

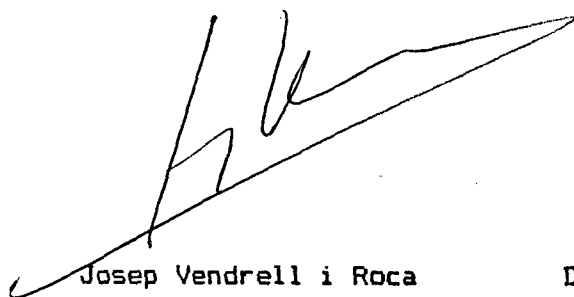


DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAT DE CIÈNCIES  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**PROCARBOXIPEPTIDASA A PORCINA:  
PROCÉS D'ACTIVACIÓ I ESTRUCTURA PRIMÀRIA  
DEL SEGMENT ALLIBERAT DURANT LA CONVERSIÓ DEL  
ZIMÒGEN EN ENZIM ACTIU.  
DESENVOLUPAMENT DE MÈTODES ANALÍTICS COMPLEMENTARIS**

Tesi presentada per adquirir el grau de Doctor en Ciències Químiques per JOSEP VENDRELL i ROCA, llicenciat en Ciències Químiques.

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



Josep Vendrell i Roca



Dr. Francesc X. Avilés i Puigvert

Bellaterra, 3 d'abril de 1987

### **III. RESULTATS I DISCUSSIÓ**



### III.1. HPLC DE PROTEÏNES I PÈPTIDS

La tècnica de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) ha estat amplament utilitzada al llarg d'aquest treball. Com es deia a la Introducció, aquesta Tesi té una important component metodològica que es concreta en el desenvolupament de mètodes generals de cromatografia de HPLC. En aquest apartat es descriu allò que fa referència a la separació analítica i preparativa de pèptids i proteïnes.

La tècnica de HPLC s'ha convertit actualment, pel que respecta a l'anàlisi i purificació de pèptids, gairebé en indispensable quan cal afrontar el problema de la seva seqüenciació i es disposa de poca quantitat de mostra. Amb aquest objectiu, s'ha treballat en la posta a punt de mètodes que donessin el màxim rendiment i eficàcia a la separació de pèptids producte de diferents digestions enzimàtiques de la proteïna que ens interessava seqüenciar, el segment d'activació de la PCPA de pàncreas de porc.

L'interés que ens oferia el camp de les proteïnes era de caire més general. Es partia, per un cantó, d'una informació molt menys que exhaustiva i contrastada sobre l'aplicació de la HPLC a aquestes macromolècules. Per altra banda, estàvem interessats en trobar condicions que podessin ajudar a un posterior estudi sistemàtic d'aïllament i caracterització de les proteïnes amb què treballa el nostre grup: les procarboxipeptidases pancreàtiques. Es va considerar convenient fer un estudi ample de condicions cromatogràfiques idònies per a proteïnes patró en general i per a les procarboxipeptidases en particular, posant especial èmfasi en la dependència de la recuperació en diversos paràmetres cromatogràfics.

Un darrer objectiu concret fou la posta a punt d'un mètode d'aïllament preparatiu del segment d'activació per HPLC, amb l'objectiu de resoldre els problemes inherents a la seva obtenció per cromatografia de bescanvi iònic a pressió atmosfèrica. Més tard, els mètodes preparatius es van estendre a l'aïllament de fragments del segment produïts durant la progressió del procés d'activació.

### III.1.1. ESTUDI DE CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES PER A PROTEINES

Durant el transcurs d'aquest treball es va disposar només de columnes de fase reversa per a la cromatografia de proteïnes. Aquest suport cromatogràfic, molt ben estudiat en el cas de pèptids, no ho és tant en el de les proteïnes; tot i això, s'ha de partir de certs conceptes generals ben establerts.

Se sap (Rubinstein et al., 1979) que certes proteïnes com quimotripsinògen i RNasa A es fixen irreversiblement a suports clàssics per a pèptids, com una columna de C-18, de 100 Å de diàmetre de porus. Aquestes evidències i altres permeteren establir que el diàmetre de porus adequat per a proteïnes és de 300 Å (Lewis et al., 1980) i que és convenient emprar cadenes hidrocarbonades més curtes que les C-18. Estudis posteriors demostraren que la recuperació i la resolució de proteïnes de pes molecular superior a 15.000 millora molt al canviar un suport de 100 Å per un altre de 300 Å (Wilson et al., 1982). En base a això es va utilitzar només columnes de 300 Å de diàmetre de porus. D'elles, una era una C-3 (Ultrapore, Beckman) i dues eren C-4 (Vydac TR-P4, Separation Systems, i Nucleosil, Mackerey-Nagel). La més profusament emprada fou la Ultrapore de la casa Beckman, una columna de 10 cm de llargada. S'ha comprovat (Pearson et al., 1982) que la llargada de les columnes només té importància quant a la capacitat de càrrega, però no quant a la resolució; per exemple, una columna cinc vegades més llarga que una altra de referència només era capaç d'incrementar la resolució de dues proteïnes patró en un 13%. L'aventatja de les columnes curtes és que les pressions de treball són més baixes, el que perllonga la seva vida.

Els dissolvents orgànics més utilitzats amb proteïnes són l'acetonitril i l'isopropanol. Aquest darrer no permet obtenir tant bones resolucions com l'acetonitril (Regnier, 1983), però en canvi resulta millor per eluir proteïnes amb elevada afinitat pel suport hidrocarbonat com la ovoalbúmina (Cohen et al., 1984). A la fase mòbil s'utilitza majoritàriament una petita proporció de TFA que, a més de permetre treballar en pH àcid i comportar-se com un excel·lent

solubilitzador de proteïnes, sembla ser que actúa com un agent d'ion pairing que s'acomplexa amb les proteïnes i modifica la seva interacció amb les columnes (Bennett et al., 1980). La literatura conté també exemples d'utilització d'altres àcids com el fosfòric, sol o amb trietilamina, formant fosfat de trietilamina.

En aquest treball s'ha comprovat la utilitat dels sistemes descrits i s'ha estès l'estudi a separacions cromatogràfiques a pH intermedi amb diversos sistemes amortidors. Cadascún dels apartats descrits s'encapçala amb la composició de la solució inicial seguida de la corresponent a la solució d'elució.

#### III.1.1.a. H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% / ACETONITRIL 80% + TFA 0,1%

El sistema acetonitril-TFA és el més universalment emprat en cromatografia en fase reversa. Aplicat a proteïnes patró va donar resultats satisfactoris per ribonucleasa A, citocrom C, lisozima i carbònic anhidrasa, i una recuperació baixa per ovoalbúmina. A la Figura III.1 (a) es presenta un cromatograma de proteïnes patró entre les que s'inclou l'ovoalbúmina. Es pot comprovar que la senyal deguda a aquesta darrera és força més baixa que les demés, malgrat que la quantitat aplicada és superior. Regnier (1983) ja comentava que la ovoalbúmina era la proteïna més difícil de recuperar quantitativament d'una columna de fase reversa. Per la seva banda, Cohen et al. (1984) observaven que l'isopropanol era un millor eluent de proteïnes hidrofòbiques que l'acetonitril, ja que en aquest darrer cas el temps de retenció i les pèrdues de proteïna per adsorció baixaven considerablement. Aquestes evidències van induir-nos a posar l'atenció sobre la relació entre el temps de retenció i la recuperació, com veuren més endavant.

Malhauradament, no va ser possible observar cap mena de recuperació per la PCPA en aquest sistema cromatogràfic (Figura III.1 (c)). La PCPA uneix a la seva qualitat de proteïna àcida (i per tant poc carregada a pH baix) el fet de ser força voluminosa. Les dues característiques, hidrofobicitat i voluminositat, han de ser les causants de la seva interacció irreversible amb la matriu cromatogràfica, al menys amb els

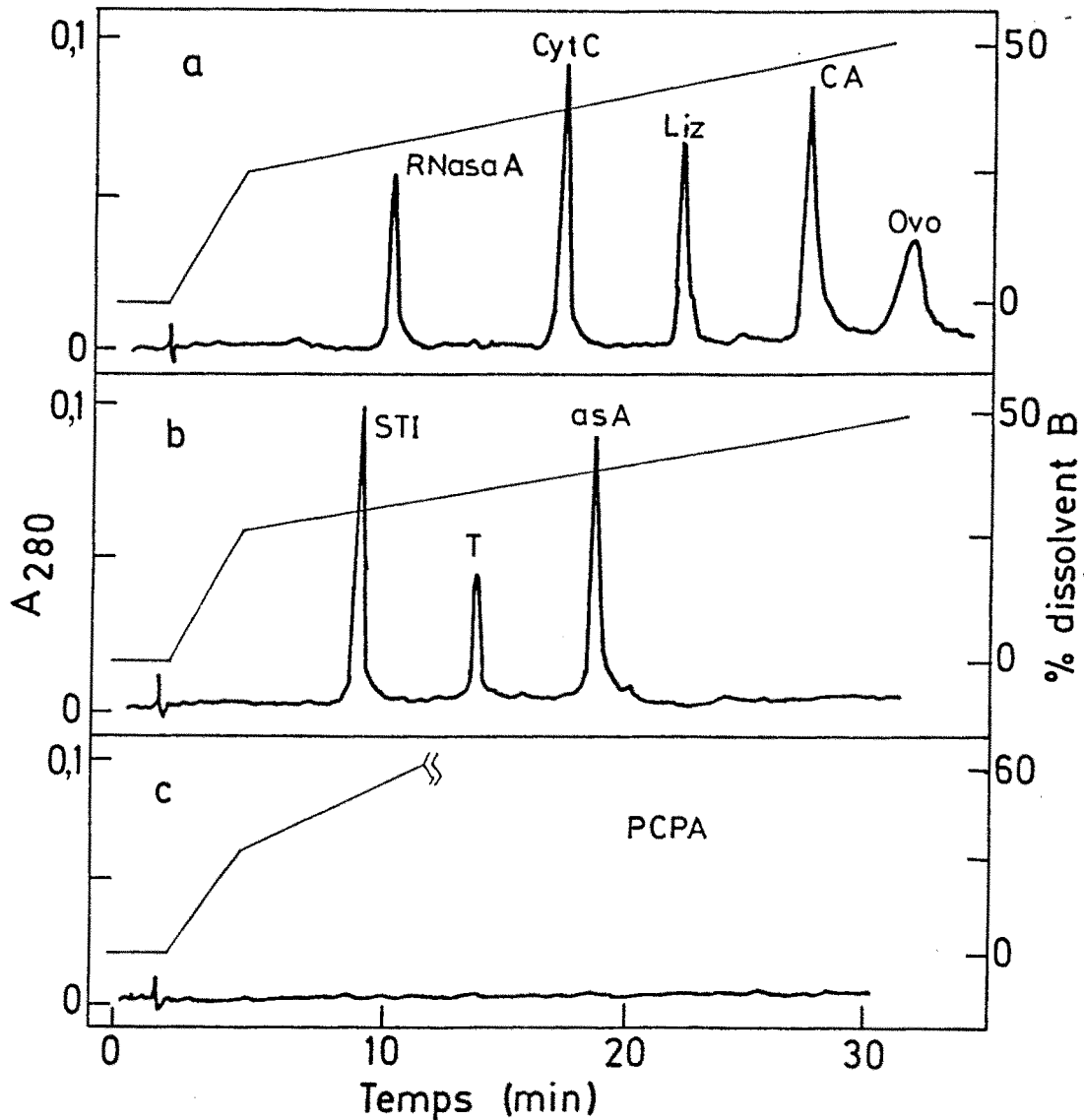


FIGURA III.1. Comportament cromatogràfic de diverses proteïnes en el sistema  $H_2O$  + TFA 0,1% (solvent A) / acetonitril + TFA 0,1% (solvent B). Quantitats injectades: (a) 45  $\mu$ gs de RNasaA, Cyt C i Liz; 15  $\mu$ gs de CA; 75  $\mu$ gs de Ovo. (b) 100  $\mu$ gs de PCPA II activada 2 min amb tripsina a relació PCPA/tripsina 40/1 (p/p) i amb l'activació parada amb STI a relació 10/1 amb respecte a la tripsina. (c) mateixa quantitat de PCPA que a (b), sense activar. Columna: Ultrapore C-3 (Beckman). Flux: 1 ml/min.

gradients que nosaltres hem aplicat.

La injecció d'una mostra de PCPA activada que contenia per tant CPA, segment d'activació, tripsina i STI, va donar com a resultat l'elució de totes les proteïnes excepte la CPA (Figura III.1 (b)). El segment d'activació es mostrava, doncs, susceptible de ser aïllat mitjançant aquest procediment al ser la seva recuperació acceptable i bona la seva resolució d'altres contaminants habituals, tals com tripsina i STI. La CPA presentava el mateix tipus de comportament ja observat per a la PCPA.

Resumint, doncs, el sistema acetonitril - TFA pot ser considerat útil per a una bona part de proteïnes, mentre que per altra banda presenta, també amb les columnes emprades en aquest estudi, greus deficiències pel que respecta a l'elució de proteïnes grans i hidrofòbiques.

#### III.1.1.b. H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% / ISOPROPANOL + TFA 0,1%

El sistema isopropanol - TFA va donar, en línies generals, resultats semblants als de l'acetonitril en quant a tipus de proteïnes recuperades i força inferiors en quant a resolució. En efecte, si bé les proteïnes patró es recuperaven igual o en major grau que en el cas anterior, la resolució baixava clarament, obtenint-se pics amples i asimètrics. Aquest fenomen ja ha estat descrit com probablement degut a l'elevada viscositat d'aquest dissolvent.

També en aquest sistema la unió de la PCPA a la columna va mostrar-se com irreversible, evidenciant que la interacció amb la matriu a pH baix era prou forta com per no ser influïda per un solvent de tant elevada hidrofobicitat com l'isopropanol.



**III.1.1.c. TEAP 0,25 o 0,1 M, pH 2,5 / idem en ACETONITRIL  
TEAP 25 mM, pH 6,5 o 6,9 / idem en ACETONITRIL**

TEAP es refereix en aquest encapçalament a fosfat de trietilamina, que es preparava afegint a l'aigua o bé a l'acetonitril la quantitat d'àcid fosfòric necessari per arribar a la concentració desitjada, i ajustant a continuació el pH amb trietilamina (Chaiken i Hough, 1980).

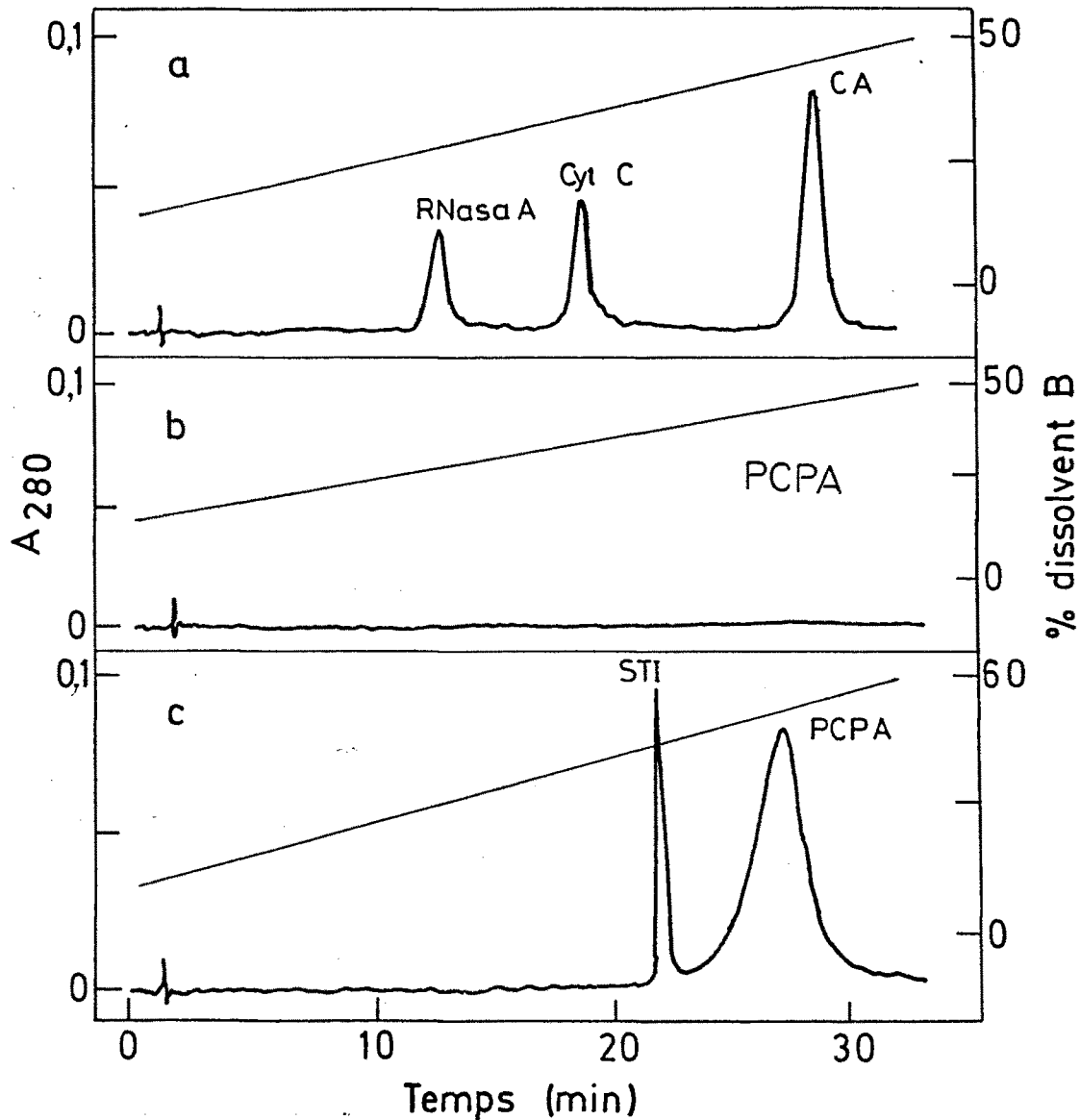
La cromatografia de patrons en aquest sistema a pH baix va donar com a resultat una bona resolució i una recuperació una mica més baixa que amb els solvents anteriors. La nul·la detecció de PCPA quan aquesta va ser injectada en aquestes condicions va acabar de demostrar la impossibilitat d'eluir-la a pH fortament àcid. A la Figura III.2 (a) i (b) s'il·lustren els fets anteriorment comentats.

La situació va ser en certa manera la inversa a pH intermig, encara que els resultats estaven molt lluny de ser satisfactoris. A pH 6,5 o 6,9 els patrons abans emprats no van ser eluits aparentment de la columna, mentre que si ho van ser PCPA i STI. La injecció de mostres procedents d'una activació de la PCPA no va permetre la detecció del segment d'activació en aquest sistema. Tot i així, tal com es veu a la Figura III.2 (c), el pic de PCPA és ample i mal definit, el que demostra que el sistema no és plenament satisfactori.

D'aquests resultats podríem concloure provisionalment que és necessari un pH proper a la neutralitat o, com a mínim, no fortament àcid per poder eluir proteïnes de les característiques de la PCPA.

**III.1.1.d. PIPERAZINA 10 mM, pH 6,5 ajustat amb TFA;  
/ idem en \* ACETONITRIL 60%  
\* ISOPROPANOL 50%**

Per tal de poder treballar en condicions properes a la neutralitat es va triar de treballar amb piperazina, afegida en la mateixa concentració tant a l'aigua (solvent A) com al solvent orgànic (solvent B). Proves prèvies van demostrar que la concentració òptima de piperazina era la de 10 mM. A aquesta concentració el seu poder



**FIGURA III.2.** Comportament cromatogràfic de diverses proteïnes en el sistema fosfat de trietilamina (TEAP) (solvent A) i acetonitril + TEAP (solvent B). (a) i (b), TEAP 0,25M, pH 2,5; (c), TEAP 25mM, pH 6,5. Mostres injectades: (a) mateixos patrons i quantitats que a la Figura III.1 (a). (b) PCPA dissolta en tampó inicial de cromatografia. (c) barreja de PCPA i STI en tampó inicial. Columna: Ultrapore C-3 (Beckman). Flux: 0,5 ml/min.

amortidor és suficient i s'eviten precipitacions observades a concentracions superiors quan es barreja amb els dissolvents orgànics.

Per elaborar aquestes dissolucions, una vegada dissolta la piperazina en aigua es va ajustar el pH a 6,5 amb TFA. A la fase orgànica s'hi va afegir la mateixa quantitat de TFA que havia estat necessària per ajustar el pH a la dissolució aquosa.

En aquestes condicions de pH intermedi és possible recuperar i aïllar tant les dues formes de la PCPA com la CPA. En canvi, no vam aconseguir en cap cas obtenir una cromatografia acceptable amb les proteïnes patró estudiades.

La presència a la fase orgànica d'acetonitril o isopropanol resulta, segons hem pogut comprovar, indiferent. Com pot veure's a la Figura III.3 (a i b), l'elució d'una mostra de PCPA té lloc pràcticament al mateix punt per un dissolvent orgànic com per un altre, encara que les concentracions respectives siguin diferents: 60% per l'acetonitril i 50% per l'isopropanol. Va comprovar-se també que no hi havien diferències importants entre els dos solvents quant a la recuperació de la mostra entrada, sempre que el temps de retenció per una mostra donada sigui igual. Aquest darrer fet és indicatiu de que els majors rendiments descrits en general a la bibliografia quan s'utilitza isopropanol són probablement deguts a que, simplement, aquest solvent disminueix el temps d'elució dels compostos gràcies a la seva major hidrofobicitat. Com veurem més endavant, la recuperació de certes proteïnes està directament relacionada amb el seu temps de residència dins la columna.

Donada la similitud de prestacions entre acetonitril i isopropanol, es va decidir adoptar aquest darrer solvent en el treball posterior, ja que amb ell és possible obtenir idèntiques separacions amb un menor consum.

A la Figura III.3 (c) es representa el cromatograma obtingut a l'injectar la mateixa mostra que en els dos casos anteriors i eluir-la amb un gradient entre aigua i acetonitril que contenen la mateixa quantitat de TFA necessària per ajustar a pH 6,5 una concentració 10 mM en piperazina (pH resultant, 1,8). El que diferenciava per tant els solvents emprats a (a) dels emprats a (c) era l'absència de piperazina en aquest darrer cas. Pot comprovar-se la nul·la recuperació de la PCPA,

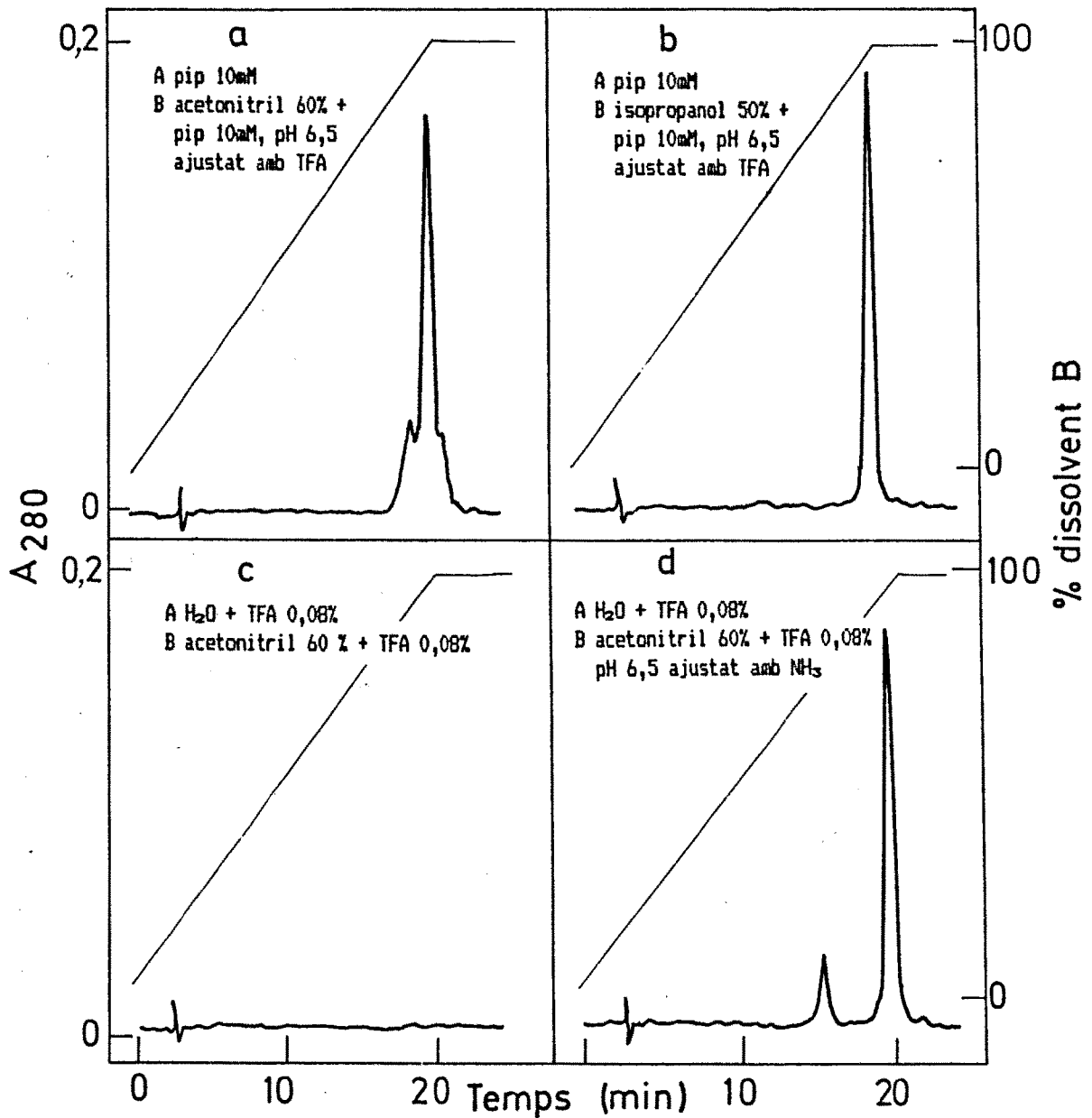


FIGURA III.3. Cromatografia de 100  $\mu$ g de PCPA en diversos sistemes cromatogràfics. La mostra fou aplicada en dissolució en el solvent A en cada cas. Columna: Ultrapore C-3 (Beckman). Flux: 0,5 ml/min.

fet ja evidenciat anteriorment en els gradients a pH baix. Els mateixos resultats negatius van obtenir-se en augmentar la concentració de TFA a 0,2% i a 0,4%. En canvi, a la Figura III.3 (d) es comprova que s'obté una altra vegada una bona recuperació de la mostra quan a les dissolucions que contenen TFA en concentració idèntica que a (a), (b) o (c) se'ls hi afegeix  $\text{NH}_3$  fins a pH 6,5. Amb això confirma el ja apuntat en apartats anteriors: és necessari un pH proper a la neutralitat per cromatografiar els zimògens i enzims pancreàtics objecte del nostre estudi. En general és preferible treballar amb una dissolució amortidora que no amb una altra a la que simplement se li ha ajustat el pH mitjançant l'addició d'àcid i base, ja que els resultats són més reproduïbles.

Contràriament al que succeeix amb les proteïnes més grans, el segment d'activació no és aïllable a partir dels seus complexos amb la CPA mitjançant aquest sistema. Els intents d'obtenir-lo a partir de la injecció d'una mostra de PCPA activada a pH intermedi i cromatografiada en aquestes condicions van resultar nuls. En vista d'això, i pel que respecta a l'aïllament del segment d'activació, es va seguir utilitzant el sistema cromatogràfic a pH baix.

A la Taula III.1 es presenta un resum del rendiment de tots els sistemes cromatogràfics comentats fins ara. D'ella se'n desprèn clarament la superioritat del sistema a pH baix amb acetonitril i TFA per a la majoria de proteïnes i la idoneïtat de l'ús d'una solució amortidora a pH intermedi pel cas de proteïnes que, com la PCPA o la CPA, s'absorbeixen fortament a la columna a pH baix.

TAULA III.1  
RENDIMENT DELS DIVERSOS SISTEMES CROMATOGRÀFICS ASSAJATS AMB PROTEÏNES\*

Sistema	Proteïnes patró (RNasaA, Cyt C, Liz, Ovo)	PCPA	CPA	STI	saA
TFA 0,1% / CH <sub>3</sub> CN + TFA 0,1%	RC RS	-	-	RC RS	rc RS
TFA 0,1% / (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHOH + TFA 0,1%	RC rs	-	-	rc rs	n.d.
TEAP 0,25M / CH <sub>3</sub> CN + TEAP 0,25M, pH 2,5	rc RS	-	-	n.d.	n.d.
TEAP 25mM / CH <sub>3</sub> CN + TEAP 25mM, pH 6,5	-	rc	n.d.	rc RS	-
AcNH <sub>4</sub> 0,1M / CH <sub>3</sub> CN + AcNH <sub>4</sub> 0,1M, pH 6,5	-	-	-	rc RS	-
Piperazina 10mM / id. en CH <sub>3</sub> CN 60%, pH 6,5	-	rc rs	rc rs	RC rs	-
Piperazina 10mM / id. en (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CHOH 50%, pH 6,5	-	RC rs	RC rs	RC rs	-

\* Columna utilitzada en tots els casos: Ultrapore C-3 (Beckman)  
RC i rc es refereixen a recuperació bona i acceptable respectivament.  
RS i rs es refereixen a resolució bona i acceptable respectivament.  
(-): recuperació o resolució nul·les  
n.d.: no determinat.

### III.1.2. FACTORS QUE CONDICIONEN LA RECUPERACIÓ CROMATOGRÀFICA DE PROTEÏNES

Durant l'assaig dels sistemes solvents de l'apartat anterior, es va posar de manifest que, a més dels dissolvents utilitzats, hi han altres factors que poden afectar la recuperació de les proteïnes i per tant el rendiment de la cromatografia. Ja s'ha fet esment que el temps de retenció és un d'aquests factors; juntament amb ell es va estudiar la influència de la quantitat de proteïna entrada i de la concentració de sals present a la solució en què aquesta estés dissolta. Amb l'estudi del primer d'aquests darrers dos factors es pretenia esbrinar quins eren els umbrals de detecció, mentre que amb l'estudi del segon es volia assajar unes condicions, presència de sals, habituals en el nostre treball.

#### III.1.2.a. RELACIÓ TEMPS DE RETENCIÓ - RECUPERACIÓ

Aquests estudis es van dur a terme sempre amb la mateixa quantitat de mostra i en el mateix sistema de solvents; en cada cas, però, es va aplicar un gradient diferent per tal de modificar el temps de retenció de les proteïnes estudiades. Les proteïnes patró van ser cromatografiades a pH baix, mentre que la PCPA i la CPA ho van ser a pH intermedi amb piperazina 10 mM i acetonitril.

A la Figura III.4 es veu la relació existent entre temps de retenció i recuperació per a RNasa A, lisozima i ovoalbúmina. Pot observar-se que, en el marge de temps estudiat, l'ovoalbúmina és pràcticament l'única proteïna per a la que la recuperació disminueix amb el temps. Aquesta proteïna ja havia estat reconeguda anteriorment com a conflictiva i difícil d'eluir de columnes de fase reversa a causa de la seva elevada hidrofobicitat. Amb algunes altres proteïnes, p. ex., histones (Hallenbeck i Mueller, 1984) s'ha observat també un augment de la recuperació al disminuir els temps de retenció.

L'efecte del temps de retenció sobre la recuperació va ser observat encara més clarament amb la PCPA i la CPA. Pot veure's a la Figura III.5

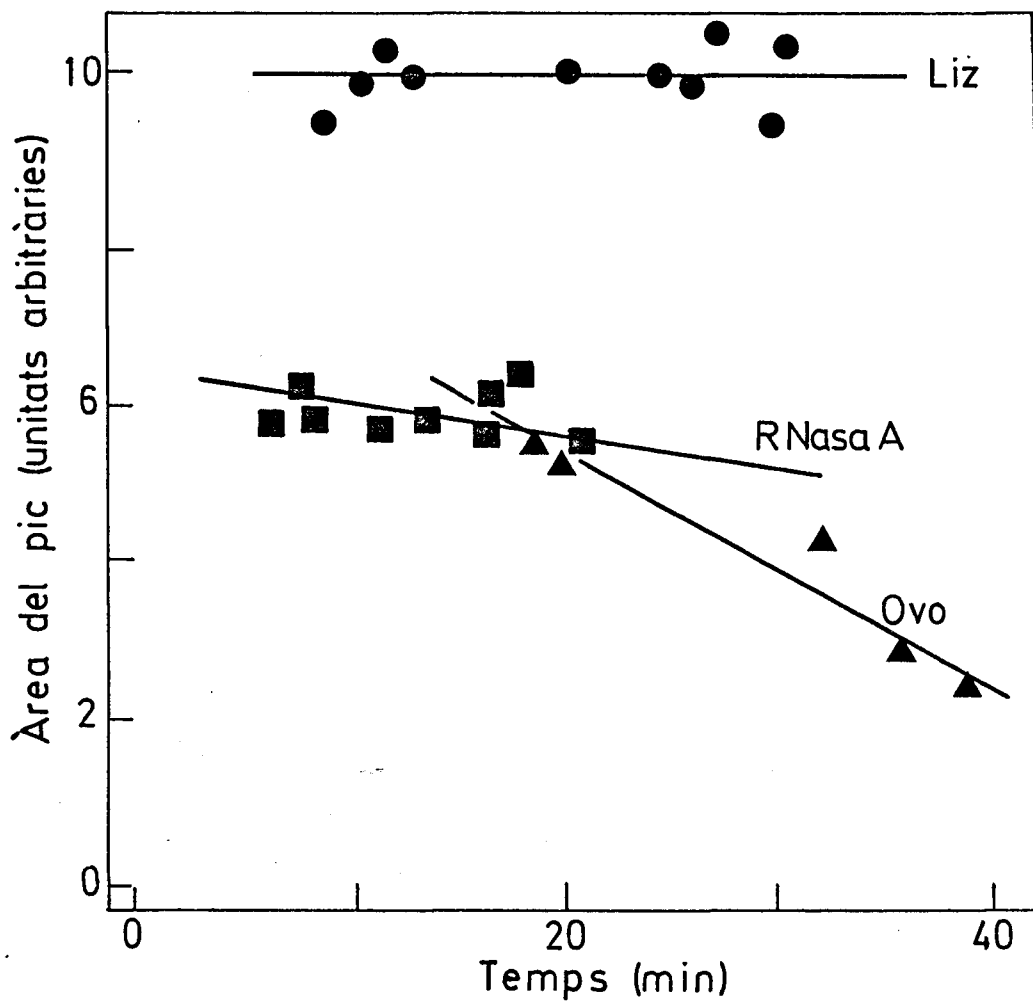


FIGURA III.4. Relació entre temps de retenció cromatogràfic de mostres proteiques i la seva recuperació. En cada cas es va injectar  $15 \mu\text{g}$  de Liz,  $45 \mu\text{g}$  de RNasaA i  $75 \mu\text{g}$  de Ovo. El gradient entre solvent A i solvent B es va anar variant de manera que s'obtinguessin diferents temps d'elució. Solvents, tipus de columna i flux com a la Figura III.1.



que la recuperació baixa de manera molt important a partir dels 15-20 minuts de residència a la columna i que, comparativament, la PCPA sofreix aquest efecte de manera més intensa que la CPA. Això ha de ser adjudicat a la presència del segment d'activació en el proenzim que, ultra fer que la proteïna sigui més voluminosa, li confereix un major grau d'hidrofobicitat (més endavant veurem que el segment d'activació té un caràcter marcadament hidrofòbic).

### III.1.2.b. RELACIÓ QUANTITAT APLICADA - RECUPERACIÓ

Aquests estudis es van dur a terme únicament amb CPA i en condicions cromatogràfiques considerades idònies per a la recuperació en vista dels resultats obtinguts en l'apartat anterior. Es va observar (Figura III.6) que la quantitat de proteïna recuperada seguia una relació lineal amb la quantitat entrada a la columna, però que a la vegada existia el que es pot considerar un valor "límit", per sota del qual la recuperació ja esdevé nul·la. En el cas de la CPA es va considerar que aquest valor era de l'ordre dels 15  $\mu$ gs. El coneixement dels valors mínims de recuperació i detecció per HPLC poden ser útils a l'hora d'aplicar aquests mètodes a l'estudi de mostres escasses o amb baixes concentracions de les proteïnes a estudiar (p.ex. sèrums humans, mostres de suc pancreàtic, etc.).

### III.1.2.c. RELACIÓ CONCENTRACIÓ DE SALS - RECUPERACIÓ

Es va partir de mostres de PCPA II dialitzada amb piperazina 10 mM a pH 6,5, que es van injectar a l'HPLC bé directament o bé després de l'addició de sulfat amònic. En tot cas es va mantenir constant el volum d'injecció. Com es pot comprovar a la Figura III.7, es produeix una disminució de la recuperació de proteïna a mesura que augmenta la concentració de sal. Aquesta disminució és lineal dins del marge de concentracions 0,05 M - 1 M. En canvi, la recuperació és més elevada que

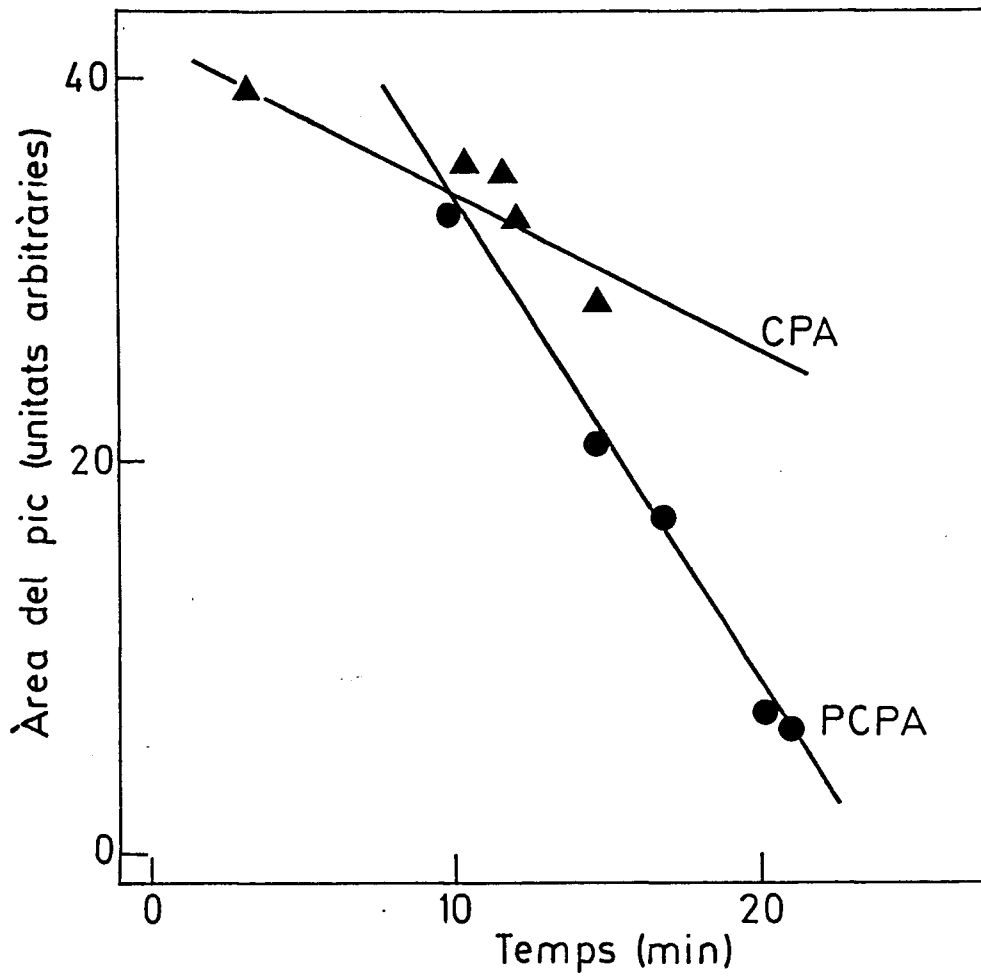


FIGURA III.5. Relació entre temps de retenció cromatogràfic i recuperació de PCPA II i CPA. Es van injectar  $100 \mu\text{g}$  de cada proteïna en tots els casos. S'empraren gradients formats entre piperazina  $10\text{mM}$  i el mateix amortidor en acetonitril  $60\%$  ( $\text{pH } 6,5$ ). Altres condicions com a la Figura III.3.

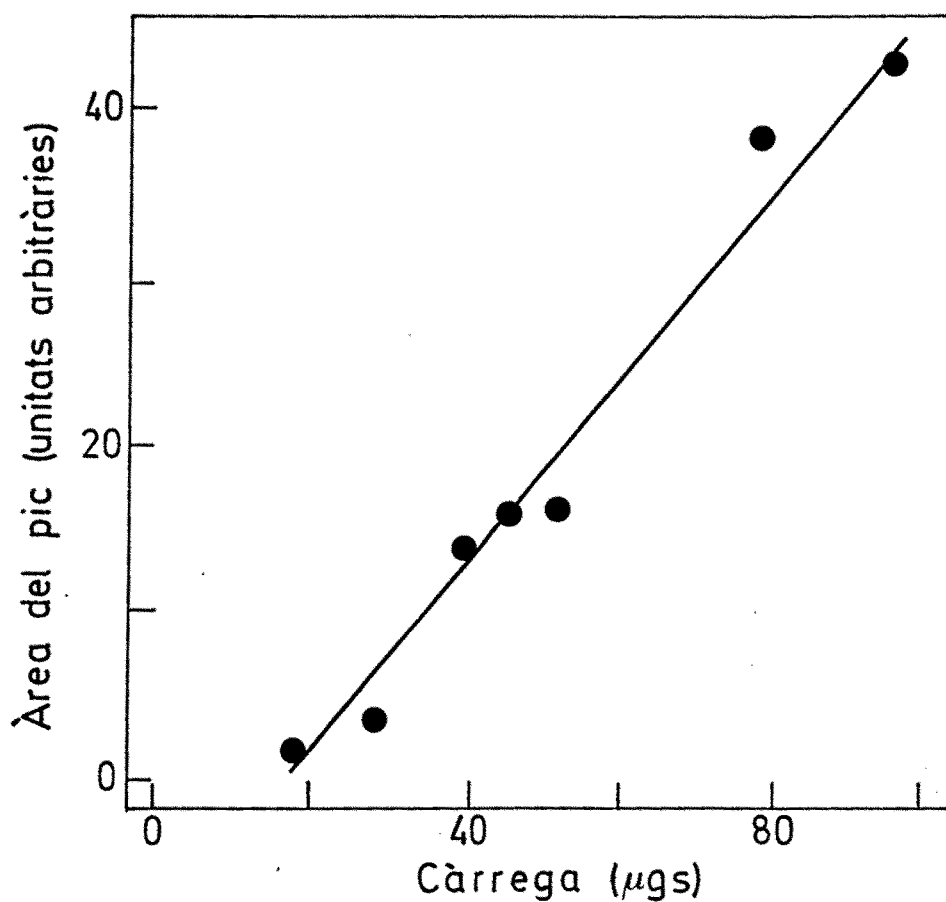


FIGURA III.6. Relació entre quantitat de mostra injectada i recuperació. Es presenta els resultats obtinguts amb la CPA aplicada en quantitats variables i eluïda a temps 12 min amb el sistema de solvents de la Figura III.3 (b). Altres condicions com a la Figura III.3.

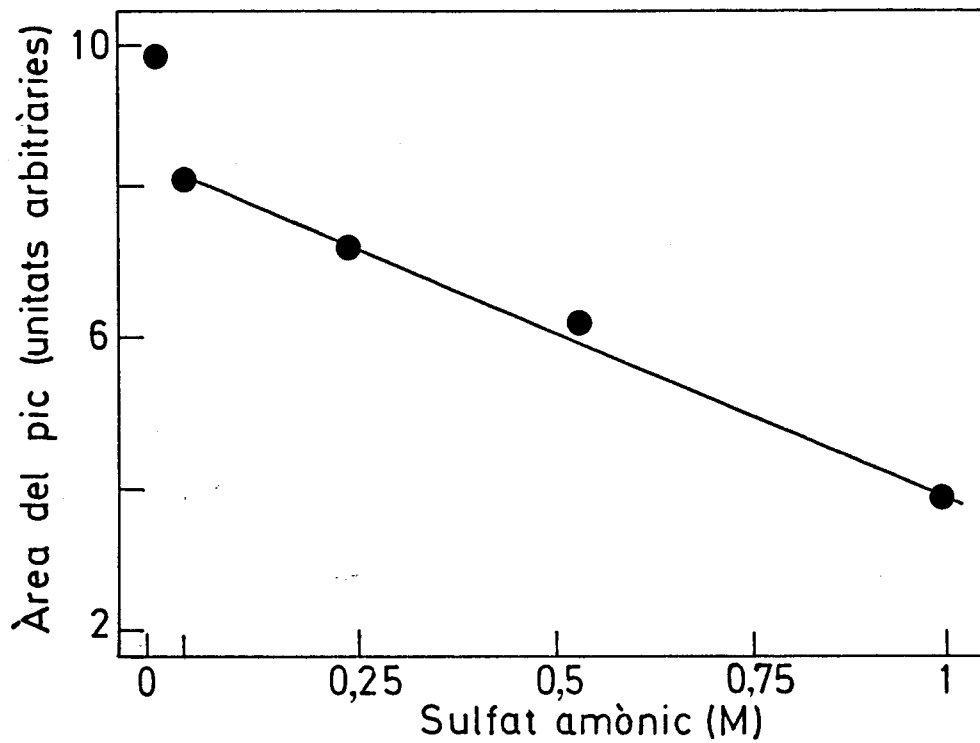


FIGURA III.7. Relació entre quantitat de sulfat amònic present a la mostra injectada i recuperació. En tots els casos es va injectar  $100 \mu\text{g}$  de PCPA, eluïda a un temps de 21 min amb el sistema de solvents de la Figura III.3 (a). Altres condicions com a la Figura III.3.

el que l'anterior linealitat faria suposar en absència de sulfat amònic. Se'n dedueix que en el cas de proteïnes de recuperació problemàtica, com és el cas de PCPA i CPA, és convenient evitar una força iònica elevada en les mostres de proteïna a cromatografiar o que, cas de no ser això possible, cal reduir-la a un mínim. Les altes forces iòniques podrien actuar disminuint la solubilitat de les proteïnes i fent la interacció amb la columna més forta, amb el que la seva recuperació sofriria pèrdues notables. Aquest efecte seria més important quan més hidrofòbiques fossin les proteïnes (Cohen et al., 1984) i és probablement el reflex de la solubilitat de la fase mòbil durant l'elució: en augmentar la força iònica a la fase mòbil es redueix la solubilitat i, en correspondència, disminueix la recuperació.

### III.1.3. SEPARACIÓ CROMATOGRÀFICA DE PROTEÏNES

#### III.1.3.a. SEPARACIÓ ANALÍTICA DE PCPAs I CPA

El sistema de solvents triat per a l'anàlisi cromatogràfica de les procarboxipeptidases A i la carboxipeptidasa A porcines fou el de gradients formats entre piperazina 10 mM a pH 6,5 en aigua i la mateixa dissolució amortidora en isopropanol al 50%. Ja s'ha vist (apartat III.1.3.a) que és convenient obtenir elucions ràpides d'aquestes proteïnes si es preten obtenir bones recuperacions. Per aquesta raó vam assajar en primer lloc gradients ràpids que provocaren l'elució de les proteïnes en 10-11 minuts. En aquestes condicions no s'obtenia, però, resolució de les diferents fraccions, degut a que el gradient no era prou selectiu. També es va assajar la injecció de barreges de PCPA i CPA en condicions inicials d'elevada presència de solvent orgànic. En aquest cas, la disminuïda interacció amb la matriu cromatogràfica per part de les proteïnes va ser probablement la causa de la seva no resolució. Ja s'havia comprovat amb altres proteïnes (Rubinstein et al., 1979) que elevades concentracions inicials de solvent orgànic actuen contra la interacció de les mostres amb la columna i, per tant, contra la seva resolució diferencial.

Es va optar per començar assajant gradients ràpids no resolutius i fent-los gradualment més lents per tal d'obtenir separacions suficients. A la Figura III.8 es poden veure dos cromatogrames de barreges de PCPA II, PCPA I i CPA. A la part (a) de la figura es veu el resultat de cromatografiar CPA i PCPA II. A l'afegir PCPA I a les altres dues mostres i utilitzar el mateix gradient per eluir-les, no s'obté cap altre pic i s'observa un augment dels altres dos (b). Això ens va fer pensar en una possible separació del complex binari en PPE i PCPA monomèrica, que suposava l'elució de la PCPA en el seu pic corresponent i la coincidència de la PPE amb la posició cromatogràfica de la CPA. L'ús de gradients més suaus permeté separar tres pics (Figura III.9) que eren, per aquest ordre, CPA, un pic corresponent a la PCPA I (suposadament PPE) i PCPA monomèrica.

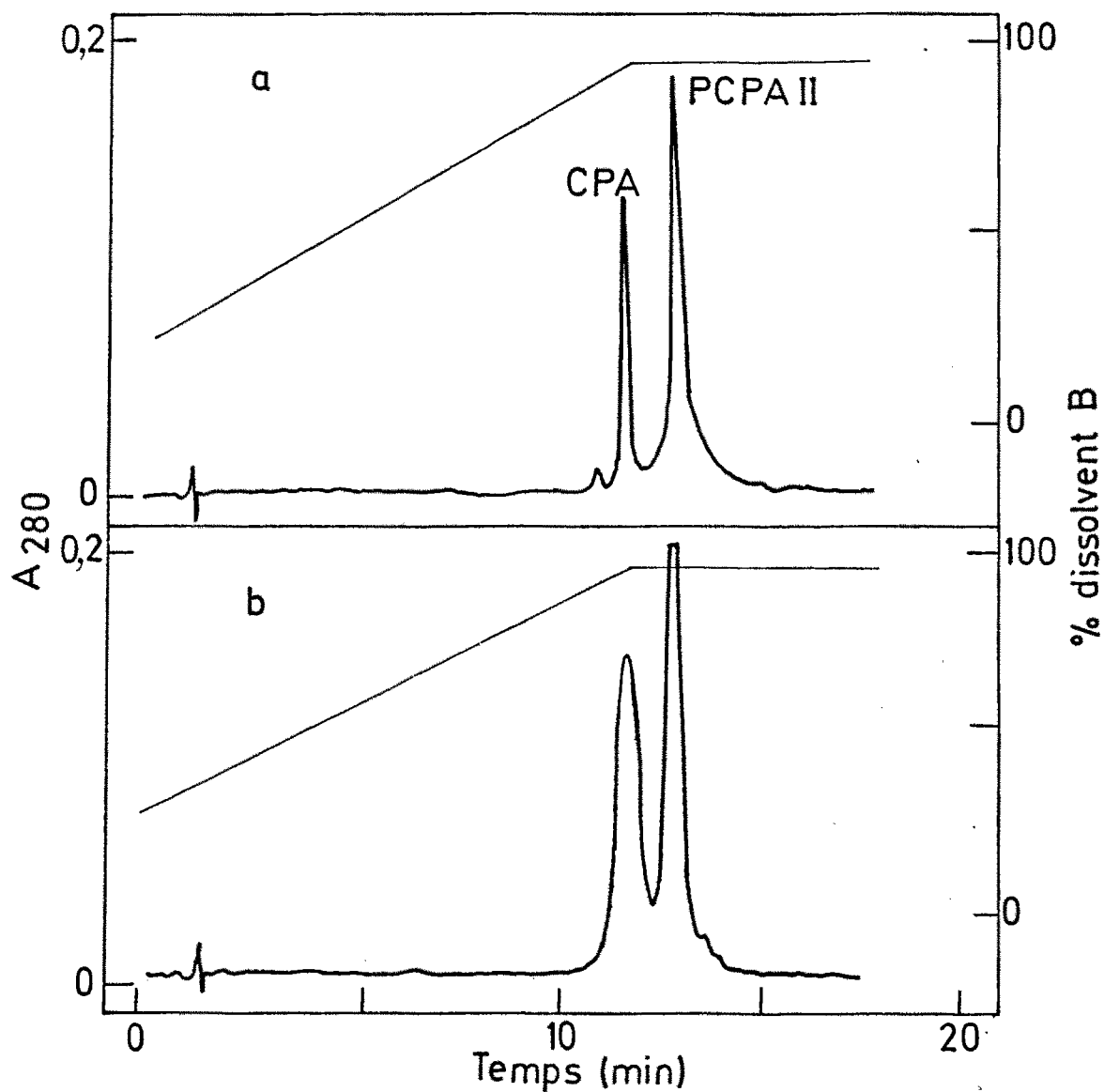


FIGURA III.8. Separació de (a) CPA ( $40 \mu\text{g}$ ) i PCPA II ( $60 \mu\text{g}$ ) i (b) idem més  $60 \mu\text{g}$  de PCPA I. Solvent A, piperazina  $10\text{mM}$  ajustada a pH  $6,5$  amb TFA; solvent B, idem en iosopropanol al  $50\%$ . Columna Ultrapore C-3 (Beckman). Flux:  $0,5 \text{ ml/min}$ .

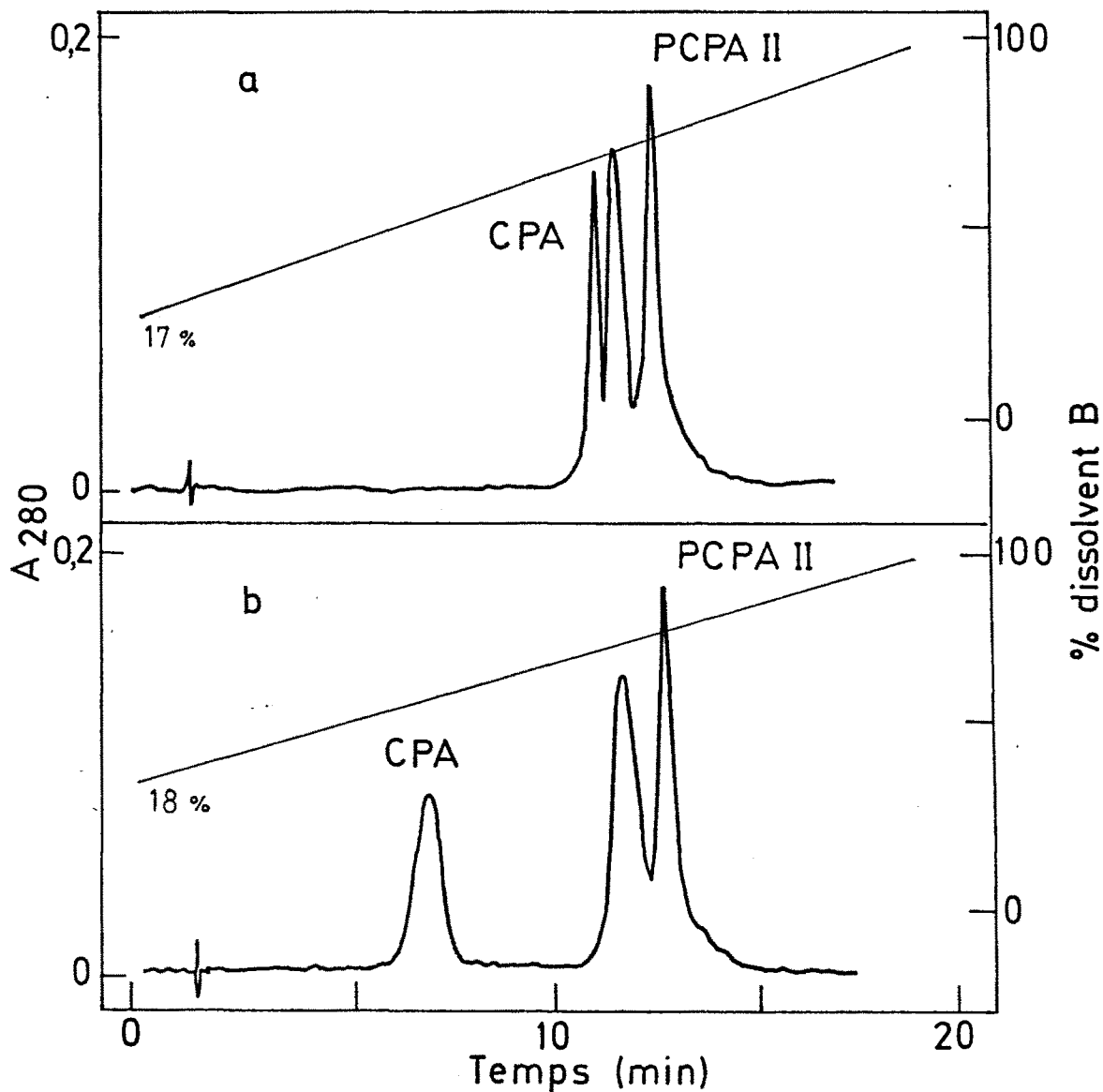
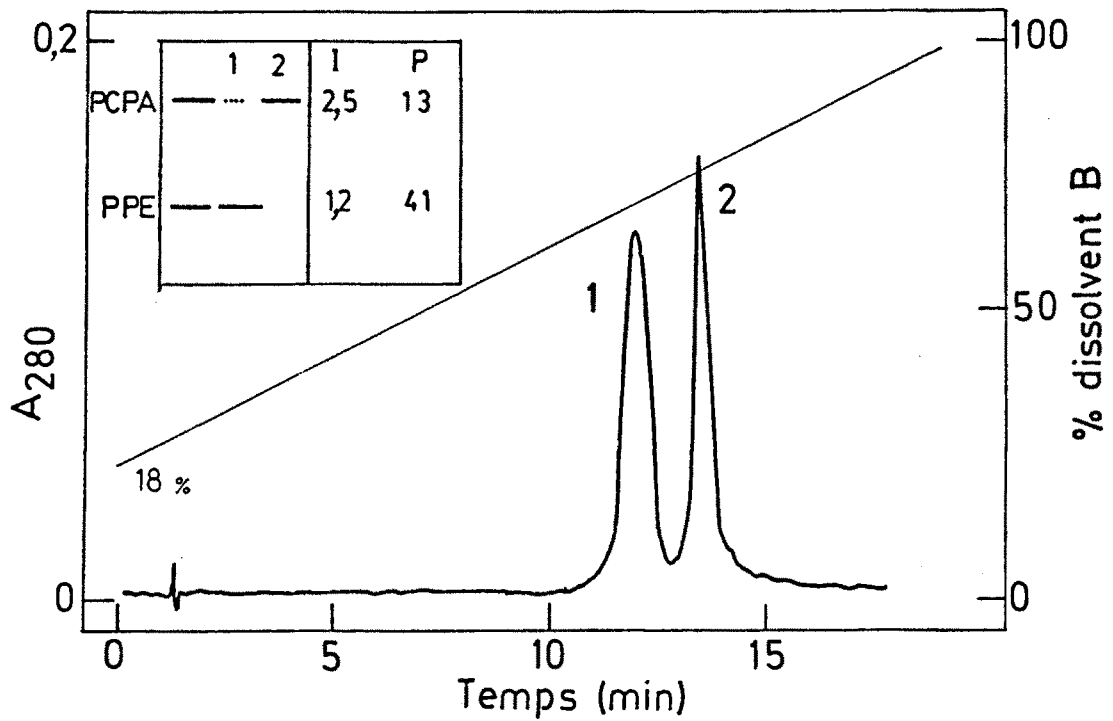


FIGURA III.9. Separació de CPA, PCPA II i un pic corresponent a la PCPA I amb dos gradients diferents. Columna, solvents i quantitat de mostra aplicada com a la Figura III.8.





**FIGURA III.10.** Comprobació de la separació dels protòmers de la PCPA I obtinguda en cromatografia en fase reversa. Injecció de 60  $\mu\text{g}$  de PCPA I en condicions idèntiques a les de la Figura III.9 (a). L'insert mostra l'anàlisi electroforètica de les dues fraccions juntament amb les activitats CPA intrínseques i potencials de cada una d'elles.

Per tal de comprovar la separació de la PCPA I en les seves subunitats al sotmetre-la a cromatografia en aquest sistema, es va procedir a la injecció d'una mostra de PCPA I en solitari amb posterior recuperació i anàlisi de les fraccions eluïdes. A la Figura III.10 es pot veure la separació cromatogràfica, l'anàlisi electroforètica i la quantitatització d'activitats de les dues subunitats eluïdes. Tal com es presuposava, el primer dels pics eluïts és la subunitat PPE, mentre que el segon pic és el corresponent a la PCPA monomèrica. Malgrat això, la puresa dels pics no és absoluta i cal una recromatografia per obtenir mostres netes de contaminació. Les activitats potencials mostrades a la taula insertada són les obtingudes després d'activar les mostres amb tripsina a relació 40/1 durant 1 hora. Com podem comprovar més endavant, els valors normals d'activitat específica a aquest temps d'activació són d'aproximadament 20 unitats. Això vol dir que, tot i obtenint proteïnes en bon estat aparent, la presència de solvent orgànic probablement dificulta la seva activació. D'aquest fet se'n dedueix la necessitat de procedir a dialitzar les mostres de proteïna així obtinguda com a pas previ a possibles estudis funcionals.

### III.1.3.b. AÏLLAMENT PREPARATIU DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A MONOMÈRICA

El mètode d'obtenció del segment d'activació per HPLC, alternatiu al clàssic en columna de bescanvi iònic (San Segundo, 1982), va permetre obtenir-lo lliure de degradacions i en un curt termini de temps. Una de les limitacions d'aquest sistema rau en la càrrega relativament petita que accepta la columna de fase reversa sense perdre resolució, sense retenir un percentatge elevat de la mostra i sense sofrir deteriorament.

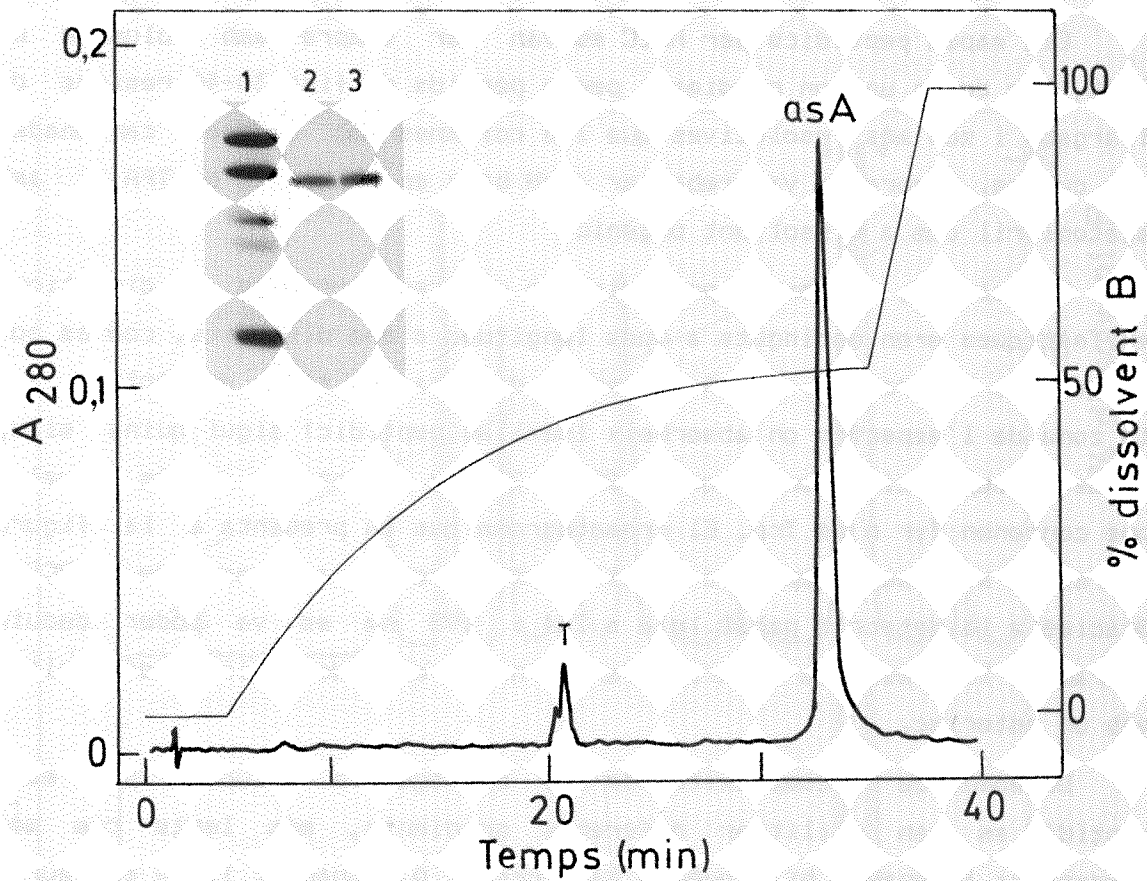
Previ al pas per la columna, la PCPA s'activa amb tripsina a una relació 40:1 (p/p) i a 25° C. A temps 1 minut on, segons s'havia comprovat prèviament (San Segundo, 1983) només hi ha en el medi CPA i segment d'activació, s'inhibeix l'acció de la tripsina mitjançant una baixada del pH a 1,8 amb TFA. A continuació la mostra s'injecta a la

columna després d'una centrifugació per eliminar el material insoluble a aquest pH.

A la Figura III.11 es pot veure un exemple de cromatografia d'obtenció del segment d'activació, on es comprova que la separació respecte de la tripsina activant és excel·lent. L'insert de la figura mostra una anàlisi electroforètica de les dues meitats del pic obtingut, evidenciant-se la seva homogeneïtat.

El segment d'activació que s'obté amb aquest mètode és el més llarg dels possibles fragments obtinguts a partir d'una activació triptica. Així ho demostra el seu pes molecular mesurat a partir de gels de poliacrilamida-SDS i la comparació electroforètica feta amb mostres procedents d'una activació suau (resultats no presentats). S'aconsegueix el segment d'activació complet gràcies a la rapidesa del procés, que permet obtenir el segment 40 minuts després de l'activació de la PCPA, minimitzant la possibilitat de degradacions per contacte amb la tripsina. A més, la inhibició d'aquesta a causa del baix pH de treball (1,8) i la separació cromatogràfica obtinguda són factors que afavoreixen la completa inhibició de l'activació (i per tant de la degradació del segment) a partir del moment d'injecció a la columna de fase reversa.

S'ha considerat que la quantitat màxima de PCPA activada que es pot entrar a la columna utilitzada (Beckman Ultrapore C-3, 75 x 4,6 mm) és de 1600  $\mu$ gs. Amb aquesta quantitat s'obtenen 200  $\mu$ gs ( 20 nmols) de segment, el que representa un rendiment aproximat del 50%, tres vegades superior a l'obtingut amb la metodologia clàssica. Aquesta limitació de càrrega obliga a efectuar repetides injeccions si es necessiten quantitats elevades de segment d'activació. La repetició d'injeccions de proteïna a nivell semipreparatiu aconsella la neteja exhaustiva de la columna amb solvent orgànic concentrat cada 4-6 injeccions, i el recanvi habitual del farciment de la pre-columna o, com a mínim, de la porció del mateix situat a l'entrada en la direcció del flux.



**FIGURA III.11.** Aïllament preparatiu del segment d'activació de la PCPA II. T: tripsina. saA: segment d'activació. Solvent A: TFA 0,05%; solvent B: acetonitril 80% + TFA 0,045%. Columna: Ultrapore C-3 (Beckman). Flux: 1 ml/min. L'inserit mostra l'anàlisi electroforètica de mioglobina tractada amb bromur de cianògen (1), la part anterior (2) i la part posterior (3) del pic principal.

### III.1.4. METODOLOGIA PER A MAPES PEPTIDICS

Els mapes peptídics per HPLC es van fer sempre amb columnes de C-18, que donen un bon rendiment per a pèptids de fins 30-40 residus de llargada i són més resolutives que les columnes amb cadenes carbonades més curtes. Sempre es va treballar a pH baix en presència de TFA i amb acetonitril com a dissolvent orgànic.

Normalment, els mapes peptídics de mostres sotmeses a digestions enzimàtiques eren obtinguts a dues longituds d'ona diferents, com es pot veure a la Figura III. 12. A 214 nm es detecta tot tipus de pèptids (és la zona de l'espectre on absorbeix l'enllaç peptídic) sigui quina sigui la seva composició, mentre que a 280 o 295 nm es detecta només aquells que contenen Tyr o bé Trp. El cromatograma que es presenta a la figura correspon a un mapa peptídic triptic del segment d'activació de la PCPA. Gràcies a la detecció paral·lela a 214 i 295 nm es va poder deduir clarament la presència de triptòfan en només els dos pics assenyalats amb un asterisc.

Depenent de la complexitat de les barreges a estudiar per mapa peptídic es van utilitzar diferents gradients, més lents com més components a separar hi hagués a la barreja. A l'apartat III.4 es veuran diversos exemples de mapes peptídics amb diferents gradients.

### III.1.5. PURIFICACIO DE PEPTIDS PER RECROMATOGRAFIA

Quan es pretén aïllar fragments peptídics producte d'una digestió enzimàtica es comença normalment per fer algun cromatograma a escala analítica per després, una vegada establertes les condicions idònies de separació, aplicar el mètode a escala preparativa. Normalment, la relació de quantitat de mostra entrada entre una cromatografia preparativa i una altra analítica és de 20-30/1. Com a conseqüència del considerable augment de material entrat a la columna es produeix una pèrdua de resolució que afecta més a aquells pèptids menys resolts en les cromatografies analítiques. Aquest efecte es comprova observant la Figura III.13, en la que es mostra una cromatografia analítica i una

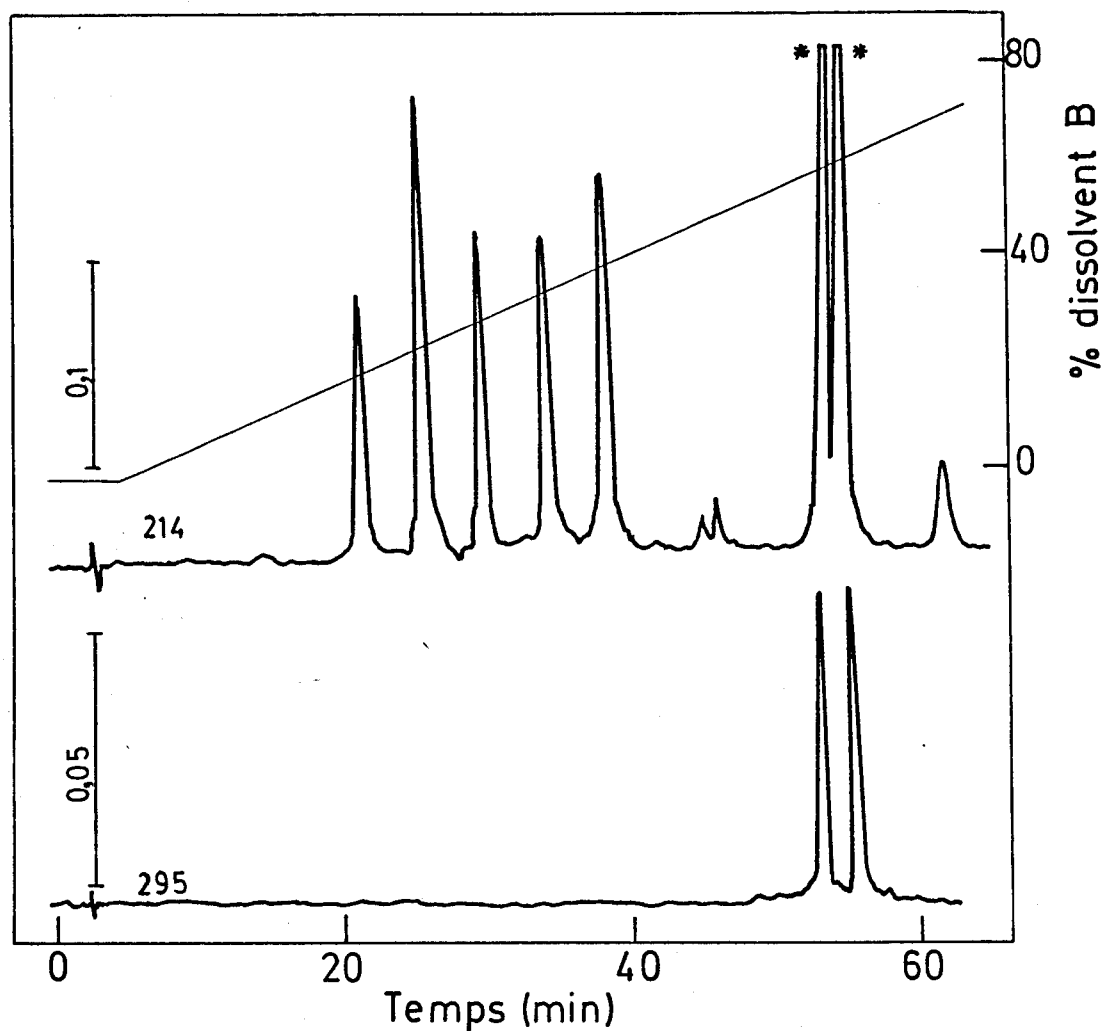


FIGURA III.12. Perfil cromatogràfic d'un mapa peptídic triptic del segment d'activació, amb detecció a dues longituds d'ona. El traç superior correspon a la detecció a 214 nm i l'inferior a la detecció a 295 nm. Els asteriscs indiquen els pèptids que contenen Trp. Columna  $\mu$ -Bondapak C-18 (Waters). Solvents: A, TFA 0,05%; B, acetonitril 80% + TFA 0,045%. Flux: 1 ml/min.

## TAULA III.2

RENDIMENT DEL REPAS CROMATOGRÀFIC DE DIVERSOS PÈPTIDS OBTINGUTS EN CROMATOGRAFIA PREPARATIVA (Figura III.13)

<i>Pèptid (temps de retenció)</i>	<i>Area original<sup>a</sup></i>	<i>Area recuperada<sup>a</sup></i>	<i>% recuperació</i>
40.18	74.000	56.000	75
47.15	332.000	229.000	69
52.30	88.000	55.000	62,5
59.80	323.000	164.000	49
61.52	38.000	40.000	100
63.08	107.000	37.000	35
63.86	75.000	74.000	100
66.83	777.000	725.000	93
73.07	129.000	110.000	48
74.03	67.000	53.000	79
Rendiment mitjà			71

altra preparativa d'un digerit triptic de la PCPA. Es pot observar que alguns del pèptids total o mitjanament resolts en la analítica apareixen solapats o indistingibles en la preparativa. En aquests casos és necessari procedir a repassar els pèptids heterogenis per la mateixa columna i amb un gradient més selectiu per tal de purificar-los (apartat II.4.2.c.). A la Taula III.2 s'hi expressa els rendiments de les purificacions portades a terme en aquest exemple concret, calculats en base a l'àrea donada pel registrador-integrador del nostre sistema de cromatografia. El rendiment mig és del 71 %. Processos de purificació com el que està aquí descrit es van dur a terme en un bon nombre de mapes peptídics preparatius que apareixen a l'apartat III.4.

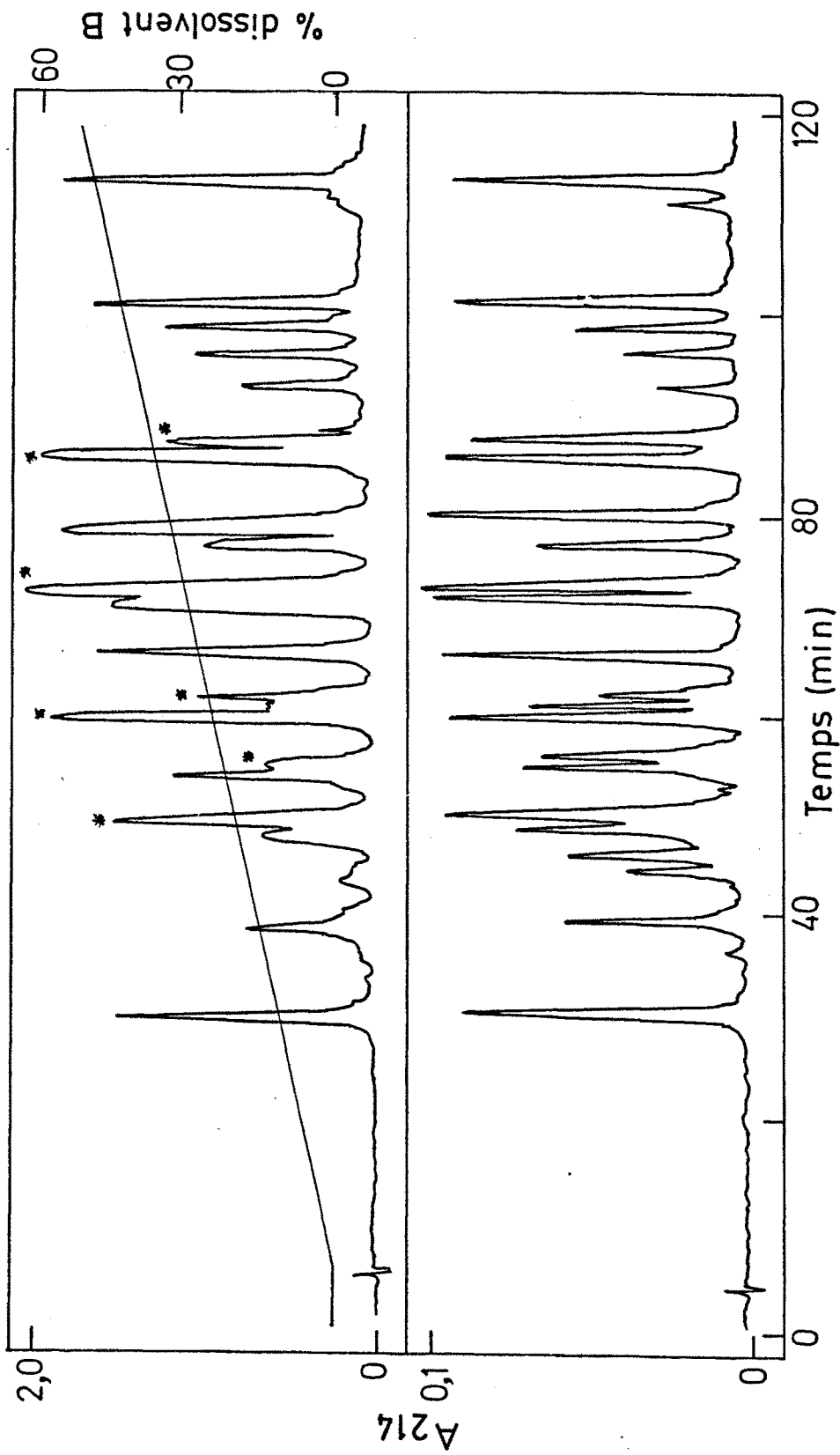


FIGURA III.13. Cromatografies analítica (a) i preparativa (b) d'un mateix digerit triptíc de la PCPA II. Els solvents i el gradient emprats són idèntics en els dos casos. Es marquen amb un asterisc aquells péptids pels que fou necessària una recromatografia. Columna i solvents com a la Figura III.12.



### III.1.6. ANÀLISI DE LA GENERACIÓ DE FRAGMENTES DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ PER ACCIÓ TRÍPTICA

Els fragments primari i secundaris del segment d'activació generats durant el procés d'activació triptica tenen una llargada que oscil·la entre 60 i 100 residus. Per aquest tipus de pèptids és més adequat utilitzar una columna de fase reversa una mica menys selectiva que una C-18 i que no presenti problemes de retenció amb polipèptids llargs.

En aquest treball s'ha utilitzat tant una columna de C-3 com una de C-4, assolint-se els millors resultats amb aquesta darrera. A la Figura III.14 es poden veure els diferents cromatogrames obtinguts al llarg de l'activació. Aquests s'obtenien injectant mostres de PCPA activades amb tripsina durant temps diferents i amb aquesta activació inhibida, segons la metodologia descrita a l'apartat anterior. Es va aplicar els mateixos gradients tant si es tractava de cromatografies analítiques com preparatives.

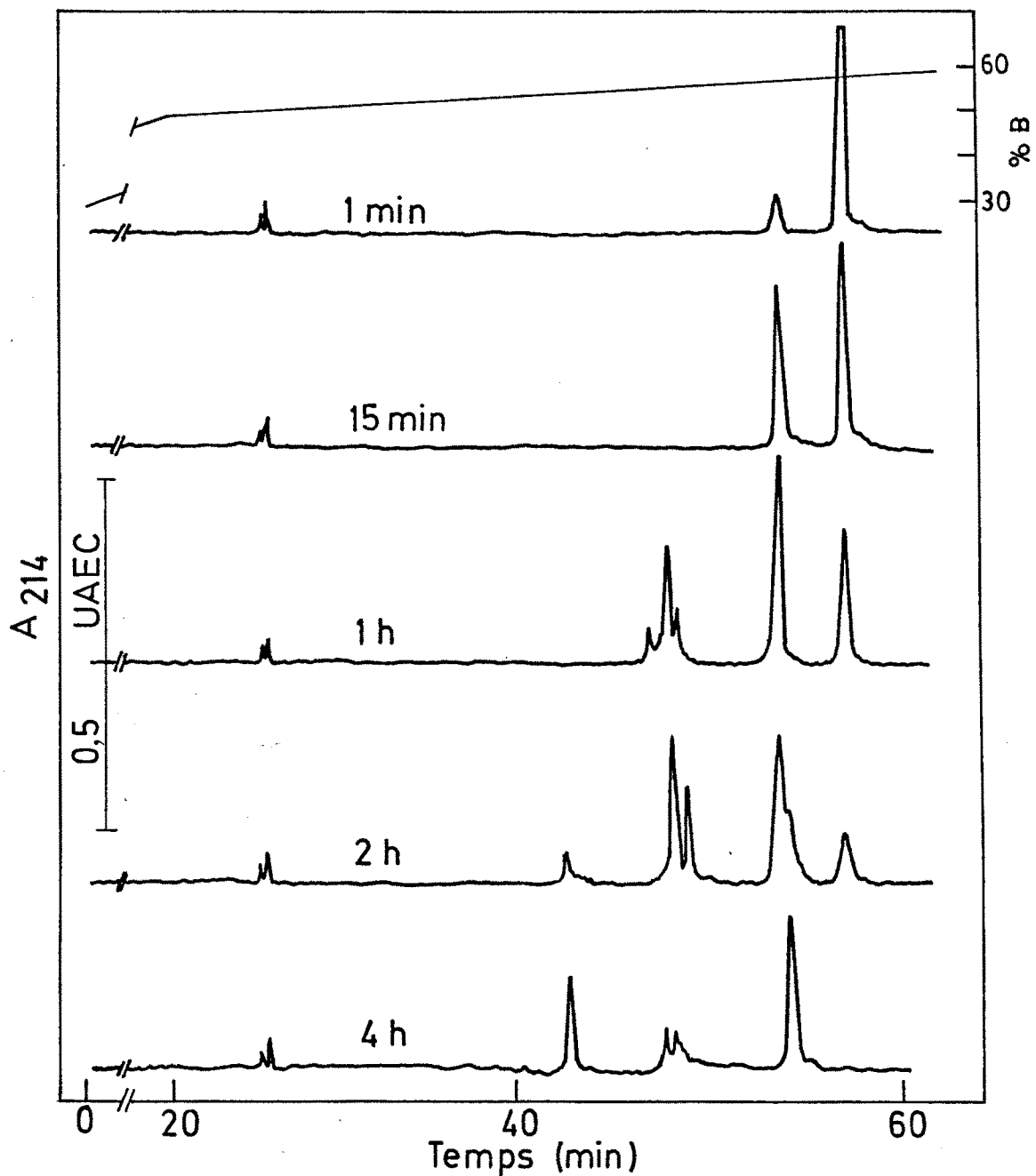


FIGURA III.14. Cromatogrames obtinguts al llarg del procés d'activació triptica de la PCPA II. T, tripsina; saA, segment d'activació. La resta de pics corresponen a fragments del segment d'activació. Solvents: A, TFA 0,1%; B, acetonitril 80% + TFA 0,09%. Columna: Nucleosil C-4 (Mackerey-Nagel). Flux: 0,5 ml/min.



### III.2. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS PER DABSILACIÓ-HPLC

La necessitat de dur a terme anàlisis d'aminoàcids amb asiduitat ens va induir a posar a punt un mètode que permetés aplicar la tecnologia de HPLC a aquest terreny concret. D'aquesta manera es pretenia explotar la versatilitat de la tècnica de cromatografia líquida i utilitzar-la tant per l'aïllament com per la caracterització composicional de pèptids.

En un principi es va pretendre reproduir el mètode descrit per Chang et al. (1981, 1982 i 1983), basat en la derivatització pre-columna amb clorur de dabsil (clorur de dimetilaminoazobenzèsulfonil), que reacciona amb grups amino lliures donant dabsil-aminoàcids (Figura III.15). Aquest mètode ha estat una de les novetats més significatives en aquests darrers anys en el terreny de l'anàlisi d'aminoàcids. Els derivats dabsilats presenten una molt elevada absorptió en una zona de l'espectre lliure d'interferències (màxim d'absorció a 420 nm en medi d'etanol) i són relativament estables al llarg del temps. Considerant a més que la seva separació és excel·lent en cromatografia en fase reversa, el mètode permet fer anàlisis d'aminoàcids d'una manera simple, lliure d'interferències i a elevada sensibilitat (de l'ordre de picomols). Donat que en aquest mètode el que es detecta és el grup dabsil, i que els aminoàcids amb dos grups susceptibles de reaccionar amb el clorur de dabsil sofreixen una didabsilació, és d'esperar que una

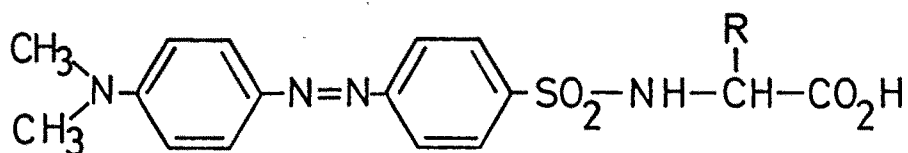


FIGURA III.15. Fòrmula general dels dimetilaminoazobenzè-sulfonil-aminoàcids (dabsil-aminoàcids).

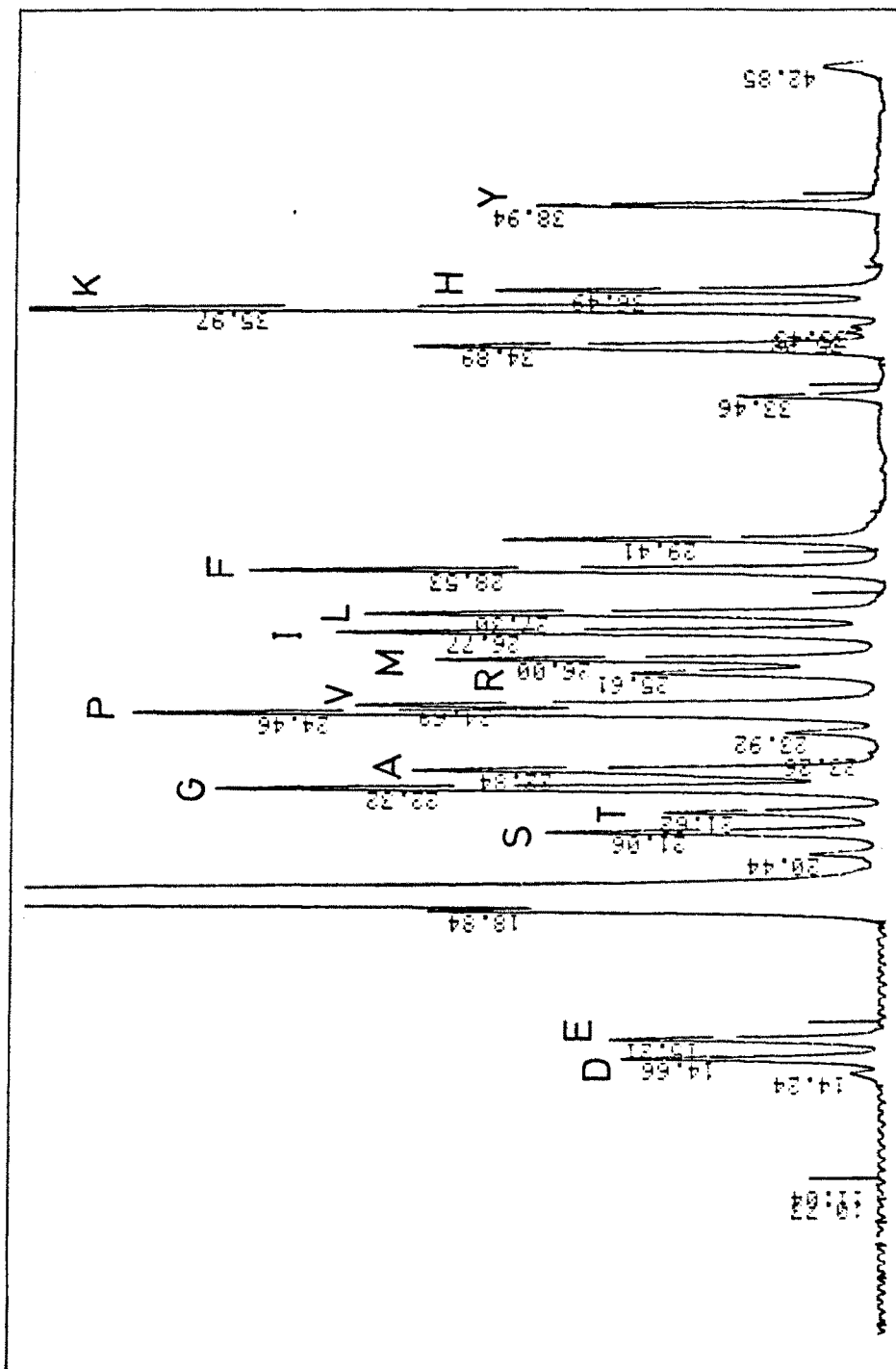


FIGURA III.16. Separació cromatogràfica de dabsil-aminoàcids en una columna Lichrosorb C-18 (Merck). Condicions de dabsilació i d'anàlisi idèntiques a les de Chang et al. (1982). Veure normes IUPAC-IUB (1969) pel significat de les notacions d'una sola lletra pels aminoàcids.

barreja equimolar d'aminoàcids doni una sèrie de pics d'àrea molt similar i uns altres (Lys, His i Tyr), d'àrea doble.

A l'aplicació rutinària del mètode vam observar, però, certs problemes que introduïen un marge d'erraticitat als resultats de les anàlisis. Per exemple, l'àrea dels pics obtinguts amb una barreja estàndard equimolar d'aminoàcids no era homogènia, amb valors baixos per a Glu, Asp, Ser, Thr i Arg. També s'observaven variacions a la derivatització dels aminoàcids didabsilats (Lys, His i Tyr) entre una anàlisi i una altra. Els problemes mencionats afecten la reproduïbilitat i la precisió en la quantificació. A la Figura III.16 es pot veure la cromatografia d'una barreja estàndard d'aminoàcids derivatitzats en les condicions descrites per Chang et al. (1982). Es pot observar en ella els problemes de resposta abans mencionats.

Per tal de millorar la fiabilitat de l'anàlisi quantitativa d'aminoàcids per dabsilació i HPLC vam iniciar un estudi sistemàtic de les condicions de reacció i conservació dels derivats amb l'objectiu d'optimitzar el rendiment i la reproduïbilitat del mètode. Al mateix temps es va aprofitar per estendre la seva aplicació a l'anàlisi de residus àcid-làbils, normalment no detectats en els procediments habituals. En aquest apartat es descriuen els resultats obtinguts en l'estudi mencionat; el seu interès excedeix en certa manera l'àmbit de la seva aplicació estricta a aquesta Tesi, però es va considerar que la utilitat futura del mètode mereixia l'estudi general i exhaustiu que es presenta.

### III.2.1. MILLORA DE L'EFICIÈNCIA I HOMOGENEÏTAT DE LA DERIVATITZACIÓ

En el procés d'optimització del mètode d'anàlisi d'aminoàcids es va treballar sempre amb barreges estàndard d'aminoàcids o bé amb dues proteïnes de composició coneguda: RNasa A i lisozima. La barreja estàndard va ser utilitzada directament en els estudis de comparació de diferents condicions de dabsilació, mentre que quan es quantificava la composició de proteïnes també s'hidrolitzava a la vegada un estàndard per tal de poder compensar possibles pèrdues per oxidació degudes a la hidròlisi.

#### III.2.1.a. SEGONS ELS ÀCIDS UTILITZATS

El procediment normal d'hidròlisi àcida d'una proteïna es basa en la utilització de HCl 5,8 M, al que generalment s'addiciona 2-mercaptoetanol, fenol o ambdós per a que actuïn com a protectors de la degradació dels residus més susceptibles a l'oxidació. La hidròlisi amb àcid clorhídric destrueix completament els residus triptòfan i la determinació d'aquests residus, poc nombrosos però a vegades molt importants segons de quina proteïna es tracti (Sabés, 1987), ha de ser feta amb mètodes indirectes, normalment espectrofotomètrics.

Hem comprovat que el mètode de derivatització per dabsilació permet la determinació de triptòfan en proteïnes si la hidròlisi de les mateixes es duu a terme mitjançant una de les tècniques no destructives ja conegudes. Concretament, la hidròlisi de proteïnes segons els mètodes de Liu i Chang (1971) i de Simpson et al. (1976) amb àcid p-toluensulfònic 3 M o amb àcid metansulfònic 4 M respectivament (contenint ambdós triptamina al 0,02%) permet la dabsilació posterior de tots els residus aminoàcids, incloent el triptòfan. El tractament amb àcids sulfònics dona un cert nombre de pics contaminants en el cromatograma de HPLC, que no influeixen en la determinació al ser eluïts fora de la zona on apareixen els aminoàcids. El triptòfan dona una resposta molt similar a la dels altres aminoàcids i és eluït entre la

leucina i la fenilalanina (veure Figura III.21).

Així com en el mètode estàndard d'hidròlisi amb àcid clorhídric l'eliminació de l'àcid es fa per evaporació al buit o per liofilització, aquest procediment no és practicable en aquest cas al ser els àcids sulfònics no liofilitzables. Per tal de mantenir un pH òptim durant la reacció de derivatització (cosa molt important, com es veurà a l'apartat III.2.1.e) cal ajustar la mostra ja sotmesa a hidròlisi a temperatura elevada a pH 9,0 acuradament, mitjançant l'addició de dissolucions de

### TAULA III.3

COMPARACIÓ DELS ÀCIDS UTILITZATS A LA HIDRÒLISI. RESULTATS DE L'ANÀLISI D'AMINOÀCIDS DE RNasa A I LISOZIMA AMB HCl, PTS I MS I POSTERIOR DABSILACIÓ I ANÀLISI PER HPLC\*

Aminoàcid	RNasaA				Lisozima			
	segons seqüència	HCl	PTS	MS	segons seqüència	HCl	PTS	MS
Aspàrtic	15	16,6	15,3	15,7	21	21,2	23,1	25,0
Glutàmic	12	10,4	11,9	11,2	5	4,5	7,1	6,5
Serina	15	11,5	14,7	12,9	10	8,8	10,5	11,5
Treonina	10	10,3	13,1	10,1	7	9,6	5,5	7,3
Glicina	3	4,8	3,2	3,1	12	10,8	10,5	11,5
Alanina	12	12,5	11,2	11,3	12	11,4	12,1	12,3
Prolina	4	4,2	3,9	3,2	2	2,3	1,6	1,5
Valina	9	9,1	7,2	7,2	6	5,5	4,7	4,5
Arginina	4	7,7	4,7	6,3	11	11,7	12,8	12,2
Metionina	4	2,6	3,7	5,1	2	2,9	2,8	1,7
Isoleucina	3	2,7	1,9	1,4	6	5,0	5,3	5,3
Leucina	2	2,5	2,2	1,8	8	7,1	8,2	8,3
Triptòfan	-	-	-	-	6	-	5,1	4,7
Cistina	4	4,3	4,5	4,1	4	4,6	4,4	3,1
Lisina	10	8,7	10,1	12,5	6	4,8	7,6	6,4
Histidina	4	5,1	4,4	4,6	1	1,7	1,3	1,5
Tirosina	6	4,7	5,7	7,5	3	2,4	3,1	2,6

\*Posteriorment a la hidròlisi, les mostres van ser derivatitzades i analitzades segons el mètode de Chang et al. (1982)



NaOH 1 M o 3 M. La nostra experiència ens demostra que és convenient efectuar, cada vegada que es tingui una sèrie de mostres a analitzar, una prova paral·lela de neutralització amb un volum gran del mateix àcid sulfònic utilitzat; aquesta precaució permet ajustar molt acuradament el volum necessari per a la neutralització.

Aquesta neutralització afegeix un pas més de manipulació a l'anàlisi i ha de ser feta amb molta precaució de no introduir contaminacions. Tot i així, permet estalviar el pas de liofilització de la hidròlisi amb clorhídric, que és per la seva part una possible font de pèrdues i contaminacions encara més importants que en el cas de la neutralització. L'estalvi d'aquest pas representa a la vegada un considerable guany de temps.

Per comparar la fiabilitat dels diferents mètodes d'hidròlisi es va tractar RNasa A i Lisozima amb els tres àcids abans anomenats i es va procedir a la quantitatització de la seva composició en aminoàcids. A la Taula III.3 es poden veure els corresponents resultats. No s'observen diferències substancials quant a la precisió de la determinació segons quin sigui l'àcid emprat. No obstant això, hi ha alguns valors que no corresponen a la realitat, diferents segons l'àcid utilitzat, i que en aquest estadi del desenvolupament del mètode vam adjudicar a la manca d'optimització de la derivatització. Aquesta va ser duta a terme segons el protocol de Chang et al. (1982) sense modificacions. Es pot comprovar que els aminoàcids més conflictius són fonamentalment aquells que sofreixen una deficient dabsilació, com glutàmic, serina, treonina, arginina o lisina. Que els valors obtinguts siguin, segons els cassos, més alts o més baixos que en la realitat no és més que el reflex de la manca d'exactitud introduïda a la quantitatització a causa de la deficient dabsilació.

#### III.2.1.b. SEGONS EL TIPUS DE DISSOLUCIÓ AMORTIDORA, LA FORÇA IÒNICA I EL SOLVENT ORGÀNIC UTILITZATS

L'estudi de diferents amortidors, concentració dels mateixos i del tipus de solvent orgànic utilitzats va confirmar que els escollits per

Chang en el mètode original eren els més adequats.

Com a amortidors es va assajar la dabsilació en presència de bicarbonat sòdic (sistema proposat per Chang), fosfat de trietilamina i N-etil-morfolina, tots ells a la mateixa concentració final de 66 mM utilitzada en el mètode original i a pH 9,0. Els resultats dels diferents assajos van demostrar que la dabsilació és més homogènia i de més elevat rendiment en medi bicarbonat sòdic. El fosfat de trietilamina permet la dabsilació de tots els residus, però agreuja el problema de baixa dabsilació d'alguns d'ells, fonamentalment els dos àcids i la tirosina. Pitjor és encara la resposta de la N-etil-morfolina, medi en el que no és possible detectar Asp, Glu, Lis, His i Tyr, i en el que la dabsilació de la resta de residus és en general molt deficient.

La variació de la força iònica del medi no va permetre apreciar diferències importants entre els diversos punts assajats. Així, quan es dabsilaren mostres de patrons amb bicarbonat sòdic a concentracions que oscil·laven entre 66 mM i 264 mM, l'únic destacable va ser un petit descens en la dabsilació dels dos residus àcids en augmentar la força iònica. No aportant cap aventatja l'augment de força iònica, es va decidir continuar amb la proposada en el mètode original.

Com a dissolvent orgànic diferent de l'acetona tant sols es va assajar el dioxà, que va donar resultats molt negatius que desaconsellaren el seu ús.

### III.2.1.c. SEGONS LA CONCENTRACIÓ DE CLORUR DE DABSIL

Una vegada establert que el sistema de dissolvents emprat per Chang en el mètode original era el més adequat, vam procedir a l'ajust de les condicions òptimes de derivatització.

Es va comprovar que quan la concentració de clorur de dabsil a la barreja de dabsilació és augmentada de 2 a 3 vegades amb respecte a la del mètode estàndard (2,66 mM), les àrees corresponents a certs aminoàcids augmenten considerablement, en particular les d'aquells derivats que donaven una resposta baixa (Glu, Asp, Ser, Thr, His, Tyr) (Figura III.17). En aquestes condicions de dabsilació, l'àrea

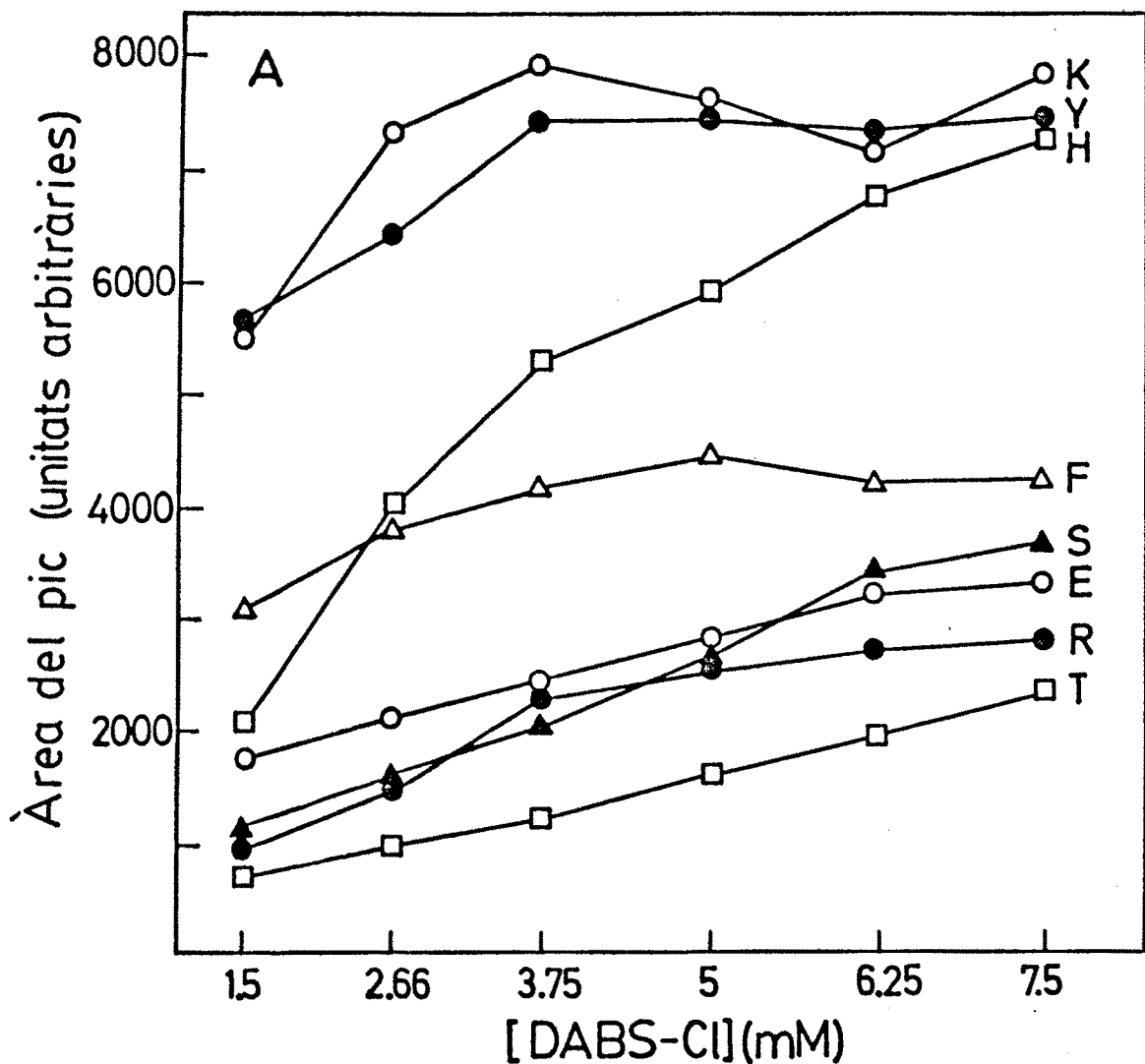
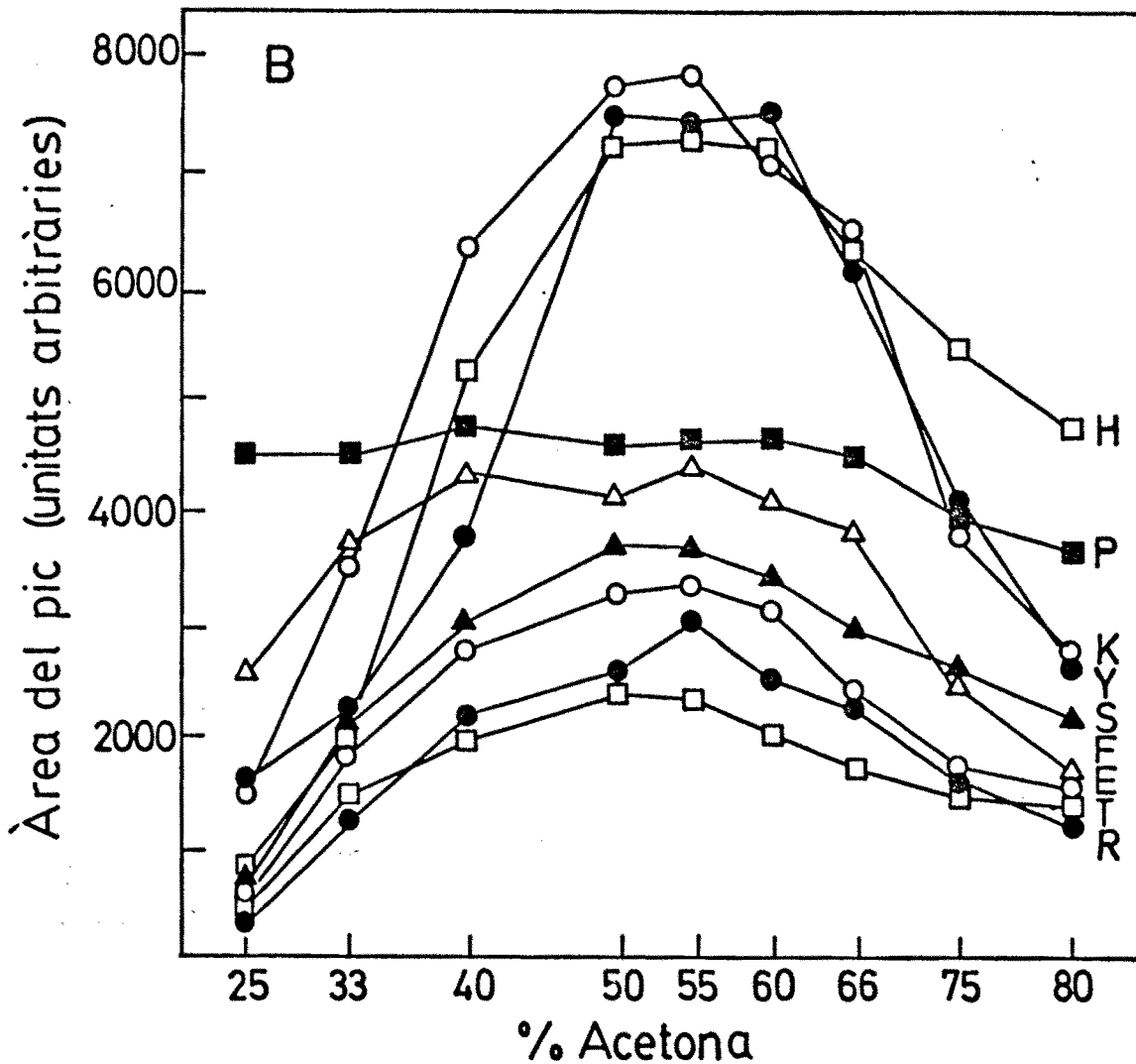


FIGURA III.17. Variació del grau de dabsilació d'aminoàcids proteïnogènics segons les concentracions de clorur de dabsil emprades a la reacció de derivatització. A  $100 \mu\text{l}$  d'una barreja estàndard ( $60 \mu\text{M}$ ) d'aminoàcids en bicarbonat sòdic  $0,132\text{M}$  a  $\text{pH } 9,0$  se li van afegir  $100 \mu\text{l}$  de clorur de dabsil en acetona a concentracions que oscil.laven entre  $3,0$  i  $15\text{mM}$  i la barreja es va mantenir a  $70^\circ \text{C}$  durant  $15 \text{ min}$ .



**FIGURA III.18.** Variació del grau de dabsilació d'aminoàcids proteïnogènics segons el percentatge d'acetona a la barreja final de derivatització. Volums progressivament creixents de dissolució de clorur de dabsil s'afegiren a volums progressivament decreixents de barreja estàndard d'aminoàcids, de manera que es va mantenir constants les condicions finals següents: concentració d'aminoàcids ( $60 \mu\text{M}$ ), concentració de bicarbonat sòdic ( $66 \text{mM}$ ), pH ( $9,0$ ) i concentració de clorur de dabsil ( $7,5 \text{mM}$ ). La barreja es va mantenir a  $70^\circ \text{C}$  durant  $15 \text{min}$ .

corresponent als residus didabsilats (Lys, His i Tyr) és gairebé el doble de la corresponent als monodabsilats, i s'elimina la variabilitat anteriorment detectada en l'àrea dels pics de His i Tyr. També és de remarcar que la homogeneïtat general de dabsilació es veu fortament afavorida.

L'ús de concentracions de clorur de dabsil superiors a 7,5 mM produeix un descens progressiu a l'àrea d'un bon nombre de residus, en particular dels didabsilats. Aquest efecte ha de ser adjudicat probablement a la formació d'agregats insolubles de reactiu, el qual es troba per damunt del seu límit de solubilitat en la barreja aigua:acetona utilitzada. És possible que els agregats de reactiu puguin fer coprecipitar els derivats més hidrofòbics, fent l'efecte de donar lloc a un menor grau de derivatització.

#### III.2.1.d. SEGONS LA RELACIÓ DISSOLVENT AQUÓS: DISSOLVENT ORGÀNIC

La relació de volums entre solvent aquós i solvent orgànic és un factor molt important de cara a una eficient i homogènia dabsilació. A la Figura III.18 pot observar-se que, per a la majoria d'aminoàcids, s'obté la màxima dabsilació a relacions aigua:acetona entre 1:1 i 1:1,25 (v/v). Aquestes són condicions diferents de les proposades per Chang (1:2, v/v). Aquesta restricció en la relació de volums limita el percentatge de solvent orgànic que es pot utilitzar i, per tant, la concentració final de clorur de dabsil utilitzada. A la figura s'observa clarament que la variació en el grau de dabsilació de residus com Lys, His i Tyr és molt important quan el percentatge d'acetona cau fora dels límits de seguretat, del que s'en dedueix la necessitat tant d'ajustar acuradament les condicions de dabsilació, com de mantenir-les, evitant al màxim l'evaporació d'acetona durant el procés de derivatització.

Dels dos factors que fins ara s'han demostrat com més relacionats amb les variacions en el grau de dabsilació dels aminoàcids, es pot afirmar en principi que la concentració de clorur de dabsil està més relacionada amb el rendiment de la derivatització, mentre que la relació

de volums entre aigua i acetona afecta més directament a la seva homogeneïtat. Aquesta darrera afirmació es dedueix directament de la Figura III.18 on, a més de les característiques ja comentades, s'observa que, fora dels límits proposats, la variació augmenta o disminueix bruscament. Això fa que petites variacions en les relacions de volum dins dels marges fins ara estandaritzats puguin provocar importants diferències en el resultat final.

### III.2.1.e. SEGONS EL pH DE DERIVATITZACIÓ

Els assajos realitzats a pH 8,5, 9,0 i 9,5 van demostrar que es pot obtenir una lleugera millora en la homogeneïtat de la derivatització si es treballa a pH 8,5 en lloc de l'estàndard 9,0 (Figura III.19). No obstant això, el màxim rendiment general del procés s'assoleix a pH 9,0, d'acord amb els resultats de Chang et al. (1981), i a pH 8,5 el grau de derivatització dels aminoàcids didabsilats disminueix clarament. A pH 9,5 s'observa un descens important a les àrees de molts dels residus, en particular d'aquells que donen una resposta baixa en les condicions originals. Aquest comportament suggereix que la degradació dels derivats es dona amb major eficiència a pH elevat i és un procés que s'oposa a la reacció de derivatització, de la mateixa manera que ho fan altres reaccions de sulfonilació relacionades (Gray, 1972).

Per concloure aquest apartat, a continuació s'enumeren les condicions de derivatització considerades finalment com idònies per obtenir la màxima homogeneïtat i rendiment en la derivatització per dabsilació dels aminoàcids proteïnogènics, fent esment en tot cas de les condicions finals a la barreja de reacció:

Concentració de clorur de dabsil: 7,5 mM

Concentració de bicarbonat sòdic: 66 mM

Relació aigua:acetona (v/v): 1:1 - 1:1,25

pH de la reacció: 9,0

Temperatura: 70° C

Temps de reacció: 15 min

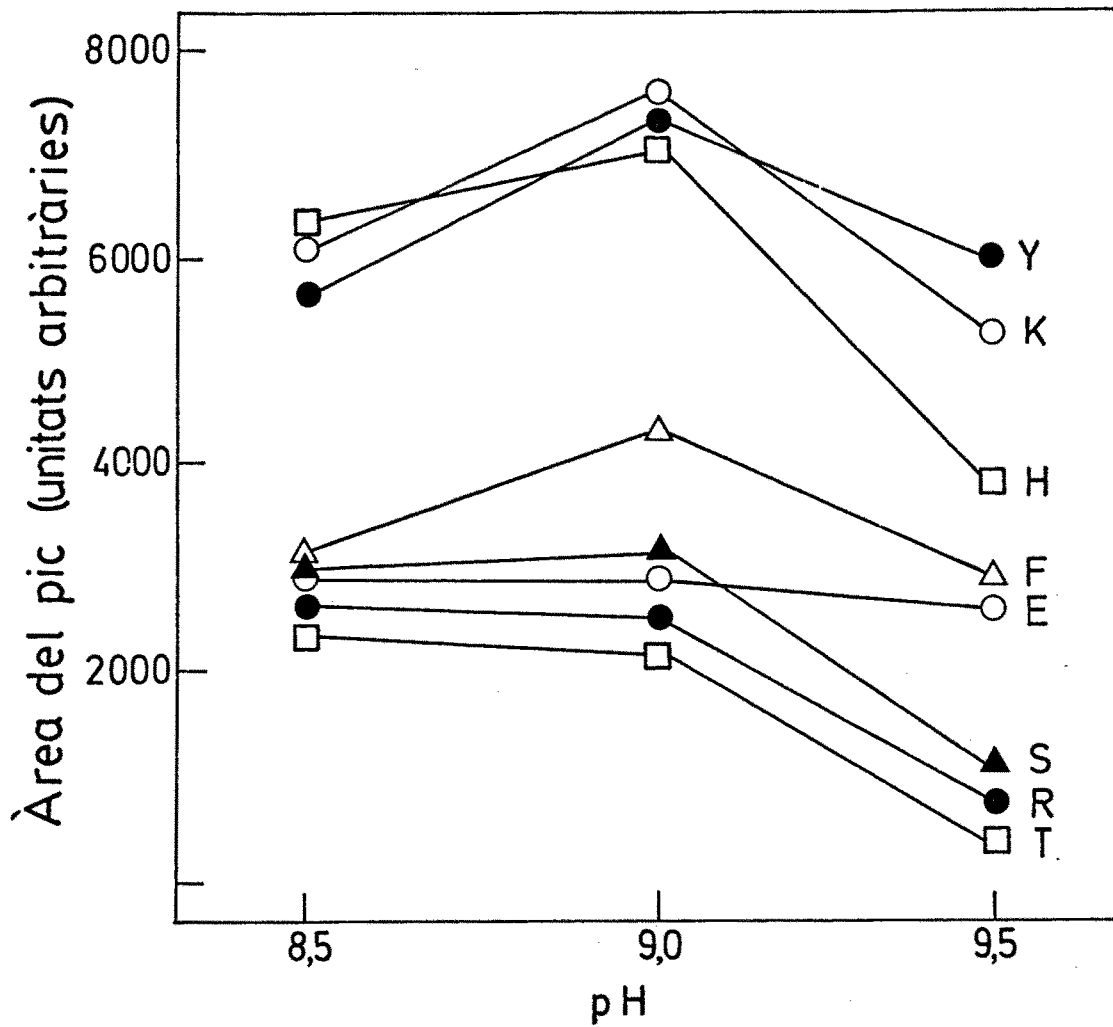


FIGURA III.19. Variació del grau de dabsilació d'aminoàcids proteïnogènics segons el pH del medi. Concentració de clorur de dabsil a la barreja final, 7,5 mM. Altres condicions, excepte el pH de la solució d'aminoàcids en bicarbonat sòdic, com a la Figura III.17.

### III.2.2. ESTABILITAT I EMMAGATZAMENT DELS DABSIL-AMINOÀCIDS

Un dels problemes amb què es troben molts dels mètodes d'anàlisi d'aminoàcids per derivatització pre-columna és el de l'estabilitat dels derivats. Segons Chang et al. (1981; 1982; 1983) l'àrea dels pics dels diferents aminoàcids dabsilats es manté durant mesos quan aquests es conserven a pH intermedi i a temperatura ambient. Malgrat això, nosaltres hem observat que aquesta estabilitat no és absolutament general, i que les àrees d'alguns residus poden disminuir fins un 30% després de mantenir les barreges a temperatura ambient durant 15 dies.

Per tal de definir les millors condicions per a l'emmagatzament dels dabsil-aminoàcids vam procedir a analitzar diverses alíquotes d'una mateixa mostra conservades en condicions diferents durant 3 setmanes. Els valors d'àrea de pic obtinguts es van comparar amb els que s'obtingueren en una anàlisi prèvia, feta amb la mostra recent dabsilada. Vam comprovar que la conservació dels derivats dabsilats a  $-20^{\circ}\text{C}$  o liofilitzats permetia mantenir les àrees dels pics dins d'un error que oscil·lava entre l'1 i el 2%. En canvi, i tal com ja havíem comprovat a la pràctica, la conservació de les mostres a temperatura ambient feia disminuir els valors d'àrea d'alguns dels residus, particularment dels didabsilats. El mateix problema es detectà en mostres conservades a  $4^{\circ}\text{C}$  durant el mateix període de temps.

A la Figura III.20, part A, es representen les àrees obtingudes per alguns residus conservats a diferents condicions; malgrat que, com pot comprovar-se a la part B de la figura, l'àrea mitja obtinguda a temperatura ambient o a  $4^{\circ}\text{C}$  no és significativament inferior a la obtinguda en les altres dues condicions, els residus His i Tyr, fonamentalment, són els que sofreixen més els efectes de conservació en condicions no idònies. Per altra banda, un bon nombre de residus, dels que se'n dona alguns exemples a la gràfica, mantenen la seva àrea independentment de les condicions. La raó de la disminució selectiva d'àrea per part d'alguns residus, concretament dels més hidrofòbics una vegada derivatitzats, ha de raure probablement en la insolubilització progressiva d'aquests derivats més voluminosos.



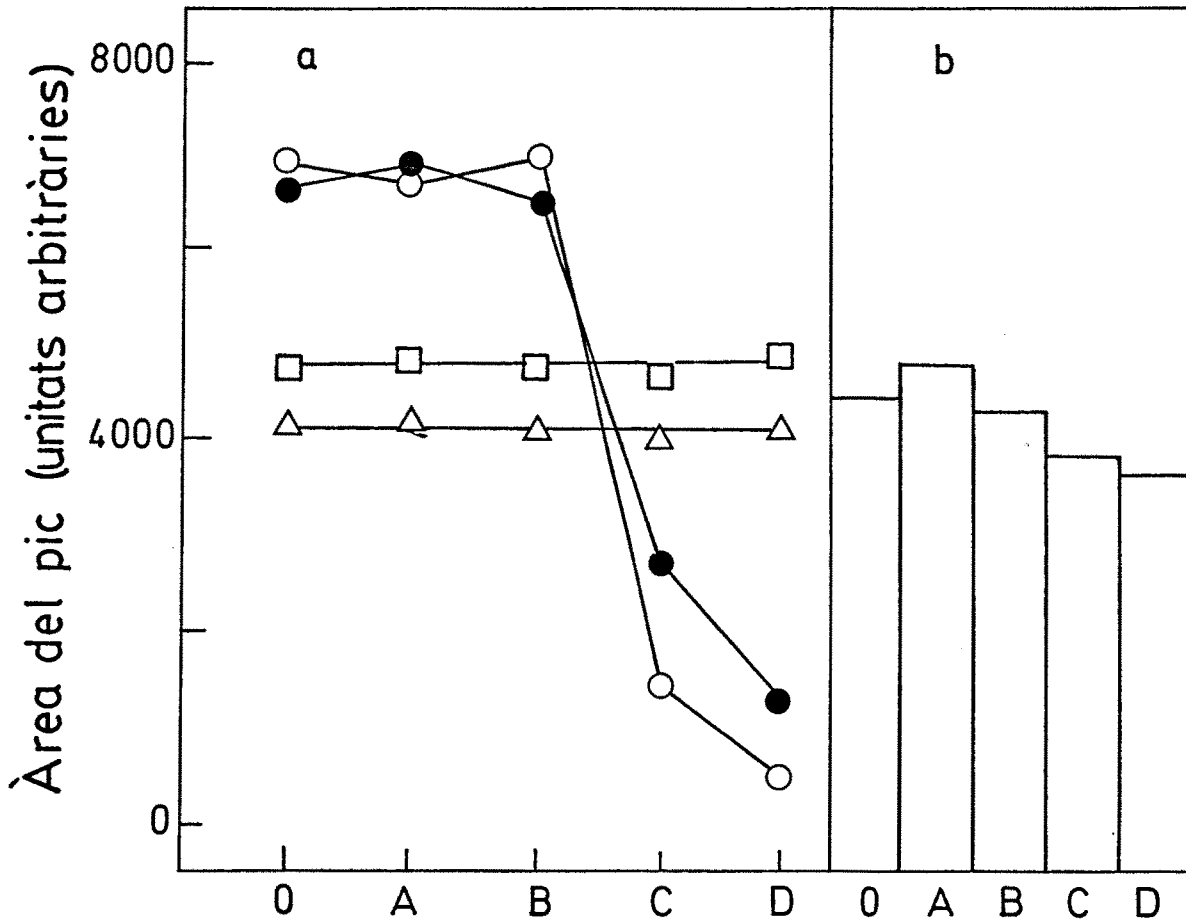


FIGURA III.20. Estudi de la conservació dels dabsil- aminoàcids segons les condicions d'emmagatzament. (a), àrees de diferents residus aminoàcids analitzats després de la dabsilació (0) o després de conservar-los tres setmanes a  $-20^{\circ}\text{C}$  (A), liofilitzats (B), a temperatura ambient (C) o a  $4^{\circ}\text{C}$  (D). (b) àrea mitja per residu després de la conservació; mateixos símbols que a la part (a).

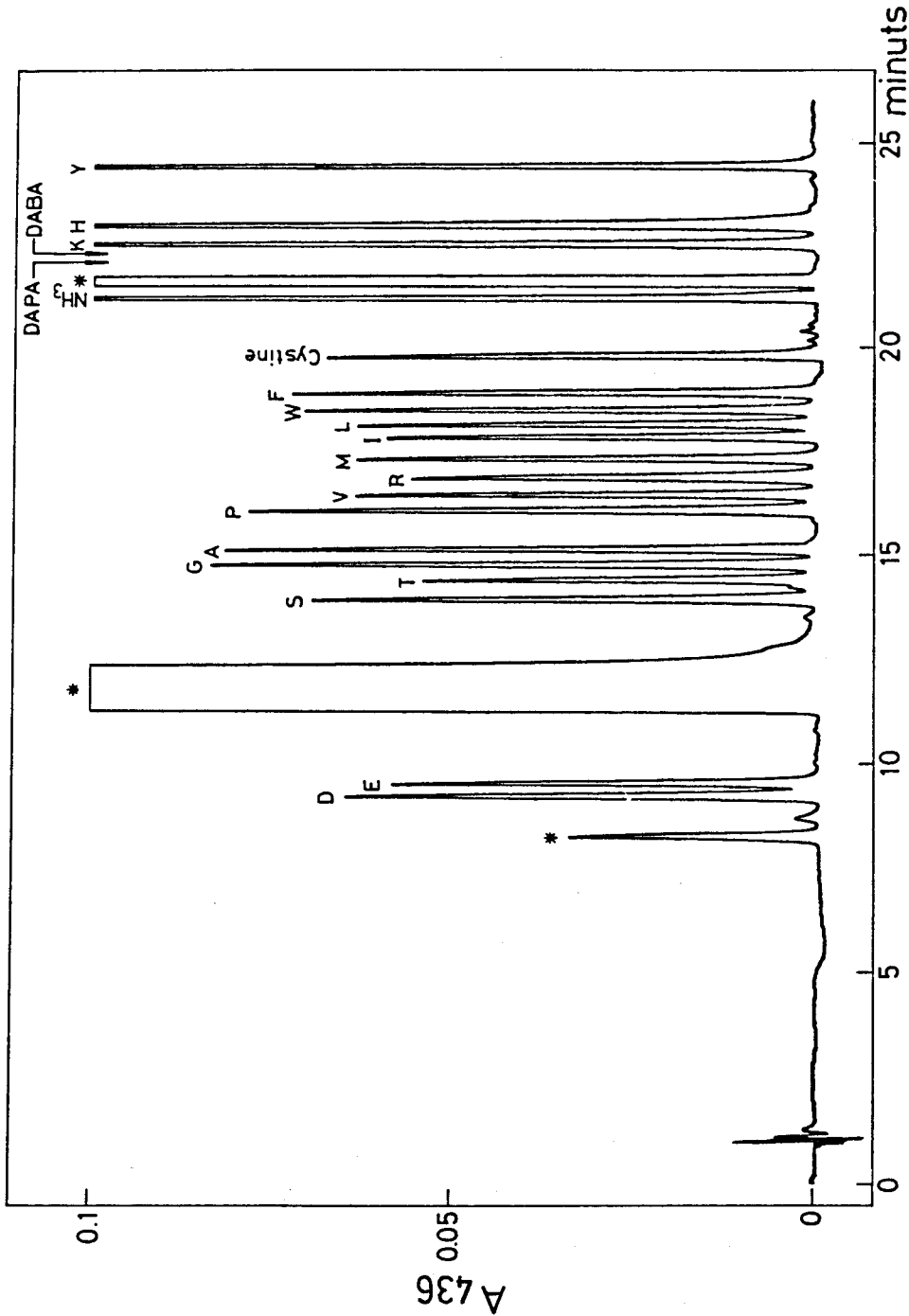
La dabsilació és un mètode de derivatització particularment adequat per a l'anàlisi automatitzada d'aminoàcids donada la gran estabilitat observada. El descens en àrea de pic durant un dia de treball a temperatura ambient per als residus menys estables ( $\sim 1\%$ ) és inferior a l'umbral de precisió del mètode de quantitatització. L'ús combinat d'un aplicador automàtic de mostres i d'un programa de cromatografia ràpida (veure més endavant) permeten l'anàlisi d'aproximadament 40 mostres en un sol dia amb errors despreciables quant a la degradació. Quan se segueix aquest procediment és aconsellable insertar un estàndard cada 5 o 10 mostres per tal d'assegurar la precisió en la quantitatització i identificació dels pics per temps de retenció. Cas que les mostres dabsilades no puguin ser analitzades el mateix dia, aquestes poden ser conservades a  $-20^\circ \text{C}$  sense que sofreixin degradacions.

### III.2.3. CROMATOGRAFIES RÀPIDA I D'ALTA RESOLUCIÓ

Segons quina sigui la naturalesa de la proteïna a estudiar cal aplicar diferents programes cromatogràfics. Això és una conseqüència de la composició diferencial d'algunes proteïnes: si bé la majoria d'elles poden ser analitzades amb un sistema de cromatografia ràpida, n'hi ha algunes que són particularment riques en certs residus aminoàcids, amb gran diferència respecte als altres. En aquests casos, i en aquells en que calgui analitzar certs aminoàcids modificats, serà necessari utilitzar gradients més suaus i selectius.

Per anàlisis de rutina, on el factor més important és la rapidesa, hem dissenyat un programa de gradient que permet separar els 20 aminoàcids primaris en 25 min (Figura III.21), aproximadament el 60 % del temps necessari per anàlisi en el mètode de Chang et al. (1982; 1983). Aquesta reducció en el temps d'anàlisi va ser possible gràcies a l'ús d'una columna C-18 de suport esfèric,  $4 \mu\text{m}$  de mida de partícula i 15 cm de llargada (Novapak C-18, Waters). El gradient i els solvents utilitzats en aquesta separació s'especifiquen a la figura.

Es possible escurçar aquests passos i efectuar la separació en menys de 20 minuts, però en aquest cas es pot veure afectada la



**FIGURA III-21.** Anàlisi d'aminoàcids proteínogènics en 25 min en columna de fase reversa Novapak C-18 (150 x 4,6 mm) de 4 m de mida de partícula (Waters). Es va tractar un estàndard d'aminoàcids que contenia 1 nmol de cada tipus de residu amb àcid p-toluensulfònic 3M (amb 0,02% de triptamina afegida) a 110° C durant 22 h. Després de seguir el procés de dabsilació estàndard descrit a II.6.5. es va injectar 1/12 de la mostra ( 80 pmols) a la columna. DAPA i DABA fan referència als àcids diaminopropiònic i diaminobutíric respectivament. Els asteriscs es refereixen als pics produïts per l'excés de reactiu i per productes laterals. Solvents: A, 9,0 mM fosfat sòdic (pH 6,5) i B, acetoniitril, ambdós contenint un 4% de dimetilformamida. Gradient, expressat en percentatges del solvent B: 9% als 0 min; 23% als 8 min, amb un increment hiperbòlic (corba 5 del controlador de gradients M680); 37% als 16 min; 46% als 17 min; 49% als 20 min; 60% als 21 min. Tots els darrers increments van ser lineals. Temperatura de la columna, 50° C.

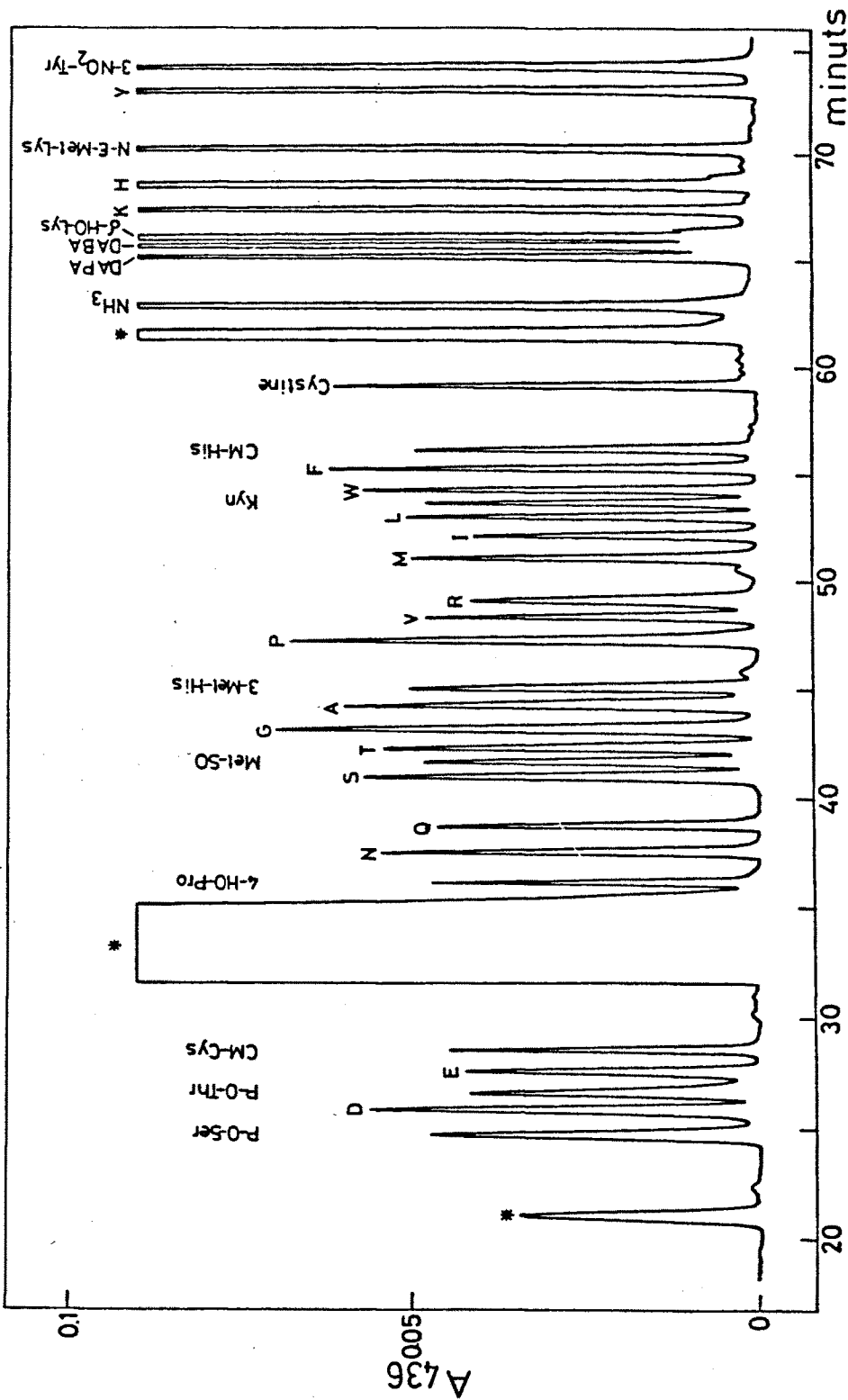


FIGURA III.22. Anàlisi d'alta resolució d'aminoàcids primaris i modificats. Els aminoàcids modificats s'afegiren a relació equimolar a una barreja estàndard i es procedí a la dabsilació de la mostra pel procediment habitual. Columna, temperatura i solvents com a la Figura III.21, excepte que el pH del solvent A és aquí de 6,6. Gradient, expressat en increments lineals del solvent B: 7% entre 0 i 5 min; 19% als 32 min; 24% als 42 min; 34% als 55 min; 38% als 56 min; 53% als 78 min; 60% als 80 min. Abreviatures: P-O-Ser: fosfoserina; P-O-Thr: fosfotreonina; CM-Cys: carboximetilcisteïna; 4-HO-Pro: 4-hidroxiprolina; Met-SO: metionina-sulfoxid; 3-Met-His: 3-metilhistidina; Kyn: kinurenina;  $\delta$ -HO-Lys:  $\delta$ -hidroxilisina; N- $\epsilon$ -Met-Lys: N- $\epsilon$ -metilisina; 3-NO<sub>2</sub>-Tyr: 3-nitrotirosina.

distribució homogènia de pics i aparèixer alguns solapaments, amb el que el sistema d'integració pot funcionar inadecuadament.

Quan la composició de la proteïna està descompensada, amb valors molt elevats per alguns aminoàcids (cas de Gly i Pro al col.làgen i de Lys i Arg a les histones i protamines), és recomanable emprar un gradient més suau, no il.lustrat amb gràfiques, i que s'indica a continuació:

91% A i 9% B a 0 min; 40% B a 24 min; 46% B a 25 min;  
55% B a 31 min; 60% B a 33 min.

En el cas que es desitji separar un nombre elevat de derivats, com quan existeixen modificacions covalents post-traduccionals o modificacions artificials, és recomanable l'ús d'un gradient encara més suau, il.lustrat a la Figura III.22. Malgrat que aquest programa d'alta resolució és relativament lent, la separació dels aminoàcids primaris i modificats és encara més ràpida que amb altres mètodes analítics basats en la cromatografia de bescanvi iònic i derivatització post-columna, ja sigui en la modalitat estàndard (Bohlen i Schroeder, 1982) o en la estesa per a fluids fisiològics (Kedenburg, 1971). Cal remarcar que en aquest programa, tot i mantenint idèntiques la resta de condicions d'anàlisi amb respecte al mètode ràpid, és necessari ajustar el pH de la dissolució de fosfat a 6,6, és a dir, 0,1 unitats per sobre de les condicions estàndard.

Aquestes condicions d'anàlisi poden ser aplicades a diferents columnes de fase reversa. Cal recordar però que, com ja deien Chang et al (1982; 1983), la posició cromatogràfica de certs derivats (Glu, Asp, Arg...) és lleugerament depenent de la columna que s'utilitzi, i cal ajustar la força iònica del medi fins assolir la separació desitjada. Amb la columna Novapak, per exemple, a 12 mM fosfat, condicions idònies per a la columna Lichrosorb, el pic d'arginina se solapa amb el de prolina, mentre que a 8 mM ho fa amb el de metionina. Com ja s'expressà anteriorment, 9,0 mM de fosfat és la força iònica adequada per aquesta columna, a la que Arg elueix entre Val i Met.

Els residus cisteïna normalment s'analitzen després de

convertir-los a un derivat més estable. En aquest treball hem estudiat les posicions de dos dels més usuals, carboximetilcisteïna o àcid cisteic, que elueixen en una posició cromatogràfica neta de contaminacions (veure Taula III.4). La forma oxidada natural de la cisteïna, la cistina pot ser analitzada directament sense conversió, puix que és estable a la hidròlisi amb àcids sulfònics i el seu derivat dabsilat elueix entre els derivats de fenilalanina i amoni.

#### III.2.4. ANÀLISI DE RESIDUS ÀCID-LÀBILS

Ja s'ha comentat a l'apartat III.2.1.a que la hidròlisi de proteïnes amb àcids sulfònics i posterior dabsilació permet l'anàlisi de triptòfan sense necessitat d'haver de recórrer a mètodes alternatius. Els residus asparagina i glutamina també sofreixen degradació en presència d'àcid, fins i tot quan aquest és un àcid sulfònic, convertint-se en aspàrtic i glutàmic respectivament.

El tractament de la proteïna amb el reactiu bis (trifluoroacetoxi)iodo benzè (BTI) previ a la hidròlisi àcida permet analitzar Asn i Gln directament (Soby i Johnson, 1981). Aquest reactiu converteix els residus carboxamida en les seves corresponents diamines, àcid diaminopropiònic (DAPA) i àcid diaminobutíric (DABA), evitant la seva conversió a les formes àcides durant la hidròlisi. Hem comprovat que després d'aquest tractament químic la major part dels aminoàcids poden ser analitzats per dabsilació-HPLC de la manera habitual i sense interferències. També s'observa un descens en l'àrea dels pics corresponents a àcid aspàrtic i àcid glutàmic i l'aparició de dos pics específics per dabsil-DAPA i dabsil-DABA (Figures III.21 i III.22).

Malgrat el bon resultat del mètode a nivell qualitatiu, la conversió de Asn i Gln en DAPA i DABA va estar sempre lluny de ser quantitativa quan el mètode es va assajar amb proteïnes patró com RNasa A i lisozima. A més, el tractament amb BTI modifica certs residus com Met, Trp, His i Tyr, fent desplaçar o eliminant els seus derivats dabsilats de la cromatografia. Aquest efecte és degut probablement a reaccions de iodinació (Merkushev et al., 1980) provocades pel reactiu.

En aquest estadi, és necessària encara una anàlisi duplicada de la mostra, amb BTI i sense, per a la determinació de tots els derivats d'aminoàcids proteïnogènics.

### III.2.5. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS MODIFICATS

A més dels 20 aminoàcids primaris les proteïnes contenen més de 100 aminoàcids secundaris naturals produïts per modificacions post-traduccionals covalents (Ury i Wold, 1977; Wold i Moldave, 1984). Si considerem a més que, durant l'aïllament de proteïnes o com a conseqüència dels tractaments destinats a conèixer-ne la composició d'aminoàcids, la seqüència i la conformació, o a detectar els residus funcionals, es genera una important quantitat d'aminoàcids modificats, podem fàcilment deduir que el nombre total d'aminoàcids susceptibles de ser analitzats és força elevat. Les metodologies per a detectar els aminoàcids modificats són molt diverses (Wold i Moldave, 1984).

El programa de cromatografia d'alta resolució, presentat a la Figura III.22, permet aïllar i quantificar un bon nombre d'aminoàcids modificats detectats freqüentment en proteïnes natives o generats després de tractaments químics de les mateixes. A la Taula III.4 es relacionen els derivats dabsilats que s'han aïllat i identificat, juntament amb els temps de retenció característics segons el programa utilitzat. Es pot deduir fàcilment a partir de la Taula que els programes ràpids no són capaços de resoldre tots els derivats, mentre que el programa estès permet separar la majoria dels derivats com pics individuals. Aquesta informació pot ser útil en la interpretació de pics desconeguts o colces apareguts durant l'anàlisi rutinària de proteïnes pel mètode de dabsilació-HPLC.

Al mateix temps que s'assajava el comportament cromatogràfic de diversos derivats, es va estudiar el corresponent a dos dels utilitzats normalment com estàndards interns en el mètode clàssic de bescanvi iònic: norleucina i S- $\beta$ -(4-piridiletíl)-D,L-penicilamina (Riordan i Giese, 1977). Vam comprovar que el seu ús no és viable amb aquest mètode, puix que aquests derivats són eluïts en una regió molt saturada

## TAULA III.4

TEMPS DE RETENCIÓ EN HPLC DE FASE REVERSA DE DIFERENTS DERIVATS D'AMINOÀCIDS NATURALS I MODIFICATS QUÍMICAMENT. (A) SISTEMA DE CROMATOGRÀFIA RÀPIDA; (B) SISTEMA DE CROMATOGRÀFIA D'ALTA RESOLUCIÓ

Aminoàcid	Temps de retenció (min)		Aminoàcid	Temps de retenció (min)	
	A	B		A	B
Fosfoserina		24,90	Cisteïna		49,01
Acid cisteic		25,66	Arginina	17,31	49,65
Acid aspàrtic	9,17	26,05	Metionina	17,79	51,62
Fosfotreonina		26,80	Isoleucina	18,34	52,67
Acid glutàmic	9,50	27,82	4-PEP**		52,92
Fosfotirosina		28,10	Leucina	18,63	53,57
CM-Cisteïna*		28,82	Kinurenina		54,22
4-Hidroxiprolina		36,42	Triptòfan	19,03	54,82
Asparagina		37,53	Norleucina		54,87
Glutamina		38,54	Fenilalanina	19,47	55,82
Serina	14,18	41,45	CM-Histidina**		56,72
Metionina sulfòxid		42,15	Cistina	20,39	59,65
Homoserina		42,63	NH <sub>3</sub>	21,86	63,40
Metionina sulfona		42,68	DAPA #		65,67
Treonina	14,69	42,77	DABA ##		66,20
Glicina	15,07	43,67	δ-Hidroxisilisina		66,65
Alanina	15,48	44,80	Lisina	23,15	67,97
3-Metilhistidina		45,47	Histidina	23,61	69,12
β-Alanina		45,60	N-ε-Metil-lisina		70,87
Prolina	16,47	47,77	Tirosina		73,65
Homoserina lactona		48,01	3-Nitrotirosina	24,82	74,75
Valina	16,87	48,90			

\* Carboximetilcisteïna

\*\* S-β-(4-piridiletil)-DL-penicilamina

\*\*\* Carboximetilhistidina

# Acid 2,3-diaminopropiònic

## Acid 2,4-diaminobutíric



de pics, el que fa que els solapaments inevitables afectin l'exactitud de la quantitatització. Suggestim com estàndard intern el derivat aminoàcid nitrotirosina, el producte de dabsilació del qual apareix en una regió neta del cromatograma (veure Figura III.22 i Taula III.4) i pot ser quantificat fàcilment per espectrofotometria a 381 nm (punt isosbèstic respecte al pH de  $= 2200 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Aquest derivat és, a més, força estable a la hidròlisi si s'addiciona al medi 2-mercaptoetanol i fenol (0,05% de cada un) durant el tractament àcid.

### III.2.6. SENSIBILITAT DEL MÈTODE

A la major part d'experiments duts a terme en aquest treball es va utilitzar 1 nmol de proteïna del que, després de la hidròlisi i dabsilació, se n'injectà 1/10 (100 pmols) a la columna de fase reversa. Segons els treballs de Chang et al. (1981; 1982; 1983), la sensibilitat del mètode permet l'anàlisi de 5-20 pmols de cada aminoàcid. No obstant, quan la quantitat inicial de proteïna és inferior a 100 pmols, considerem que és important prendre mesures de precaució exigents per evitar la contaminació de la mostra (Hare, 1977) i pèrdues de derivats per adsorció als tubs (Robel, 1973).

### III.2.7. REPRODUÏBILITAT DEL MÈTODE

La reproduïbilitat del mètode de dabsilació-HPLC es va estudiar amb referència a cada un dels passos del mètode analític, per tal de veure quina era la influència de cada un d'ells en el resultat final. Així, es va estudiar la reproduïbilitat de la cromatografia, la corresponent al procés de dabsilació, i la corresponent a la hidròlisi i a l'emmagatzament. Cada un dels dos passos posteriors acumula, a més de l'error intrínsec que pugui tenir, el degut al pas o passos que tenen lloc anteriorment. Així, per exemple, a l'error que pugui haver-hi al cromatografiar dues mostres diferents s'hi acumularà el degut a l'anterior dabsilació.

TAULA III.5

## REPRODUÏBILITAT DE LES ANÀLISIS D'AMINOÀCIDS PER DABSILACIÓ-HPLC

Influència de la cromatografia, dabsilació i emmagatzament a l'anàlisi quantitativa d'una proteïna estàndard (lisozim de pollastre) hidrolitzada amb àcid p-toluensulfònic 3 M a 110° C durant 22 h. Els valors es refereixen a residus per molècula i s'expressen en mitja  $\pm$  D.E. de 7 determinacions diferents, fetes en les condicions següents: (A) Es va dabsilar una mostra d'hidrolitzat de lisozim; la mostra va ser separada en set al·iquotes que van ser analitzades immediatament; (B) set al·iquotes d'una mostra d'hidrolitzat de lisozim van ser dabsilades individualment i analitzades immediatament; (C) en dies diferents, set mostres que contenien la mateixa quantitat de lisozim liofilitzat van ser hidrolitzades i dabsilades immediatament. Les mostres dabsilades van ser conservades a -20° C durant dos mesos, analitzant-les posteriorment totes juntes el mateix dia; (D) valors deduïts de l'anàlisi seqüencial.

Aminoàcid	A (n = 7)	B (n = 7)	C (n = 7)	D
Acid aspàrtic	21,81 $\pm$ 0,20	21,62 $\pm$ 0,24	21,52 $\pm$ 1,14	21
Acid glutàmic	5,34 $\pm$ 0,09	5,76 $\pm$ 0,12	4,32 $\pm$ 0,47	5
Serina	9,79 $\pm$ 0,17	10,10 $\pm$ 0,16	9,67 $\pm$ 1,01	10
Treonina	6,68 $\pm$ 0,02	7,07 $\pm$ 0,23	6,12 $\pm$ 1,01	7
Glicina	12,06 $\pm$ 0,12	12,10 $\pm$ 0,05	12,77 $\pm$ 0,12	12
Alanina	11,37 $\pm$ 0,12	11,39 $\pm$ 0,18	12,00 $\pm$ 0,29	12
Prolina	2,08 $\pm$ 0,06	2,19 $\pm$ 0,13	2,21 $\pm$ 0,06	2
Valina	5,45 $\pm$ 0,08	5,28 $\pm$ 0,10	5,32 $\pm$ 0,28	6
Arginina	12,07 $\pm$ 0,05	11,81 $\pm$ 0,10	11,26 $\pm$ 0,70	11
Metionina	2,11 $\pm$ 0,04	2,02 $\pm$ 0,16	2,01 $\pm$ 0,41	2
Isoleucina	5,43 $\pm$ 0,09	5,25 $\pm$ 0,14	5,71 $\pm$ 0,49	6
Leucina	8,39 $\pm$ 0,09	8,15 $\pm$ 0,14	8,56 $\pm$ 0,46	8
Triptòfan	6,14 $\pm$ 0,07	5,89 $\pm$ 0,13	6,53 $\pm$ 0,43	6
Fenilalanina	3,20 $\pm$ 0,10	3,31 $\pm$ 0,23	3,23 $\pm$ 0,32	3
Cistina	4,25 $\pm$ 0,07	4,11 $\pm$ 0,07	4,40 $\pm$ 0,45	4
Lisina	5,76 $\pm$ 0,05	5,73 $\pm$ 0,11	4,94 $\pm$ 0,70	6
Histidina	1,13 $\pm$ 0,03	1,36 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,18	1
Tirosina	2,75 $\pm$ 0,06	2,76 $\pm$ 0,19	3,16 $\pm$ 0,73	3

Es van dur a terme tres sèries diferents d'anàlisi d'aminoàcids amb hidrolitzats de lisozima amb àcid p-toluensulfònic. Si s'observen els valors de la Taula III.5, columna A, es comprova que, al nivell de 100 pmol de càrrega, la reproduïbilitat del sistema cromatogràfic considerat aïlladament és d'aproximadament el 1,3 % (Desviació Estàndard Relativa, D.E.R.). Aquesta variabilitat és la deguda a les diferències en àrea de pic, a possibles errors en la integració i a l'estabilitat diferencial a curt termini dels derivats dabsilats quan s'analitzen amb l'ajut d'un injector automàtic de mostres). Quan es considera també la variabilitat deguda al procés de dabsilació, columna B de la Taula III.5, la reproduïbilitat mitja és del 2,1% (D.E.R.). Aquest valor és comparable als obtinguts amb mètodes clàssics de bescanvi iònic (Needleman, 1970) o de derivatització post-columna amb o-ftaldehid (Bohlen i Schroeder, 1982).

A la columna C de la Taula III.5 s'expressa la reproduïbilitat del mètode quan es consideren totes les possibles fonts de variabilitat: hidròlisi, dabsilació i emmagatzament a  $-20^{\circ}$  C, tot fet en dies diferents i amb preparacions diferents de reactius. A aquests factors cal ajuntar-hi el de la cromatografia final. Es comprova que la reproduïbilitat disminueix fins a un 7,5% (D.E.R.), variabilitat important, però que ha de ser adjudicada a les condicions extremes de l'experiment. El sol fet de no emmagatzemar els derivats a  $-20^{\circ}$  C fa que la reproduïbilitat presenti un valor ja més acceptable del 5,2% (D.E.R.). Se'n pot concloure que, per anàlisis quantitatives de precisió és recomanable no emmagatzemar els derivats i procedir a la seva immediata cromatografia després de la dabsilació.

### III.3. IDENTITAT DE LES DUES FORMES DE PCPA

Les dues formes de procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc presenten diferències en quant al seu comportament durant l'activació triptica (Martínez et al., 1981), de la mateixa manera que succeix amb les diferents formes oligomèriques de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de bou. Aquestes diferències de comportament s'han interpretat normalment com efectes de l'estructura quaternària sobre la funcionalitat de la subunitat procarboxipeptidasa A. Sembla més improbable que puguin ser degudes a diferències estructurals entre les subunitats precursors de l'activitat CPA. No obstant aquest punt de vista generalment acceptat, mai no s'ha fet amb les PCPAs bovines, les més estudiades, un estudi estructural comparatiu entre les subunitats I aïllades a partir de les formes S5 i S6. Tant sols, a partir d'anàlisis d'aminoàcids fets amb la subunitat I aïllada a partir del complex ternari (Freisheim et al., 1967a) i de la deducció de la composició de la subunitat I aïllada a partir del complex binari S5, feta per substracció de la composició de la subunitat II sobre la composició total del complex binari (Uren i Neurath, 1972), es pot deduir que hi ha una elevada homologia entre la composició d'aminoàcids d'ambdues PCPA. Les diferències observades han de ser adjudicades a que les anàlisis no han estat fetes simultàniament i a que, depenent dels autors, s'han considerat pesos moleculars lleugerament diferents per a formes òbviament iguals.

Pel que respecta a les procarboxipeptidases A de pàncreas de porc, se sap que tant la PCPA monomèrica natural com la subunitat PCPA en el complex binari posseeixen el mateix pes molecular (Kobayashi et al., 1978; Martínez et al., 1981). La composició d'aminoàcids de la subunitat PCPA aïllada del complex binari per cromatografia en SDS resultava ser pràcticament igual (considerant l'error experimental) que la corresponent al monòmer natural (Kobayashi et al., 1978). Per altra banda, els mapes peptídics de les dues formes, seguits per electroforesi en SDS després del tractaments fets amb bromur de cianògen i àcid o-iodosobenzoic, van demostrar que, pel que respecta als residus Met i

Trp respectivament, les seves posicions a la seqüència, així com la llargada dels fragments que queden limitats per ambdós residus aminoàcids són plenament coincidents entre una forma i altra de PCPA. Les úniques diferències aparegudes en aquests mapes peptídics foren les bandes corresponents al trencament de la subunitat PPE, present al complex binari. Malgrat aquestes coincidències, no es pot encara concloure definitivament que la PCPA presenta la mateixa seqüència en ambdues formes.

Cal afegir que anteriorment hem aïllat la subunitat PCPA del complex binari de pàncreas de porc mitjançant cromatografia en medi dissociant (Vendrell, 1981; Vendrell et al., 1982; apartat II.1.2). Amb totes les subunitats aïllades es van poder dur a terme estudis de reconstitució que indicaven que les dues formes monomèriques eren capaces d'associar-se amb la PPE donant, respectivament, un complex híbrid i un de reconstituït que no presentaven diferències quant a comportament en front de l'activació triptíca.

Per tal d'aportar dades més concloents respecte la identitat de les dues PCPA vam dur a terme una sèrie de comparacions estructurals i funcionals mitjançant mapes peptídics i estudis d'activació.

### III.3.1. MAPES PEPTÍDICS COMPARATIUS

#### III.3.1.a. PER CROMATOGRAFIA EN CAPA PRIMA

A la Figura III.23 es poden veure els mapes peptídics triptics bidimensionals de les dues formes de la PCPA, fets en un suport de capa prima de sílica gel. La primera dimensió del mapa peptídic va ser una cromatografia en un medi que contenia cloroform, etanol, metanol i aigua, mentre que la segona dimensió fou una electroforesi d'alt voltatge en un medi piridina:acètic a pH 4,7. Es pot comprovar que el patró de fragmentació, tant pel que respecta al nombre de pèptids com al seu desplaçament cromatogràfic o electroforètic, és pràcticament idèntic en els dos casos. En alguns punts es van observar lleugeres diferències en la intensitat de les marques de fluorescamina. Això podria ser degut a una diferent eficiència en la digestió triptica de les dues proteïnes com a conseqüència de la qual s'hauria detectat en el mapa algun pèptid producte de digestió incompleta. Aquesta possibilitat vé recolçada per la presència d'un nombre de marques superior al que es podria esperar a partir del nombre de residus bàsics de la proteïna.

#### III.3.1.b. PER HPLC

El mateix tipus de comparació, i amb els mateixos objectius que en l'apartat anterior, es va dur a terme per cromatografia líquida d'alta pressió, segons es descriu en l'apartat II.4.2.b. Els mapes triptics comparatius de les dues formes de la PCPA, seguits per cromatografia de HPLC en fase reversa (C-18) van evidenciar una identitat gairebé absoluta pel que respecta a la presència i posició de pics homòlegs (Figura III.24). Les úniques diferències apreciables són petites variacions en l'alçada dels pics que, com es comentava anteriorment, podrien ser degudes a lleugeres diferències en l'eficiència de la digestió triptica.

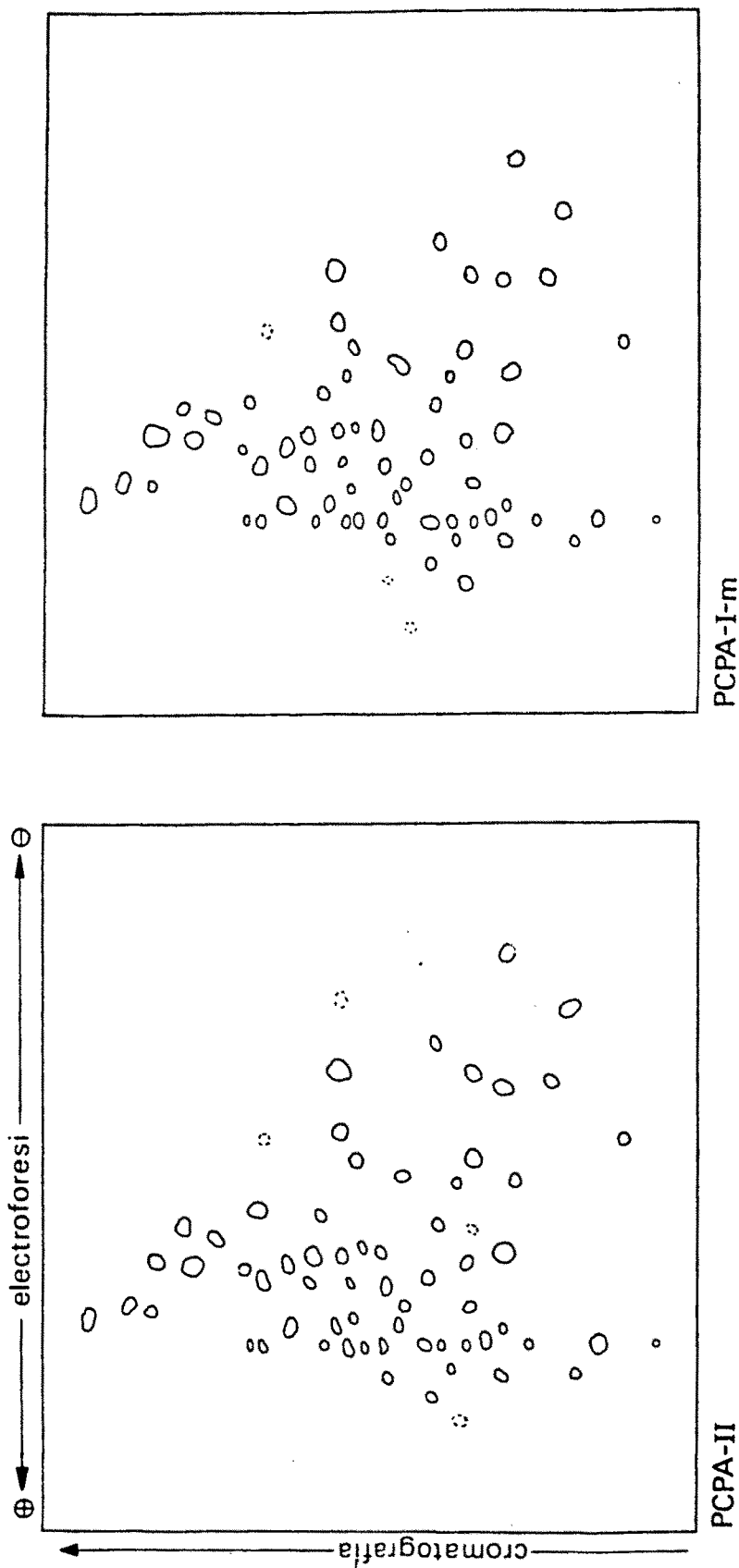
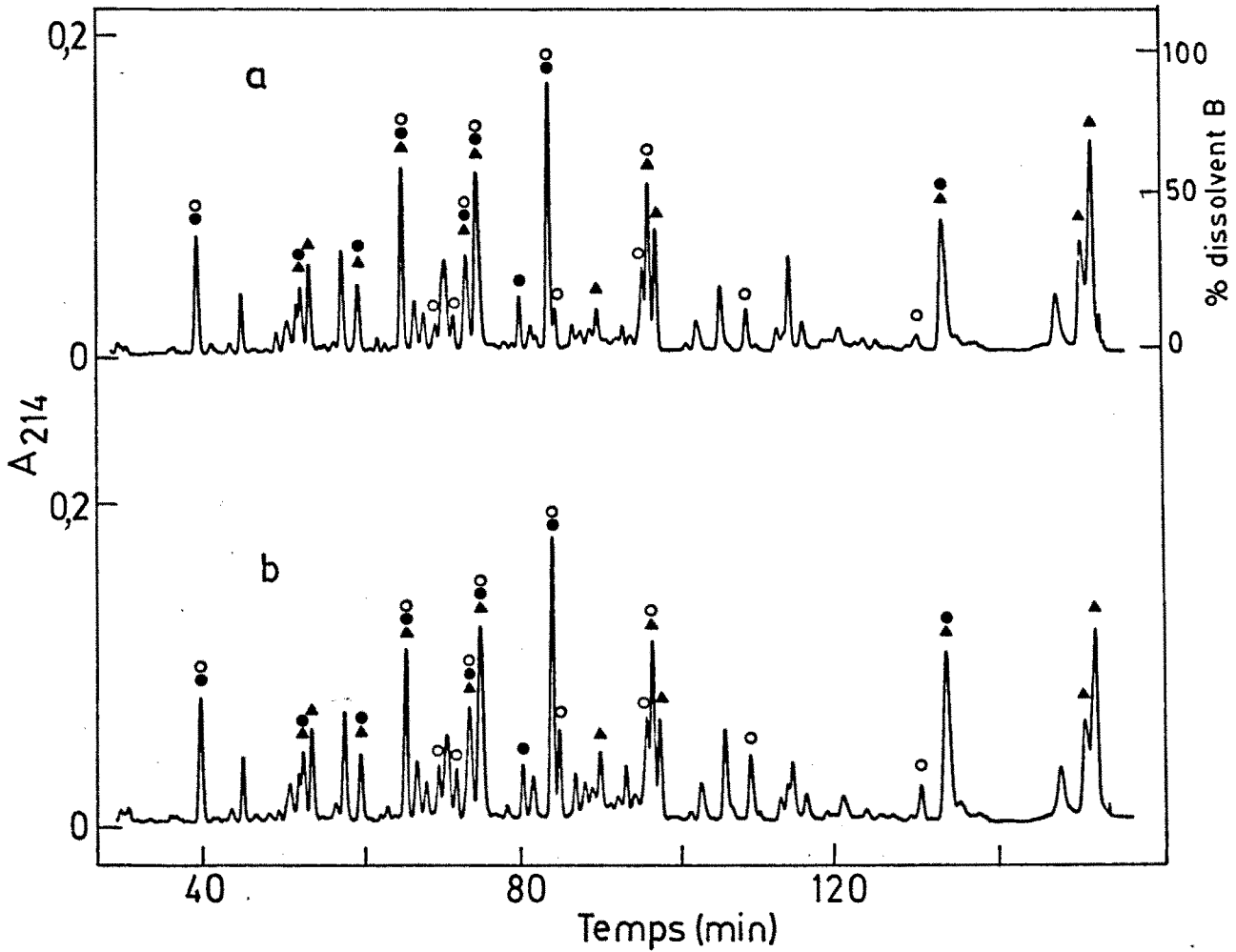


FIGURA III.23 Mapes peptídics bidimensionals de digerits triptics de la PCPA monomèrica natural i de la PCPA protomèrica aïllada a partir del complex binari amb la PPE. Les proteïnes, prèviament carboximetil·lades, foren digerides amb tripsina tractada amb TPCK a relació proteïna/tripsina 100/1 (p/p) i durant 18 hores a 25° C. Després de la liofilització, les mostres foren aplicades a plaques de sílica-gel de 20 x 20 cm en un petit volum d'hidròxid amònic 10 mM. 1ª dimensió: cromatografia en cloroform:metanol:etanol:amoníac (25%) (2:1:1:1). 2ª dimensió: electroforesi en H<sub>2</sub>O:piridina:àcid acètic (960:20:20) (pH 4,7). Revelat dels peptíds amb fluorescamina.



**FIGURA III.24** Mapes peptídics triptics per HPLC de PCPA II (a) i PCPA Im (b). Les proteïnes carboximetil.lades foren digerides tal com s'indica a II.3.2 i aplicades a una columna  $\mu$ -Bondapak C-18 de fase reversa (Waters). Solvents: A, TFA 0,1%; B, acetonitril 80% + TFA 0,09%. Flux: 1 ml/min. S'indica el resultat de les tincions específiques pels pèptids que contenen histidina (▲), tirosina (●) i triptòfan (○). El gradient emprat s'indica al damunt de la gràfica.



### III.3.1.c. DETECCIÓ DE RESIDUS ESPECÍFICS ALS MAPES DE HPLC

Els mapes peptídics seguits per HPLC i comentats al subapartat anterior es van fer a nivell semipreparatiu per tal de poder recollir els diferents pics i procedir a continuació a la detecció de residus específics per tincions diverses (veure apartat II.5.4). Una vegada recollides i liofilitzades les diferents fraccions, es van redissoldre en un petit volum d'hidròxid amònic diluït (pH 9,0) i es van aplicar puntualment a dues plaques de sílica gel, sobre les que es van dur a terme les tincions. A la mateixa Figura III.24 es pot veure el resultat d'aquestes tincions, al que s'hi afegeix el resultat de la detecció de residus triptòfan per seguiment de l'absorbància a 295nm durant la cromatografia. Es pot comprovar que la identitat quant a la posició dels pèptids que contenen residus His i Tyr (els quals són importants en relació a l'acció catalítica de la CPA) i quant a la posició dels que contenen triptòfan és absoluta.

Del conjunt de resultats obtinguts amb els mapes peptídics en podem concloure que la procarboxipeptidasa A monomèrica natural i la protomèrica aïllada del complex binari posseeixen seqüències molt similars, si no iguals, i probablement idèntiques pel que respecta a regions funcionalment importants. Malgrat les evidències, la seva identitat seqüencial només podrà ser plenament comprovada per determinació de les estructures primàries.

### III.3.2. IDENTITAT DELS SEGMENTS D'ACTIVACIÓ

Estudis anteriors del nostre grup ja havien aportat diverses proves a favor de la identitat dels segments d'activació de les dues formes de PCPA. Així, per exemple, San Segundo (1982) va demostrar que els pesos moleculars dels segments alliberats a temps curts d'activació eren idèntics i que els diferents fragments produïts a temps més llargs d'activació eren també probablement iguals, malgrat que en aquest darrer cas no es podia fer una afirmació concluent donada la poca resolució del sistema electroforètic emprat. Els mateixos mapes peptídics seguits per electroforesi i comentats a l'apartat anterior són ja una prova de que la situació de certs residus a la seqüència és la mateixa.

Vam procedir en primer lloc a seguir l'alliberament de pèptids durant l'activació de les dues formes de PCPA per mapes peptídics en capa prima. Tant les cromatografies monodimensionals com els mapes bidimensionals per cromatografia i electroforesi van evidenciar que els pèptids alliberats durant l'activació de les dues formes monomèriques, natural i protomèrica, eren els mateixos, segons la presència de taques tenyides amb fluorescamina permetia deduir, encara que la progressió en la intensitat de les taques seguia una cinètica diferent. Aquests resultats no es mostren al ser en certa manera redundants amb els que es descriuen a continuació.

També es va procedir a l'obtenció de mapes peptídics per HPLC dels dos segments. Per a tal finalitat, una vegada separades les subunitats del complex binari, s'aïllà el segment d'activació de cada una d'elles per cromatografia de bescanvi iònic en presència d'urea mitjançant el procediment descrit a l'apartat II.1.3. Els segments d'activació aïllats van ser digerits amb tripsina i les barreges de pèptids analitzades per cromatografia en fase reversa. A la Figura III.25 es poden veure els dos mapes peptídics comparatius. Els dos segments presenten una completa identitat quant a temps de retenció dels diferents pèptids es refereix. Certes diferències en l'alçada dels pics poden ser degudes a petites variacions en l'eficiència de la digestió triptica, en la redissolució de les barreges liofilitzades, o en la mateixa cromatografia (cas dels cinc primers pèptids). Les diferències en la recuperació del primer dels

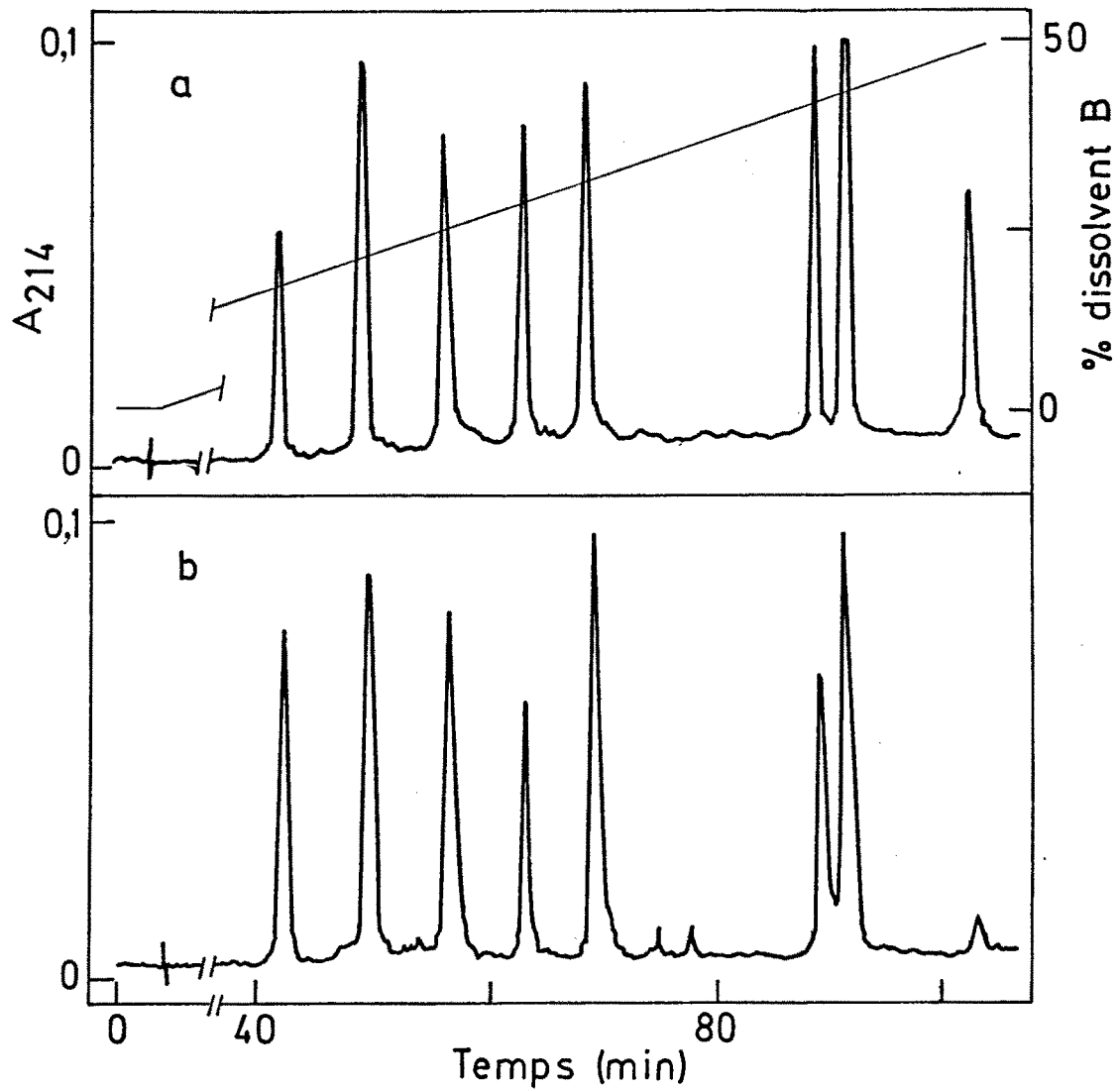


FIGURA III.25 Mapes triptics comparatius per HPLC dels segments d'activació aïllats a partir de la PCPA II (a) i de la PCPA Im (b) en columna  $\mu$ -Bondapak C-18 (Waters). Solvents: A, TFA 0,05%; B, acetonitril 80% + TFA 0,045%. Flux: 1 ml/min. El gradient s'indica ala damunt de la gràfica.

pèptids del doblet aparegut a temps de retenció d'aproximadament 90 min i del pèptid aparegut a 106 min eren més difícils d'explicar i posaven dubtes a la identitat d'ambdós segments. El coneixement de la composició d'aminoàcids dels dos pèptids que formen el doblet i la variabilitat en la recuperació del darrer dels pèptids, fins i tot a partir de la mateixa mostra de proteïna (veure apartats III.4.2 i III.4.3), van permetre adjudicar les diferències observades només a variacions en l'eficiència de la digestió i de la recuperació, i no a canvis en la composició dels dos segments d'activació.

Així doncs, es pot concloure que els segments d'activació de les dues formes de PCPA són estructuralment iguals. Aquesta afirmació vé recolçada per la identitat en composició i per mapes peptídics de les dues PCPA i per l'observació d'un mateix model de trencament tríptic en els dos segments aïllats.

### III.3.3. ACTIVACIÓ DE LES FORMES MONOMÈRIQUES

La procarboxipeptidasa A protomèrica aïllada a partir del complex binari natural posseeix una activitat específica potencial d'aproximadament el 60 % de la corresponent a la forma monomèrica natural, després de les cromatografies i diàlisis descrites a II.1.2. El valor de l'activitat potencial assolida augmenta fins a un 85 % aproximadament quan la mostra és recromatografiada en absència d'urea o es conserva precipitada en sulfat amònic abans de la mesura d'activitat. En cap cas però, es va recuperar el 100 % de l'activitat potencial. Cal, però, tenir en compte que aquesta proteïna havia sofert un tractament dissociador i desnaturalitzador amb urea 7 M.

Aquest fet es veu reflectit a les corbes que defineixen el curs d'activació tríptica de les dues formes monomèriques (Figura III.26). Pot comprovar-se que les dues PCPA presenten un mateix comportament des d'un punt de vista qualitatiu, amb corbes d'activació molt similars, però que difereixen quant als valors puntuals.

Com es veurà més endavant, l'expressió del 100% de l'activitat potencial de la procarboxipeptidasa A depèn de la desaparició de la

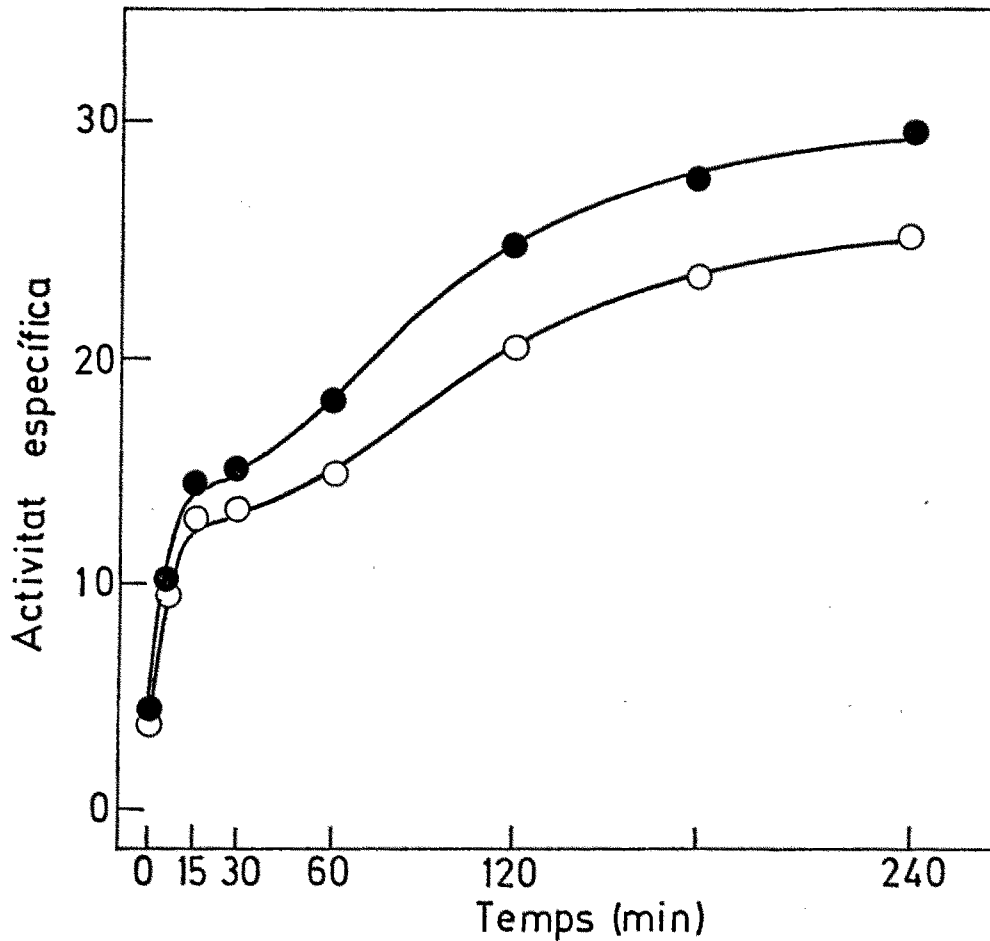
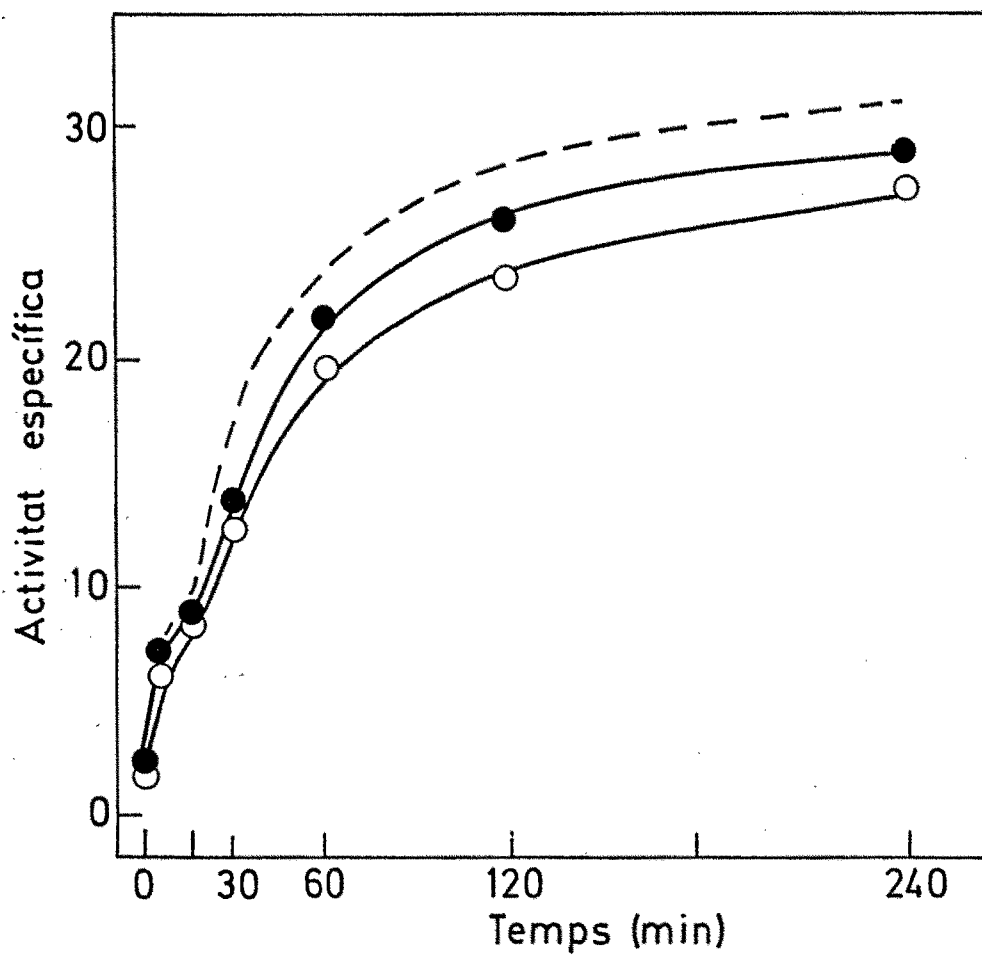


FIGURA III.26 Corbes de generació d'activitat per acció de la tripsina en PCPA monomèrica natural (●) i en la PCPA protomèrica aïllada a partir del complex binari (○). Relació PCPA/tripsina 4/1 (p/p). Medi d'activació, fosfat sòdic 20mM (pH 6,5) a 25° C. Mesura d'activitat peptidàsica, amb BGP 1mM.



**FIGURA III.27** Corbes de generació d'activitat per acció de la tripsina sobre els complexos formats per la PCPA II (●) i la PCPA Im (○) amb la PPE aïllada a partir del complex binari natural. S'indica com a comparació la corba corresponent al complex binari natural, PCPA I (---). Condicions d'activació, com a la Figura III.26.

totalitat o una gran part del segment d'activació. En altres paraules, la raó de que l'activitat expressada no sigui la total és l'efecte inhibitor que el segment té sobre l'enzim, fet per altra part plenament comprovat (San Segundo et al., 1982). Així doncs, les diferències d'activitat observades entre les dues formes de PCPA podrien ser degudes a que el segment de la forma protomèrica fos un inhibitor més efectiu que el corresponent al monòmer natural. Hem vist abans que és possible descartar raons estructurals (els dos segments semblen posseir seqüències idèntiques, al menys fins un grau important) i resta la possibilitat que existissin petites variacions en la conformació dels dos segments. Aquesta explicació és, no obstant, poc consistent, i sembla més adequat pensar que una petita part de la PCPA protomèrica ha restat irreversiblement inactivada com a conseqüència del tractament dissociant. Aquesta explicació seria consistent amb una corba d'activació qualitativament igual però amb diferències quantitatives.

#### III.3.4. ACTIVACIÓ DELS COMPLEXES BINARIS

A les corbes d'activitat CPA generada per acció de la tripsina sobre els complexos binaris formats per les dues PCPA monomèriques i la propeptidasa E s'observen les mateixes diferències quantitatives comentades en l'apartat anterior, encara que en grau inferior. A la Figura III.27 es pot veure la representació del transcurs de l'activació del complex reconstituït (PCPA I m + PPE) i del complex híbrid (PCPA II + PPE) i es comprova que les dues corbes són iguals des d'un punt de vista qualitatiu, mantenint-se certes diferències quantitatives. En el cas dels complexos binaris, l'activitat potencial total assolida va ser d'aproximadament el 95 % a la corresponent al complex binari natural. Aquests resultats abonen, de manera més fefaent a com ho feien els obtinguts amb les formes monomèriques, la identitat entre les dues PCPA.

Una altra possibilitat de comparar el comportament dels complexos binaris reconstituït i híbrid és la de seguir la generació d'activitat proteïnasa E al llarg del temps per acció de la tripsina (Figura

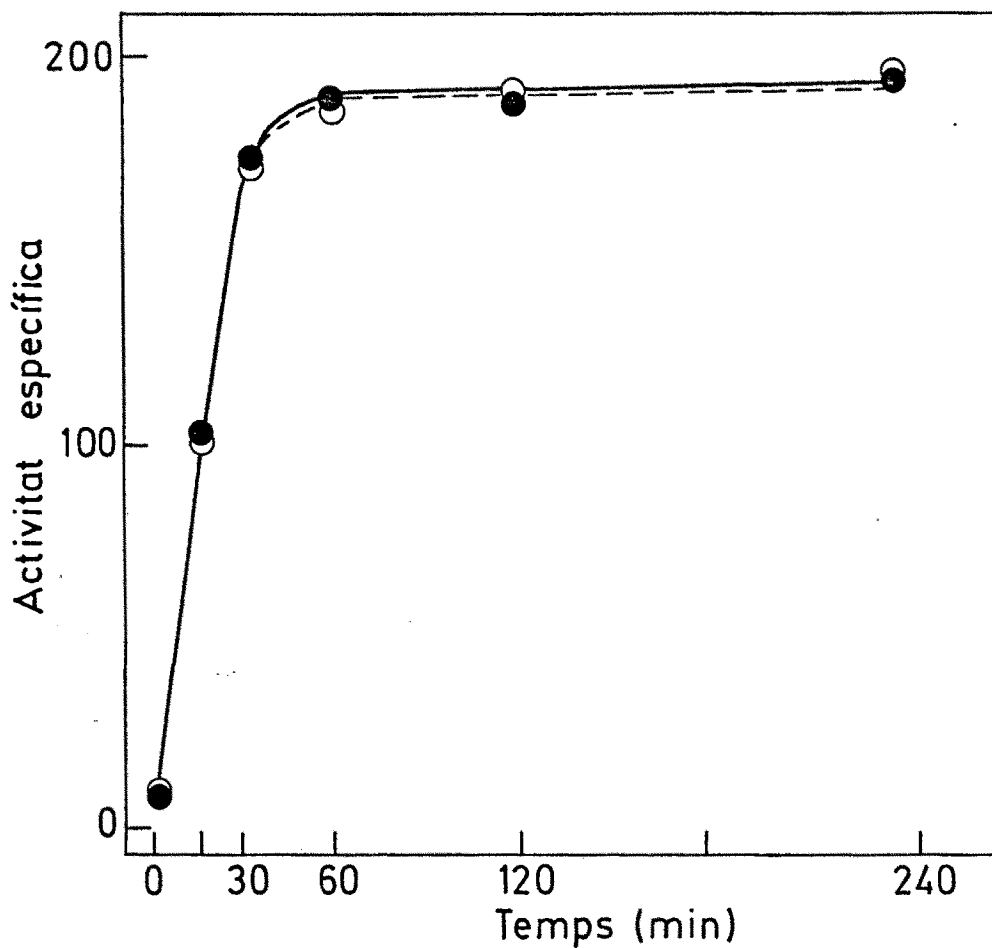


FIGURA III.28 Generació d'activitat proteïnasa E per acció de la tripsina en els mateixos complexos de la Figura III.27, i amb l'addició de la corba corresponent a la proproteïnasa E aïllada (---). Mateixes condicions d'activació que a les Figures III.26 i III.27. Activitat seguida amb el substrat N-succinil-(L-Ala)<sub>3</sub>-pNA 1mM.



III.28). En aquest cas és evident la pràcticament total identitat de comportament de les diferents barreges. Cal dir, no obstant, que la proproteïnasa E presenta un procés d'activació independent de la seva associació a la subunitat PCPA (veure la mateixa figura), amb el que és necessari comentar que d'aquest experiment no se'n poden treure conclusions sobre la funcionalitat de dita subunitat ni sobre l'efecte que pugui tenir el procediment seguit en el seu aïllament.

Al capítol III.5 es parlarà de manera més aprofundida sobre les característiques diferencials dels processos d'activació triptica de la PCPA monomèrica i del seu complex binari, que han estat presentats aquí només per a servir de comparació entre les dues PCPA monomèriques.

### III.3.5. DISMINUCIÓ DE L'ACTIVITAT INTRÍNSECA PER ADDICIÓ DE PROPROTEÏNESA E

En la seva forma no activada, les dues PCPA de pàncreas de porc presenten diferent activitat peptidàsica intrínseca. D'aquesta manera, la forma monomèrica posseeix normalment un 35-40% més d'activitat que el complex binari. Es immediat adjudicar aquest descens en l'activitat intrínseca a la presència de la proproteïnasa E en el complex, i per aquesta raó vam creure convenient assajar l'efecte de la subunitat PPE aïllada sobre les dues formes monomèriques. Si la capacitat inhibidora de la PPE és la mateixa sobre ambdues formes de PCPA monomèrica, aquesta dada ha de reforçar la hipòtesi sobre la seva identitat.

Vam procedir a incubar la PCPA II i la PCPA Im amb PPE a diferents relacions molars, compreses entre 0 i 3, en solució amortidora de fosfat sòdic 20 mM,  $ZnCl_2$   $10^{-6}M$  i a 25° C, durant un temps mínim de 30 min. A continuació es procedí a mesurar l'activitat carboxipeptidasa A de les barreges en front de substrat BGP a diferents concentracions.

A la Figura III.29 es pot veure la representació del percentatge d'inhibició de l'activitat inicial en front de la relació molar entre les dues subunitats. Es comprova que la unió és molt forta al ser la inhibició pràcticament total a relacions molars de 1. En aquest

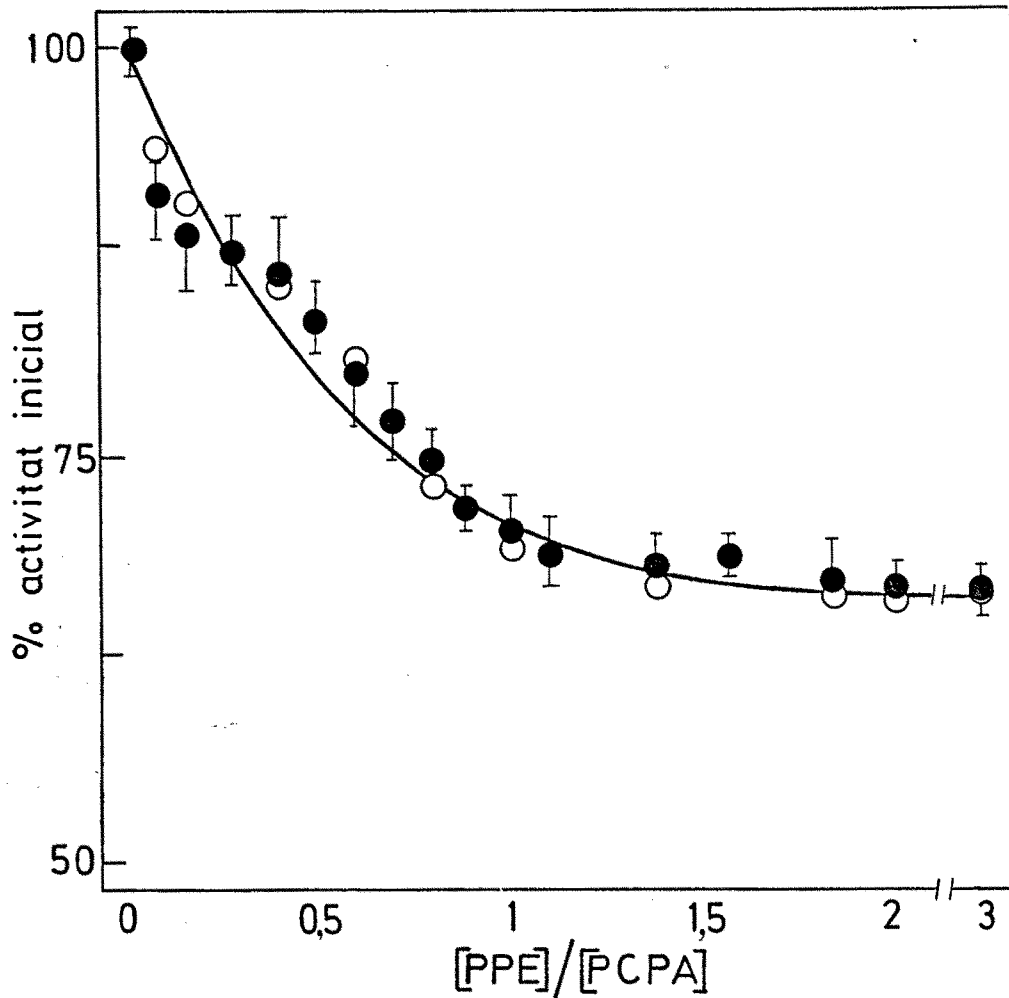


FIGURA III.29. Disminució de l'activitat residual de la PCPA II (●) i de la PCPA Im (○) per addició de PPE a diverses relacions molars, indicades en abscisses. Les activitats, expressades com percentatges de l'activitat en absència de PPE, es van mesurar en front de BGP 1mM. Concentració de PCPA a la barreja de reacció,  $2,65 \times 10^{-7}$  M. Abans de la mesura d'activitat, les barreges de PCPA i PPE van ser incubades en fosfat 20mM,  $ZnCl_2$  (pH 6,5) durant 20 minuts a temperatura ambient.

experiment l'activitat mínima observada en condicions d'excés de PPE fou del 66% de la corresponent a la PCPA aïllada. Pel que respecta al comportament de les dues formes de la PCPA, és fàcil observar que la forma protomèrica és inhibida de la mateixa faïsó, en el mateix grau i a la mateixa velocitat que ho és la forma monomèrica natural. Cal esmentar que la representació està feta en percentatges de l'activitat inicial, i no en valors absoluts, al tenir la PCPA Im un valor d'activitat intrínseca lleugerament inferior a la del monòmer natural (veure Figura III.26), com a conseqüència del procés d'obtenció del protòmer.

### III.3.6. CARACTERÍSTIQUES DE LA INTERACCIÓ PPE-PCPA

Al mateix temps que servien per aportar proves de la identitat de les dues PCPA, les dades obtingudes sobre la interacció amb la propeptinasa E foren aprofitades per iniciar l'estudi de les característiques d'aquesta unió quaternària de proteïnes. Els experiments aquí descrits, càlcul de les constants d'associació i d'inhibició, foren duts a terme només amb PCPA II.

Si considerem l'equació:



$$K_d = \frac{[P]_{LL} [E]_{LL}}{[PE]}, \quad \text{on LL es refereix a la quantitat}$$

d'espècie lliure,

podem definir:

$$r = \frac{[E]_u}{[P]_r}, \quad \text{on } u \text{ es refereix a espècie unida i } r \text{ es}$$

refereix al total de PCPA.

LLavors,

$$r = \frac{[PE]}{[P]_{LL} + [PE]} = \frac{[P]_{LL} [E]_{LL}/K_d}{[P]_{LL}(1 + [E]_{LL}/K_d)} = \frac{E_{LL}}{K_d + [E]_{LL}}$$

que és el mateix que dir:

$$1/r = 1 + \frac{K_d}{[E]_{LL}}$$

d'aquesta manera, la representació de  $1/r$  en front de  $1 + K_d/E_{LL}$  serà una recta que tindrà com a pendent la constant de dissociació del complex. La seva inversa representarà la constant d'associació.

El problema d'aplicar aquestes equacions generals a la interacció que aquí es comenta és el de conèixer la concentració de la fracció de lligand (PPE) que es troba lliure o formant complex. El seguiment de les quantitats relatives per mètodes com electroforesi s'ha mostrat inoperant a causa de la baixa definició de les electroforesis no dissociants. Hem optat per la següent aproximació:

$$[PPE]_{LL} = [PPE]_T - [PPE]_U = [PPE]_T - [PCPA]_U$$

d'on es dedueix:

$$[PPE]_{LL} = [PPE]_T - ([PCPA] (1 - X)),$$

on  $X$  és la fracció d'activitat remanent, que es calcula obtenint la diferència entre l'activitat assolida i la que s'obté a inhibició màxima i deduïnt el tant per 1 que aquest valor suposa respecte a la diferència màxima.

A la Figura III.30, part A, s'observa la representació abans mencionada, feta a partir de dades obtingudes a una sola concentració de substrat. El càlcul de la pendent i del seu invers dóna un valor de 3,51

$\times 10^8 \text{ M}^{-1}$  per a la constant d'associació, indicant que la interacció és molt forta, tal i com les dificultats per aïllar les subunitats en estat natiu feien preveure. Un valor semblant ja havia estat descrit per al complex reconstituït SS en bou (Puigserver i Desnuelle, 1977), treball en el que s'utilitzen subunitats dedimetilmaleïlades, actives i funcionalment correctes. En canvi, un altre treball (Behnke et al., 1970) es troba una constant d'associació baixa (de l'ordre de  $10^4 \text{ M}^{-1}$ ), encara que cal considerar que en aquest darrer cas s'estudiava la interacció de l'enzim CPA, no del zimògen, amb la subunitat II de bou aïllada per dissociació alcalina, que ha estat demostrat que desnaturalitza irreversiblement les subunitats. No es pot descartar, però, que la baixa constant d'associació observada en aquest treball sigui deguda a una possible menor eficiència del lloc de fixació en l'enzim actiu, aspecte del que pel moment no posseïm dades en pàncreas de porc. Behnke et al. (1970) avancen també una hipòtesi sobre el tipus d'interacció que té lloc entre les dues subunitats estudiades en bou: els autors observen que les modificacions de residus carregats i la presència d'una força iònica elevada fan disminuir el grau d'interacció, amb el que acaben conclouent que les interaccions electrostàtiques estan fortament implicades en la formació del complex. Així mateix, arriben a la conclusió que el centre actiu de la CPA no intervé al procés. És possible que aquestes característiques de la interacció es donin també al complex binari de porc.

El càlcul de la constant d'inhibició de la PPE sobre la PCPA II, que ha de ser contemplat amb certes precaucions al no tractar-se d'un inhibidor dirigit al centre actiu i que dona una inhibició quantitativament poc important en un paràmetre de per sí baix, es troba representat a la Figura III.30, part B. S'observa, no obstant els comentaris anteriors, una constant relativament elevada, de l'ordre de  $10^{-7} \text{ M}$ . Val a dir que el mètode emprat aquí, el gràfic de Dixon (Dixon i Webb, 1980), només permet aproximar el valor de la constant, sense que de la representació se'n pugui deduir amb gran seguretat quin és el tipus d'inhibició que té lloc.

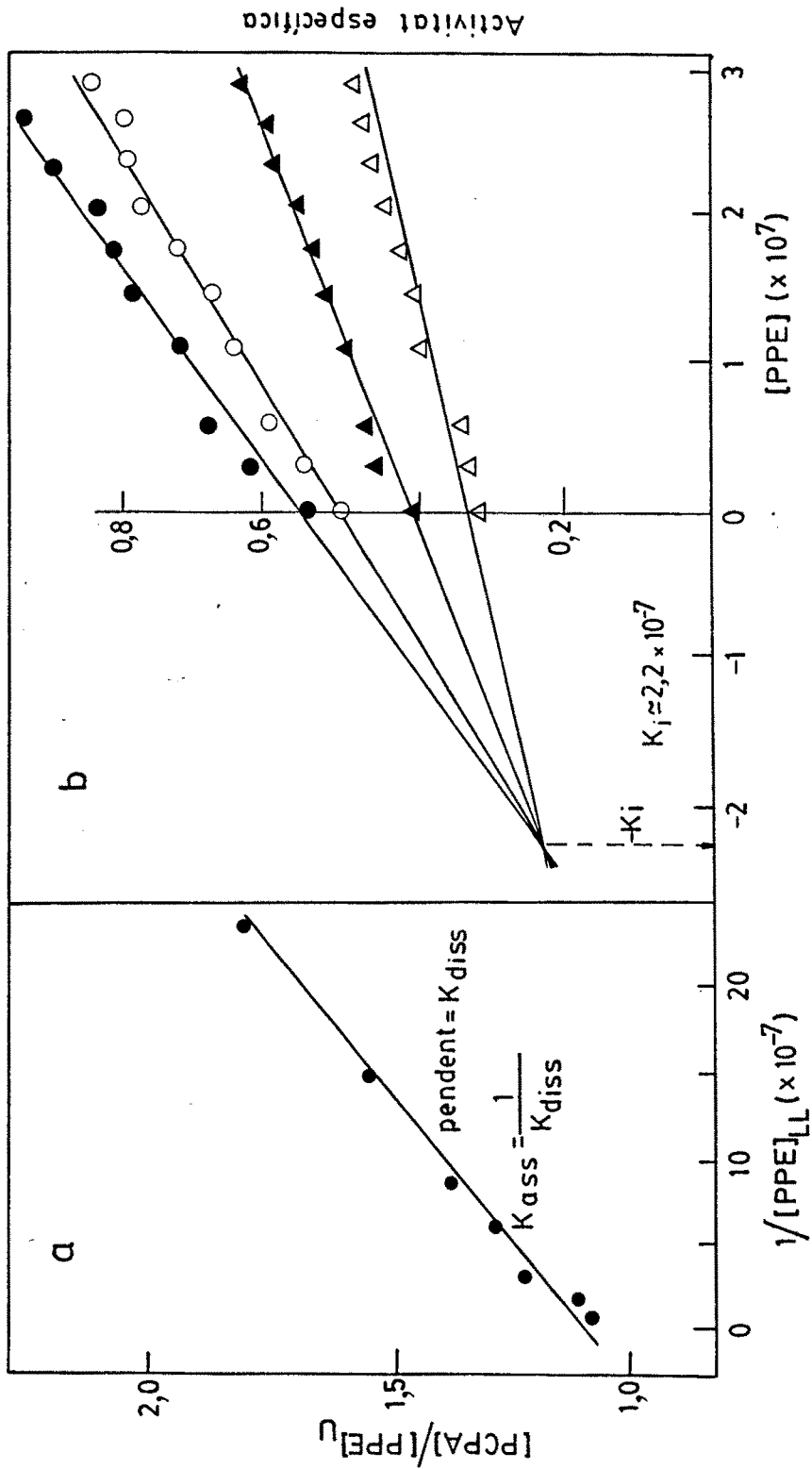


FIGURA III.30. Càlcul de les constants d'associació (a) i d'inhibició (b) de la PPE en la seva interacció amb la PCPA monomèrica.  $\bullet$  indica espècie lligada i  $\circ$  espècie lliure. Concentracions de substrat BGP emprades: (●) 0,5mM, (○) 0,75mM, (▲) 1mM i (Δ) 1,5mM. Concentració de PCPA a les barreges de reacció,  $2,98 \times 10^{-7}M$  (part b). Medi d'incubació i demés condicions com a la Figura III.29.



**III.4. SEQÜENCIACIÓ DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ****III.4.1. SEQÜÈNCIA N-TERMINAL DE LA PCPA**

La seqüència N-terminal del segment d'activació de la PCPA, obtinguda per degradació automàtica d'Edman del zimògen sencer reduït i carboximetilat, es presenta a la Taula III.6. La seqüenciació automàtica va permetre obtenir l'estructura primària dels primers 34 residus. Certs dubtes que van quedar sobre la identitat dels residus 30 i 31, identificats anteriorment com Ala i Phe (San Segundo, 1982; Avilés et al., 1985) van ser resolts per anàlisi d'aminoàcids dels

TAULA III.6

DEGRADACIÓ SEQÜENCIAL AUTOMÀTICA DE LA PROCARBOXIPEPTIDASA A CARBOXIMETIL.LADA

<i>N° de cicle</i>	<i>PTH Aminoàcid</i>	<i>N° de cicle</i>	<i>PTH Aminoàcid</i>
1	Lys	18	Ala
2	Glu	19	Gln
3	Asp	20	Val
4	Phe	21	Gln
5	Val	22	Lys
6	Gly	23	Val
7	His	24	Lys
8	Gln	25	Glu
9	Val	26	Leu
10	Leu	27	Glu
11	Arg	28	Asp
12	Ile	29	Leu
13	Ser	30	Glu
14	Val	31	His
15	Asp	32	Leu
16	Asp	33	Gln
17	Glu	34	Leu

Quantitat inicial: 50 nmols

Identificació dels PTH's feta en tots els cassos per cromatografia en capa fina i anàlisi d'aminoàcids després de retrohidròlisi



corresponents pèptids triptics que els contenien, per seqüenciació manual d'un d'ells i per seqüenciació automàtica d'un pèptid procedent de trencament amb proteïnasa V-8 (S.a.) (veure més endavant). La identificació de PTH's es va fer en aquest cas per cromatografia en capa fina i retrohidròlisi àcida seguida d'anàlisi d'aminoàcids.

### III.4.2. DIGESTIONS TRIPTIQUES

La major part dels pèptids triptics utilitzats a la seqüenciació es van obtenir a partir del segment d'activació aïllat per cromatografia de bescanvi iònic o per HPLC (apartats II.1.3 i III.1.3.b). No va ser possible obtenir a nivell preparatiu la totalitat dels pèptids triptics a partir del segment aïllat, tal com s'explica més endavant.

#### III.4.2.a. MAPES PEPTÍDICS DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ PER HPLC

A la Figura III.31 es pot veure un *pattern* d'elució típic obtingut al cromatografiar un digerit triptic del segment d'activació en columna de fase reversa. Es pot observar la presència de 8 pèptids en el seguiment a 214 nm i de 2 en el seguiment a 295 nm (que detecta la presència de triptòfan). Tant a les cromatografies analítiques (cas de la figura) com a les preparatives es van fer servir les mateixes condicions.

A partir de la seqüència de la PCPA de rata (Quinto et al., 1982) es pot deduir que hi han 9 possibles pèptids triptics a la mateixa zona del zimògen; si la composició i seqüència del pèptid d'activació de porc mantenen la mateixa homologia amb la PCPA de rata que la observada observada en els primers 34 residus, és d'esperar un nombre igual o molt semblant de pèptids triptics en els dos casos. Ara bé, dos dels pèptids corresponents a rata són molt curts, concretament un di- i un tetrapèptid, i només un conté triptòfan. En el mapa de la Figura III.31 no apareixen pèptids els temps d'elució dels quals faci pensar que es tracta de pèptids curts i, per altra banda, el doblet de pics que

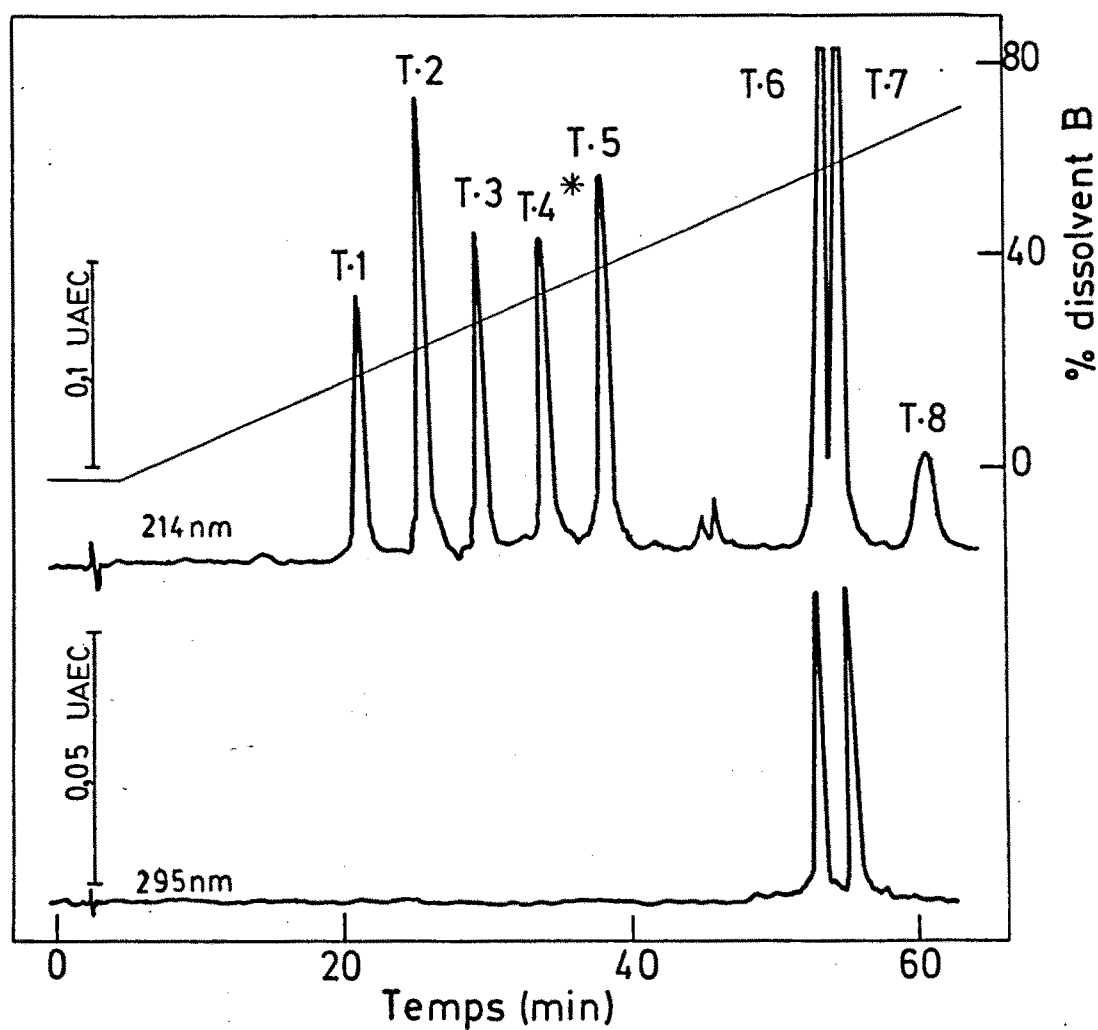


FIGURA III.31. Mapa peptídic per HPLC d'un digerit triptic del segment d'activació. S'indica el traç de les deteccions a 214 nm i a 295 nm. La gràfica correspon a una cromatografia semi-preparativa on s'injectaren aproximadament 10 nmols de proteïna digerida. Columna:  $\mu$ -Bondapak C-18. Solvents: A, TFA 0,05%; B, acetonitril 80% + TFA 0,045%. Flux: 1 ml/min. (Aquesta figura ja havia aparegut abans com Figura III.12. (\*): posició del peptid T-4').

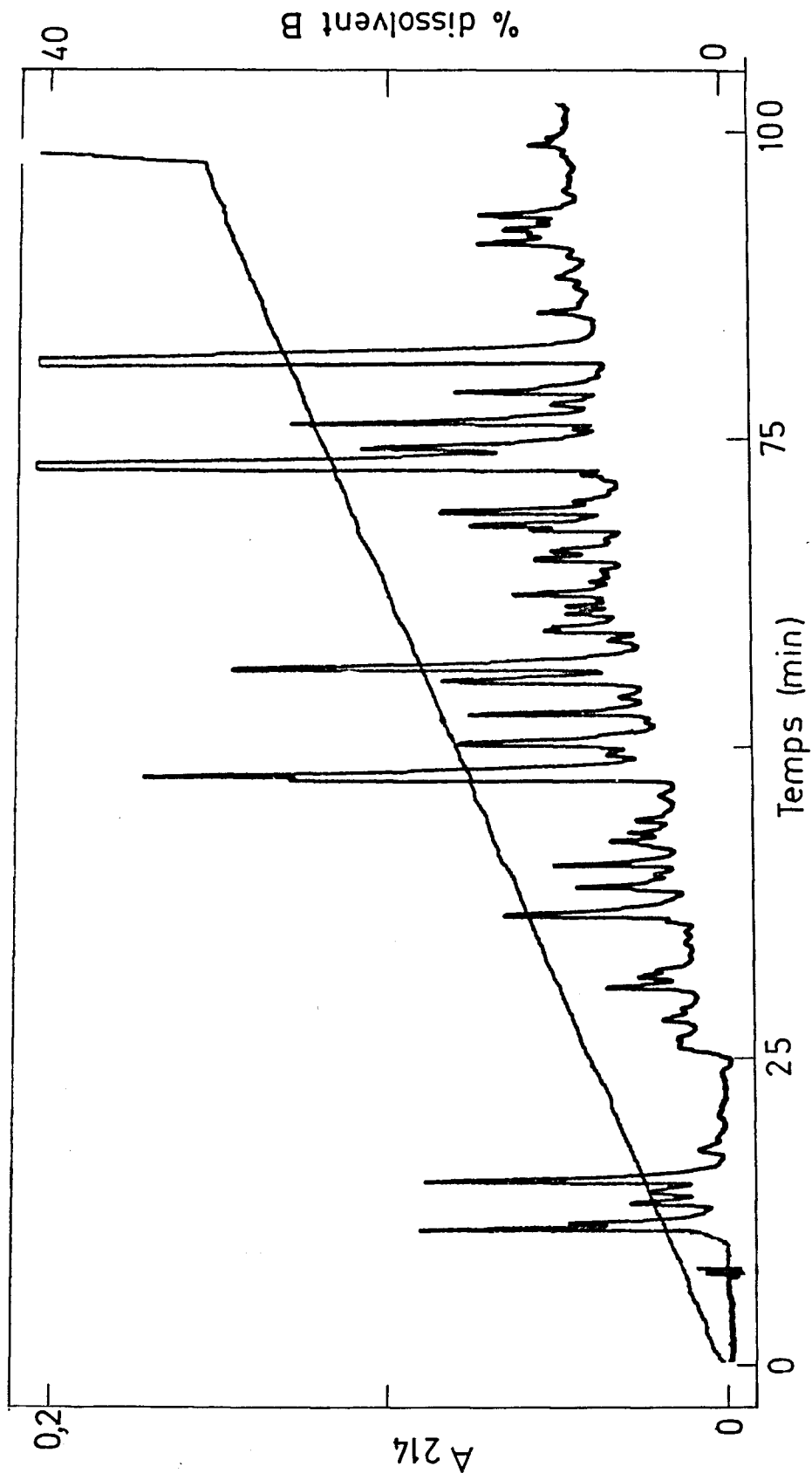


FIGURA III.32. Mapa peptídica per HPLC d'un digerit triptic del segment d'activació. Segons anàlisi electroforètica, el segment estava lleugerament contaminat amb PPE. Quantitat injectada, 5 nmols. Columna Vydac C-4 TP-RP. Solvents: A, TFA 0,1%; B, acetonitril + TFA 0,1%. Flux: 1 ml/min.

contenen triptòfan fa pensar en la possibilitat que es tracti essencialment del mateix pèptid a diferents graus de digestió. Les anàlisis d'aminoàcids permeteren resoldre aquestes incògnites.

El pèptid assenyalat aquí com T-8 no va poder ser mai aïllat en quantitat suficient per a seqüenciació a partir d'un digerit triptic del segment d'activació, doncs la seva recuperació baixava de manera important a l'injectar mostres preparatives (per damunt dels 10 nmols). Aquest comportament és degut probablement a la seva composició, rica en residus àcids, que fa que estigui descarregat en les condicions cromatogràfiques emprades, el que afavoreix la seva adsorció a la columna en absència de competició d'altres pèptids. Aquest pèptid va haver de ser aïllat a partir del zimògen sencer (apartat III.4.2.d).

Val la pena fer esment aquí de la necessitat de partir de preparacions de segment d'activació perfectament purificades abans d'obtenir digestions enzimàtiques del mateix. En alguns casos en que es partí de PCPA amb lleugeres contaminacions de PPE es va obtenir un segment d'activació contaminat també amb la mateixa proteïnasa. La posterior digestió triptica d'aquesta mostra donà un perfil cromatogràfic completament diferent del que es veu a la Figura III.31 (Figura III.32). Anàlisis d'aminoàcids d'alguns dels pèptids obtinguts en aquesta darrera cromatografia van evidenciar que la multiplicitat obtinguda era deguda a trencaments no triptics ocasionats per la presència de les traces de PPE abans esmentades.

#### III.4.2.b. ANALISI DELS PEPTIDS PER CAPA FINA.

##### DETECCIO DE RESIDUS ESPECIFICS

La cromatografia en capa fina fou utilitzada com el primer pas en la caracterització dels pèptids obtinguts a partir de digestió triptica. Va permetre comprovar la homogeneïtat dels pics, a la vegada que detectar la presència de certs residus (His, Tyr i Trp) en alguns d'ells. A la Figura III.33 es pot veure l'anàlisi cromatogràfica dels pèptids aïllats en la cromatografia representada a la Figura III.31, juntament amb un diagrama on es veu el resultat de les tincions. Quatre dels pèptids donen positiu amb la tinció de Pauli per histidines, T-2,

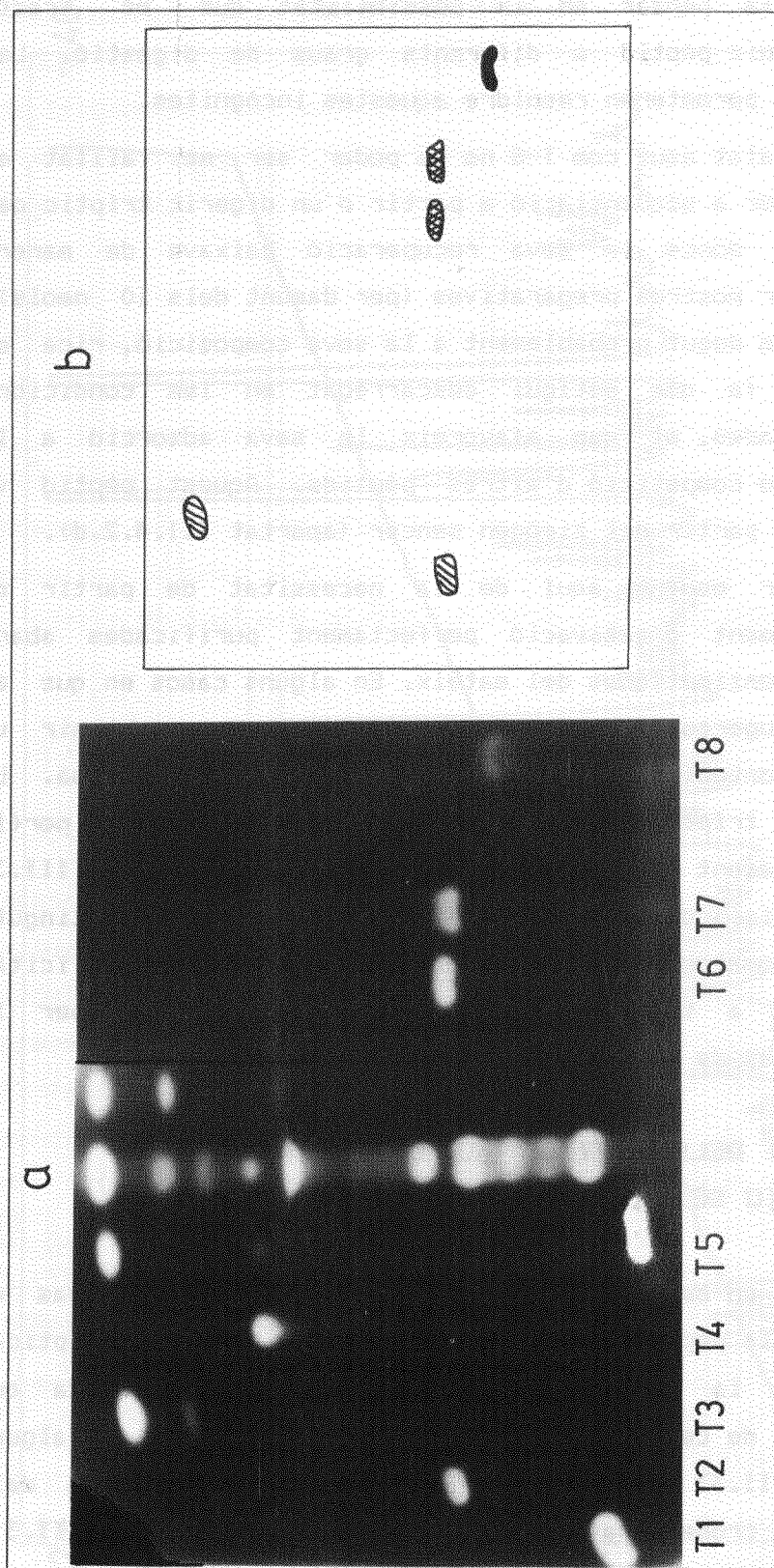





FIGURA III-33. (a) Cromatografia en capa prima dels péptids aïllats a partir del cromatograma de la Figura III-31. Al centre s'hi inclou una mostra de la barreja de péptids abans d'entrar a la columna. (b) Diagrama que mostra els resultats de les distintes tincions específiques: : positiu per His; : positiu per His i Trp; : positiu per Tyr.

T-3, T-6 i T-7; un (T-8) dóna positiu amb la tinció específica de tirosines; i finalment dos (T-6 i T-7) donen positiu amb la tinció d'Erlich per triptòfans. La coincidència entre T-6 i T-7 recolçava que podessin tenir una composició essencialment igual.

### III.4.2.c. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS OBTINGUTS

Les anàlisis d'aminoàcids corresponents als pèptids triptics aïllats a partir del segment d'activació es presenten a la Taula III.7.

TAULA III.7

COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS TRÍPTICS DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

Aminoàcid	T-1	T-2	T-3	T-4	T-4'
A. aspàrtic	1,88 (2)	0,93 (1)		1,06 (1)	
A. glutàmic	3,01 (3)	1,93 (2)	1,12 (1)		
Serina	1,20 (1)				
Treonina					
Glicina		1,17 (1)	1,53 (1)	1,58 (1)	2,13 (2)
Alanina	1,09 (1)		1,20 (1)		1,01 (1)
Prolina				2,20 (2)	2,75 (3)
Valina	1,98 (2)	1,92 (2)	1,16 (1)	0,83 (1)	1,14 (1)
Arginina		0,95 (1)	1,04 (1)	1,35 (1)	1,83 (2)
Metionina					
Isoleucina	1,09 (1)		1,20 (1)	0,99 (1)	1,01 (1)
Leucina		1,0 (1)	1,22 (1)		
Triptòfan					
Fenilalanina		0,73 (1)	0,86 (1)	1,54 (1)	1,06 (1)
Lisina	1,16 (1)	0,73 (1)			
Histidina		0,84 (1)	0,56 (1)		
Tirosina					
Total	(11)	(11)	(9)	(8)	(12)
nmols	25	21	13	16	8
Posició a la seqüència	12-22	1-11	61-69	43-50	39-50

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència.

TAULA III.7 (cont.)  
 COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS TRIPTICS DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

Aminoàcid	T-5	T-6	T-7	T-8
A. aspàrtic		1,65 (2)	1,67 (2)	1,87 (2)
A. glutàmic	0,79 (1)	3,78 (4)	3,39 (4)	7,72 (8)
Serina	0,69 (1)			1,28 (1)
Treonina				0,93 (1)
Glicina				1,42 (1)
Alanina	0,87 (1)			1,32 (1)
Prolina	1,86 (2)			
Valina	1,77 (2)		0,82 (1)	0,84 (1)
Arginina		1,08 (1)	0,83 (1)	1,00 (1)
Metionina				1,86 (2)
Isoleucina	1,32 (1)			1,76 (2)
Leucina		3,66 (4)	3,91 (4)	2,73 (3)
Triptòfan		0,65 (1)	1,03 (1)	
Fenilalanina	0,90 (1)	0,81 (1)	0,93 (1)	1,32 (1)
Lisina	0,53 (1)		0,71 (1)	
Histidina		1,12 (1)	0,57 (1)	
Tirosina				0,96 (1)
Total	(10)	(14)	(16)	(25)
nmols	20	33	16	7
Posició a la seqüència	51-60	25-38	23-38	70-94

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència

S'observen importants coincidències de composició entre T-1, T-2, T-4, T-5 i T-6 i cinc pèptids triptics de la seqüència de rata, no així amb els anomenats T-3 i T-8.

El pèptid T-7 té la mateixa composició que el T-6, amb l'afegit d'un residu Val i un residu Lys. La presència de dos residus bàsics en l'anàlisi de T-7 demostra la seva incompleta digestió. Les composicions de T-6 i T-7 coincideixen totalment amb les corresponents a les seqüències 25-38 i 23-38, respectivament, al segment de rata.

Alguns digerits triptics del segment van donar un pic que, per anàlisi d'aminoàcids, tenia una composició igual a la de T-4 més un

residu Gly, un residu Pro, un residu Ala i un residu Arg. Aquest pèptid, anomenat 7-4', era eluït a un temps de retenció intermedi entre T-4 i T-5. A la Figura III.31 es marca amb un asterisc la posició d'aquest pèptid a les cromatografies en que aparegué; la Taula III.7 inclou també la seva composició.

#### II.4.2.d. MAPES TRÍPTICS DE LA PCPA I DE LA CPA AÏLLAMENT DE PÈPTIDS DIFERENCIALS

La PCPA és una font de pèptids tríptics del segment d'activació de molt més fàcil disposició que ell mateix, al no ser necessari el pas previ d'aïllament del segment que, a més de molt laboriós, té un rendiment baix. Malgrat això, el fet de ser una proteïna aproximadament quatre vegades més gran fa que la complexitat de les barrejaes de pèptids procedents de digestió tríptica augmenti considerablement i que, en processos preparatius, no sigui possible aïllar cada pèptid individualment.

La impossibilitat d'aïllar el pèptid T-8 a partir del segment d'activació (veure II.4.2.a) va fer necessari el seu aïllament a partir del proenzim sencer. Per tal de localitzar amb seguretat els pèptids formadors del segment, vam procedir a la digestió de la PCPA i de la CPA amb tripsina i posterior anàlisi per cromatografia d'HPLC. A la Figura III.34 es poden veure els dos mapes peptídics comparatius. S'aprecia a la figura un nombre de pèptids diferencials aproximadament igual als esperats i en posicions coincidents amb la majoria dels pèptids que apareixen en un digerit tríptic del segment cromatografiat en un gradient idèntic (resultat no presentat, veure Vendrell et al., 1986).

Cal remarcar que a la Figura III.34 es representen dues cromatografies fetes a nivell semipreparatiu. La cromatografia preparativa, a partir de la qual es van aïllar els pèptids va ser, per raons òbvies, força menys resolutiva, i aparegué la necessitat de repurificar molts dels pèptids assenyalats. Aquesta cromatografia es pot veure a la Figura III.13, juntament amb una reproducció de la part superior de la Figura III.34 a efectes de comparació.



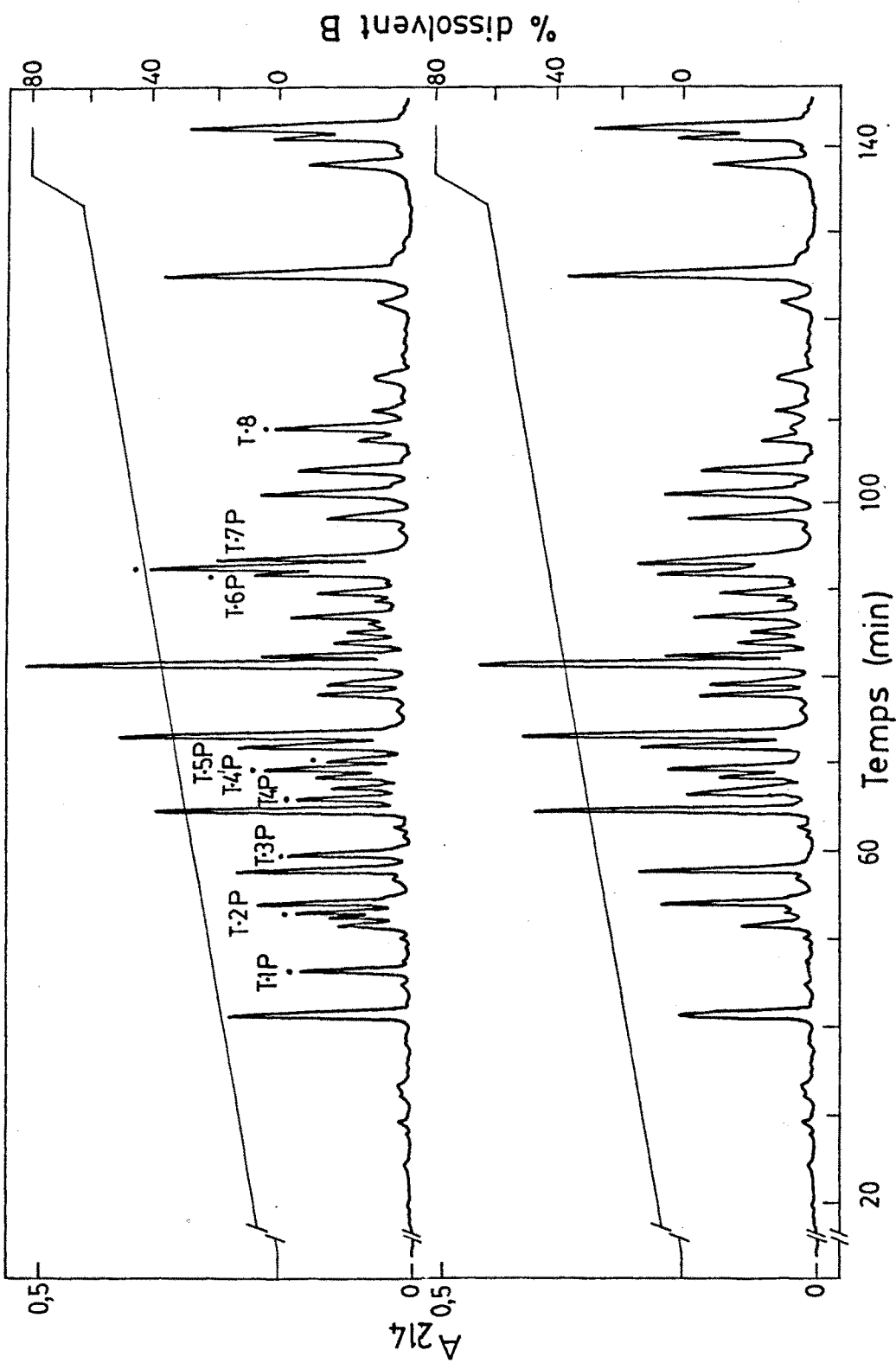


FIGURA III.34 Mapes peptídics comparatius de digerits triptics de PCPA (a) i CPA (b). Aquí es mostra dues cromatografies semi-preparatives, amb injecció d'aproximadament 10 nmols de proteïna. Columna  $\mu$ -Bondapak C-18. Solvents: A, TFA 0,05%; B, acetonitril 80% + TFA 0,045%. Flux: 1 ml/min.

## III.4.2.e. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS DE PÈPTIDS TRÍPTICS DE PCPA

A la Taula III.8 es poden veure els resultats de les anàlisis d'aminoàcids dels pèptids assenyalats a la Figura III.34. Altres pèptids analitzats, contaminants de pèptids majoritaris i pertanyents a la CPA, no apareixen a la taula. S'observa que la coincidència de composició amb els pèptids del segment d'activació (Taula III.7) és pràcticament total, apareixent només petites diferències degudes a que les anàlisis van ser fetes en dies diferents. D'aquesta manera, les anàlisis d'aminoàcids dels pèptids propis de la PCPA no presents a la CPA, van servir com a prova de que el segment aïllat era el més llarg dels possibles i que la zona seqüenciada acaba allà on comença l'enzim.

TAULA III.8

COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS TRÍPTICS DIFERENCIALS ENTRE PCPA I CPA

Aminoàcid	T-1P	T-2P	T-3P	T-4P	T-4'P
A. aspàrtic	1,79 (1)	1,12 (1)		0,57 (1)	1,01 (1)
A. glutàmic	2,43 (3)	2,15 (2)	1,25 (1)		
Serina	1,22 (1)				
Treonina					
Glicina		0,76 (1)	1,39 (1)	1,45 (1)	2,21 (2)
Alanina	1,30 (1)		1,02 (1)		0,70 (1)
Prolina				2,29 (2)	2,64 (3)
Valina	1,77 (2)	1,91 (2)	0,87 (1)	0,78 (1)	1,76 (2)
Arginina		0,63 (1)	0,64 (1)	1,48 (1)	1,76 (2)
Metionina					
Isoleucina	0,79 (1)		0,81 (1)	0,76 (1)	1,20 (1)
Leucina		0,95 (1)	1,00 (1)		
Triptòfan					
Fenilalanina		0,63 (1)	1,01 (1)	0,58 (1)	0,98 (1)
Lisina	0,94 (1)	1,13 (1)			
Histidina		0,57 (1)	1,05 (1)		
Tirosina					
Total	(11)	(11)	(9)	(8)	(12)
nmols	30	17	8	15	5
Posició a la seqüència	12-22	1-11	61-69	43-50	39-50

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència

TAULA III.8 (cont.)

COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS TRÍPTICS DIFERENCIALS ENTRE PCPA I CPA

Aminoàcid	T-5P	T-6P	T-7P	T-8P
A. aspàrtic		1,66 (2)	2,15 (2)	1,93 (2)
A. glutàmic	1,00 (1)	3,13 (4)	3,79 (4)	7,84 (8)
Serina	1,24 (1)			1,30 (1)
Treonina				0,95 (1)
Glicina				1,20 (1)
Alanina	1,09 (1)			1,07 (1)
Prolina	1,52 (2)			
Valina	1,89 (2)		0,75 (1)	0,85 (1)
Arginina		0,94 (1)	0,84 (1)	1,13 (1)
Metionina				2,29 (2)
Isoleucina	0,73 (1)			1,91 (2)
Leucina		3,37 (4)	3,80 (4)	2,87 (3)
Triptòfan		1,02 (1)	1,15 (1)	
Fenilalanina	0,81 (1)	1,04 (1)	0,82 (1)	0,85 (1)
Lisina	0,53 (1)		0,65 (1)	
Histidina		0,60 (1)	0,63 (1)	
Tirosina				0,79 (1)
Total	(10)	(14)	(16)	(25)
nmols	12	50	32	24
Posició a la seqüència	51-60	25-38	23-38	70-94

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència

## III.4.2.f. SEQÜENCIACIÓ DE PÈPTIDS TRÍPTICS

Es van seqüenciar tres pèptids tríptics per degradació automàtica, mentre que altres quatre van ser seqüenciats per degradació manual. A la Taula III.9 es veu el resultat de les degradacions automàtiques dels pèptids T-4', T-5 i T-8P (equivalent a T-8). La seqüenciació del pèptid T-4' es va continuar només fins al residu n° 6 al coincidir amb una zona ja prèviament seqüenciada gràcies a un pèptid obtingut de trencament del segment amb V-8. El pèptid T-8 és el C-terminal del segment d'activació i també el més llarg; és, a més, l'únic que conté Tyr i Met. La seqüència d'aquest pèptid no ha estat confirmada per seqüenciació de

TAULA III.9

## DEGRADACIÓ SEQÜENCIAL AUTOMÀTICA DE PÈPTIDS TRÍPTICS

N° de cicle	T-4'		T-5		T-8P	
	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)
1	Gly	7,5	Val	4,3	Tyr	7,6
2	Pro	6,0	Pro	3,4	Thr	5,3
3	Ala	3,4	Phe	1,5	Ile	8,5
4	Arg	2,1	Pro	1,4	Met	6,3
5	Pro	5,0	Ser	0,2	Ile	4,6
6	Gly	0,8	Ile	0,7	Glu	4,7
7			Gln	0,4	Asp	3,1
8			Ala	0,6	Val	4,2
9			Val	0,5	Gln	1,8
10			Lys	0,1	Leu	2,8
11					Leu	3,3
12					Leu	3,1
13					Asp	2,2
14					Glu	2,3
15					Glu	2,9
16					Gln	1,9
17					Glu*	2,0
18					Gln*	1,2
19					Met	2,1
20					Phe	2,4
21					Ala	2,0
22					Ser*	0,2
23					Gln	0,8
24					Gly	0,5
25					Arg*	0,3
Quantitat inicial (nmols)	8		12		18	
Rendiment repetitiu	64%		77%		92%	
Posició a la seqüència	39-50		51-60		70-94	

Identificació dels PTH's feta per HPLC en tots els cassos, excepte a (\*), en que es va fer per HPLC + retrohidròlisi.

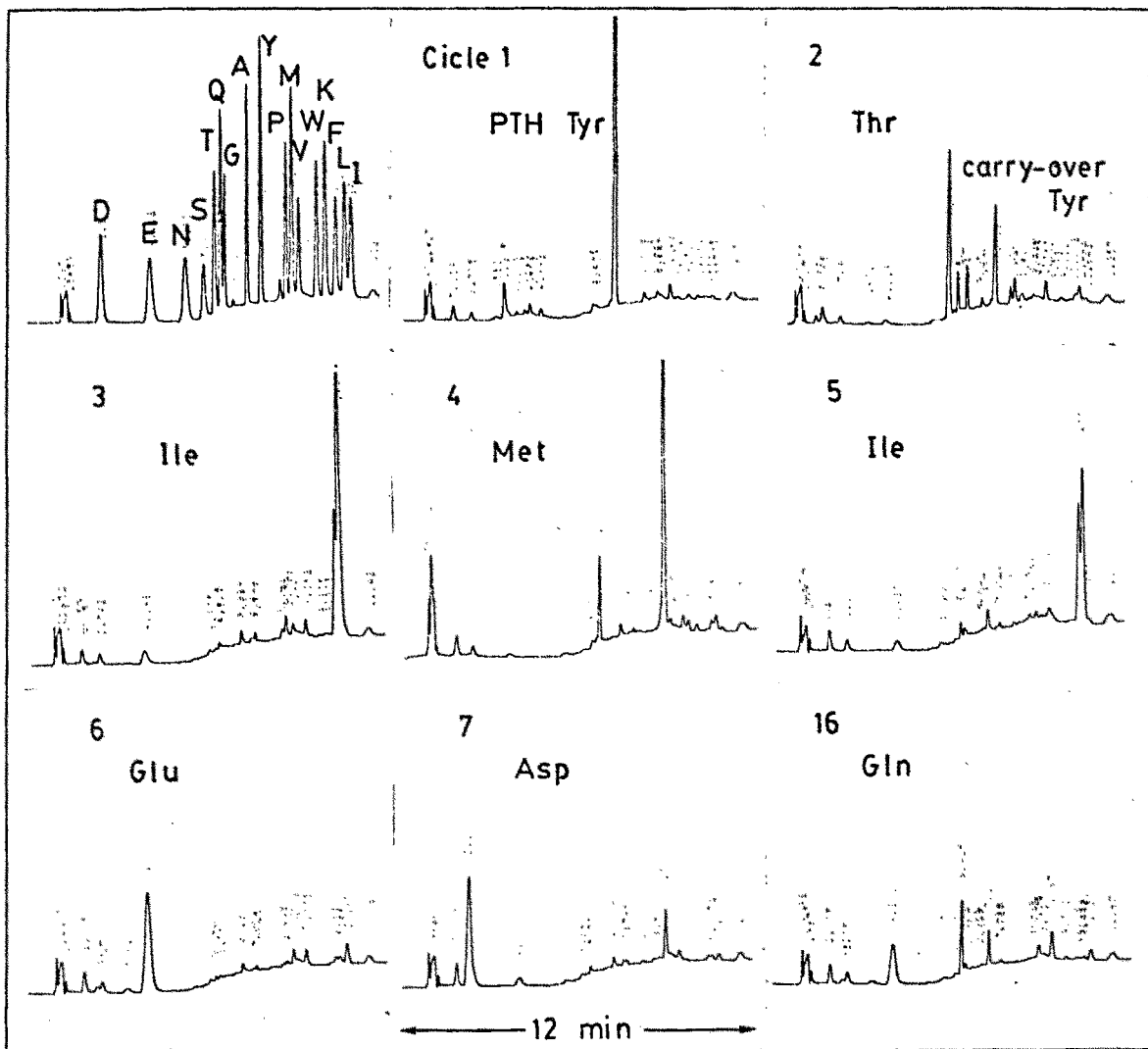


FIGURA III.35. Traçats de les anàlisis per HPLC dels PTH's alliberats en els cicles 1-7 i 16 de la degradació automàtica d'Edman del peptid T-8P. Al primer requadre es presenta la cromatografia d'una barreja de patrons (200 pmols). En cada cas es va injectar 1/10 del total de la mostra en un volum de 10  $\mu$ l. Es presenta el cicle 16 al donar-se en aquest punt una substitució important entre rata i porc: Gln per Lys. Les condicions de l'anàlisi es troben descrites a l'apartat II.7.4.

TAULA III.10

## DEGRADACIÓ SEQÜENCIAL MANUAL DE PÈPTIDS TRÍPTICS

Nº de cicle	T-1	T-2	T-6	T-4
1	Ile	Lys	Glu	Pro
2	Ser	Glu	Leu	Gly
3	Val	Asp	Glu	Phe
4	Asp	Phe	Asp	Pro
5	Asp	Val	Leu	Ile
6	Glu	Gly	Glu	Asp
7	Ala	His		Val
8	Gln	Gln	Leu	Arg
9	Val	Val	Gln	
10	Gln	Leu	Leu	
11	Lys	Arg		
Quantitat inicial (nmols)	20	21	20	16
Posició	12-22	1-11	25-38	43-50

Identificació dels PTH's feta en tots els cassos per cromatografia en capa fina  
(veure apartat II.7.5.)

pèptids provinents d'altres trencaments, però ja es veurà més endavant que l'anàlisi d'aminoàcids de pèptids producte del trencament amb bromur de cianògen confirma la composició dels dos darrers fragments corresponents al pèptid T-8. A la Figura III.35 es pot veure, a tall d'exemple l'anàlisi d'alguns PTH-aminoàcids alliberats en el procés de degradació automàtica del pèptid T-8P.

A la Taula III.10 es pot veure el resultat de la degradació manual dels pèptids tríptics T-1, T-2, T-6 i T-4. La seqüència així obtinguda pels pèptids T-1 i T-2 va confirmar plenament la ja obtinguda per anàlisi seqüencial N-terminal. La seqüència del pèptid T-6 no es va poder dur a terme en la seva totalitat, arribant-se només a la posició 34, amb un residu, el 31, no identificat. Les altres posicions de la seqüència són plenament coincidents amb la corresponent a la degradació N-terminal i amb la corresponent a un pèptid de V-8. La seqüència del

pèptid T-4 va servir per establir un solapament entre dos pèptids provinents de V-8. En aquesta taula no s'indica el rendiment de l'alliberament de PTH's, puix que aquests només van ser identificats per cromatografia en capa prima.

### III.4.3. DIGESTIÓ AMB PROTEÏNESA V-8 DE *Staphylococcus Aureus*

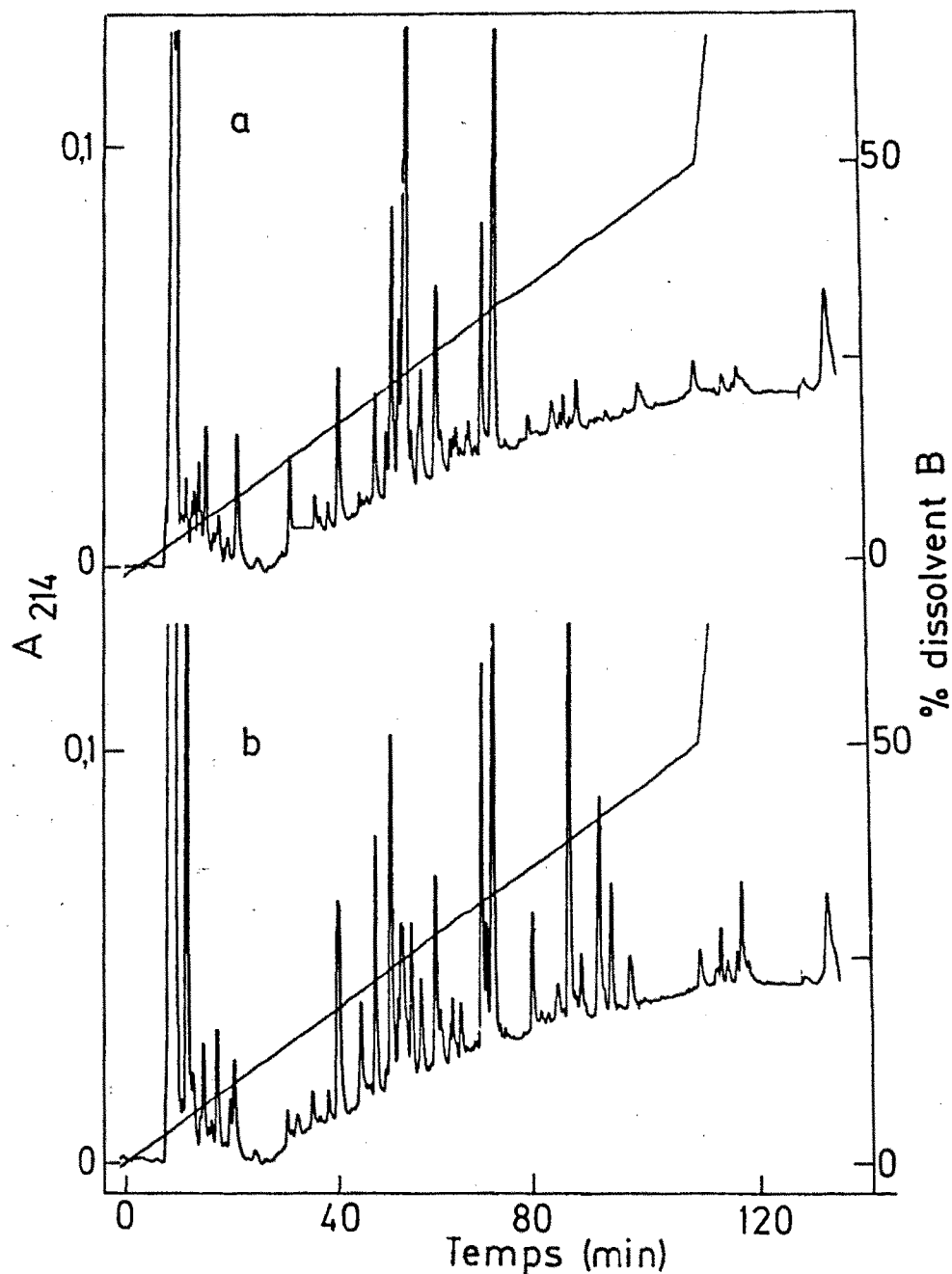
Els tractaments amb proteïnasa V-8 de *Staphylococcus Aureus*, també anomenada glutàmic-endoproteïnasa, es van dur a terme a nivell analític sobre PCPA, CPA i el segment d'activació. No obstant, només es va utilitzar el segment al passar a escala preparativa.

Les digestions i mapes peptídics analítics sobre l'enzim i el proenzim es van dur a terme tant a pH 7,8-8,0 com a pH 4,0, ambdós descrits com a pH's òptims d'actuació de l'enzim (Drapeau i Houmard, 1972). Malgrat emprar temps de digestió perllongats, no es va aconseguir un trencament satisfactori per a cap de les dues proteïnes. Possiblement, la forta estructura globular que presenten i les mateixes característiques de la V-8, una proteïnasa de la que s'ha descrit que té dificultats per a digerir algunes proteïnes, permeteren la presència de nuclis resistents a la digestió en les condicions assajades.

En aquest apartat es presenta, per tant, únicament els resultats assolits en el tractament del segment amb la proteïnasa V-8 (anomenada V-8 a partir d'aquí).

#### III.4.3.a. MAPES PEPTÍDICS DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ DIGERIT AMB V-8

Amb el segment es van assajar també les condicions descrites a l'apartat anterior, i a més es van fer digestions en condicions desnaturalitzants. Es sabut que la V-8 és capaç de conservar un percentatge elevat de la seva activitat en presència de 0,2% SDS i de 4 M urea (Drapeau, 1977). A la Figura III.36 es comparen els mapes



**FIGURA III.36.** Mapes peptídics comparatius de digestions del segment d'activació amb proteïnasa V-8 d'S.a. en absència (a) i presència (b) de urea 4M en el medi de digestió. S'injectaren 3 nmols a una columna Vydac C-4 TP-RP. Solvents: A, TFA 0,1%; B, acetonitril + TFA 0,1%. Flux: 1 ml/min.



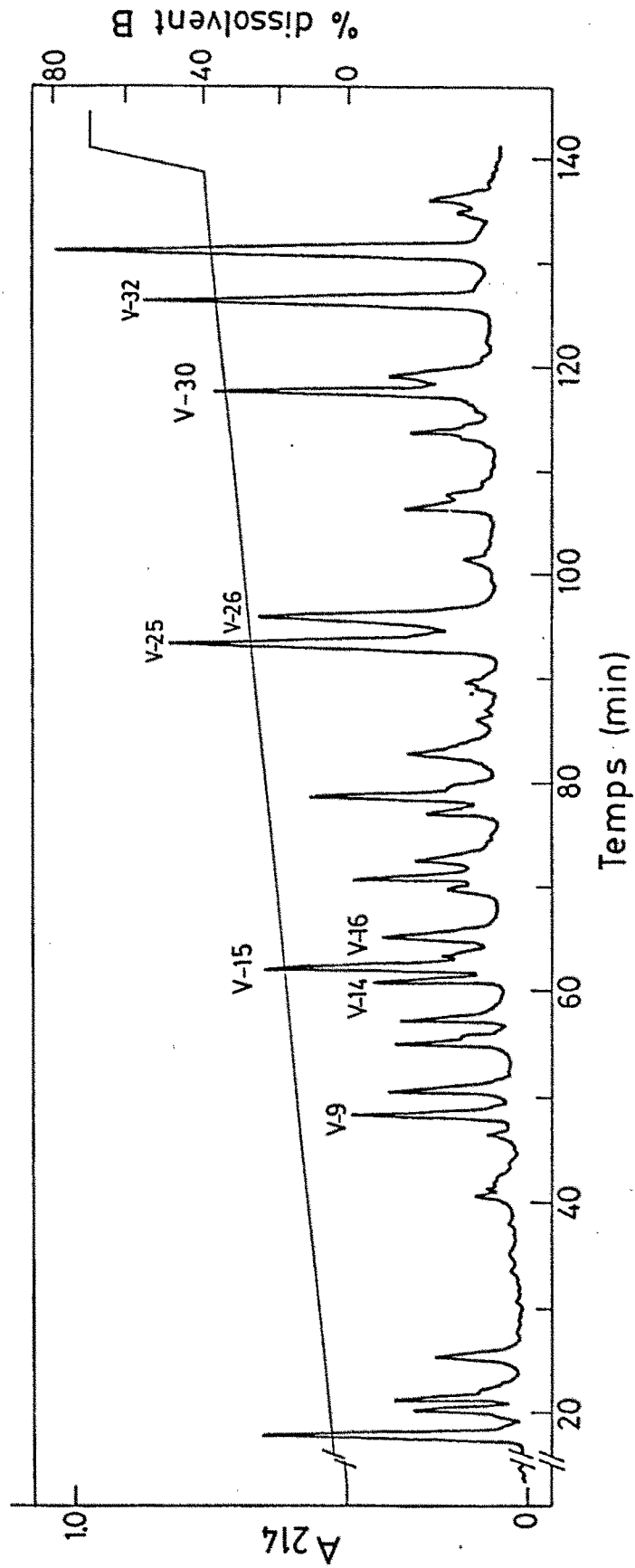


FIGURA III.37. Mapa peptídica preparatiu per HPLC d'un digerit de segment d'activació amb proteïnasa V-8 d'S.a.. S'injectaren 45 nmols a una columna Vydac C-4 IP-RP. Solvents i flux com a la Figura III.36.

peptídics obtinguts al cromatografiar dos digerits del mateix segment d'activació fets en presència i absència d'urea 4 M. Es pot apreciar que el cromatograma de la mostra digerida en 4 M urea presenta un major nombre de pics, alguns d'ells de temps de retenció superiors als assolits amb la digestió en condicions no desplegants. Donat que és preferible disposar de pèptids llargs per poder-los aplicar al seqüenciador automàtic, optarem per la digestió en urea 4 M al passar a escala preparativa.

A la Figura III.37 es pot veure el perfil de la cromatografia preparativa d'un digerit de V-8 del segment d'activació. La posició teòricament ocupada pel segment en una cromatografia com la de la figura apareixia lliure de material, el que ens permetia suposar que la digestió havia estat completa.

#### III.4.3.b. ANÀLISI D'AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS DE V-8

Les anàlisis d'aminoàcids dels pèptids més importants obtinguts a partir d'una digestió amb V-8 es presenten a la Taula III.11. Les composicions dels pèptids analitzats i la predicció del lloc possiblement ocupat a la seqüència, feta amb l'ajuda del programa de càlcul i localització, així com les dades de seqüència que es presenten a l'apartat següent, demostren que els productes de digestió finals no corresponen als que es podria esperar de l'especificitat de la V-8. Aquesta elevada heterogeneïtat, que dona com a resultat un nombre de pèptids superior a l'esperat pot ser una característica intrínseca del lot de V-8 amb que vam treballar, però a la vegada pot haver estat també potenciada per les dràstiques condicions que s'han utilitzat (i que han estat necessàries) per a la digestió de la proteïna (concentracions elevades de proteïnasa, temps de digestió llargs i presència d'urea 4 M). La resistència del segment a la digestió en condicions que no fossin les emprades ha de ser adjudicada al caràcter fortament globular del mateix a pH neutre (Avilés et al., 1985; López et al., 1985). No es pot descartar que una possible contaminació del segment amb proproteïnasa E sigui paral·lelament la responsable de trencaments que no corresponen a

TAULA III.11  
COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS DE V-8 DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

Aminoàcid	V-9	V-14	V-15	V-16
A. aspàrtic		1,13 (1)	2,00 (2)	
A. glutàmic	1,19 (1)	1,28 (1)	6,50 (6)	
Serina				
Treonina				0,96 (1)
Glicina	1,03 (1)		0,77 (1)	
Alanina				
Prolina				
Valina	0,95 (1)	0,93 (1)	0,73 (1)	
Arginina				0,85 (1)
Metionina			0,81 (1)	
Isoleucina				1,03 (1)
Leucina	0,86 (1)		3,38 (3)	
Triptòfan				
Fenilalanina		1,00 (1)	0,65 (1)	
Lisina		1,10 (1)		
Histidina	0,92 (1)			
Tirosina				0,98 (1)
Total	(5)	(5)	(15)	(4)
nmols	40	34	22	19
Posició a la seqüència	6-10	1-5	76-90	69-72

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència.

l'especificitat de la V-8.

Alguns del pèptids aïllats tenien composicions que no corresponien a cap zona concreta de la seqüència. La seqüenciació d'algun d'ells (p.e. V-26) va demostrar que la heterogeneïtat del pic cromatogràfic en què apareixien era la causa d'aquestes composicions anòmales. Cal esmentar que els pèptids procedents de trencament amb V-8 van ser analitzats pel procediment convencional utilitzant un analitzador automàtic d'aminoàcids Beckman 121-M.

TAULA III.11 (cont.)

COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS DE V-8 DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

Aminoàcid	V-25	V-26*	V-30*	V-32
A. aspàrtic	1,52 (1)	1,10	2,26	0,95 (1)
A. glutàmic		2,60	1,52	1,31 (1)
Serina	1,01 (1)			
Treonina				
Glicina		0,80	1,14	1,52 (2)
Alanina		0,51		0,62 (1)
Prolina	1,73 (2)	1,14		1,65 (2)
Valina	1,54 (2)	0,20		
Arginina	0,90 (1)	0,51	1,18	0,97 (1)
Metionina				
Isoleucina				
Leucina		2,80	1,81	0,88 (1)
Triptòfan				(1)
Fenilalanina	1,00 (1)	0,53	0,68	1,81 (2)
Lisina		0,64		
Histidina		0,63	1,40	
Tirosina				
Total	(8)			(13)
nmols	22	19	9	18
Posició a la seqüència	48-55	24-32*	28-38*	33-45

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència

\*Barreja heterogènia: només s'indica la posició a la seqüència del pèptid majoritari, i no s'indica el nombre enter de residus

### III.4.3.c. SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA DE PÈPTIDS DE V-8

Es van seqüenciar tres dels fragments obtinguts a partir de la digestió amb proteïnasa V-8, els quals van permetre conèixer l'estructura primària de la part central de la molècula. A la Taula III.12 es relacionen els resultats dels passos consecutius de degradació automàtica per a cada un dels pèptids. Només s'indica una seqüència per al pèptid V-26, la majoritària, encara que a cada cicle degradatiu apareixien senyals de dos PTH's minoritaris més; el pèptid era, per tant, heterogeni i format per un pèptid majoritari i dos de minoritaris, les seqüències dels quals, no expressades a la taula, són: 39-43 i 50-54.

TAULA III.12

DEGRADACIÓ SEQÜENCIAL AUTOMÀTICA DE PÈPTIDS DE V-8

N° de cicle	V-25		V-26		V-32	
	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)
1	Asp	9,5	Lys	10,2	Gln	4,2
2	Val	6,2	Glu	8,4	Leu	3,7
3	Arg	4,3	Leu	7,6	Asp	2,4
4	Val	5,4	Glu	4,4	Phe	3,6
5	Pro	4,3	Asp	4,5	Trp	2,3
6	Phe	1,9	Leu	5,8	Arg	2,5
7	Pro	1,3	Glu	5,0	Gly	3,3
8	Ser	0,3	His	3,2	Pro	2,9
9			Leu	2,8	Ala	0,6
10					Arg	0,5
11					Pro	0,8
12					Gly	0,2
13					Phe	0,2
Quantitat inicial (nmols)	22		19		18	
Rendiment repetitiu	55%		91%		74%	
Posició a la seqüència	48-55		24-32		33-45	

Identificació dels PTH's feta per HPLC en tots els casos.

### III.4.4. DIGESTIÓ DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ AMB PEPSINA

El tractament amb pepsina es va aplicar només al segment d'activació, doncs a partir d'ell es va obtenir un model de trencament força convenient, amb un nombre no molt elevat de pèptids, que a més podien ser separats per cromatografia de HPLC en un temps més curt que, per exemple, els digerits amb V-8. En aquest cas, doncs, ni tant sols es va recórrer a estudiar el comportament de digestions analítiques del proenzim i l'enzim. A la Figura III. 38 es pot veure el perfil

TAULA III.13

COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS PEPSÍNICS DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

Aminoàcid	P-1	P-2	P-4	P-5
A. aspàrtic		1,10 (1)	1,20 (1)	
A. glutàmic	0,97 (1)	1,25 (1)	2,32 (2)	0,70 (1)
Serina				
Treonina		1,06 (1)		
Glicina	1,27 (1)		1,41 (1)	
Alanina	1,00 (1)			0,81 (1)
Prolina				
Valina			2,02 (2)	1,65 (2)
Arginina	0,61 (1)			
Metionina		(1)		
Isoleucina	0,97 (1)	2,21 (2)		
Leucina			1,09 (1)	1,16 (1)
Triptòfan				
Fenilalanina			1,12 (1)	0,86 (1)
Lisina			0,92 (1)	0,75 (1)
Histidina	0,74 (1)		0,72 (1)	
Tirosina	1,14 (1)			
Total	(7)	(6)	(10)	(6)
nmols	7	10	13	8
Posició a la seqüència	64-70	71-76?	1-10	56-62

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència

TAULA III.13 (cont.)  
 COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS PEPSÍNICS DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

Aminoàcid	P-6	P-7	P-10
A. aspàrtic	0,82 (1)		
A. glutàmic		1,08 (1)	1,31 (1)
Serina		0,99 (1)	
Treonina			
Glicina	2,15 (2)		1,53 (1)
Alanina	0,97 (1)		1,69 (2)
Prolina	3,65 (4)	1,75 (2)	
Valina	2,01 (2)	2,00 (2)	2,32 (2)
Arginina	2,74 (3)	0,86 (1)	
Metionina			
Isoleucina	0,92 (1)	0,90 (1)	0,96 (1)
Leucina			0,66 (1)
Triptòfan	0,71 (1)		
Fenilalanina	1,66 (2)	0,94 (1)	0,63 (1)
Lisina			0,54 (1)
Histidina			0,71 (1)
Tirosina			
Total	(17)	(9)	(11)
nmols	10	17	7
Posició a la seqüència	37-53?	49-57	58-68

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència

cromatogràfic d'un digerit de segment amb pepsina, mentre que a la Taula III.13 hi ha llistats els resultats de les anàlisis d'aminoàcids dels pèptids numerats a la figura. No es presenta l'anàlisi d'aminoàcids d'alguns dels pics cromatogràfics (P-8, 11, 12 i 13), doncs es va comprovar que contenien barreges heterogènies de més d'un pèptid.

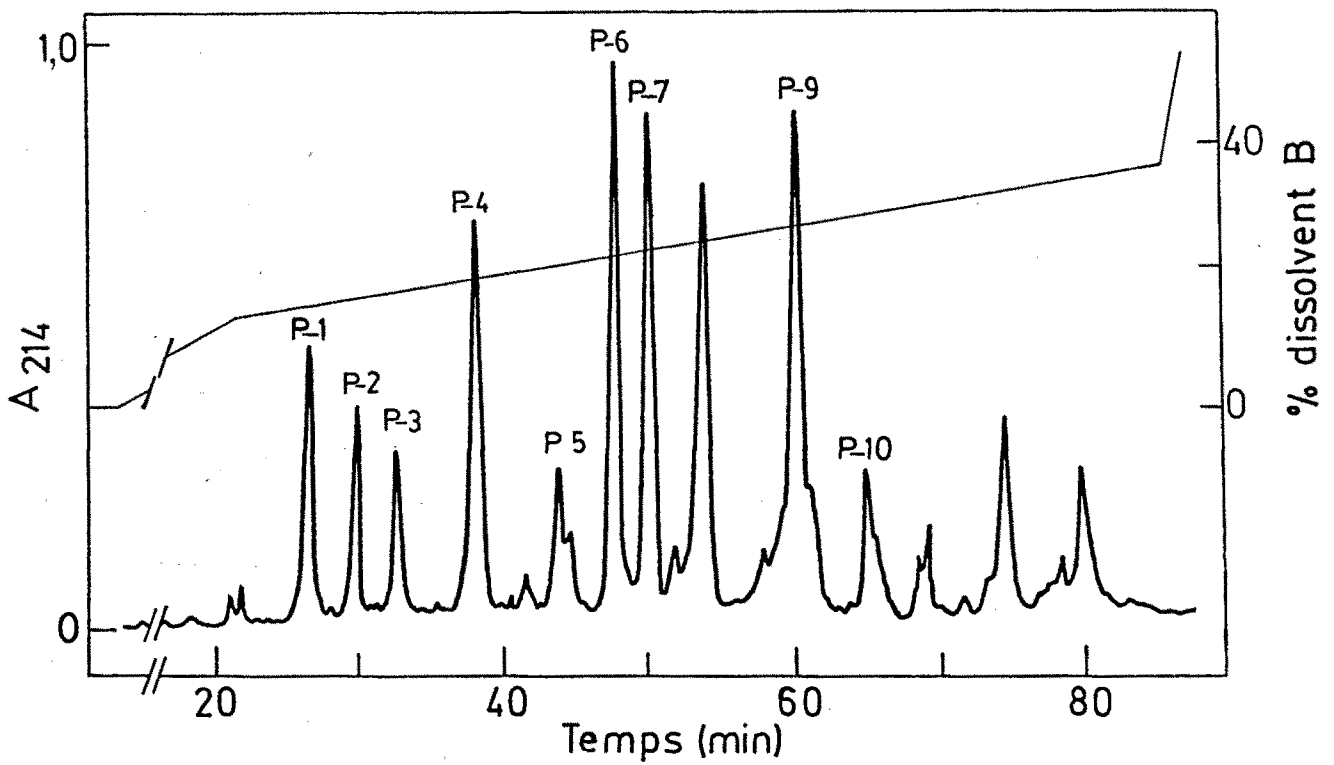


FIGURA III.38. Mapa peptidic per HPLC d'un digerit del segment d'activació amb pepsina. Es va injectar un total de 50 nmols de mostra a una columna  $\mu$ -Bondapak C-18. Solvents: A, TFA 0,05%; B, acetonitril 80% + TFA 0,045%. Flux: 1 ml/min.



## III.4.4.a. SEQÜENCIACIÓ AUTOMÀTICA DE PÈPTIDS PEPSÍNICS

Es va seqüenciar per degradació automàtica tres pèptids pepsínics, P-1, P-7 i P-10, que van permetre la deducció de l'estructura primària d'una ampla zona del segment prèvia al pèptid triptic C-terminal. La seqüència del pèptid P-1 va permetre l'establiment del solapament amb el citat pèptid triptic C-terminal. La zona de la molècula seqüenciada a partir dels pèptids pepsínics, rica en residus prolina, va ser especialment difícil de seqüenciar, donat el poc rendiment que s'obté en la degradació d'Edman en els enllaços Pro-X. Els resultats de les anàlisis seqüencials dels pèptids citats es pot veure a la Taula III.14.

TAULA III.14

## DEGRADACIÓ SEQÜENCIAL AUTOMÀTICA DE PÈPTIDS PEPSÍNICS

N° de cicle	P-1		P-7		P-10	
	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)	PTH Aminoàcid	Rendiment (nmols)
1	Glu	3,6	Val	10,6	Ala	4,6
2	Ala	3,4	Arg	12,2	Val	2,4
3	His	2,6	Val	9,7	Lys	1,1
4	Gly	4,1	Pro	6,9	Val	1,1
5	Ile	1,4	Phe	4,2	Phe	1,0
6	Arg	2,1	Pro	4,9	Leu	0,5
7	Tyr	0,7	Ser	0,6	Glu	0,6
8			Ile	2,0	Ala	0,5
9			Gln	1,2	His	0,4
10					Gly	0,4
Quantitat inicial (nmols)		7	12		7	
Rendiment repetitiu			96%		74%	

Identificació dels PTH's feta per HPLC en tots els casos.

### III.4.5. TRENCAMENTS QUÍMICS DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

Es van aplicar quatre trencaments químics diferents al segment d'activació: bromur de cianògen, BNPS-escatol, àcid o-iodosobenzoic i N-bromsuccinimida. Dels quatre, únicament el tractament amb bromur de cianògen va donar resultats parcialment vàlids. En cap dels altres casos es va obtenir una separació cromatogràfica per HPLC de la suficient qualitat ni en la quantitat suficient com per a dur a terme una caracterització inicial.

Aquesta resistència al trencament del segment per diversos procediments químics pot ser el resultat d'una agregació del mateix que es produiria a pH baix en presència de concentracions elevades d'àcids orgànics, condicions habituals d'aquesta mena de trencaments. Aquesta agregació impediria l'accés del reactiu als punts de trencament.

A la Figura III.39 es pot veure el perfil cromatogràfic obtingut a l'analitzar un digerit semipreparatiu del segment d'activació amb bromur

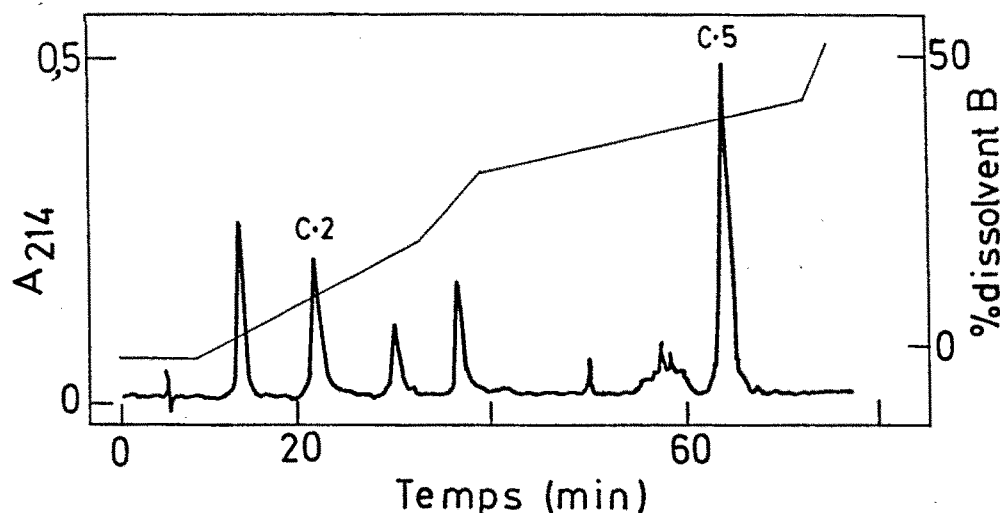


FIGURA III.39. Separació cromatogràfica de pèptids producte del tractament del segment d'activació amb CNBr. Es van injectar 20 nmols de mostra a una columna Vydac C-4 TP-RP. Solvents: A, TFA 0,1%; B, acetonitril + TFA 0,1%. Flux: 1 ml/min.

TAULA III.15

COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DELS PÈPTIDS DE BROMUR DE CIANOGEN DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

<i>Aminoàcid</i>	<i>C-2</i>	<i>C-5</i>
A. aspàrtic	2,51 (2)	2,08 (2)
A. glutàmic	1,4 (1)	7,21 (7)
Serina	1,5 (1)	
Treonina		
Glicina	1,2 (1)	
Alanina	0,8 (1)	
Prolina		
Valina		0,88 (1)
Arginina	0,71 (1)	
Metionina		0,21 (1)
Isoleucina		1,21 (1)
Leucina		2,73 (3)
Triptòfan		
Fenilalanina	0,83 (1)	
Lisina		
Histidina		
Tirosina		
Total	(6)	(15)
nmols	0,7	1,1
Posició a la seqüència	89-94	74-88

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència

de cianògen. Al tenir el segment d'activació dues metionines, seria d'esperar l'aparició de tres pèptids en el cas que el trencament fos absolutament específic i amb un rendiment total. S'obté, no obstant, un cromatograma més heterogeni, i l'anàlisi d'aminoàcids dels pèptids obtinguts no evidencia la presència del pèptid teòric més llarg (1-72). A la Taula III.15 es presenta l'anàlisi d'aminoàcids dels pèptids C-2 i C-5, la composició dels quals corresponia, respectivament a la dels fragments 89-94 i 74-88. D'aquesta manera es confirmava la composició del pèptid T-8 (T-8P), l'únic del que es va poder obtenir la seqüència en aquesta zona.

### III.4.6. ESTRUCTURA PRIMÀRIA DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

A la Figura III.40 es presenta l'estructura primària del segment d'activació de la procarboxipeptidasa A de pàncreas de porc, deduïda a partir dels resultats descrits als apartats anteriors. Sota la seqüència d'aminoàcids s'indica la situació dels fragments sotmesos a degradació automàtica o manual d'Edman.

Com és habitual a la major part de seqüències de proteïnes, l'anàlisi de l'estructura primària dels fragments triptics ha estat també aquí la base sobre la que s'ha construït l'alineament d'aminoàcids. Els fragments procedents del trencament amb V-8 han servit per establir solapaments a la zona compresa entre els residus 23 i 55, mentre que els pèptids pepsínics han cobert els solapaments de la zona 49-70. Precisament a la posició 70 es produeix l'únic solapament d'un sol residu de tota la seqüència, doncs el pèptid P-1 acaba en Tyr<sub>70</sub> (digestió per C-ter d'un aminoàcid aromàtic, típica de pepsina), que és allà on comença el pèptid triptic T-8 (Tyr posterior a Arg). Tot i així, diverses evidències recolcen la fidelitat de la seqüència d'aquesta zona:

i) l'anàlisi d'aminoàcids del segment d'activació dona compte de la presència d'una sola tirosina (veure Taula III.16).

ii) els pèptids T-8, P-1 i V-16 són els únics entre els analitzats que contenen tirosina; T-8 i P-1 han estat seqüenciats, mentre que l'anàlisi del pèptid V-16 coincideix perfectament amb el fragment 69-72 (dos trencaments per Ile, propis d'una possible contaminació de PPE a la barreja de digestió).

iii) l'anàlisi dels PTH's producte de la degradació automàtica no deixa lloc a dubtes sobre la identitat del residu 70, tirosina. A més, aquesta identitat es veu reforçada per la presència d'un "carry-over" de Tyr al PTH corresponent a les posicions 71 (Thr) i 72 (Ile) de la seqüència i que corresponen respectivament a les posicions 2 i 3 del pèptid T-8; com és sabut, els aminoàcids aromàtics són aquells que amb més facilitat deixen *carry-over* en processos de seqüenciació.

El segment d'activació conté 94 residus i té un pes molecular calculat de 10.768. Aquest valor és lleugerament inferior al calculat

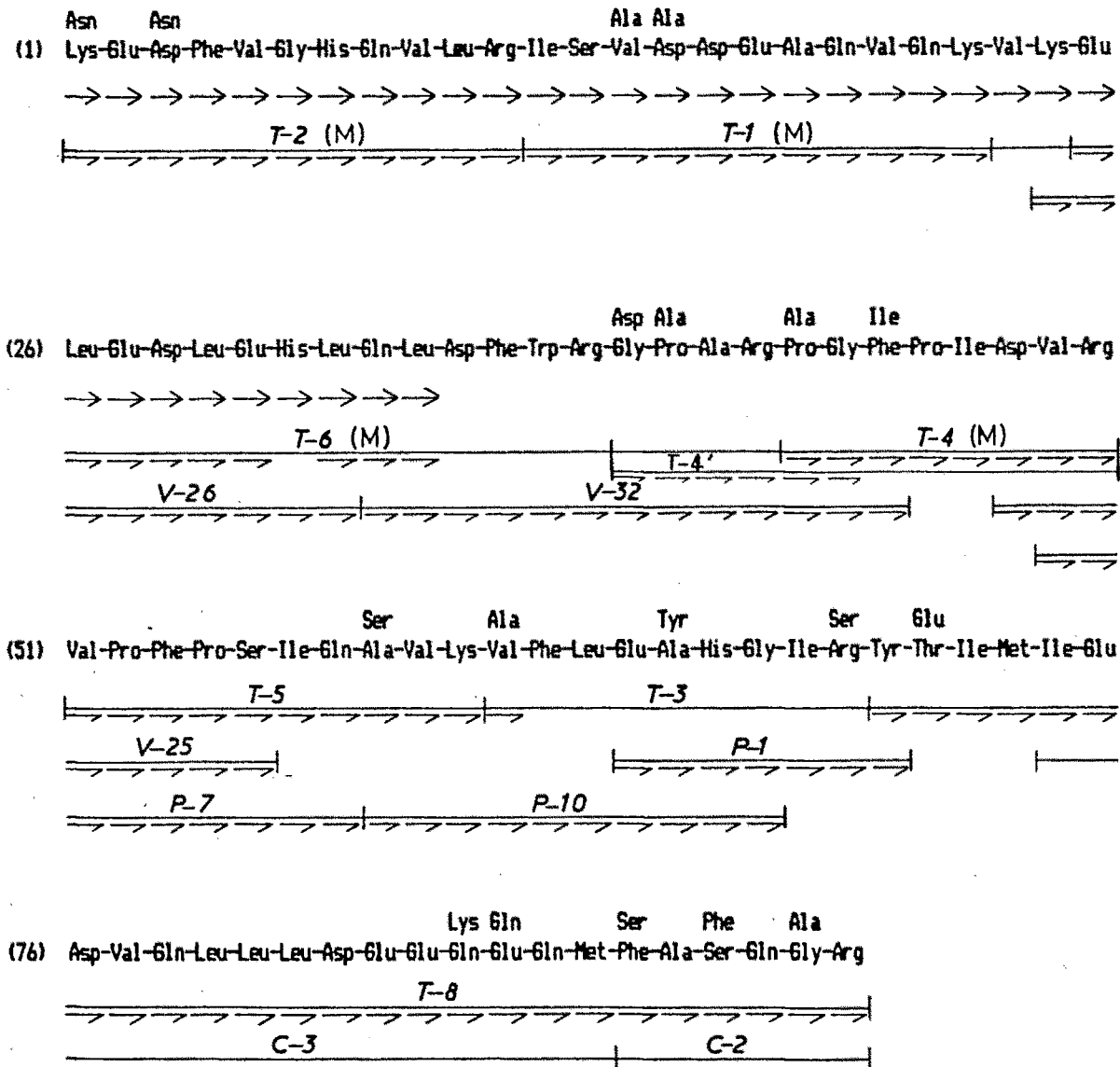
TAULA III.16  
COMPOSICIÓ EN AMINOÀCIDS DEL  
DEL SEGMENT D'ACTIVACIÓ

<i>Aminoàcid</i>		<i>Aminoàcid</i>	
A. aspàrtic	8,04 (8)	Metionina	1,92 (2)
A. glutàmic	18,09 (19)	Isoleucina	5,80 (6)
Serina	3,21 (3)	Leucina	9,12 (9)
Treonina	1,15 (1)	Triptòfan	1,01 (1)
Glicina	5,33 (5)	Fenilalanina	6,05 (6)
Alanina	5,47 (5)	Cistina	0 (0)
Prolina	5,03 (5)	Lisina	4,11 (4)
Valina	9,69 (10)	Histidina	3,27 (3)
Arginina	5,40 (6)	Tirosina	1,30 (1)
Total			(94)

Entre parèntesi s'indica el nombre de residus calculat a partir de la seqüència

Aquests resultats representen la mitja de tres anàlisis; s'ha fet hidròlisi a 22, 48 i 72 per extrapolar els valors de Ser i Thr a 0 h.

anteriorment per electroforesi en SDS i anàlisi d'aminoàcids (San Segundo et al., 1982). La proporció d'aminoàcids hidrofòbics és especialment elevada (48 %), així com la d'acídics (18 %). També és de destacar la presència d'una regió rica en prolines (5 en total localitzades entre els residus 40 i 54). El segment posseeix també dues metionines, una tirosina i un triptòfan.



**FIGURA III.40.** Estructura primària del segment d'activació de la procarboxipeptidasa A monomèrica de pàncreas de porc. Es va aplicar mètodes automàtics o manuals (M) de degradació d'Edman al zimògen sencer carboximetil·lat (→) o a pèptids (—) derivats de trencaments amb tripsina (T), proteïnasa V-8 d'S.a. (V), pepsina (P) o bromur de cianògen (C). La numeració dels pèptids correspon a la de les Figures III.34,37 i 38.

### III.4.7. HOMOLOGIES AMB LA SEQÜÈNCIA CORRESPONENT DE PÀNCREAS DE RATA

Com ja ha estat citat a la Introducció d'aquest treball, es coneix l'estructura primària del segment d'activació de pàncreas de rata, deduïda a partir de la seqüència de bases del cDNA corresponent al pre-zimògen (Quinto et al., 1982). La comparació directa de les estructures primàries dóna compte d'una homologia del 81 % d'identitats estrictes; l'homologia augmenta a un 88 % aproximadament quan es tenen en compte substitucions conservatives. Aquest és un percentatge d'homologia molt elevat i que coincideix amb el que presenten les seqüències dels enzims de rata i de bou (també d'un 81 % de correspondències estrictes). Cal pensar en l'existència d'importants raons estructurals i funcionals per a que la seqüència del pèptid d'activació sigui conservada en un grau tant elevat com l'observat en l'enzim actiu.

A la Figura III.41 es pot veure una comparació de les estructures primàries dels segments d'activació de rata i de porc, juntament amb un esquema de zones homòlogues de la seqüència de bou, no publicada, però citada com comunicació oral a una publicació (Quinto et al., 1982). S'observa que hi ha tres regions que presenten una homologia més elevada que la mitja: les compreses entre els residus 3-38, 44-57 i 72-84, amb 94 %, 92 % i 100 % d'homologia respectivament. Aquestes són aproximadament les mateixes regions altament preservades de variacions que s'observen en la comparació de les seqüències de rata i bou (Quinto et al., 1982). La primera d'aquestes regions coincideix gairebé plenament amb el segon dels exons descrits per al ADN genòmic de rata, mentre que les altres dues estarien incloses dintre del tercer exó. Es d'imaginar que aquestes regions conservades puguin jugar un paper important en la conformació i en la funcionalitat del segment d'activació. Concretament, es pot pensar que cal una conformació molt definida per a que el segment s'uneixi a la carboxipeptidasa A i formi l'estructura de complex inactiu.

L'homologia observada en el conjunt de l'estructura primària disminueix fins a un 50% en la zona corresponent als darrers 10 residus

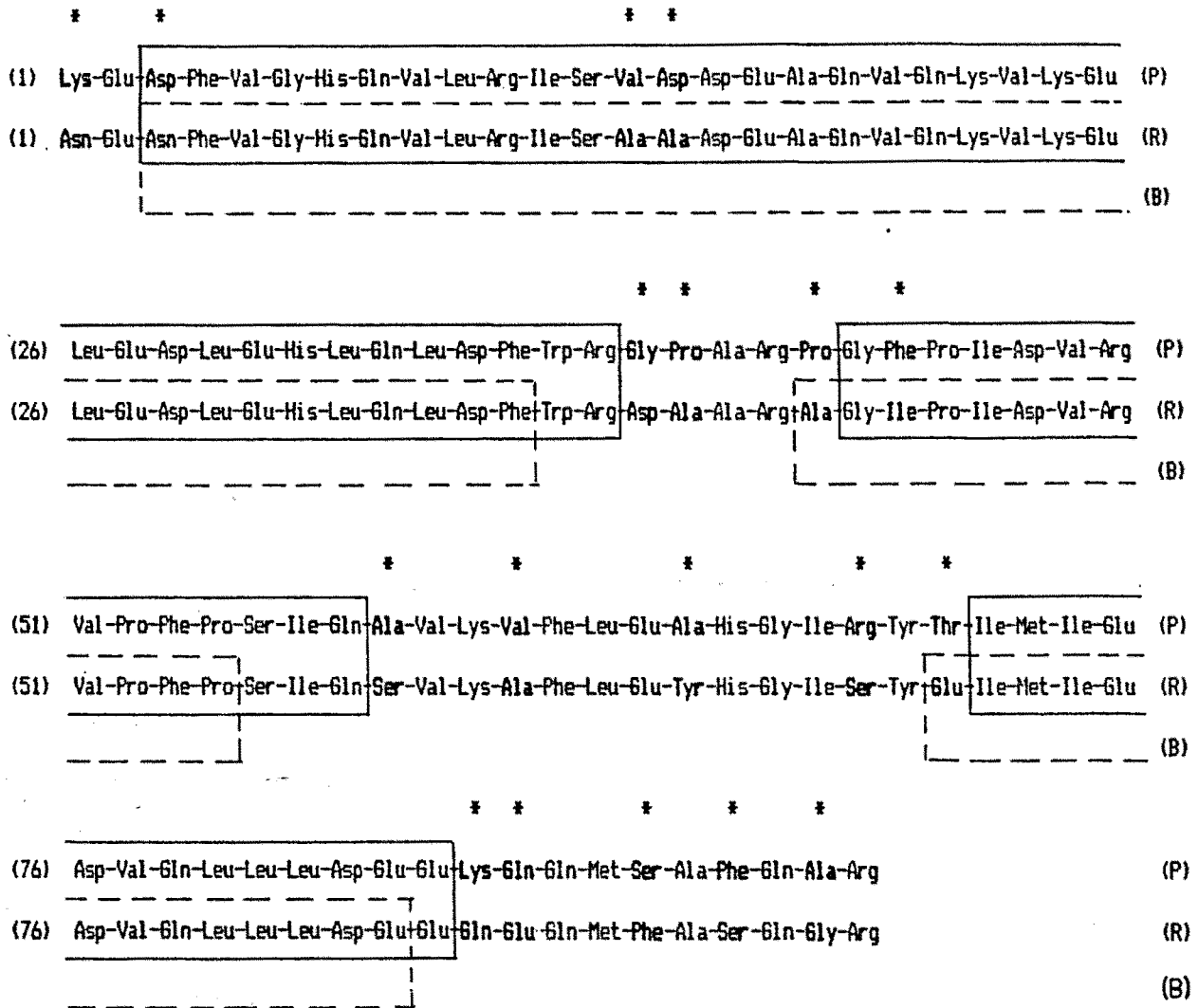


FIGURA III.41 Comparació de les estructures primàries dels segments d'activació de les PCPA de porc (P) i rata (R). Les diferències estan marcades amb negreta i amb un asterisc al damunt de la seqüència. Les regions que presenten una homologia superior a la mitjana estan marcades amb capsos: 3-38: 94% d'homologia; 44-57: 92%; 72-84: 100%. Amb traç discontinu es presenta les regions més conservades entre la seqüència de rata (R) i de bou (B), espècie de la qual no es coneix encara l'estructura primària. L'existència de tals regions (3-36: 82% d'homologia; 43-54: 92%; 71-83: 92%) és citada per Quinto et al. (1982).



del segment d'activació (84-94). Una variabilitat similar s'observa en els primers 7 residus de la seqüència de la CPA (Koide et al., 1981a; Quinto et al., 1982). Es possible hipotetitzar a partir d'aquesta observació que la regió d'unió entre el segment d'activació i l'enzim, regió on s'efectua l'atac proteolític a la PCPA, no requereix d'una especial conservació de seqüència i no presenta per tant requeriments estructurals estrictes per a ser atacada per proteïnases. El fet que les PCPAs pancreàtiques puguin ser activades per proteïnases diferents (Freisheim et al., 1967b; Uren i Neurath, 1972) recolça aquesta hipòtesi.

### III.4.8. ESTUDIS CONFORMACIONALS INICIALS

L'estudi de les característiques conformacionals del segment d'activació és la continuació lògica de la determinació de la seqüència d'aminoàcids. Ambdós estudis, a més d'indicar el parentiu que presenta aquesta proteïna amb altres, han de permetre establir les bases de la discussió sobre els mecanismes d'interacció enzim-segment i sobre la possible funcionalitat del segment aïllat. En una altra Tesi recentment presentada (Vilanova, 1987) s'ha presentat un estudi conformacional més exhaustiu que el que aquí només s'inicia. En aquest apartat es presenta tant sols una introducció a aquests estudis feta des d'un angle diferent, amb l'objectiu d'establir la relació que pot haver-hi entre la proteòlisi que sofreixen diferents regions del segment d'activació durant l'activació del proenzim i la conformació i exposició al medi que podrien presentar.

#### III.4.8.a. PREDICCIÓ D'ESTRUCTURA SECUNDARIA

A la Figura III.42 es presenta la probabilitat de formació d'estructures hèlix  $\alpha$  i gir  $\beta$  per al segment d'activació de la PCPA de pàncreas de porc seqüenciat en aquesta Tesi. S'hi afegixen, a més,

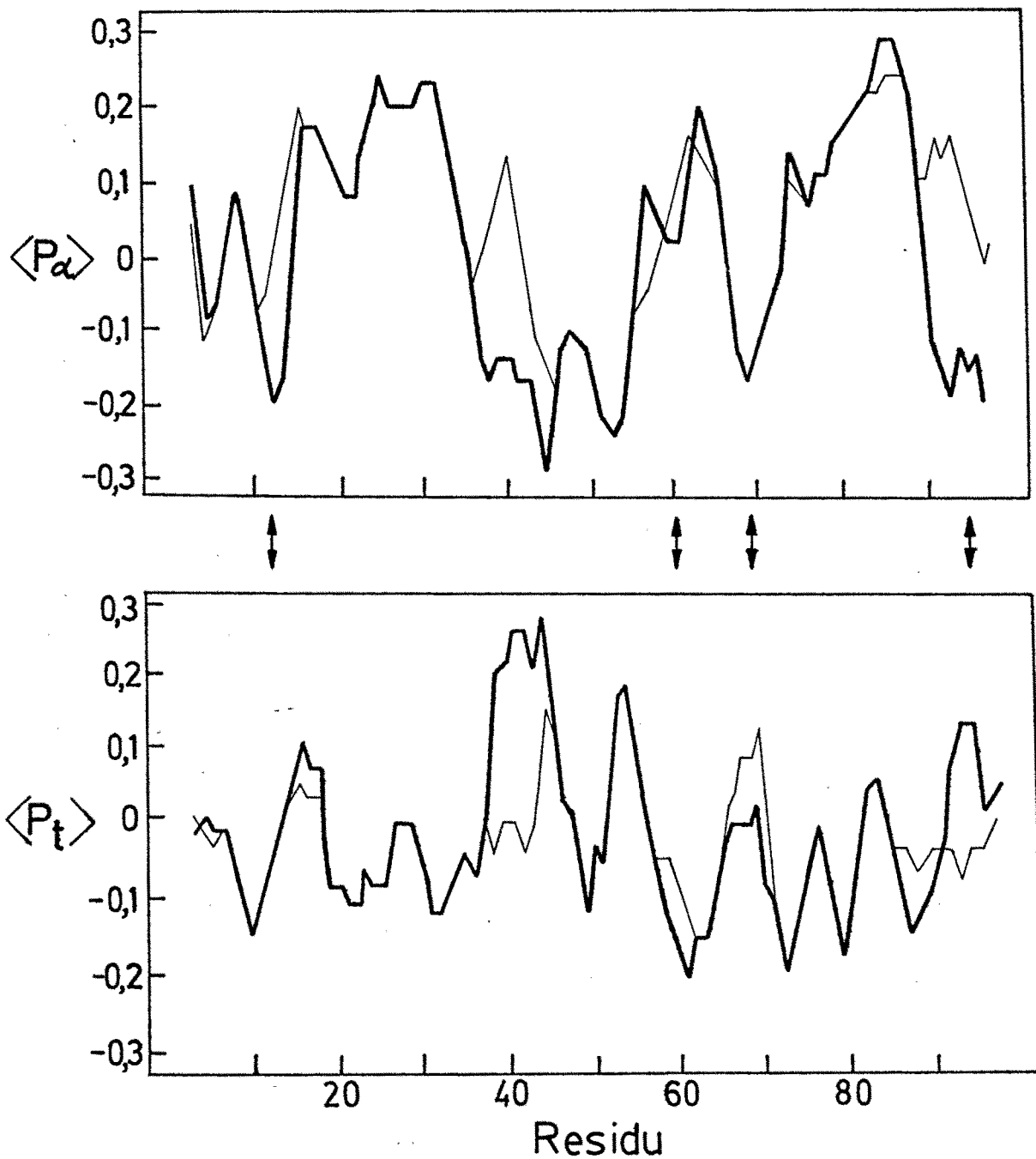


FIGURA III.42. Perfils de probabilitat de formació d'hèlix ( $P_\alpha$ ) i de gir  $\beta$  ( $P_\beta$ ), segons el mètode de Chou i Fasman, per als segments d'activació de porc (traç gruixut) i de rata (traç fi). El càlcul s'ha fet segons el mètode de Pongor i Szalay, utilitzant una finestra de 5 residus.

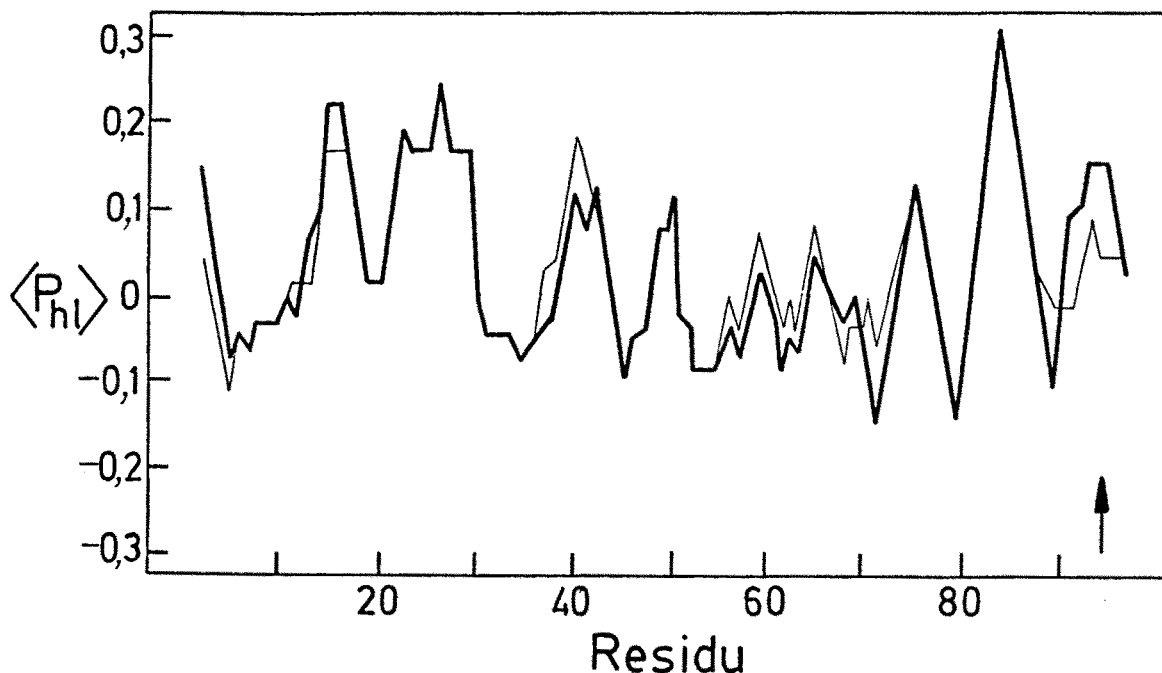


FIGURA III.43. Perfils de probabilitat de predicció de hidrofilitat segons els paràmetres de Hopp i Woods i calculats utilitzant el mètode de Pongor i Szalay. Traç gruixut, segment d'activació de porc; traç fi, el corresponent a rata.

les prediccions corresponents a la seqüència corresponent al segments de pàncreas de rata. Les prediccions han estat fetes a partir dels paràmetres de Chou i Fasman (1978 i 1979) i calculades i normalitzades mitjançant el mètode de Pongor i Szalay (1985). No es presenten prediccions d'estructura en fulla  $\beta$  donat que el percentatge d'aquesta en el saA, deduït per estudis de difracció circular (Avilés et al., 1982) és molt baix en front del corresponent a hèlix  $\alpha$ .

Es pot observar a la Figura que la coincidència en les prediccions d'estructura secundària és tant elevada com la que s'observa entre les estructures primàries, i que els màxims de predicció d'ambdues

estructures ocupen posicions virtualment idèntiques.

Per a quantificar el grau d'homologia conformacional, el programa de Pongor i Szalay (1985) permet el càlcul d'un coeficient de correlació (R) que és una mesura del grau d'identitat estructural entre dues seqüències. Els autors consideren que valors de  $R > 0,2$  són indicatius de presència de conformacions homòlogues. Entre les dues seqüències aquí presentades s'obtingueren uns coeficients de correlació de 0,73 per a l'hèlix i de 0,80 per als girs  $\beta$ , valors indicatius d'una elevada identitat estructural. A la mateixa figura s'indica amb sagetes la posició dels enllaços que sofreixen probablement hidròlisi durant el procés d'activació de la PCPA, aspecte discutit a l'apartat següent. Es pot veure que els dos trencaments més propers a l'extrem C-terminal estan situats en una zona amb baixa probabilitat de formació d'hèlix  $\alpha$  i amb probabilitat més o menys elevada de formació de girs  $\beta$ , exposats al solvent.

Aquestes darreres consideracions es poden complementar amb l'observació dels perfils d'hidrofilicitat presentats a la Figura III.43 i calculats segons els paràmetres de Hopp i Woods (1981) i utilitzant el mètode de Pongor i Szalay (1985). Les mateixes regions abans corresponents a girs  $\beta$ , corresponen ara a regions d'elevada hidrofilicitat, i per tant amb elevada probabilitat d'estar exposades al solvent i a l'atac proteolític.

#### III.4.8.b. ESTUDIS DE RESSONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Els treballs duts a terme amb espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear de protó permeteren deduir que el saA aïllat, en dissolució aquosa i a pH intermedi, presenta una conformació globular compacta que es manté al llarg d'un ample marge de condicions experimentals. Així, es va observar espectres característics de proteïnes amb estructura globular en el marge de pH entre 5,7 i 13,0, en el marge de concentracions de NaCl entre 20mM i 1M i fins a concentracions d'urea intermitges entre 2 i 4M (resultats no

presentats).

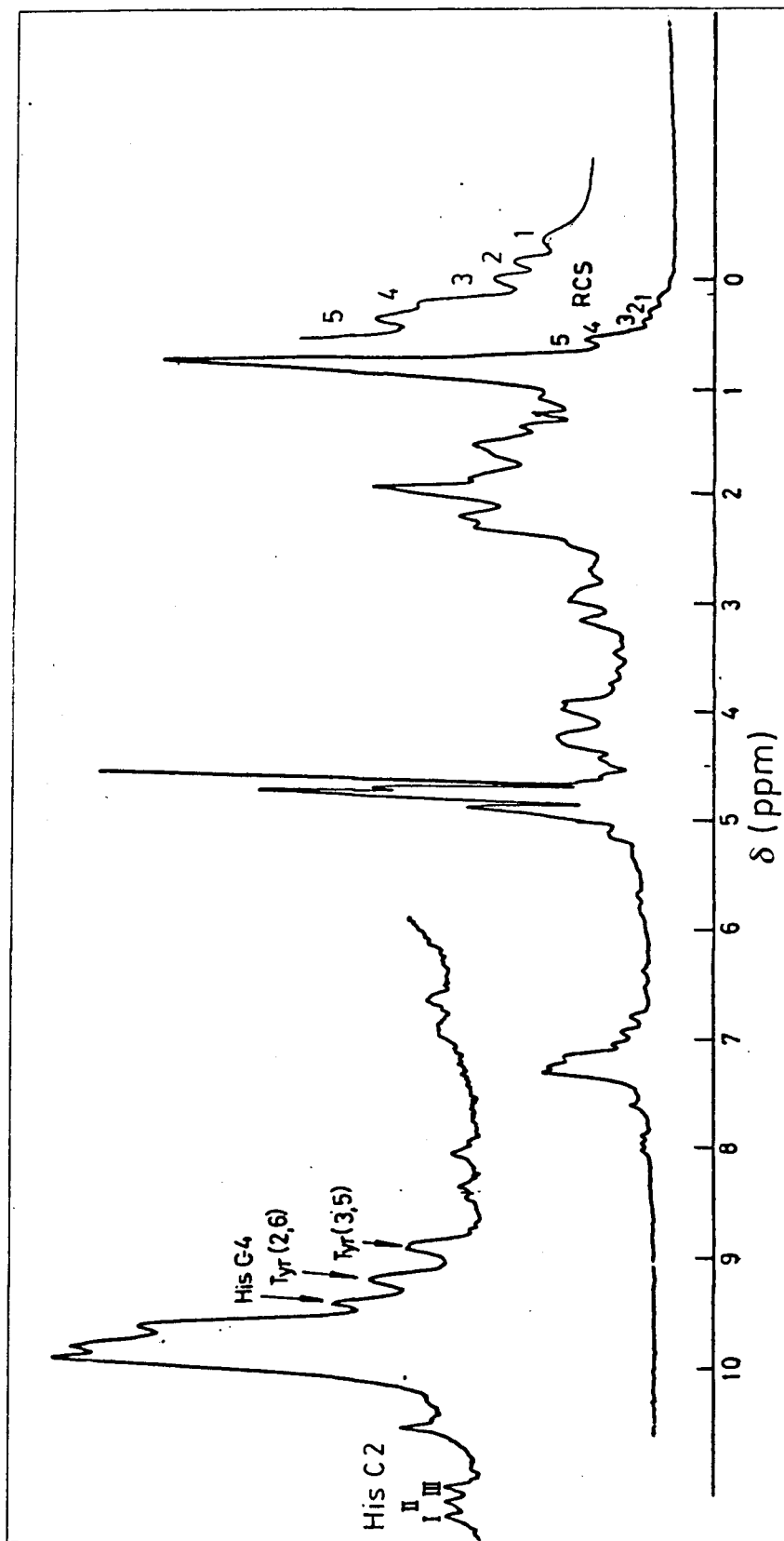
A la Figura III.44 es presenta un espectre de  $^1\text{H}$  NMR del segment d'activació, on s'observen les característiques d'estructura globular abans esmentades. Les ressonàncies a camps baixos dels protons C-2 de les tres histidines del segment presenten desplaçaments individuals, signe de diferents envolcallis proteics, així com ho fan els protons C-3,5 i C-2,6 de l'únic residu de tirosina present a la seqüència. Una altra sonda de plegament globular és la presència de ressonàncies desplaçades per corrents d'anell a camps elevats (0 - 1 ppm), degudes a la interacció de residus aromàtics amb grups alifàtics, probablement grups metil.

Els estudis de titració al llarg del pH permeten calcular el  $pK_a$  dels residus ionitzables i observar la presència d'interaccions entre residus de l'estructura. La Figura III.45 recull les corbes de titració dels residus His, Tyr, i d'algunes ressonàncies de desplaçaments per corrent d'anell. Les corbes de titració que es presenten no van poder ser resoltes per sota de pH 5,7 a causa de la manca de solubilitat de la proteïna en aquestes condicions. El  $pK_a$  aparent de cada residu es va calcular mitjançant l'ajust de les dades experimentals a corbes sigmoidals amb l'aplicació d'un programa d'anàlisi de regressió no lineal (Turner et al., 1983).

Els valors de  $pK_a$  per a les histidines I, II i III foren, respectivament 6,49, 6,43 i 6,40, mentre que el corresponent al protó C-4 detectat fou de 6,50. Aquesta similitud de valors i la semblança amb els que presenta una histidina es proteïnes en *random coil* (6,5) suggereixen que els microenvolcallis de les His són similars i que aquestes es troben a la superfície de la molècula, encara que altres dades relacionades amb la velocitat de deuteració de les His (resultats no presentats) semblen contradir les anteriors assumpcions.

L'únic residu tirosina del segment presenta un valor de  $pK_a$  molt elevat, de 11,8, que està d'acord amb l'obtingut per mètodes espectrofotomètrics (Vilanova, 1987). D'aquest valor se'n pot deduir que la tirosina està localitzada en una zona interna de la proteïna i que es troba unida a un altre residu per un pont d'hidrògen.

La major part de les ressonàncies de metil desplaçades per corrents



**FIGURA III.44.** Espectre de ressonància magnètica nuclear de  $^1\text{H}$  a 270 MHz del saA en  $^2\text{H}_2\text{O}$ , pH 6,5, 25° C i 5 mg/ml. Les zones corresponents a camps alts i baixos es presenten ampliadés. S'indica la posició de les ressonàncies de protons pertanyents a His, Tyr i carbonis així com la de les ressonàncies desplaçades per corrents d'anell (RCS).

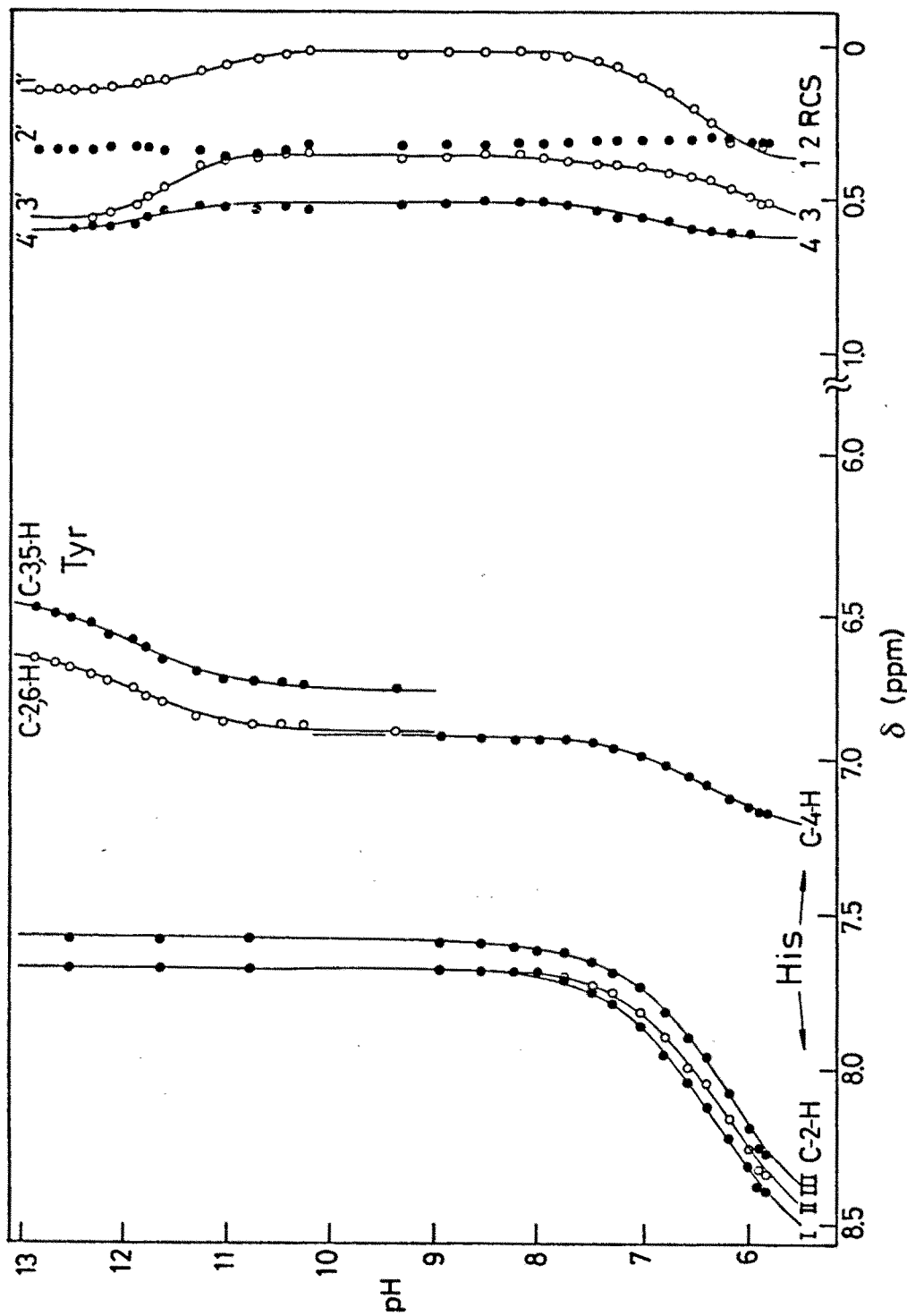


FIGURA III.45 Titració al llarg del pH de diverses ressonàncies de protó del saA, seguida a 270 MHz, en  $^2\text{H}_2\text{O}$ , a  $25^\circ\text{C}$  i a 5 mg/ml. La nomenclatura es correspon amb la utilitzada a la

Figura III.44.

d'anell entre 0 i 0,6 ppm presenten una dependència del pH en la seva posició espectral. Algunes d'aquestes ressonàncies presenten una titració doble sigmoïdal relacionada a la vegada amb les titracions de les histidines i de la tirosina. Les petites diferències observades en els  $pK_a$  impideixen l'assignació més concreta de ressonàncies.

Les característiques esmentades en aquest apartat recolcen la idea que el segment d'activació posseeix una conformació globular en estat aïllat, el que vindria a coincidir amb anàlisis prèvies (Avilés et al., 1982). En ser una molècula petita desproveïda de ponts disulfur, és d'esperar que posseeixi un grau important de moviment de cadena lateral, que és el mateix que dir un grau elevat de fluctuació conformacional, característica comú a proteïnes globulars petites desprovistes de ponts disulfur i amb un elevat contingut en hèlix  $\alpha$ .

#### III.4.9. APÈNDIX: PROGRAMA DE CàLCUL I LOCALITZACIÓ DE LES DADES D'ANÀLISI D'AMINOÀCIDS

Es presenten en aquest apartat uns exemples de les prestacions del programa de càlcul dels valors d'anàlisi d'aminoàcids que ha estat comentat a II.6.7. A la Figura III.46 es poden veure els resultats de l'aplicació del programa a un pèptid triptíc (T-1) i a un pèptid pepsínic (P-7).

Cal entrar en primer lloc les dades corresponents a les àrees dels aminoàcids patró i a les àrees dels de la mostra problema. A continuació, i a partir d'una suposició de les possibles longituds dels pèptids triades per l'usuari (tantes com es vulgui), el programa en calcula la composició en percentatge i en nombre de residus (primer llistat).

A continuació cal escollir entre les llargades temptatives aquella que doni els resultats considerats com més adients i entrar aquesta dada com a pes molecular temptatiu de la proteïna-pèptid (aquesta operació també es pot repetir tantes vegades com es vulgui). Coneixent, a més, la fracció de mostra total entrada a l'autoanalitzador-HPLC, en aquest segon estadi (segon llistat), el programa calcula el total de nanomols i



PROTEINA: T-1					PROTEINA: P-7				
RESIDU	PERCENTATGE	nMOLS	BASE 9	BASE 11	RESIDU	PERCENTATGE	nMOLS	BASE 7	BASE 9
ASP	14.5001	0.4295	1.4850	1.8150	ASP	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
GLU	26.3525	1.0038	2.3717	2.8988	GLU	13.1860	1.7114	1.0430	1.3467
SER	10.5571	0.4021	0.9501	1.1613	SER	13.6251	1.5355	0.9538	1.2263
THR	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	THR	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
GLY	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	GLY	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
ALA	9.5148	0.3624	0.8543	1.0448	ALA	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PRO	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	PRO	20.6067	2.3222	1.4425	1.8544
VAL	17.3357	0.4404	1.5402	1.9049	VAL	21.0304	2.3700	1.4721	1.8927
ARG	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	ARG	10.4272	1.1751	0.7299	0.9384
MET	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	MET	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
ILE	9.5504	0.3630	0.8578	1.0484	ILE	9.0473	1.0194	0.6333	0.8143
LEU	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	LEU	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
TRP	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	TRP	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PHE	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	PHE	10.0773	1.1354	0.7054	0.9070
CIS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	CIS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
LYS	10.2092	0.3889	0.9188	1.1230	LYS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
HIS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	HIS	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
TYR	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	TYR	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

PROTEINA: T-1					PROTEINA: P-7				
RESIDU	nMOLS	nGRAMS	N. AA	N. SENCER	RESIDU	nMOLS	nGRAMS	N. AA	N. SENCER
ASP	0.43	71.65	1.88	2.00	ASP	0.00	0.00	0.00	0.00
GLU	1.00	128.49	3.01	3.00	GLU	1.71	219.05	1.34	1.00
SER	0.40	54.99	1.20	1.00	SER	1.54	133.39	1.20	1.00
THR	0.00	0.00	0.00	0.00	THR	0.00	0.00	0.00	0.00
GLY	0.00	0.00	0.00	0.00	GLY	0.00	0.00	0.00	0.00
ALA	0.36	25.73	1.09	1.00	ALA	0.00	0.00	0.00	0.00
PRO	0.00	0.00	0.00	0.00	PRO	2.32	225.26	1.82	2.00
VAL	0.44	65.38	1.78	2.00	VAL	2.37	234.83	1.85	2.00
ARG	0.00	0.00	0.00	0.00	ARG	1.18	184.49	0.92	1.00
MET	0.00	0.00	0.00	0.00	MET	0.00	0.00	0.00	0.00
ILE	0.36	41.02	1.09	1.00	ILE	1.02	115.21	0.80	1.00
LEU	0.00	0.00	0.00	0.00	LEU	0.00	0.00	0.00	0.00
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	TRP	0.00	0.00	0.00	0.00
PHE	0.00	0.00	0.00	0.00	PHE	1.14	144.94	0.89	1.00
CIS	0.00	0.00	0.00	0.00	CIS	0.00	0.00	0.00	0.00
LYS	0.39	50.17	1.14	1.00	LYS	0.00	0.00	0.00	0.00
HIS	0.00	0.00	0.00	0.00	HIS	0.00	0.00	0.00	0.00
TYR	0.00	0.00	0.00	0.00	TYR	0.00	0.00	0.00	0.00

nMOLS DE PROTEINA: 0.333943573      UGRAMS TOTALS: 0.417429464      nMOLS DE PROTEINA: 1.27916789      UGRAMS TOTALS: 1.27916789

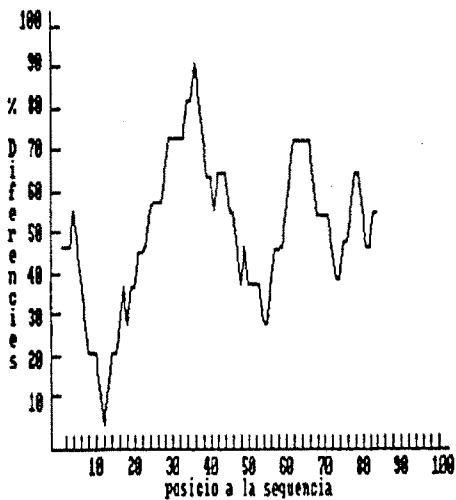
FRACCIÓ DE MOSTRA ENTRADA RESPECTE AL TOTAL: 80      FRACCIÓ DE MOSTRA ENTRADA RESPECTE AL TOTAL: 20  
nMOLS TOTALS A LA MOSTRA ORIGINAL: 26.7154858      nMOLS TOTALS A LA MOSTRA ORIGINAL: 25.5833578  
UGRAMS TOTALS A LA MOSTRA ORIGINAL: 33.3943573      UGRAMS TOTALS A LA MOSTRA ORIGINAL: 25.5833578

¿1 DE MOSTRA ORIGINAL SECATS O LIOFILIZATS PER HIDROLITZAR: 0      ¿1 DE MOSTRA ORIGINAL SECATS O LIOFILIZATS PER HIDROLITZAR: 0  
ABSORBANCIA DE LA MOSTRA ORIGINAL: 0      ABSORBANCIA DE LA MOSTRA ORIGINAL: 0  
COEFICIENT D'EXTINCIO ESTIMAT (10 mg/ml): 0      COEFICIENT D'EXTINCIO ESTIMAT (10 mg/ml): 0

NOMBRE TOTAL DE RESIDUS: 11      NOMBRE TOTAL DE RESIDUS: 9

SENCERA TOTAL KEDFYGVHEVLRISVDDAEVKKVELEDLEHLELDFWRGPARPGFPIDVRYVFPSPSIEAVKVFLE  
ANGIRYTIMEDVVELLDEEEEFVFASEAR

PEPTID: T-1 11 RESIDUS



PEPTID: P-7 9 RESIDUS

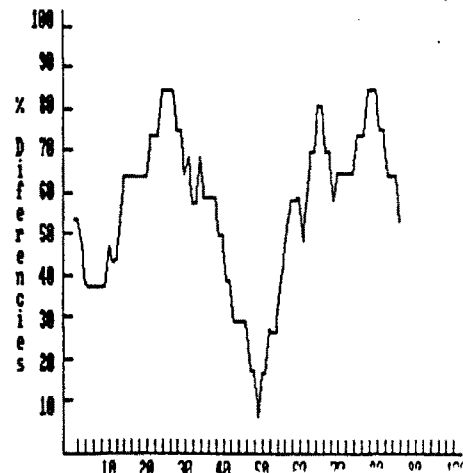


FIGURA III.46. Exemples d'utilització del programa de càlcul i localització de dades d'anàlisi d'aminoàcids

micrograms analitzats, la quantitat de mostra total de què es disposa i, cas de conèixer l'absorbància d'aquesta, el seu coeficient d'extinció a 10 mg/ml.

En un tercer estadi, cas de voler comparar la composició recentment analitzada amb la seqüència d'una proteïna homòloga, el programa compara, residu a residu i començant pel N-terminal, la composició del pèptid amb la llargada estimada per l'usuari amb un fragment de la seqüència coneguda del mateix nombre de residus, calculant, en cada pas, el percentatge de diferències. Aquest càlcul es pot expressar en una taula o en una gràfica (veure la part inferior de la figura), on el mínim representarà la zona de major probabilitat de situació de l'extrem N-terminal del pèptid problema.

Els exemples presentats donen com a posicions de mínima diferència la 12 pel pèptid T-1, que ocupa, efectivament, la posició 12-22; pel pèptid P-7 dona la posició 49, correcte, al ocupar la zona 49-57.

