.

En qualsevol cas, si realment la formació del gen de la PCPA s'ha produït per fusió d'un gen d'una proteïna EF-hand i un gen de CPA, i si aquesta fusió ha suposat un guany evolutiu a causa de la capacitat de fixar Ca^{2+} de la nova proteïna, quedaria explicat perquè aquesta presenta un segment d'activació tan llarg.

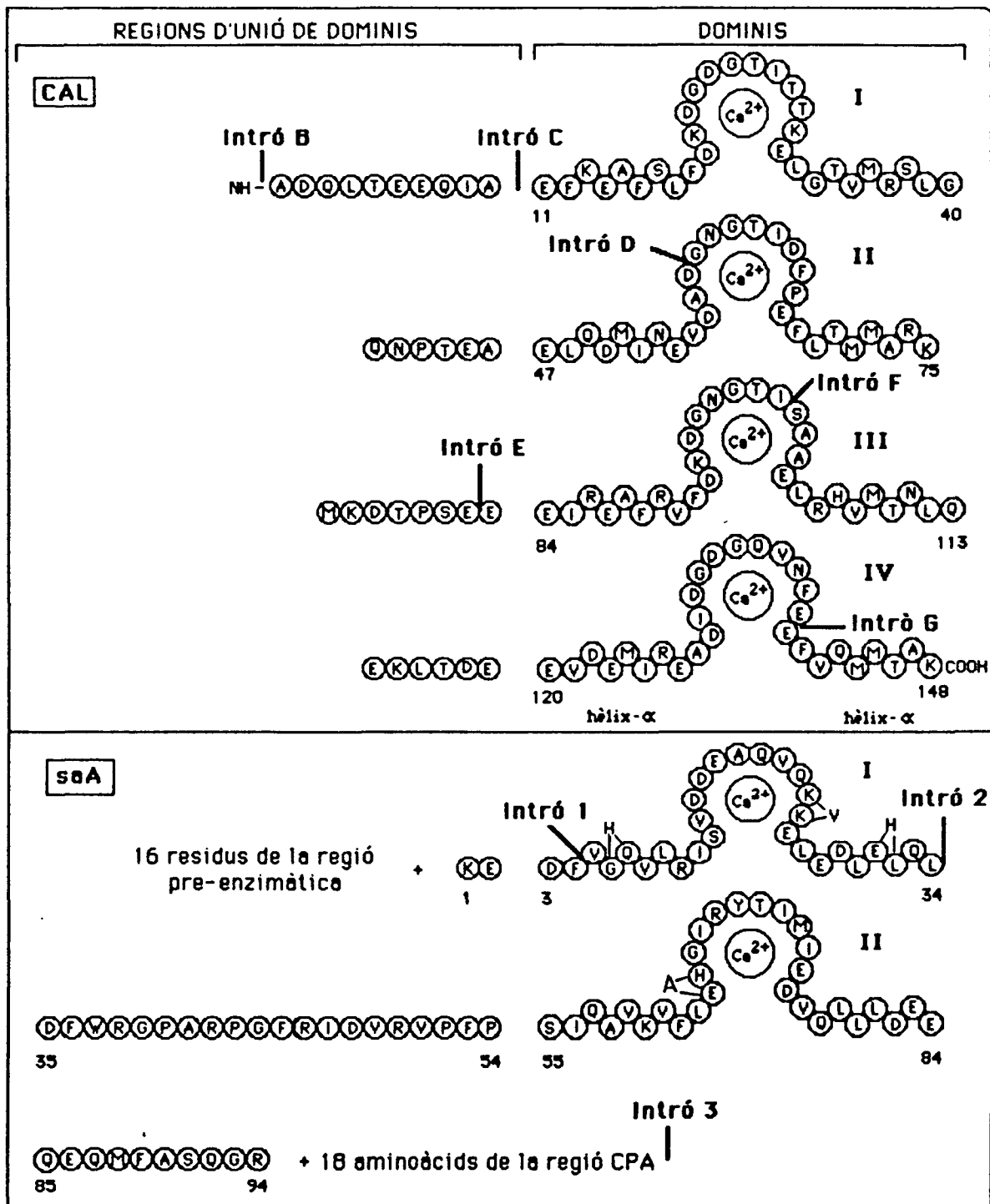


Figura 70.- Localització dels introns dels gens de la calmodulina de pollastre (197) i saA de la PCPA de rata (94) respecte a les unitats funcionals proposades com a llocs de fixació de Ca²⁺ en CAL de rata (199) i saA de la PCPA de pàncreas porcí.

Totes les proteïnes fixadores de Ca^{2+} tipus EF-hand (108) tenen almenys dues regions fixadores del metall per poder transmetre els efectes d'aquest catió, és a dir, requereixen almenys 2×29 residus (més la regió d'unió) per poder efectuar la seva acció. No és per tant estrany que el saA tingui 94 residus si, d'alguna manera, prové d'una proteïna de la família EF-hand. Com a contrast recordem que durant la seva activació els tripsinògens perden 6 aminoàcids de l'extrem N-terminal i els quimotripsinògens, proproteases i proelastases d'11 a 15.

Relacionat amb el fet que el saA presenti dues regions fixadores de Ca^{2+} , és curiós constatar el fet que per microcalorimetria de DSC es detecti un sol domini estructural, una sola transició en el seu desplegament tèrmic. Això semblaria indicar que les dues regions fixadores de Ca^{2+} del saA presenten un plegament depenent una de l'altra. Caldria però observar l'efecte del Ca^{2+} o del Tb^{3+} sobre les corbes de DSC del saA per poder determinar realment el grau de dependència esmentat. Altres proteïnes de la família EF-hand, per exemple la calmodulina, presenten un nombre variable de dominis estructurals definits per calorimetria, segons sigui el seu grau de saturació amb el metall (198). És important indicar que en base a les corbes de titració del saA per Tb^{3+} és podria arribar a obtenir informació sobre el caràcter independent o dependent de la unió d'aquest metall a les dues regions fixadores i sobre la seva interrelació. Aquest estudi, si es vol fer bé, exigeix però dades complementàries, preferiblement obtingudes per altres tècniques tal com l'equilibri de diàlisi. Nosaltres però, i com a primera i més senzilla aproximació, hem aplicat un tractament matemàtic que considera l'existència de dos llocs de fixació independents. Aquest és un punt a revisar i millorar en el futur.

Cal també esmentar que s'ha proposat que la CPA de pàncreas de bou conté tres dominis estructurals en base a estudis cristallogràfics per difracció de Raigs X (69) i en base a prediccions teòriques de l'estructura terciària de la proteïna (70). En canvi, nosaltres en base als experiments de DSC, n'hem trobat només dos en la CPA aïllada de pàncreas porcí. Val a dir que, dels tres dominis predits teòricament per a la CPA de bou, un d'ells és molt petit, i no presenta, amb prou feines, estructura secundària. Això fa pensar que si en la CPA de porc aquest domini es manté, la seva fusió tèrmica pot ésser no detectable per calorimetria o bé que es doni conjuntament amb algun dels altres dos dominis.

Quan s'ha estudiat la coincidència entre els tres dominis proposats per a la CPA de pàncreas de bou i la distribució d'introns i exons que es troba en el gen que codifica la mateixa proteïna en pàncreas de rata, tampoc és evident una correlació clara. Concretament els residus de la CPA considerats com a essencials es troben dispersats en 5 exons diferents sense presentar cap agrupament funcional. A la vegada, en la molècula de CPA tampoc es troba cap correlació entre el plegament secundari que presenta i l'ordenació d'exons (94).

Tot això fa pensar que l'estructura d'aquestes proteïnes, tant la CPA com la PCPA (i per tant el saA) presenta encara tota una sèrie d'incògnites a nivell evolutiu i de la seva relació amb l'estructura gènica que fins al moment no tenen resposta clara.

Referent a la mobilitat conformacional presentada pel saA, fenomen del qual s'han aplegat diversos indicis al llarg del treball presentat en aquesta Tesi, cal recordar que és una propietat no aliena a les proteïnes EF-hand amb les quals se'l pretén emparentar. De les proteïnes d'aquesta família la funció de les quals es coneix, és a dir, la calmodulina i la cadena lleugera de la miosina, se sap que interaccionen amb

altres proteïnes, siguin receptors o subunitats del complex del qual formen part. Aquesta interacció es veu afavorida pel canvi conformacional que sofreixen en fixar el metall i per la seva mobilitat conformacional intrínseca que els permet una adaptació al lloc d'interacció.

Quant a problemàtica sobre la localització espacial del saA respecte a l'enzim actiu i a la subunitat de proproteasa E que acompanya aquest últim en el complex binari (PCPA-I), ha quedat demostrat per electroforesi en gradient d'urea que el segment se situa entre ambdues subunitats, participant de forma secundària en la seva unió. Aquest complex binari, no obstant, també es forma entre la CPA i la PE actives i és més estable que el format entre el saA i la PPE. Aquest resultat indica de forma clara que un cop activat el proenzim binari, la dissociació de les subunitats components no té lloc, punt que en el sistema enzimàtic de pàncreas de bou no quedava clar (88).

Per altra part, el fet que el saA interaccioni amb la PPE dóna una raó per comprendre el diferent procés d'activació triptica que presenta el complex binari respecte a la forma monomèrica en el sistema enzimàtic de la PCPA de pàncreas de porc. Així, l'activació triptica de la PCPA-II (monòmer) és molt més ràpida en els primers estadis que el de la PCPA-I (complex binari), però al cap d'1 a 2 hores d'addicionar la tripsina l'activitat del complex binari es fa més elevada que la de la forma monomèrica (100). Per aconseguir activar completament la PCPA-II cal que el seu segment d'activació deixi de formar complex amb l'enzim actiu. Perquè això succeixi cal, probablement, que el segment d'activació perdi alguns aminoàcids del seu extrem C-terminal ja que sembla ésser que quan aquest segment es presenta en una de les formes de baix pes molecular no es forma el complex CPA-saA, tal com s'ha observat per electroforesi en gradient d'urea (Vendrell J, Vilanova M., resultats no publicats). La pèrdua

d'alguns residus de l'extrem C-terminal pot tenir lloc per acció de la tripsina sobre algun enllaç susceptible d'atac per aquesta proteasa. Si observem la seqüència d'aquesta proteïna es veu que en la posició 25 a partir del C-terminal presenta un enllaç peptídic d'aquestes característiques.

Aquest segon atac per part de la tripsina es pot veure dificultat pel fet de la interacció saA-PPE, interacció que pot ajudar a protegir el segment d'activació. Cal recordar també que aquesta regió C-terminal es troba plegada presentant un elevat potencial formador d'hèlix- α , estructura que dificulta l'acció de les proteases sobretot si a més aquesta regió interacciona amb alguna altra proteïna com podria succeir en el complex binari. Ara bé, quan la PPE s'activa pot ésser que ataquí directament el saA, reduint-lo de mida i facilitant el seu alliberament. En aquest punt és quan s'observaria l'augment d'activitat del complex binari respecte a la forma monomèrica.

Un últim punt posat en evidència de forma lateral en aquesta Tesi, i fins al moment no conegut, és el fet de la formació d'un complex PCPB-PPE. L'existència d'aquest complex, encara que només es pugui obtenir artificialment, i l'estudi de la cinètica d'activació d'aquest permetrà una comparació amb el sistema de la PCPA, comparació que pot ésser útil per comprendre el diferent mecanisme d'activació presentat per una i altra forma de procarboxipeptidasa.

CONCLUSIONS

1.- El segment d'activació de la procarboxipeptidasa A monomèrica de pàncreas de porc presenta una mobilitat estructural i posicional elevada quan es troba unit a l'enzim actiu formant el proenzim.

2.- Un cop alliberat del proenzim aquest segment presenta una conformació diferent, mantenint un elevat grau de flexibilitat conformacional. Aquesta nova conformació li confereix una sèrie de propietats que no presenta quan està unit a l'enzim actiu.

3.- A partir dels estudis de RMN del saA aïllat podem concloure:

a) Aquest segment presenta una estructura globular, la qual es manté en un marge de pH ample, de 5.7 a 13.0. La força iònica no sembla contribuir a l'estructuració d'aquesta proteïna.

b) Els experiments de titració del saA al llarg del pH indiquen una localització superficial dels seus residus d'histidina, residus que presenten un pK_a no pertorbat.

c) El seguiment en funció del pH del desplaçament químic de les ressonàncies de residus apolars pertorbades per corrents d'anell dóna, en la major part del casos, una doble sigmoide que indica l'existència de veïnatges d'aquests residus amb residus histidina i tirosina. Aquestes relacions espacials són de naturalesa complexa, i no s'ha arribat a la seva resolució ni emprant tècniques de pertorbació.

d) L'anàlisi de bescanviables, la iodació d'histidines i la seva deuteració suggereix que el saA aïllat presenta una elevada flexibilitat conformacional.

4.- Experiments d'espectroscòpia de RMN i d'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat confirmen que l'única tirosina del saA presenta un pK_a molt elevat, superior a 11.8. Aquest valor suggereix que el grup fenòlic del residu de tirosina està formant pont d'hidrogen amb algun altre grup o bé que es troba interioritzat.

5.- El saA aïllat presenta una elevada termoestabilitat amb una temperatura mitja de desnaturalització molt superior a la del proenzim. En canvi, aquest últim és, comparativament, més resistent a la desnaturalització per urea. Entre 0 i 9M urea el saA presenta una transició, corresponent a un procés de desnaturalització ràpid en una sola etapa, i amb un punt mig al voltant de 6.5M urea, en canvi, la PCPA no es desnaturalitza en el marge de concentracions d'urea esmentat.

6.- El procés de desnaturalització tèrmica del saA aïllat és totalment reversible, mentre que el del seu proenzim precursor i el de l'enzim actiu només ho són en determinades condicions, sobretot quan la força iònica del medi és baixa i el temps de pertorbació tèrmica curt.

El saA aïllat presenta una termoestabilitat pràcticament constant en un ample marge de pH, que va de pH neutre a pH lleugerament alcalí, al contrari del que succeeix en el cas del proenzim i de l'enzim actiu.

En general la PCPA presenta, en les mateixes condicions del medi, una termoestabilitat lleugerament superior a la CPA. La petita diferència de termoestabilitat entre ambdues no es justifica per la presència en la primera del saA ja que aquest un cop aïllat presenta una termoestabilitat molt superior a la d'ambdues proteïnes. En les corbes de DSC de la PCPA tampoc s'observa cap transició deguda al saA. Tot això indica una diferent conformació per al saA a dins que a fora de la PCPA.

7.- Segons els resultats trobats per microcalorimetria diferencial d'escombrat el saA aïllat presenta una desnaturalització tèrmica que és reversible i de la qual es dedueix que conté un únic domini estructural. En cas que el saA contingui subestructures, com s'hipotetitzarà seguidament, aquestes presenten una desnaturalització no-independent.

8.- L'estructura primària i els potencials de formació d'estructura secundària del saA presenten un grau d'homologia elevat amb l'estructura primària i els potencials de formació d'estructura secundària de les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand. Concretament es postula l'existència en el saA de dues regions fixadores de Ca^{2+} (localitzades del residu 3 al 34 i del residu 55 al 84) homòlogues a les regions fixadores de Ca^{2+} de les proteïnes de l'esmentada família .

9.- El saA, quan es troba aïllat, és capaç de fixar dos àtoms de Tb^{3+} per mol de proteïna les constants d'associació del qual són del mateix ordre que les presentades per les proteïnes de la família EF-hand. En canvi no s'ha trobat una fixació forta de Ca^{2+} al saA, semblant a la que presenten les proteïnes d'aquesta família.

10.- El saA aïllat s'uneix al colorant "Stains-all" produint-li un increment en el seu espectre d'absorció al voltant de 620-640 nm. Aquest increment resulta anul·lat quan s'addiciona Tb^{3+} o Ca^{2+} al medi. Ambdós fenòmens també es donen de forma característica en complexos del colorant amb les proteïnes EF-hand.

11.- Tota la sèrie de propietats trobades en la caracterització estructural i funcional del saA el caracteritzen com a una proteïna relacionada evolutivament amb les proteïnes fixadores de Ca^{2+} de la família EF-hand. Hi ha raons per suposar que els segments d'activació de procarboxipeptidases pancreàtiques podrien tenir funcions relacionades amb les proteïnes fixadores de Ca^{2+} . Aquestes funcions en el cas del saA s'haurien perdut o estarien emmascarades.

Es pot pensar que les procarboxipeptidases s'haurien originat per fusió gènica del gen de la carboxipeptidasa amb un gen que codifica per una proteïna fixadora de Ca^{2+} , fet que permetria el control primari de l'activitat de l'enzim.

12.- Per últim, i referit a tot el sistema enzimàtic de les procarboxipeptidases de pàncreas de porc estudiat, a partir dels experiments d'electroforesi en gradient d'urea es pot arribar a les següents conclusions:

a) L'estabilitat de la PCPA enfront de la desnaturalització per urea és superior a la de la PCPB, succeint el mateix per als respectius segments d'activació.

b) El complex format entre CPA-saA es manté fins arribar a concentracions d'urea de 4M. En canvi, la CPB i el seu segment d'activació no formen complex ni en absència d'urea.

c) El comportament electroforètic i l'estabilitat del complex binari natural (PCPA-I) són els mateixos que els presentats pel complex artificial PCPA-II/PPE.

d) El saA participa directament encara que de forma secundària en la unió PCPA-PPE tant en el complex binari natural com en l'artificial.

Aquesta participació podria explicar l'existència de diferències en el procés d'activació proteolítica dels l'esmentats complexos respecte a la forma monomèrica.

e) S'ha posat en evidència la formació d'un complex entre PCPB i PPE fins al moment no descrit. Aquest complex presenta però una estabilitat molt inferior al format entre PCPA i PPE.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Schimke R.T., Doyle D. (1970) *Annu. Rev. Biochem.* 39, 929-976.
- (2) Ottesen M. (1967) *Annu. Rev. Biochem.* 36, 55-76.
- (3) Stadtman E.R. (1970) *The Enzymes*, ed. Boyer P.D. (Academic Press, NY) 3rd. ed. Vol 1 pp. 397-459.
- (4) Neurath H., Walsh K.A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3825-3832.
- (5) Neurath H. (1975) en *Proteases and Biological Control*, eds. Reich E., Rifkin D.B., Shaw E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor N.Y.) Vol 2, p. 51-64.
- (6) Maroux S., Baratti J., Desnuelle P. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5031-5039.
- (7) Porter R.R. (1981) *Methods in Enzymol.* Vol 80 pp. 3-5.
- (8) Davie E.W. (1981) *Methods in Enzymol.* Vol 80 pp. 153-156.
- (9) Laskowski M Jr., Kato I. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593-612.
- (10) Hass G.M., Ako H., Grahn D.T., Neurath H. (1976) *Biochemistry* 15, 93-100.
- (11) Birk Y. (1976) *Methods in Enzymol.* 45, 695-697.
- (12) Neurath H. (1984) *Science* 224, 350-357.
- (13) Lehninger A.L. (1978) en *Bioenergética*, eds. Omega S.A. Barcelona, p. 164-170.
- (14) Hugli T.E. (1975) en *Proteases and Biological Control* eds. Reich E., Rifkin D.B., Shaw E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor N.Y.) Vol 2 pp 273-290.
- (15) Walsh K.A. (1971) en *Proteases and Biological Control* eds. Reich E., Rifkin D.B., Shaw E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor N.Y.) Vol 2 pp 1-11.
- (16) Abita J.P., Moulin A., Lazdunski M., Hoge G., Palasciano G., Brasca A., Tiscornia D., (1973) *FEBS Lett.* 34, 251-257.
- (17) Dunn B.M., Deyrup C., Hoesching W.G., Gilbert W.A., Nolan A.J., Trach M.L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7269-7275.
- (18) San Segundo B., Martínez M.C., Vilanova M., Cuchillo C.M., Avilés F.X. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 707, 74-80.
- (19) Enfield D.L., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H., Titani K. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 16-19.
- (20) Stenflo J., Fernlund P., Roepstorff P. (1975) *Proteases and Biological Control* eds. Reich E., Rifkin D.B., Shaw E. (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor N.Y.) Vol 2 pp 111-122.
- (21) Grassmann W., Dickerhoff H. (1928) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem* 179, 41-78.
- (22) Barret A.J. (1980) *Fed. Proc.* 39, 9-14.
- (23) Kassel B., Kay J., (1973) *Science* 180, 1022-1027.

- (24) Hanson H., Frohne M. (1976) *Methods in Enzymol.* 45, 504-521.
- (25) Zuber H., Hayashi R. (1976) *Methods in Enzymol.* 45, 561-586
- (26) Yaron A. (1976) *Methods in Enzymol.* 45, 599-609.
- (27) Patterson E.K. (1976) *Methods in Enzymol.* 45, 377-396.
- (28) Brown C.R., Harrison R.A.P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 526, 202-217.
- (29) Starkey P.M., Barret A.J. (1976) *Biochem J.* 155, 273-278.
- (30) Matthews R.A., Alden J.J., Birktoft S.T., Freer J, Krant J. (1977) *J. Biol. Chem.* 256, 8875-8884.
- (31) Keilová H. Turková J. (1970) *FEBS Lett.* 11, 287-288
- (32) Kirschke H. Langer J. Wiederanders B., Ansorge S., Bohley T., Hanson H. (1977) *Acta Biol. Med. Ger.* 36, 185-199.
- (33) Kirschke H., Langer J., Wiederanders B., Ansorge S. (1973) *Eur. J. Biochem* 74, 293-301.
- (34) Reville W.J., Goll D.E., Stromer M.H., Robson R.H., Dayton W.R. (1976) *J. Cell. Biol.* 70, 1-8.
- (35) Drenth J., Jansonius J.N., Koekoek R., Walthers B.G. (1971) *Adv. Prot. Chem.* 25, 79-88.
- (36) Anson M.L. (1940) *J. Gen. Physiol.* 23, 695-704.
- (37) Andreeva N.S., Fedoroc A.A., Gushchina A.E., Riskulov R.R., Schutskever N.E., Safro M.G. (1975) *J. Mol. Biol.* 12, 922-936.
- (38) Blundell T., Sibanda B.L., Pearl L. (1983) *Nature* 304, 273-278.
- (39) Roche S, Voordouw G. (1978) *CRC Critical Rev. in Biochem.* 12, 1-23
- (40) Harris E.D., Cartwright E.C. in *Proteinases in mammalian cell and tissues*, Barret A.J. eds. (1977) Amsterdam North Holland pp 249-283.
- (41) Brown J.R., Cox D.J., Greenshields R.N., Walsh H., Yamasaki M., Neurath H., (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 1554-1559.
- (42) Yamasaki M., Brown J.R., Cox D.J., Greenshields R.N., Wade R.D., Neurath H., (1963) *Biochemistry* 2, 859-866.
- (43) Brown J.R., Greenshields R.N., Yamasaki M., Neurath H (1963) *Biochemistry* 2, 867-876.
- (44) Puigserver A., Desnuelle P. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2442-2445.
- (45) Kobayashi R., Kobayashi Y., Hirs C.H.W. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 2466-2470.
- (46) Kerfelec B, Chapus C., Puigserver A (1985) *Eur. J. Biochem.* 151, 515-519
- (47) Kobayashi R., Kobayashi Y., Hirs C.H.W. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5526-5530.
- (48) Martínez M.C., Avilés F.X., San Segundo B., Cuchillo C.M. (1981) *Biochem J.* 197, 141-147.

- (49) Lacko A.G., Neurath H., (1970) *Biochemistry* 9, 4680-4690.
- (50) Reeck G.R., Winter W.P., Neurath H. (1970) *Biochemistry* 9, 1398-1403.
- (51) Marchis-Mouren G., Charles M., Ben Abdeljlil A., Desnuelle P. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 50, 186-188.
- (52) Yoneda T. (1980) *Comp. Biochem. Physiol.* 67, 81-86.
- (53) Kim W.J., White T.T. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 242, 441-445.
- (54) Wintersberger E., Cox D.J., Neurath H. (1962) *Biochemistry* 1, 1069-1078.
- (55) Reeck G.R., Neurath H. (1972) *Biochemistry* 11, 3947-3955.
- (56) Gates B.J., Travis J. (1973) *Biochemistry* 12, 1867-1876.
- (57) Zwilling R., Jakob F., Bauer H., Neurath H. (1979) *Eur. J. Biochem.* 91, 223-229.
- (58) Hass G. M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 247-252.
- (59) Breddam K., Bazzone T.J., Holmquist, Vallee B.L. (1979) *Biochemistry* 18, 1563-1571.
- (60) Waldschmidt-Leitz E., Purr A. (1979) *Ber. Dent. Chem. Ges.* 62, 2217-2224.
- (61) Keller R.J., Cohen E., Neurath H. (1956) *J. Biol. Chem* 223, 457-464.
- (62) Blackburn S. (1976) en "Enzyme Structure and Function" Vol. 3 p. 169. Marcel Dekker ed. (NY).
- (63) Bradshaw R.A., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 1389-1394.
- (64) Vallee B.L., Neurath H., (1954) *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 5006-5011.
- (65) Rupley J.A., Neurath H. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 609-615.
- (66) Coleman T.E., Vallee B.L. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 390-395.
- (67) Vallee B.L., Rupley J.A., Coombs T.L., Neurath H., (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 64-69.
- (68) Lipscomb W.N., Hartuck J.A., Reek G. N., Quioco F.A., Bethge P.H., Ludwig M.L., Steitz T.A., Muirhead H., Coppola J.C. (1968) *Brookhaven Symp. Biol.* 21, 24-29.
- (69) Liljas A., Rossman M.G., (1974) *Annu. Rev. Biochem.* 43, 475-507.
- (70) Wodak S.J., Janin J., (1981) *Biochemistry* 20, 6544-6552.
- (71) Quioco F.A., Lipscomb W.N. (1971) *Adv. Prot. Chem* 25, 1-14.
- (72) Hartsuck J.A., Lipscomb W.N. (1977) *The Enzymes* 3rd ed. Vol 3 P.D. Boyer Ed. Academic Press NY. p 1.
- (73) Ludwig M.L., Lipscomb W.N. (1973) *Inorganic Biochemistry* Vol 1, G. Eichhorn Ed. Elsevier Amsterdam p. 438
- (74) Rees D.C., Lipscomb W.N. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5455-5460.
- (75) Rees D.C., Lipscomb W.N. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4633-4638.

- (76) Rees D.C., Lipscomb W.N. (1982) *J. Mol. Biol.* 160, 475-498.
- (77) Coleman J.E., The Reactivities of Functional Groups of Metalloproteins (1970) NTP International Reviews of Science- Biochemistry Series vol 1, Butterworths University Parck Press p 194.
- (78) Koshland D.E. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44, 98-103.
- (79) Auld D.S., Holmquist B. (1974) *Biochemistry* 13, 4355-4362.
- (80) Vallee B.L., Galdes A., Auld D.S., Riordan J.F. (1983) Metal Ions in Biology Vol 5, T.G. Spiro Ed. Wiley NY, p 26.
- (81) Gardell S.J., Craik Ch. S. Hilvert D., Urdea M.S., Rutter W.J. (1985) *Nature* 317, 551-555.
- (82) Monzigo A.F., Matthews B.W. (1984) *Biochemistry* 23, 5724-5729.
- (83) Bauer R., Christensen C., Johansen J.J., Bethune J.L., Vallee B.L. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 697-702.
- (84) Galdes A., Auld D.S., Vallee B.L. (1983) *Biochemistry* 22, 1888-1895.
- (85) Uren J.R., Neurath H. (1974) *Biochemistry* 13, 3512-3520.
- (86) Freisheim J.H., Walsh K.A., Neurath H. (1967) *Biochemistry* 6, 3010-3019.
- (87) Freisheim J.H., Walsh K.A., Neurath H. (1967) *Biochemistry* 6, 3020-3028.
- (88) Kerfelec B., Chapus C., Puigserver A. (1984) *Biochim. Biophys. Res. Commu.* 121, 162-167.
- (89) Brown J.R., Yamasaki M., Neurath H. (1963) *Biochemistry* 2, 877-886.
- (90) Puigserver A., Desnuelle P. (1977) *Biochemistry* 16, 2497-2501.
- (91) Uren J.R., Neurath H. (1972) *Biochemistry* 11, 4483-4492.
- (92) Piras R., Vallee B.L. (1967) *Biochemistry* 6, 348-357.
- (93) Behnke W.D., Vallee B.L. (1972) 69, 2442-2445.
- (94) Quinto C., Quiroga M., Swain W.F., Nikovits W.C. jr., Standring D.N., Pictet R.L., Valenzuela P., Rutter W.J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 31-35.
- (95) Folk J.E. , Schirmer E.W. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3884-3894.
- (96) Vilanova M., Vendrell J., López M.T., Cuchillo C.M., Avilés F.X. (1985) *Biochem J.* 229, 605-609.
- (97) Kobayashi R., Kobayashi Y., Hirs C.H.W. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 2460-2465.
- (98) Martínez M.C., Nieuwenhuyen P., Clauwaert J., Cuchillo C.M. (1983) *Biochem J.* 215, 23-27.
- (99) Vilanova M. Tesina de Llicenciatura. Març 1981. Univertitat Autònoma de Barcelona.
- (100) Vendrell J., Avilés F.X., San Segundo B., Cuchillo C.M. (1982) *Biochem J.* 205, 449-452.

- (101) Avilés F.X., Vendrell J., Burgos F.J., Soriano F., Méndez E. (1985) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 130, 97-103.
- (102) Koide A., Yoshizawa M. (1981) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 100, 1091-1098.
- (103) Homandberg G.A., Peanasky R.J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2226-2233.
- (104) Vendrell J., resultats no publicats.
- (105) Avilés F.X., San Segundo B., Vilanova M., Cuchillo C.M., Turner C. (1982) *FEBS Lett.* 149, 257-260.
- (106) Vendrell J., Avilés F.X., San Segundo B., Genescà E., Soriano F., Méndez E. (1986) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, en premsa.
- (107) Kretsinger R.H. (1976) *Annual Rev. Biochem.* 45, 238-266.
- (108) Kretsinger R.H. (1980) *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 8, 119-174.
- (109) Gariépy J., Hodges R.S. (1983) *FEBS Lett* 160, 1-6.
- (110) Moews P.C., Kretsinger R.H. (1975) *J. Mol. Biol* 91, 701-712.
- (111) Kretsinger R.H., Barry C.D. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 405, 40-52.
- (112) Fullmer C.S., Wasserman R.M., Hamilton J.W., Huang W.Y. Cohn D.V. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 412, 256-261.
- (113) McCubbin W.D., Kay C.M. (1985) *Can. J. Biochem and Cell Biol.* 63, 812-823.
- (114) Guerini D., Krebs J. (1983) *FEBS Lett.* 164, 105-110.
- (115) Brzeska H., Venyaminov S.V., Gravarek Z., Drabikowski W. (1983) *FEBS Lett.* 153, 169-173.
- (116) O'Neil J.D.J., Dorrington K.J., Hofmann T. (1984) *Can. J. Biochem. and Cell Biol.* 62, 434-442.
- (117) Kolhoffer M-C., Gerard D., Demaille J.G. (1980) *FEBS Lett.* 120, 99-103.
- (118) Chiba K., Ohayashiki T., Mohri T. (1984) *J. Biochem.* 95, 1767-1774.
- (119) Rhee M-J., Sudnick D.R., Arkle V.K. Horrock Jr. W de W. (1981) *Biochemistry* 20, 3328-3334.
- (120) Shelling J.G., Hofmann T., Sykes B.D. (1985) *Biochemistry* 24, 2332-2338.
- (121) Masura H.R., Head J.F., Tice H.M. (1984) *Biochem J.* 218, 691-696.
- (122) Mani R.S., Kay C.M. (1983) *Biochemistry* 22, 3902-3907.
- (123) Berchtold W.M., Heizmann C.W., Willson K.J. (1983) *Anal. Biochem.* 129, 120-131.
- (124) Guerini D., Krebs J. (1985) *Anal. Biochem.* 150, 178-187.
- (125) Vogel H.J., Lindahl L., Thulin E. (1983) *FEBS Lett.* 157, 241-246.
- (126) Tanaka T., Umekawa H., Ohmura T., Hidaka H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 787, 158-164.

- (127) Campbell K.P., MacLennan D.H., Jorgensen A.D. (1983)
J. Biol. Chem 258, 11267-11273.
- (128) Caday C.G., Steiner R.F. (1985) J. Biol. Chem 260, 5985-5990.
- (129) Klevit R.E., Dalgarno D.C., Levine B.A., Williams R.J.P. (1984)
Eur. J. Biochem. 139, 109-114.
- (130) Shelling J.G., Sykes B.D., O'Neil J.D.J., Hofmann T. (1983)
Biochemistry 22, 2649-2654.
- (131) Pfyffer G.E., Haemmerli G., Heizmann C.W. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6632-6636.
- (132) Laemmli V.K. (1970) Nature 227, 680-685.
- (133) Hashimoto F., Tsuneyoshi H., Kanbayashi H., Yoshida K. Sugano H.
(1983) Anal. Biochem. 129, 192-199.
- (134) Creighton T.E. (1979) J. Mol. Biol. 129, 235-264.
- (135) Folk J.E., Piez K.A., Carrol W.R., Gladner J.A. (1960)
J. Biol. chem. 235, 2272-2277.
- (136) Schuwert G.W., Takenaka Y. (1955) Biochim. Biophys. Acta 16,
570-576.
- (137) Herskovits T.T. (1967) Methods in Enzymology 11, 748-769.
- (138) Donovan J.W. (1973) Methods in Enzymology 27, 497-523.
- (139) Brandts J.F., Kaplan L.J. (1973) Biochemistry 12, 2111-2119.
- (140) Nicola N.A., Leach S.J. (1976) Int. J. Peptide and Protein Res. 8,
393-398.
- (141) Butler W.L. (1979) Methods in Enzymology 56, 501-515.
- (142) Horwitz J., Striakland E.H., Billups C. (1970) J. Amer. Chem. Soc. 92,
2119-2129.
- (143) Padrós E., Morros A, Mañosa J., Duñach M. (1982) Eur. J. Biochem. 127,
117-122.
- (144) Reinhard B., Günther H. (1983) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 22,
350-380.
- (145) Opella S.J. (1977) Science 198, 158-165.
- (146) Campbell I.D., Dobson C.M. (1979) Methods of Biochem. Anal. 25,
55-87.
- (147) Gadian D.G. (1982) en "Nuclear Magnetic Resonance and its
applications to living systems" Clarendon Press. Oxford.
- (148) Wütrich K. (1976) NMR in Biological Research, Peptides and Proteins.
North Holland. Amsterdam.
- (149) Wütrich K. (1974) Experientia 30, 577-584.
- (150) Campbell I.D., Dobson C.M., Williams R.J.P. Zavier A.V. (1973) J. Mag.
Res. 11, 172-181.
- (151) Chapman G.E., Hartman P.G., Cary P.D., Bradbury E.M., Lee D.R. (1978)
Eur. J. Biochem. (1978) 86, 35-44.

- (152) Pesce A.J., Rosén C-G., Pasby T.L. (1971) Fluorescence Spectroscopy. Marcel Dekker Inc. New York.
- (153) Richardson F.S. (1982) Chemical Reviews 82, 541-552.
- (154) Haiech J., Klee C.B., Demaille J.G. (1981) Biochemistry 20, 3890-3897.
- (155) Froser R.D., Suzuki E. (1973) en "Physical Principles an Techniques of Protein Chemistry (S.J. Leach Ed.) Part C p. 301-357, Academic Press (NY).
- (156) Thiers R.E. (1957) Methods of Biochem. Anal. 5, 272-335.
- (157) Vallee B.L., Galdés A. (1984) Adv. Enzymol. 45, 288-289.
- (158) Langerman N., Biltonen R.L. (1979) Methods in Enzymology 61, 261-319.
- (159) Woledge R.C. (1977) en "Application of calorimetry in life sciences ". Lamprecht I. and Scharschmidt B. eds. Berlin p.183-187.
- (160) Fulling R. (1974) Diplomarbeit Munster.
- (161) Bjurulf C., Laynez J., Wadsö I. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 47-52.
- (162) Privalov P.L. (1979) Adv. Prot. Chem. 33, 167-241.
- (163) Privalov P.L. (1982) Adv. Prot. Chem. 35, 1-104.
- (164) Mateo P.L. (1984) en "Thermochemistry and its applications to Chemical and Biochemical Systems" (da Silva R. eds.) pp. 541-569 Reidel Publishing Co. Holland.
- (165) Donovan J.W. (1984) TIBS 54, 340-344.
- (166) Cutting J.A. (1984) Methods in Enzymology 104, 451-455.
- (167) Chou P.Y., Fasman G.D. (1978) Adv. Enzymol. 47, 45-141.
- (168) Chou P.Y., Fasman G.D. (1979) Biophys. J. 26, 365-383.
- (169) Garnier J. (1978) J. Mol. Biol. 120, 97-120.
- (170) Kyte J., Doolittle R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132.
- (171) Sweet R.H., Eisenberg D. (1983) J. Mol. Biol. 171, 479-488.
- (172) Hopp T.P., Woods K.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3824-3828.
- (173) Pongor S., Szalay A.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 366-370.
- (174) Goldenberg D.P., Creighton T.E. (1984) Anal. Biochem. 138, 1-18.
- (175) Vallee B.L., Rupley J. A., Coombs T.L., Neurath H., (1960) J. Biol. Chem. 235, 64-71.
- (176) Felber J.P. Coombs T.L., Vallee B.L. (1962) Biochemistry 1, 231-238.
- (177) Dixon-Webb "The Enzymes" (1979) Longman-Group Lim. (London) Academic Press. New York.
- (178) Privalov P.L., Mateo P.L., Khechinashvili N.N., Stepanov V., Revina L. (1981) J. Mol. Biol. 152, 445-464.
- (179) Kwoles P.F., Marsh D., Rattle H.W.E. (1976) en "Magnetic Resonance of Biomolecules" J. Wiley & Sons, London.

- (180) Hochschwender S.M., Laursen R.A., De Marco A., Llinas M. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 223, 58-67.
- (181) Crane-Robinson C., Privalov P.L. (1983) Biopolymers 22, 113-118.
- (182) Turner C., Cary P.D., Grego B., Hearn M.T.V., Chapman G.E. (1983) Biochem J. 213, 107-113.
- (183) Bradbury E.M., Cary P.D., Chapman G.E., Crane-Robinson C., Dandy S.E., Rattle H.W.E., Boulik M., Palau J., Avilés F.X. (1975) Eur. J. Biochem. 52, 605-613.
- (184) Crane-Robinson C., Dandy S.E., Bradbury E.M., Garel A., Kovacs A., Champagne M., Danne M. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 379-388.
- (185) Markley J.L. (1975) Biochemistry 14, 3546-3554.
- (186) Holmquist B., Vallee B.L. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4601-4607.
- (187) Desplan C., Heidmann O., Lillie J.W., Auffray Ch., Thomasset H. (1983) J. Biol. Chem. 258, 13502-13505.
- (188) Wallace R.W., Tallant E.A., Dockter M.E., Chang W.Y. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1845-1854.
- (189) Donato H., Martin R.B. (1974) Biochemistry 13, 4575-4579.
- (190) Mani R.S., Shelling J.G., Sykes B.D., Kay C.M. (1983) Biochemistry 22, 1734-1740.
- (191) Seamon K.B. (1980) Biochemistry 19, 207-215.
- (192) Gusev N.B., Barskaya N.V. (1984) Biochem J. 220, 315-320.
- (193) Buerkler J., Kerbs J. (1985) FEBS Lett. 182, 167-170.
- (194) Kometani K., Yamada K. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commu. 114, 162-167.
- (195) Tanokura M., Yamada K. (1984) J. Biochem. 95, 643-649.
- (196) Emori Y., Ohno S., Tobita M., Suzuki K. (1986) FEBS Lett. 194, 249-252.
- (197) Simmen R.C., Tanaka T., Ts'ui K.F., Putkey J.A., Scott M.J., Lai E.C., Means A.R. (1985) J. Biol. Chem. 260, 907-912.
- (198) Permyakov E.A., Shnyrov V.L., Kalinichenko L.P., Nicolai Y.D. (1985) Biochim. Biophys. Acta 830, 288-295.
- (199) Means A.R. (1981) Recent Prog. Horm. Res. 37, 333-367.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BARCELONA

BIBLIOTECA T UAB
768

REG. 137.144

SIG.

