

FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

ESTUDI DE L'ACCIÓ D'UNA PROTEASA DE LEUCÒCITS
POLIMORFONUCLEARS SOBRE LA FOSFORILASA b QUINASA

Memòria presentada per a optar
al grau de llicenciada
en Farmàcia per
Anna M. Bassols Teixidó
sota la direcció de la
Dra. Roser Cussó Fresquet
Barcelona, juny de 1981

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701740851

A la meva família

A Joaquín

Aquest treball s'ha pogut portar a terme gràcies a la col.laboració de moltes persones, i, encara que no sigui possible, no voldria oblidar-me de ningú.

En primer lloc, voldria testimoniar la meua gratitud a la Dra. Roser Cussó, directora i amiga, per tots els moments compartits durant aquest any, coneixements que m'ha donat i ànims en tot moment.

Agraeixo també al Dr. Fausto García-Hegardt, catedràtic del Departament de Bioquímica, haver pogut relitzar aquest treball, i, juntament amb el Dr. J.J. Guinovart i el Dr. Joan Aguilar, la comprensió i els consells que m'han donat.

I, sobretot, voldria agrair a tots els companys i amics del laboratori, amb els que he compartit les vicissituds d'un any de treball: en Ferran Pegueroles, Manolo Pena, Carmen Ribas, Angels Mor, Jordi Vila, Carles Ciudad, Abel Fernandez, i tots els demés.

No voldria oblidar a tots aquells que, en un moment donat, han col.laborat en la realització d'aquest treball d'una manera o altra. Entre ells voldria destacar al personal de l'Escorxador Municipal per la seva simpatia, a Estanis Navarro i Pilar Benedicto de la Universitat Autònoma, a en Kim Ros pels seus consells amb els gradients, a l'Ana Lloret de la Càtedra de Microbiologia i a César Blanché per l'ajuda en la correcció de l'idioma.

Molt especialment vull donar les gràcies al meus germans: Mònica, Josep M. i Gerard, perquè sense la seva ajuda no estaria imprès aquest treball.

I a Joaquín Ariño, que en tot moment ha sigut un estímul i un ajut en tots els aspectes.

ABREVIATURES UTILITZADES EN AQUEST TREBALL.

AMP	Adenosin-5'-monofosfat
AMP cíclic	Adenosin-3',5'-monofosfat cíclic
ATP	Adenosin-trifosfat
cpm	Comptes per minut
DCPIP	Diclorofenolindofenol
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
DIPF	Diisopropilfluorofosfat
EDTA	Etilendiaminotetracetat
EGTA	Etilenglicol-bis-(β -aminoetil eter)-N,N' tetracetat
GS	Glicogen sintasa
K _m	Constant de Michaelis
M, mM, μ M	Molar, milimolar, micromolar
PhK	Fosforilasa <u>b</u> quinasa
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorur
PPO	2,5-difeniloxazol
SDS	Dodecilsulfat sòdic
STI	Inhibidor de llavos de soja per a la tripsina
TLCK	Tosil-lisil-clorometilcetona
TPCK	Tosil-fenil-clorometilcetona
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetà
U	Unitats d'activitat enzimàtica

PRESENTACIÓ DEL TREBALL.

L'estudi del metabolisme del glicogen en leucòcits polimorfonuclears de porc i humans ha estat portat a terme des de fa temps en el nostre laboratori.

Prèviament a la iniciació d'aquest treball, s'havien obtingut dades que demostraven que els leucòcits polimorfonuclears humans, al contrari que la majoria dels teixits estudiats incluint els limfòcits humans i de porc i els leucòcits de porc, eren incapaces de portar a terme la transformació de glicogen sintasa forma D a la forma I, reacció catalitzada per la glicogen sintasa fosfatasa.

Quan es va aconseguir la purificació de la glicogen sintasa de leucòcits polimorfonuclears humans frescos, va quedar clar que havia d'existir algun inhibidor que afectés a aquesta transformació i que podia actuar sobre la glicogen sintasa fosfatasa o directament sobre la glicogen sintasa.

L'inhibidor es va identificar finalment com una proteasa, activa a pH neutre i present en el sediment de 27000 xg dels leucocits polimorfonuclears.

Aquesta proteasa, la total purificació de la qual s'està estudiant actualment en el nostre laboratori, degrada

i simultàniament inactiva a la glicogen sintasa forma I. Aquesta acció explica el perquè no es trobava activitat glicogen sintasa I en homogenats de polimorfonuclears humans.

Posteriors estudis portats a terme amb la proteasa semipurificada van mostrar que posseïa també activitat sobre la fosforilasa b quinasa, i, que en aquest cas ocasionava un increment de l'activitat de l'enzim.

Així, doncs, aquest treball està enquadrat en l'estudi d'una proteasa neutra aïllada de polimorfonuclears humans i de porc amb activitat sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa b quinasa.

Els objectius d'aquest treball són dos:

- La caracterització de l'efecte d'activació de la fosforilasa b quinasa incluint l'observació de les conseqüències estructurals de l'acció de la proteasa sobre la molècula de fosforilasa b quinasa.

- La localització subcel·lular de l'enzim: el sediment de 27000xg inclou mitocondries i diferents tipus de grànuls semblants als lisosomes. Malgrat el fet de que moltes proteases es troben dintre dels lisosomes, hi ha abundants exemples de proteases de localització mitocondrial, nuclear, citoplasmàtica, etc. Per aquesta raó hem desenvolupat la tècnica de fraccionament subcel·lular mitjançant gradients de densitat i posterior localització en ells de l'activitat proteasa.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Visió general del metabolisme del glicogen	1
1.1.1. Glicogen sintasa	3
1.1.1.1. Estructura i propietats	3
1.1.1.2. Proteòlisi	3
1.1.2. Fosforilasa <u>b</u> quinasa	4
1.1.2.1. Estructura	5
1.1.2.2. Formes de regulació	6
1.1.3. Metabolisme del glicogen en leucòcits	10
1.2. Degradació de proteïnes. Proteases	13
1.2.1. Degradació de proteïnes	13
1.2.1.1. Significat de la degradació	14
1.2.1.2. Selectivitat de la degradació	15
1.2.1.3. Regulació de la degradació	19
1.2.2. Degradació lisosomal i no lisosomal	22
1.2.2.1. Lisosomes	22
1.2.2.2. Degradació específica de proteïnes	25
1.2.3. Proteases. Classificació	27
1.2.4. Proteases de leucòcits	29
1.2.4.1. Col.lagenasa	30
1.2.4.2. Gelatinasa	34
1.2.4.3. Elastasa	36

1.2.4.4.	Catepsina G	39
1.2.4.5.	Catepsina D	40
1.2.4.6.	Inhibidors citoplasmàtics de les proteases neutres de leucòcits	42
1.2.4.7.	Degradació del col.lagen per les proteases neutres de leucòcits	44
1.2.4.8.	Paper fisiològic	44
1.2.5.	Inhibidors proteics de proteases	47
1.3.	Separació subcel.lular	51
1.3.1.	Fraccionament subcel.lular mitjançant centrifugació	51
1.3.1.1.	Centrifugació diferencial	52
1.3.1.2.	Centrifugació zonal	53
1.3.1.3.	Centrifugació isopícnica	53
1.3.1.4.	Densitat de les partícules en un medi de gradient de densitat	55
1.3.1.5.	Artefactes	57
1.3.1.6.	Soluts per a gradients de densitat	58
1.3.1.7.	El Ludox com a medi de gradient	59
1.3.1.8.	Aplicacions de la centrifugació en gradient de densitat	62
1.3.2.	Subfraccionament de leucòcits polimorfonuclears	64

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. Reactius utilitzats	70
2.2. Separació de leucòcits polimorfonuclears	71
2.2.1. Fonts d'obtenció	71
2.2.2. Separació dels polimorfonuclears	72
2.2.3. Obtenció del sediment de 27000xg	73
2.2.4. Tècniques hematològiques	74
2.3. Mètodes de purificació d'enzims	75
2.3.1. Glicogen sintasa	75
2.3.2. Fosforilasa <u>b</u>	78
2.3.3. Fosforilasa <u>b</u> quinasa	81
2.3.4. α -amilasa	83
2.3.5. Proteasa	85
2.4. Determinació d'activitats enzimàtiques	88
2.4.1. Glicogen sintasa	88
2.4.2. Glicogen fosforilasa <u>b</u>	89
2.4.3. Fosforilasa <u>b</u> quinasa	90
2.4.4. Proteasa	93
2.4.5. Fosfatasa àcida	94
2.4.6. β -glucuronidasa	95
2.4.7. Succinat deshidrogenasa	97
2.4.8. Glutamat deshidrogenasa	98
2.4.9. Peroxidasa	99
2.4.10. Lisozima	100
2.4.11. Fosfatasa alcalina	101
2.4.12. Protein-quinasa	102

2.5. Gradients de densitat	103
2.5.1. Diàlisi del Ludox	103
2.5.2. Gradients de Ludox-PVP+sacarosa	104
2.5.3. Gradients de Ludox-PVP-NaCl	104
2.5.4. Obtenció de fraccions	105
2.5.5. Determinació de la densitat de les fraccions	106
2.5.6. Modificacions dels assaigs enzimàtics	107
2.6. Altres mètodes	109
2.6.1. Determinació de proteïna	109
2.6.2. Preparació de fosforilasa β lliure d'AMP	110
2.6.3. Gels de poliacrilamida	111
3. RESULTATS	
3.1. Estudi de la latència de la proteasa	113
3.2. Estudi d'un inhibidor citoplasmàtic de la proteasa neutra	119
3.3. Estudi de les activitats fosfatasa àcida, β -glucuronidasa, succinat dehidrogenasa i proteasa de les diferents fases de separació dels polimorfonuclears	124
3.4. Activació de la fosforilasa β quinasa per acció de la proteasa. Caracterització de l'efecte	127

3.4.1. Acció de la proteasa sobre la fosforilasa <u>b</u> quinasa	127
3.4.2. Estudi sobre l'efecte de diferents concentracions de proteasa	140
3.4.3. Efecte de possibles inhibidors	143
3.4.4. Inhibició per STI	147
3.4.5. Estudi de la influència del calci	150
3.4.6. Corba de pH	153
3.4.7. Gels de poliacrilamida	155
3.5. Formació de gradients de Ludox-PVP	158
3.5.1. Estudi sobre la influència de la PVP	158
3.5.2. Influència del tipus de centrífuga	159
3.5.3. Efecte de la velocitat i temps de centrifugació	161
3.5.4. Efecte de la densitat inicial en gradients de Ludox-PVP-sacarosa	165
3.5.5. Efecte de la densitat inicial en gradients de Ludox-PVP-NaCl	167
3.5.6. Prova de distorsió del gradient	167
3.5.7. Efecte de la resuspensió de la mostra	171
3.5.8. Comparació de la separació de la sílica per centrifugació o filtració	172
3.5.9. Problema de la formació d'agregats	177
3.6. Fraccionament subcel.lular de polimorfonuclears mitjançant gradients de densitat	180

3.6.1. Efecte de la densitat inicial en el bandejament de lisosomes i mitocòndries en gradients de Ludox-FVP-sacarosa	180
3.6.2. Comparació entre els gradients de Ludox-FVP-sacarosa i Ludox-FVP-NaCl	182
3.6.3. Efecte del medi sobre la glicogen sintasa i la proteasa	184
3.6.4. Efecte de la densitat inicial en el bandejament de lisosomes i mitocòndries en gradients de Ludox-FVP-NaCl	184
3.6.5. Distribució subcel·lular dels polimorfonuclears en gradients de Ludox-FVP-NaCl	186
4. DISCUSSIÓ	191
5. CONCLUSIONS	209
6. BIBLIOGRAFIA	213

1. INTRODUCCIÓ

1.1. VISIÓ GENERAL DEL METABOLISME DEL GLICOGEN.

El glicogen és un polímer format per cadenes ramificades d'unitats glicosíliques unides entre elles per un enllaç de tipus α -(1,4), excepte en els punts de ramificació en els quals la unió és de tipus α -(1,6). El glicogen constitueix el dipòsit en que s'emmagatzemen les molècules de glucosa per ésser alliberades quan sigui necessari.

El glicogen es troba localitzat predominantment en el citoplasma de les cèl.lules de la majoria dels teixits dels mamífers, de manera que el múscul i el fetge són els òrgans més importants des del punt de vista quantitatiu.

El glicogen emmagatzemat en el múscul constitueix una reserva de glucosa d'utilització pròpia, mentre que el fetge actua com a administrador de la reserva de glucosa per l'organisme. Es presenta associat fortament amb proteïnes, i, en especial, amb aquelles relacionades amb el seu metabolisme.

Els responsables de la síntesi i degradació del glicogen són, respectivament, la glicogen sintasa i la glicogen fosforilasa. La via de síntesi acceptada parteix de la glucosa, la qual passa a glucosa-6-P, i aquesta a glucosa-1-P. El donador de grups glicosil és la uridindifosfoglucosa (UDPG), formada per acció de la UDPG-pirofosforilasa sobre la glucosa-1-P i l'uridin-trifosfat (UTP).

El procés degradatiu es basa en la separació d'unitats de glucosa-1-P a partir del glicogen en la reacció que catalitza la glicogen fosforilasa. La glucosa-1-P es transforma en glucosa-6-P, la qual pot entrar en la via glucolítica i alliberar energia, o bé, en el cas del fetge, ésser hidrolit-

zada per la glucosa-6-fosfatasa, formant-se glucosa, que sortirà a la sang i serà repartida per tot l'organisme.

La glicogen sintasa i la glicogen fosforilasa són enzims regulables per canvis en el seu grau de fosforilació, o sigui, en el contingut de fosfat unit covalentment a la molècula.

La glicogen sintasa és fisiològicament activa quan no està fosforilada (forma I), mentres que la forma fosforilada (forma D) necessita per a la seva activitat la presència de glucosa-6-P.

La reacció de fosforilació de la glicògen sintasa és catalitzada per diverses protein-quinases, que catalitzen la tranferència del fosfat gamma de l'ATP a una gran varietat de proteïnes, entre elles, la glicogen sintasa.

En el cas de la glicogen fosforilasa, la forma activa és la fosforilada (forma a), mentres que la forma b, defosforilada, és activa només en presència d'AMP. Aquesta diferència permet que quan el procés de síntesi estigui activat, no ho estarà el de degradació i viceversa.

La interconversió de la glicogen fosforilasa està controlada per dos enzims: la fosforilasa b quinasa, que catalitza la conversió de la forma b en a, i la fosforilasa fosfatasa, que transforma la forma a en b.

La fosforilasa b quinasa, enzim que activa a la fosforilasa b per fosforilació es troba en múscul i teixit adipós en una forma d'alta activitat a pH 6,8 i una altra no activa a aquest pH.

L'activació de la fosforilasa b quinasa es realitza mitjançant un mecanisme en el qual intervé una protein-quinasa dependent d'AMP cíclic, enzim idèntic a una de les quinases que catalitzen la fosforilació de la glicogen sintasa.

La fosforilasa b quinasa fosfatasa és l'enzim que defosforila i inactiva a la fosforilasa b quinasa. Aquest enzim és la mateixa proteïna que la glicogen sintasa fosfatasa.

1.1.1. GLICOGEN SINTASA.

La glicogen sintasa catalitza la formació d'enllaços glicosílics entre els extrems de les branques de la molècula de glicogen i les unitats glicosíliques activades en forma de UDP-glucosa.

La reacció catalitzada per la glicogen sintasa constitueix la clau del control de la biosíntesi del glicogen.

1.1.1.1. ESTRUCTURA I PROPIETATS.

L'enzim ha estat purificat a homogeneïtat a partir de diversos teixits (1). El pes molecular calculat per a la subunitat de glicogen sintasa en diferents teixits està entre 77000 i 100000, segons tècniques d'electroforèsi en gel en presència de SDS (2). L'enzim està constituït per l'agregació d'un cert nombre de subunitats que varia segons el teixit (2). El significat exacte d'aquestes diferències en l'estat d'agregació no es coneixen. El nombre de fosfats incorporats varia segons la quinasa que catalitzi la reacció.

1.1.1.2. PROTEÒLISI LIMITADA.

El tractament limitat de la glicogen sintasa de múscul amb tripsina descrit per diversos grups de treball (3,4,5) demostren que la subunitat nativa de glicogen sintasa que posseeix un pes molecular de 85000 D és degradada per la tripsina a dues espècies més petites de 75000 D i 68000 D. Aquest trencament proteolític de la glicogen sintasa produeix una disminució en la relació $-G6P/+G6P$, ja que incrementa

en 10 vegades el valor de la $S_{0,5}$ per a la UDP-glucosa.

Qualitativament, l'acció limitada de la tripsina imita la fosforilació covalent de la glicogen sintasa, no només en el canvi en el percentatge de forma I, sinó també en les modificacions cinètiques que tenen lloc en el procés. Aquesta observació indica que el segment de la molècula accessible a la proteòlisi té un important paper en la regulació de l'activitat de l'enzim (6).

Segons Takeda i col. (7), la seqüència NH_2 -terminal és la mateixa en la subunitat de 75000 D que en la subunitat original. Això suggereix que la degradació portada a terme per la tripsina té lloc aprop de l'extrem $COOH$ -terminal de l'enzim, sense que s'alteri l'extrem NH_2 -terminal.

Aquests mateixos autors van observar que el tractament d'una preparació de glicògen sintasa D que contenia 3,2 fosfats/subunitat amb tripsina, produïa un fragment de 75000 D amb una activitat glicogen sintasa I molt baixa, i que només contenia 2 fosfats. D'això es dedueix que les dues formes de la glicògen sintasa poseeixen un nucli resistent a la tripsina, el qual conté diversos centres fosforilables.

1.1.2. FOSFORILASA b QUINASA.

La fosforilasa b quinasa és l'enzim que catalitza la fosforilació de la fosforilasa b per passar a fosforilasa a. És regulada a la seva vegada de manera complexa, la qual cosa la converteix en un dels enzims més intensament estudiats de la cadena de reaccions que condueixen a la degradació del glicògen.

1.1.2.1. ESTRUCTURA.

L'enzim està compost per diverses subunitats: α , α' , β i γ . D'elles, segons apareixen en gels de poliacrilamida en presència de SDS, la banda α' està clarament en una proporció més petita que les altres. A la banda α' se li va atribuir un origen proteolític, però posteriors estudis van demostrar que això no era cert i que en realitat provenia de diferent tipus de múscul que la banda α (8,9).

Més recentment, Cohen i col. (10), utilitzant gels de poliacrilamida al 10% en presència de SDS, van aconseguir detectar una nova banda corresponent a la subunitat δ , idèntica a la calmodulina, i que és la responsable de l'afinitat de l'enzim per el calci.

El pes molecular de l'enzim, determinat mitjançant tècniques d'equilibri de sedimentació a alta velocitat, és, aproximadament, de $1,3 \times 10^6$ D. Les subunitats tenen un pesos moleculars de: $\alpha = 145000$, $\alpha' = 140000$, $\beta = 128000$ i $\gamma = 41000$.

La relació molar entre les diverses subunitats, determinada per densitometria en gels de poliacrilamida, és de: $\alpha : \alpha' : \beta : \gamma$ de 1:1:1. Experiments posteriors duts a terme amb la subunitat δ demostren que aquesta està present en la mateixa proporció que les demés, encara que estudis més recents suggereixen que l'enzim pot associar-se a una altra molècula de δ , a més de la que forma part de l'enzim (11).

En base a tot això, es pot afirmar que la fosforilasa b quinasa és un hexadecàmer compost per quatre tipus de subunitats que difereixen en diverses característiques, entre elles el pes molecular. És a dir, l'estructura de l'enzim vé representada per $(\alpha \beta \gamma \delta)_4$ i té un pes molecular de $1,3 \times 10^6$.

Les subunitats α i β manifesten un comportament diferent al de la subunitat γ , especialment en tres característiques importants:

- a) la composició en aminoàcids.
- b) la resistència a la proteòlisi per tripsina.
- c) la fosforilació per protein-quinases dependents de AMP cíclic.

a) La subunitat γ conté una major proporció de tirosina, fenilalanina, lisina i arginina, mentre que conté un nombre més petit de residus de leucina i serina.

b) Es comentarà més endavant.

c) En condicions fisiològiques i sota l'acció de la protein-quinasa dependent d'AMP cíclic, la fosforilasa quinasa és fosforilada en les seves subunitats α i β . En primer lloc i a gran velocitat es fosforila β , mentre que α es fosforila molt més lentament. Transcorregut un cert temps, ambdues subunitats arriben a un grau de fosforilació màxim, que correspon a un mol defosfat per cada mol d' α i de β .

La subunitat γ no és fosforilada (12).

1.1.2.2. FORMES D'ACTIVACIÓ.

La fosforilasa b quinasa de múscul esquelètic de mamífer existeix en dues formes: Una forma activa, amb una K_m per a la fosforilasa molt baixa, i que mostra activitat en un àmpli interval de pH (6,8-8,6), i una forma inactiva, amb una K_m per a la fosforilasa molt elevada i que només és activa a pH 8,6.

L'enzim pot ésser activat de diverses formes:

- A) Per proteòlisi limitada.

B) Per fosforilació.

C) Per calci.

A) Activació per proteòlisi limitada:

Està descrita l'activació de la fosforilasa b quinasa per tripsina i per una proteasa dependent de calci.

- Per tripsina:

La incubació de la fosforilasa b quinasa amb tripsina a concentracions de 2 μ g/ml, incrementava l'activitat a pH 6,8 unes 100 vegades en 5 minuts, paral·lelament a la desaparició de les bandes corresponents a les subunitats α i β . En el primer minut, en el qual la subunitat α desapareixia, s'arribava a una activació de quasi el 80% de la total, mentre que el 100% d'activació s'aconseguia quan començava a desaparèixer la subunitat β .

Posteriorment, l'activitat decreixia. Com que l'activitat es mantenia àdhuc quan havien desaparegut les subunitats α i β , aquest fet suggeria que la subunitat γ , que no resulta afectada per la tripsina, pot ésser la subunitat catalítica.

-Per una proteasa dependent de calci:

A l'any 1964, Meyer i col. (13) van demostrar que l'activació de la fosforilasa quinasa de múscul esquelètic de conill per preincubació amb Ca^{2+} requeria un factor proteic, que normalment era eliminat durant la purificació de la fosforilasa b quinasa. Aquest factor activant de la quinasa va ésser anomenat KAF.

Els primers intents per a demostrar que es tractava d'un enzim proteolític van resultar negatius, fins que Huston i col. (14) van demostrar que posseïa activitat proteolítica. Els primers intents havien fallat degut a la gran

inestabilitat de KAF en presència de calci, el qual feia que s'autoinactivés. Aquests autors van arribar a purificar el factor quasi a homogeneïtat i van demostrar que era actiu sobre caseïna i albúmina, mentres que mostrava poca activitat sobre fosforilasa a i b, hemoglobina i fosvitina.

Drummond i Duncan (15) van observar un factor similar en extractes de múscul cardíac. A més, van descriure en el sobrenedant un inhibidor que podia evitar l'activació de la fosforilasa b quinasa.

A l'any 1976, Dayton i col. van purificar una proteasa activable per calci a partir de múscul esquelètic de porc: van anomenar a aquest factor activable per calci, CAF.

Aquest factor era capaç de degradar alguns dels components de l'aparell contràctil del múscul. Prèviament ja s'havia descrit que una fracció proteïca activable per calci aïllada de múscul esquelètic de conill era capaç de degradar els discs Z de les miofibrilles "in vivo".

Els procediments utilitzats per Dayton per a purificar aquest factor i les propietats químiques i físiques de KAF i CAF suggerien que ambdós factors eren idèntics.

El factor CAF (16) degrada proteïnes musculars com la troponina T i la I, la tropomiosina i la proteïna C, però no hidrolitza a l'actina, la miosina, l' α -actinina o la troponina C.

CAF és òptimament actiu a pH 7,5 en presència de 1 mM de calci, sobre els discs Z del múscul. És inhibit per iodoacetat, però no per l'inhibidor de soja de la tripsina.

En quant a l'estructura, consta de dues cadenes polipeptídiques de P.m.= 80000 i 30000, respectivament.

Aquest factor pot tenir un paper fisiològic en la desorganització de les miofibrilles durant el seu "turnover"

metabòlic. Hi han evidències de l'existència d'una proteasa similar en cervell, plaquetes i úter i es possible que es trobi àmpliament distribuït per els teixits.

Més endavant, Waxman i Krebs (17) van descriure dues activitats inhibidores de proteases, aïllades de múscul cardíac de bou. Una d'elles era específica per a la proteasa dependent de calci i l'altra era capaç d'inhibir a la tripsina i quimotripsina, però no a altres serin-proteases, com la plasmina, la trombina i la subtilisina

El primer d'aquests inhibidors té un pes molecular molt elevat: 270000. El mecanisme d'inhibició és a través d'una interacció directa amb la proteasa, més que a través de la quelació del calci, ja que la inhibició no era eliminada per una concentració de 25 mM Ca^{2+} . Normalment l'inhibidor està unit a la proteasa, de la qual es separa per una columna d'intercanvi iònic. Encara que la concentració d'inhibidor sembla ésser molt més gran que la de proteasa, no es sap com es regula la seva interacció.

B) Activació per fosforilació:

La fosforilasa quinasa és capaç d'ésser fosforilada per una protein-quinasa dependent d'AMP cíclic i també per ella mateixa en una reacció d'autofosforilació.

Ja hem observat prèviament que la incubació amb la protein-quinasa dependent d'AMP cíclic, portava a la fosforilació de les subunitats α i β , mentres que la γ no es fosforilava. L'activació de l'enzim és paral·lela a la fosforilació de β , mentres que la fosforilació d' α , més lenta, quasi no té efecte sobre l'activitat.

C) Activació per calci:

La fosforilasa β quinasa és inhibida per EDTA i EGTA i a més és activada per una concentració de calci de només 10^{-7} M fins a un 50% respecte a l'activació màxima. Aquests fets, independents de l'existència de KAF, van demostrar que la fosforilasa β quinasa és un enzim dependent de calci.

La subunitat δ és la responsable de la unió de l'enzim al calci (18). La concentració de Ca^{2+} en el múscul en repòs és de 3×10^{-7} M i en tensió màxima, de 2×10^{-5} M, de manera que sembla ésser un procés d'importància "in vivo".

1.1.3. METABOLISME DEL GLICOGEN EN LEUCÒCITS NORMALS I LEUCÈMICS.

El glicogen és un dels components principals del citoplasma dels polimorfonuclears (PMN) i dels limfòcits (19). Aquestes cèl.lules poseeixen tots els enzims de la síntesi i la degradació d'aquest polisacàrid.

La glicogen fosforilasa i l'amilo-(1,6)glucosidasa es troben en leucòcits normals i leucèmics, encara que en aquests últims, l'activitat és més petita. La fosforilasa es troba present en les seves dues formes, una activa i l'altre inactiva en absència d'AMP. Ambdues formes són interconvertibles gràcies a la fosforilasa quinasa i la fosforilasa fosfatasa, que catalitzen la reacció de fosforilació i defosforilació de l'enzim, respectivament (20,21).

L'activitat de la glicogen sintasa és la mateixa en leucòcits normals humans i de porc, però, en les cèl.lules leucèmiques es troba disminuïda.(22).

La glicogen sintasa de PMN i limfòcits de porc pot ser

transformada de la forma D, que és la que es troba normalment, a la forma I, com passa a la majoria dels teixits investigats. L'enzim que catalitza la conversió de la forma D a la forma I presenta les mateixes característiques que en altres teixits i, probablement, es tracta d'un enzim molt similar a la fosfatasa descrita en aquests. Per altra banda, l'enzim que catalitza la conversió de la forma I a la D és, amb gran probabilitat, una quinasa, ja que depèn de l'ATP-Mg²⁺ per a la seva activitat.

En canvi, els leucòcits polimorfonuclears humans no tenen capacitat per convertir la glicogen sintasa D a la forma I (23,24), mentre que els limfòcits sí que poden fer-ho. En quant als leucòcits leucèmics, els provinents de leucèmia mieloide crònica no podien dur a terme aquesta conversió, mentre que els provinents de leucèmia mieloblàstica aguda o de leucèmies limfoides, sí que podien fer-ho (25).

Més tard, es va aconseguir purificar la glicogen sintasa I a partir de leucòcits frescos (26), però la raó de perquè no es produïa la conversió va ésser descrita per Cussó i col. (22).

La fracció de 27000xg de leucòcits polimorfonuclears humans conté un inhibidor de la conversió de la forma D a la I. L'inhibidor s'inactivava per ebullició i per l'inhibidor de llavor de soja per a la tripsina (STI).

Aquest factor es va reconèixer com una proteasa, semblant a la tripsina, activa a pH 7,8 i probablement present en els lisosomes. Cavia també la possibilitat de que es tractés d'una proteasa amb acció sobre la glicogen sintasa D fosfatasa, però més tard es va identificar com una proteasa activa sobre la glicogen sintasa I directament.

Aquesta proteasa està també present en els polimorfonuclears de porc, però a concentracions més baixes.

La proteasa es va mostrar també activa sobre la fosforilasa quinasa, produint en aquest cas un increment de l'activitat. Aquest fet ens va conduir a profunditzar l'estudi de la proteasa en aquest camp, tema que és un dels objectius del present treball.

1.2. DEGRADACIÓ DE PROTEÏNES. PROTEASES.

1.2.1. DEGRADACIÓ DE PROTEÏNES.

Els sistemes vius estan en un estat continu de "turnover" de tots els seus components, des de les molècules individuals fins els organismes sencers. Malgrat el coneixement actual sobre el catabolisme intracel·lular de proteïnes, es tenen només idees vagues sobre la significació fisiològica, les raons de les diferents vides mitges de les proteïnes, els factors que regulen el procés i els mecanismes bioquímics que l'integren. Cal remarcar el grau d'ignorància sobre aquest procés, que contrasta amb el coneixement dels sofisticats mecanismes de la síntesi de proteïnes.

Finalment, però, s'ha reconegut que la degradació de proteïnes és un procés fonamental per a la regulació bioquímica, la genètica, la biologia cel·lular, la fisiologia i la medicina.

Les característiques més notables de la degradació de proteïnes són:

- És un procés ampli: el 40% de les proteïnes del fetge derata és degradat cada dia (27).

- Totes les proteïnes són degradades.

- Les proteïnes individuals es degraden a velocitats molt diferents i les velocitats de degradació poden ésser alterades independentment de les velocitats de síntesi.

- Hormones, drogues, dieta i probablement l'edat, alteren la velocitat de degradació.

- És un procés exponencial de primer ordre. Això vol dir que és un procés a l'atzar.

- Requereix energia.

1.2.1.1. SIGNIFICAT FISIOLÒGIC.

Encara que la degradació continua de proteïnes sembla un procés inútil i poc econòmic, ha de tenir algun avantatge selectiu per l'organisme.

Les funcions de la degradació de proteïnes poden ésser, entre altres:

1.- Eliminació de proteïnes anormals originades per mutacions, errors en la síntesi, desnaturalització o modificacions químiques (oxidació, peroxidació, radicals lliures, ...). Una proteïna pot desnaturalitzar-se dins la cèl.lula espontàniament ja que la conformació d'una macromolècula fluctua de manera continua. Per altre banda, la freqüència d'errors en la síntesi pot ésser extremadament alta, de manera que pot afectar a un 15% de les proteïnes (28).

2.- Incrementar la capacitat de les cèl.lules per a adaptar-se amb rapidesa als canvis ambientals. Un increment en la concentració d'un enzim pot ocórrer teòricament només per un increment en la velocitat de síntesi, però una disminució de la concentració precisa una velocitat ràpida de degradació. Així, molts enzims que regulen la velocitat de reaccions crucials del metabolisme són proteïnes de vida mitja curta i així, són capaços de respondre ràpidament als requeriments cel.lulars. De fet, s'han determinat les vides mitges de 40 proteïnes de fetge de rata i les 12 de vida mitja més curta corresponen a enzims que catalitzen els passos

limitants de diverses vies metabòliques (29).

3.- Les proteïnes constitueixen una reserva d'energia que pot ésser mobilitzada en èpoques de necessitat.

4.- Funcions protectores: els organismes pluricel·lulars combaten les infeccions bacterianes i virals degradant els organismes invasors, després de fagocitar-los gracies a cèl·lules especialitzades.

5.- Processos de regressió de teixits, com la desaparició de la cua en els capgrossos, o en la transformació de teixits, com és la conversió del cartílag en òs.

6.- Donar fi a senyals aportades per hormones, etc. Normalment receptor i estímul són endocitats i degradats.

7.- Molècules sintetitzades com a precursors: hormones, enzims, etc.

8.- Sistemes complexes formats per cascades proteolítiques: coagulació, fibrinolisi i complement.

1.2.1.2. SELECTIVITAT DE LA DEGRADACIÓ.

El fet més sorprenent quan s'estudia la degradació de proteïnes és la gran diversitat de les velocitats de degradació. Per exemple, de 40 proteïnes de fetge estudiades, les vides mitges oscil·len entre els 12 minuts i els 25 dies (30). En canvi, la vida mitja de la proteïna total del fetge és de 2 ò 3 dies i pot variar segons l'estat endocrí i nutricional.

La degradació de proteïnes específiques segueix una cinètica de 1^{er} ordre (31) i això implica que la probabilitat de que una molècula sigui degradada és totalment a l'atzar.

Aleshores, el problema és conjuntar els dos fets: la naturalesa a l'atzar de la degradació i l'heterogeneïtat de les vides mitges.

Hi han diversos mecanismes que expliquen en part aquesta selectivitat:

a) Alteracions de la conformació normal de la proteïna poden afectar marcadament la seva velocitat de degradació. És el cas de l'eliminació de proteïnes anormals i potencialment perilloses. Les evidències al seu favor inclouen en bacteris, l'aïllament de soques de Escherichia coli defectives en la seva capacitat de degradar proteïnes anòmales. Per altra banda, s'han induït complexos aberrants fent créixer a E. coli en presència d'anàlegs d'aminoàcids: aquestes proteïnes eren degradades de 2-10 cops més ràpidament que les normals. A més, certs aminoàcids promouen la degradació més que altres, possiblement perquè pertorben més profundament l'estructura de la proteïna (32). Aquestes proteïnes tendeixen a formar uns grànuls per agregació espontània i sense necessitat d'energia (33).

Gran nombre d'observacions indiquen que les cèl.lules de mamífers tenen una capacitat similar per a degradar proteïnes anormals. Rabinowitz (34) va observar que la incorporació d'un anàleg de valina o lisina en l'hemoglobina conduïa a un ràpid catabolisme d'aquesta proteïna. Les cèl.lules de mamífers poden degradar també proteïnes anormals provinents de mutacions, com per exemple, les hemoglobines anormals.

Per altra banda, s'ha suggerit que el pas limitant de la degradació seria la desnaturalització espontània (35) i encara que els estudis són limitats, s'ha descrit que la fa-

cilitat en desnaturalitzar-se és una característica de moltes proteïnes de vida mitja curta. També s'ha descrit que aquelles proteïnes més làbils són particularment adequades per adherir-se, i potser travessar les membranes lipídiques, tals com les lisosomals.

b) La velocitat de degradació d'una proteïna es correlaciona amb la seva mida. Encara que es poden donar altres explicacions, s'han determinat les velocitats de degradació de moltes proteïnes i la correlació amb el pes molecular és gran, especialment enfrontat amb el pes molecular de la subunitat. Això sembla indicar que el substrat real per a la maquinària degradativa és la subunitat, ja que subunitats diferents de la mateixa proteïna són degradades a velocitats diferents. La dissociació pot influir augmentant l'exposició de zones susceptibles a la proteòlisi (28).

També és veritat que existeixen excepcions a aquesta regla, però això el que indica és que existeixen altres factors que regulen la degradació.

Hi han varies raons químiques que suggereixen el perquè una proteïna gran seria degradable més ràpidament:

- Posseeixen més llocs sensibles a les proteases.
- Tenir més part de la molècula en una conformació susceptible a la proteòlisi.
- Ésser menys estables i desnaturalitzar-se més ràpidament.
- Més probabilitat de tenir un error en la seva seqüència.

Un altre factor és la càrrega de la proteïna: aquelles que tenen un punt isoelèctric més baix tendeixen a ésser de-

gradades més fàcilment. La raó és desconeguda. Segons aquests raonaments, una proteïna petita i bàsica seria particularment estable; de fet, les histones, les proteïnes més estables de la cèl.lula, compleixen aquests dos requisits.

Altres enzims poden estar regulats de manera més sofisticada, com la tirosina aminotransferasa, que és un enzim fosforilable i aquest fet pot afectar a la seva degradació (36).

c) Interaccions amb altres molècules: es coneixen nombrosos casos en que la velocitat de degradació canvia en resposta a substrats, coenzims, etc, degut a alteracions induïdes en la conformació de la proteïna per la unió del lligand (29). L'estructura d'una proteïna és molt flexible i pot sofrir grans canvis per la unió de petites molècules, de manera que poden alterar nombroses propietats fisicoquímiques, incluint la sensibilitat a proteases. Per exemple, la glucosa disminueix la sensibilitat de l'hexoquinasa a la tripsina (37). És a dir, el catabolisme d'una proteïna pot canviar com a conseqüència d'una estabilització deguda al lligand. És interessant senyalar que la glucosa incrementa la sensibilitat a la tripsina de la fosforilasa (38), encara que "in vivo" no es coneix cap cas en que un cofactor incrementi la velocitat de degradació d'una proteïna.

També és possible que les proteïnes anormals tinguin disminuïda la capacitat d'unir al lligand.

d) La velocitat de degradació d'una proteïna es correlaciona amb la seva sensibilitat a proteases "in vitro".

Això és cert per a moltes proteïnes solubles, però quan es fa el mateix tipus d'experiment amb òrgans aïllats, ja no es compleix. Aquest fet pot indicar que les proteïnes no

es degraden mentre estan formant part dels òrgànuls; de fet, la disrupció dels òrgànuls incrementa la sensibilitat de les proteïnes que els formen a les proteases.

Aquesta correlació s'ha observat tant amb proteases inespecífiques com amb enzims lisosomals i proteases neutres, per tant, el pas limitant es pot trobar en ambdós casos.

La regulació de la proteòlisi no es pot explicar en tot cas, només per les diferències en la susceptibilitat a proteases. Un mateix enzim pot tenir vides mitges molt diferents segons el teixit, per exemple, l'isoenzim 5 de la LDH té una vida mitja de 16 dies en el fetge, 1,6 dies en el cor i 31 dies en el múscul (39). És possible que es degui a diferències en la concentració de lligands o bé a diferències en el sistema degradatiu.

Finalment, existeixen proteases específiques (veure després), que poden ésser un mecanisme superimposat al mecanisme general de degradació i seria aquí on es regularia aquest procés sota les diferents condicions fisiològiques (40).

1.2.1.3. REGULACIÓ DE LA DEGRADACIÓ.

La velocitat de degradació de les proteïnes està perfectament regulada, tant en el que respecte a les proteïnes individuals com per la velocitat total de degradació cel·lular.

En E. coli, la degradació de proteïnes està regulada coordinadament amb la síntesi de mRNA i altres processos relacionats amb el creixement, de manera que quan incrementa la proteòlisi, disminueix la síntesi de proteïnes. Aquestes

alteracions estan relacionades amb el nivell de guanosina tetrafosfat (ppGpp).

En cèl.lules de mamífers, s'han descrit nombrosos casos en que la velocitat de degradació contribueix a canvis en el nivell d'enzims específics. La vida mitja d'un enzim s'incrementa si augmenta la concentració de substrat (41), en canvi, el producte final d'una via metabòlica pot incrementar la velocitat de degradació de l'enzim (42). Possiblement, el substrat o el producte poden interaccionar amb la proteïna i influir directament en el seu catabolisme.

També poden influir condicions fisiològiques com el creixement, etc.

Podem senyalar algunes circumstàncies que es coneix afecten a la velocitat de degradació de les proteïnes:

A) Degradació i aport de nutrients.

Ja fa temps que es coneix que la privació de nutrients redueix marcadament la síntesi de proteïnes i de RNA en el múscul al dia següent de la manca, mentre que la degradació augmenta una mica més tard. El catabolisme pot, doncs, ésser una resposta secundària a la falta d'aportació calòrica. Existeix, però, algun mecanisme per evitar la degradació continua de proteïnes essencials. De fet, és raonable que la disponibilitat de reserves d'energia no proteïca (àcids grassos, cossos cetònics) tinguin una influència important en la velocitat de degradació durant el dejú (43).

L'administració d'aminoàcids també influeix en la velocitat de degradació, encara que només alguns aminoàcids poden inhibir la degradació de proteïnes (44). En E. coli, el mecanisme d'inhibició és a través dels tRNA, però en ma-

mífers és desconegut.

L'analogia d'aquests processos en mamífers i E. coli, fa pensar que algun compost relacionat amb el ppGpp estigui implicat en aquest control. També s'ha suggerit (45) que el AMPc pot ésser el responsable, però no sembla que aquest nucleòtid actui en totes les cèl.lules de la mateixa manera.

B) Degradació i hormones:

Varies hormones importants en la regulació del creixement semblen influenciar la velocitat tant de la síntesi com de la degradació en el múscul.

En absència d'insulina (diabetes), la pèrdua de proteïnes en els teixits és marcada. En el fetge, el glucagó incrementa la degradació de proteïnes, al mateix temps que inhibeix la síntesi (46). Possiblement aquests canvis estiguin relacionats amb el nivell d'AMPc. Alguns autors han suggerit que el glucagó i la insulina influencien la degradació a través del lisosoma.

C) Proteòlisi límit:

És un fenomen important en processos diversos. Els sistemes més estudiats són la coagulació, la fibrinolisi i el complement. S'ha de recalcar que els components activats del complement poden comportar-se com a molècules amb propietats lítiques o facilitar la fagocitosis.

D) Inhibidors:

Parlarem d'ells més àmpliament en l'apartat 1.2.5.

1.2.2. DEGRADACIÓ LISOSOMAL I NO LISOSOMAL.

El lisosoma és l'únic orgànu que conté suficient concentració d'enzims hidrolítics per degradar proteïnes totalment. Malgrat aquest fet, no es creu que el lisosoma sigui l'únic lloc de degradació ja que les proteases lisosomals tenen poca especificitat de substrat, i no són regulades per hormones, dieta, etc.

Actualment s'accepta que el sistema degradatiu de la cèl.lula està format per dos components (47):

- L'aparell lisosomal inespecífic que suposa el 70-80% de la degradació total a la cèl.lula.

- Un sistema no lisosomal degut a proteases específiques i molt poc conegut actualment. Suposa el 20-30% restant de la degradació cel.lular de proteïnes.

1.2.2.1. LISOSOMES.

Són el sistema de les cèl.lules eucariotes on es creu té lloc la degradació intracel.lular. Són vesícules membranoses, de 0,5 μ de diàmetre i que contenen enzims hidrolítics de pH òptim àcid.

La membrana concedeix als enzims lisosomals la propietat de la latència, degut a què, quan es trenca, els enzims queden lliures per entrar en contacte amb el substrat. La membrana també té la funció de mantenir el microambient necessari perquè funcionin els enzims. El manteniment del pH és probablement degut a un equilibri Donnan que provoca una acumulació de protons dintre del lisosoma, amb la qual cosa es forma un gradient de pH a través de la membrana de 1,5

unitats. També s'ha suggerit l'existència d'una bomba de protons, que faria servir ATP. La membrana només és permeable a petites molècules, com els aminoàcids, que retornen al citoplasma, on són utilitzats.

La dinàmica del sistema lisosomal (27): Els enzims lisosomals es sintetitzen en el reticle endoplasmàtic rugós. Són glicoproteïnes i la part glucídica és molt semblant en tots ells (48). S'ha suggerit que la part glucídica està implicada en guiar la proteïna cap al lisosoma, a més, aquesta regió conté un dels sucres fosforilats i s'ha de destacar que en la mucopolíidosi II hi ha un gran decrement del grau de fosforilació dels restes glucídics d'aquests enzims (49).

Els enzims arriben al lisosoma a través del reticle endoplasmàtic llis (REL) i aparell de Golgi. Una ruta alternativa ha estat suggerida per Novikoff (27) que anomena sistema GERL (Golgi-reticle endoplasmàtic-lisosoma) en el qual regions especialitzades del REL, diferents de l'aparell de Golgi, donarien lloc als lisosomes. Aquest són els lisosomes primaris, que no han rebut encara el substrat. Quan es fusionen amb vacuoles formen els lisosomes secundaris, que ja tenen molècules per a degradar. Els lisosomes són capaços de fusionar-se entre ells, de manera que formen un sistema dinàmic i continu.

Els lisosomes a més no són homogenis. Pertoft i col. (50) van demostrar la seva heterogeneïtat, treballant amb la degradació de la (125 -I)-asialoceruloplasmina, que es degrada només en els hepatòcits i no en les cèl.lules de Kupffer, de manera que les diferències observades en els lisosomes no es podien deure a diferent procedència. Es va de-

mostrar a més que els lisosomes adquirien una densitat més alta durant la degradació de la molècula.

Les vacuoles que porten els substrats per a la degradació tenen dos procedències:

-endocitosi: inclou la fagocitosi i la pinocitosi. La vacuola (fagosoma) es fusiona amb els vertaders lisosomes.

-autofagia: és el procés seguit per a la degradació intracel.lular. El material és rodejat per una membrana originada des del reticle endoplasmàtic i la vacuola resultant es fusiona amb el lisosoma.

Hi ha també vesícules secretores d'origen lisosomal i d'origen no lisosomal. Aquest és el cas de la lisozima en els macròfags. En canvi, els lisosomes dels leucòcits neutròfils contenen lisozima.

Paper degradatiu dels lisosomes: És important la degradació de material intracel.lular i extracel.lular:

-extracel.lular: hi han moltes evidències i sembla ésser que l'endocitosi acaba irreversiblement en la degradació total.

-intracel.lular: és més difícil de demostrar, però s'han fet estudis "in vivo" amb inhibidors que ho recolzen. Una altra indicació és l'existència de malalties per acumulació de material no degradat en els lisosomes. No hi ha malalties per deficiència de proteases lisosomals, però és possible que siguin letals.

Un altre problema és que la membrana lisosomal també es degrada durant l'autofagia i al mateix temps, està demostrat que la degradació de la membrana no és unitària, si-

nó que les proteïnes que la componen tenen vides mitges diferents (51).

Aquesta discrepància es pot resoldre per un mecanisme de reciclatge per el qual el lisosoma s'invagina per a captar material del citoplasma. Aquest material forma primer una vesícula intralisosomal i està separat dels enzims catabòlics. Part de la membrana de la vesícula es pot fusionar de nou amb la membrana lisosomal, de manera que no es degrada, mentre que el material captat és degradat després de la desintegració de la vesícula (52).

1.2.2.2. DEGRADACIÓ ESPECÍFICA DE PROTEÏNES.

El coneixement sobre les proteases va en augment, però en la majoria dels casos, es desconeix la seva funció fisiològica. Aquests enzims poden estar implicats en molts processos a més de la degradació irreversible de proteïnes (proenzims i prohormones, anticossos, col.làgen, albúmina) regulació del creixement, metabolisme de pèptids, degradació de proteïnes extracel.lulars i modificació d'activitats enzimàtiques (30)).

Schimke (53) va suggerir que el procés de degradació no és un procés uniforme, sinó que té lloc de manera escalonada. Va demostrar que el primer pas consisteix en la degradació de la proteïna en pocs fragments, que són degradats posteriorment per proteases no específiques. Va suggerir que les cèl.lules contenen proteases específiques que inicien la degradació amb una proteòlisi molt limitada, així explica les diferents vides mitges de les proteïnes. Aquestes proteïnes semidegradades entrarien després en el

sistema catabòlic general de la cèl.lula.

Existeixen moltes proteases específiques. Entre elles cal destacar:

-Proteasa activable per calci: comentada anteriorment a l'apartat 1.1.2.2.

-S'han descrit proteases específiques per a diversos enzims, entre ells la 5'-nucleotidasa i la glutamina sintetasa de E. coli, la ornitina transcarbamilasa de S. cerevisiae i la ribonucleasa i la glucosa-6-P-deshidrogenasa de fetge de rata (54).

-Cas dels enzims del piridoxal: Katunuma i col.(55) van identificar un grup de proteases específiques per aquells enzims que treballen amb piridoxal. Es van purificar de múscul esquelètic, mucosa i múscul de l'intestí, i de fetge. Les seves característiques principals eren:

1- Normalment presenten una activitat latent en el teixit, degut a l'existència d'un inhibidor.

2- Especificitat relativa sobre els enzims del piridoxal: ornitin-aminotransferasa, serina-deshidratasa, cistationasa, δ -aminolevulinat sintetasa, fosforilasa, etc

3- Actuen sobre les formes apoenzimàtiques, però no sobre les holoenzimàtiques.

4- En general, actuen sobre els substrats sintètics de la quimotripsina, però no de la tripsina.

5- Són serin-proteases, de pH òptim entre 8,5-9.

6- La seva activitat respon a canvis en la dieta i segons l'estat de l'animal, però no de la mateixa forma segons els teixits.

Segons sembla, la conversió de la forma holo en apo és el pas limitant de la degradació. S'ha demostrat que tots

els enzims són proteolitzats limitadament i que s'inactiven amb aquest procés.

També s'han descrit uns altres dos grups de proteases específiques: les que hidrolitzen les formes apo de deshidrogenases FAD-dependents i les que hidrolitzen les formes apo de les deshidrogenases NAD-dependents (55).

1.2.3. PROTEASES: CLASSIFICACIÓ.

Són aquells enzims que hidrolitzen enllaços peptídics. Es divideixen en (53):

1) Exopeptidases: Trenquen els enllaços peptídics dels extrems de la cadena. Sembla ésser que la seva funció comença quan les endopeptidases han obert el camí. Aleshores, les exopeptidases actuen ràpidament fins aconseguir la degradació total. Són tan actives que és molt difícil detectar proteïnes parcialment proteolitzades en la cèl.lula.

Entre elles es troben les catèpsines A i C (que també es troben en leucòcits) i les peptidases.

Normalment es nombren segons la seva especificitat.

2) Endopeptidases: Trenquen enllaços de l'interior de la cadena polipeptídica. Es classifiquen segons el mecanisme catalític en:

- Carboxil-proteases.
- Tiol-proteases.
- Serin-proteases.
- Metallo-proteases.

El nom de catepsina s'aplica a les proteases tisulars (és a dir, amb l'excepció de les digestives i de la sang). Tradicionalment, es referia a aquelles que tenien un pH òptim àcid, però actualment s'aplica a totes les proteïnes tisulars.

Carboxil-proteases:

Són aquelles que tenen un grup $-COOH$ en el centre actiu. Són inhibides per pepstatina i alguns compostos diazo com el diazoacetil-norleucina en presència de Cu^{2+} .

La carboxil-proteasa més ben caracteritzada és la catepsina D. Ha estat aïllada de nombrosos teixits i parlarem d'ella a l'apartat 1.2.4.5.

Tiol-proteases:

Són enzims dependents de reactius sulfidrils i inhibibles per compostos protectors de grups $-SH$.

La principal tiol-proteasa de teixits d'animals superiors és la catepsina B1, d'origen lisosomal. Una de les característiques d'aquest enzim és la seva àmplia especificitat sobre diversos enzims, inactivant-los: la glucoquinasa, la fructosa-diP-aldolasa, la piruvat quinasa i la tirosin-aminotransferasa. També és capaç de degradar els proteoglicans i el col·làgen a pH àcid.

Serin-proteases:

Tenen en el centre actiu una serina. Són les més ben caracteritzades des del punt de vista del mecanisme catalític.

Són inhibides per STI, el Limabeen Trypsin Inhibitor

Inhibidor	Serin	Proteasa Tiol	Carboxil	Metalo
Pepstatina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	--	--	inhibida	--
DTT +EDTA (2 mM)	--	activada	--	inhibida
DIPF o PMSF 1 mM	inhibida	--	--	--
STI o LTI 1 mg/ml	inhibida	--	--	--
1,10-fenantrolina 1 mM	--	--	--	inhibida
4-cloromercuriben- zoat 1 mM	--	inhibida	--	--
Diazo-Ac-nLeu- metilester - Cu^{2+} 1 mM	--	inhibida	inhibida	--

Teula I: CRITERIS PER A LA CLASSIFICACIÓ
D'ENDOPEPTIDASES.

i per compostos químics com el PMSF i el DIPF, en una relació estequiomètrica de 1:1 (64).

Unes de les principals són l'elastasa i la catepsina G, de les que parlarem més endavant.

Metalo-proteases:

L'activitat d'aquestes proteases és dependent de metalls divalents, generalment el Ca^{2+} o el Zn^{2+} . Són inhibides, per tant, per agents quelatants com l'EDTA i la 1,10-fenantrolina.

La principal és la col.lagenasa, descrita més endavant.

La classificació és un d'aquests grups es fa mitjançant estudis d'inhibició. Els criteris més generalment acceptats es representen a la taula I.

1.2.4. PROTEASES DE LEUCÒCITS.

El paper dels leucòcits polimorfonuclears (PMN) és la reacció de defensa contra invasors degut a la seva capacitat de captar i destruir gran quantitat de microorganismes. Per a portar a terme aquesta funció contenen gran varietat d'enzims hidrolítics directament responsables de la inactivació i degradació de bacteris, etc. A més, són una de les fonts més riques en hidrolases àcides,

Però, possiblement, són més importants les proteases neutres. Metchnikoff a l'any 1901 i Opie a l'any 1906 ja van descriure que els leucòcits contenien proteases actives a pH neutre i alcalí.

Van passar els anys i els estudis han portat a la identificació de 4 proteases principals actives a pH neutre:

- Col.lagenasa (E.C. 3.4.24.7.): descrita per Lazarus a l'any 1972 (65). Ha estat purificada.
- Gelatinasa: descrita per Sopata l'any 1974. No ha estat purificada a homogeneïtat (66).
- Elastasa (E.C. 3.4.21.11.): descrita per Janoff l'any 1973. Ha estat purificada (67).
- Catepsina G, també anomenada "proteasa semblant a la quimotripsina" (E.C. 3.4.21.20): descrita per Rindler-Ludwig l'any 1975. Ha estat purificada (68).

Els leucòcits neutròfils estan implicats en una gran varietat de processos fisiològics, entre ells la inflamació, la resistència a la infecció, l'enfisema de pulmó i l'artritis reumàtica. Les proteases de leucòcits neutròfils són enzims capacos de digerir el col.làgen, l'elastina pulmonar i arterial, els proteoglicans dels cartílags, la membrana basal vascular i les parets dels bacteris. Aquestes propietats els fan responsables de gran part de les funcions generals dels leucòcits.

"In vivo", l'acció de les proteases és modificada pels inhibidors existents en el plasma, però fòra de la circulació, com en les primeres etapes de la inflamació, s'expressarà l'activitat proteolítica, ja que les proteases no estaran en contacte amb els inhibidors.

1.2.4.1. COL.LAGENASA.

Les col.lagenases són enzims que catalitzen la degra-

dació del col.làgen no desnaturalitzat. Inclou diversos enzims que hidrolitzen diferents tipus d'enllaços peptídics.

La molècula de tropocol.làgen (unitat bàsica del col.làgen) consisteix en tres cadenes (α_1 , α_2 i una α_1 ò α_3), de pes molecular 95000 D cada una. Formen una triple hèlix característica, estabilitzada per enllaços per pont d'hidrògen i enllacos covalents entre les cadenes. Les cadenes tenen la peculiaritat d'ésser molt riques en prolina.

Segons el tipus de col.lagenasa, aquesta pot trencar una sola cadena de la molècula del col.làgen i no modificar l'estructura general, o bé, trencar les tres cadenes i degradar per tant tota la molècula.

Proteases com la tripsina poden atacar certes regions del col.làgen que no tenen estructura de triple hèlix, però una veritable col.lagenasa he d'ésser capaç de degradar aquestes regions helicoidals característiques.

Les col.lagenases són produïdes per diferents tipus de cèl.lules, tant procariotes com eucariotes: els leucòcits són unes d'elles. Com s'ha demostrat en cultius de diversos teixits, moltes cèl.lules són capaces de sintetitzar i secretar col.lagenasa, però normalment no l'emmagatzemen en quantitats apreciables. Els leucòcits PMN són una excepció notable. En aquestes cèl.lules, s'ha localitzat a la fracció granular (69) i, com altres components dels grànuls, es creu que és sintetitzada i guardada durant la maduració de les cèl.lules.

Ja a l'any 1962, Gros i col. (70) van descriure l'existència d'una col.lagenasa tisular que catalitzava la degradació del col.làgen "in vivo". Per la seva banda, la infil-

tració dels leucòcits neutròfils en els llocs d'inflamació està sovint associada amb la degradació de proteïnes estructurals en el teixit connectiu.

Hi ha dos mecanismes en els quals podria actuar la col.lagenasa, així com els demés enzims del que parlarem després:

- Intracel.lular: el contingut dels grànuls és descarregat per fusió dintre de les vacuoles fagocítiques i així és degradat el material que contenen.

- Extracel.lular: el contingut dels grànuls pot ésser exocitat sota la influència de diferents estímuls (71). El mecanisme per el qual els enzims són alliberats i activats és desconegut.

La col.lagenasa de PMN trenca selectivament les cadenes del col.làgen en dos fragments anomenats TC_A i TC_B .

Les seves característiques són: és completament inhibida per EDTA i EGTA, ja que el calci és necessari per a la unió de l'enzim amb el substrat. El Mg^{2+} no pot substituir el calci. També és inhibida per la 1,10-fenantrolina (un altre agent quelant de metalls). No és inhibida per DIPF i està classificada com una metalo-proteasa (72). El seu pH òptim és de 8-9.

Un dels punts principals per elucidar la funció biològica era determinar la localització subcel.lular. Baggiolini i Bretz (69) van demostrar que la col.lagenasa està localitzada quasi exclusivament en els grànuls específics, separada d'altres proteases, situació que pot proporcionar una forma de control selectiu de l'alliberament de diferents enzims degradatius, si la velocitat de descarregament dels

diversos tipus de grànuls és diferent.

Aquest fet ha estat descrit recentment per Oronsky (72): la compartimentació de la col.lagenasa en els grànuls específics explica el perquè és alliberada per els neutròfils a diferent velocitat que altres proteases neutres i àcides. Els grànuls específics descarreguen el seu material en les vacuoles fagocítiques més ràpidament que els azuròfils i, sota condicions especials, el contingut dels grànuls específics pot ésser exòcitat.

La col.lagenasa està present en forma latent en els grànuls i l'activació pot ésser proteolítica amb col.lagenasa (autocatalítica) o a través de l'acció d'altres proteases com la tripsina, o bé també pot ésser activada per agents bloquejants de grups sulfidrils. Altres possibles activadors de la col.lagenasa (72) són la plasmina (com que els neutròfils alliberen el factor activador del plasminògen, és possible que hi hagi plasmina entorn d'aquestes cèl.lules) i també s'han descrit activadors en el fluid sinovial normal i reumàtic.

El pes molecular de la col.lagenasa disminueix en 25000 D quan s'activa de qualsevol de les maneres descrites. Aquesta disminució tan notable i el fet de que sigui activada per agents bloquejants de grups tiol, suggereix que en realitat es tracta d'un inhibidor que s'allibera i no d'un proenzim, però aquest inhibidor no ha pogut ésser detectat. És a dir, el (s) mecanisme(s) d'activació encara resta obscur.

S'ha descrit també l'existència d'un inhibidor citoplasmàtic de la col.lagenasa, però no es creu que sigui el responsable de la latència de l'enzim. També és inhibida per el sèrum.

1.2.4.2. GELATINASA.

A l'any 1974, Sopata i Dancewicz (73) van demostrar que els leucòcits tenien, apart de la col.lagenasa, un altre enzim col.lagenolític: la gelatinasa.

La gelatinasa és una altra metalo-proteasa, aïllada de leucòcits. Els seus substrats són la gelatina (és a dir, el col.làgen desnaturalitzat i el fragment TCA del col.làgen produït per la col.lagenasa. Aquests dos enzims participen, doncs, en la degradació del col.làgen. La principal funció de la col.lagenasa seria la divisió del col.làgen en els dos fragments esmentats i la gelatinasa proseguiria segurament el treball iniciat per la col.lagenasa. La gelatina és també degradada per proteases inespecífiques com la tripsina, però, "in vivo", la degradació del col.làgen desnaturalitzat o, més probablement, dels seus fragments, es deu a la gelatinasa, un enzim específic i actiu a pH fisiològic.

És també un enzim de pH òptim neutre: 7,8, i és inactiva per sota de pH=5. És inhibida per EDTA, ja que l'enzim depèn de la presència d'ions divalents. També la inhibeixen agents protectors de grup tiol, i el sèrum.

No presenta activitat sobre col.làgen natiu, caseïna, hemoglobina, elastina, histona o altres pèptids.

La localització subcel.lular de la gelatinasa és diferent a la col.lagenasa: es descriu com a oertanyent a unes partícules menys denses, les partícules C (72).

La gelatinasa existeix també en leucòcits en una forma latent. És activada per reactius bloquejants de grups tiol i per certes proteases. S'han suggerit aleshores dos mecanismes d'activació:

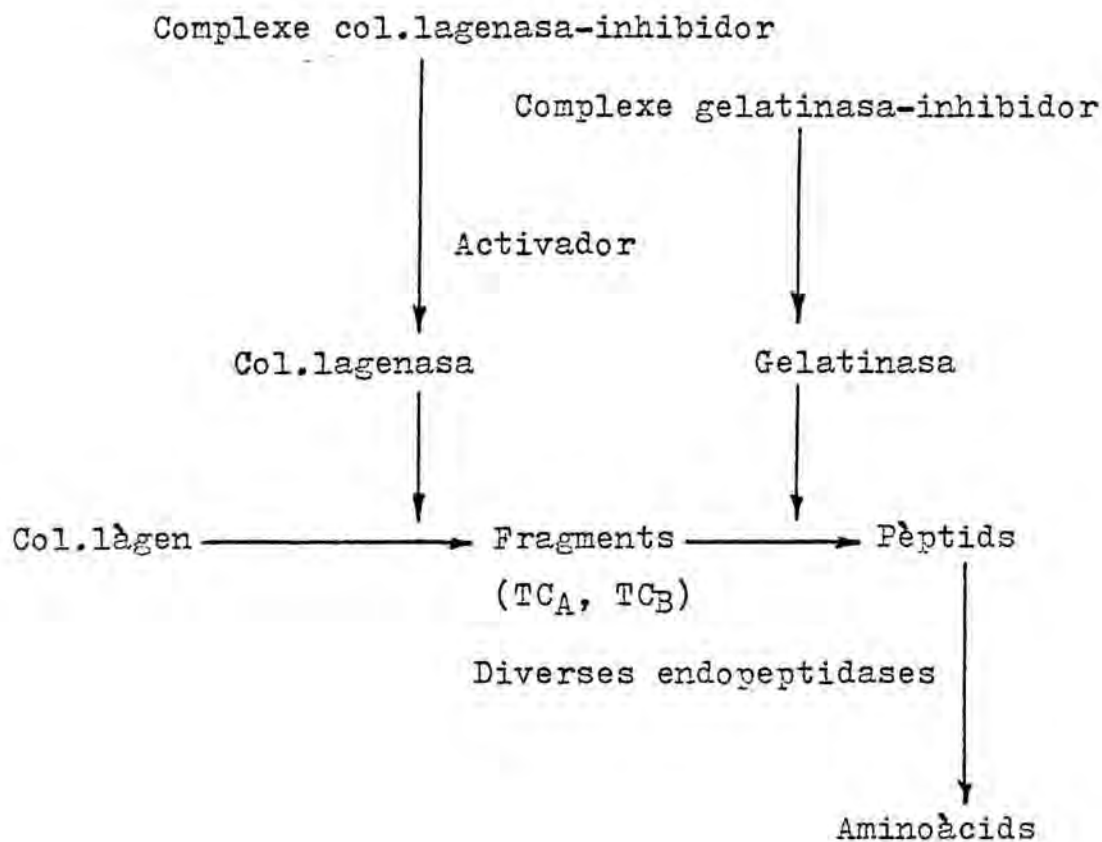
a) Conversió d'un zimògen en l'enzim actiu: la gelatinasa pot ésser activada per tripsina, quimotripsina, i, el què és més important, per elastasa, catepsina G de leucòcits, l'enzim semblant a la tripsina de leucòcits i un activador específic present en el fluid sinovial. La disminució de pes molecular que sofreix l'enzim és de 20000 D.

b) Existència d'un inhibidor què, en el cas de que sigui retirat, dóna lloc a una activació no proteolítica com a resultat de la dissociació enzim-inhibidor. Aquesta dissociació seria produïda per agents com el tiocianat sòdic, la urea, el clorur mercuric i altres. La disminució del pes molecular és també de 20000 D. Si es fa passar la gelatinasa latent en 8 M urea a través d'una columna de Sephadex G-200, es produeix un increment considerable de l'activitat (74).

Però, com en el cas de la col.lagenasa, no s'ha aconseguit identificar aquest factor inhibitori, encara que les dades més recents suggereixen que els extractes de leucòcits contenen un inhibidor de la gelatinasa. Sembla, doncs, més verosímil pensar que la gelatinasa, i possiblement també la col.lagenasa, existeix com un complexe enzim-inhibidor, més que com un verdader zimògen, encara que no es pot excloure la possibilitat de que sigui sintetitzada com un zimògen i que, després d'ésser activada, s'unéixi amb l'inhibidor.

Queda, però, saber com aquests dos enzims són produïts, emmagatzemats i alliberats per els leucòcits.

La forma d'actuar de la col.lagenasa i la gelatinasa és:



1.2.4.3. ELASTASA.

L'elastasa ha estat purificada a partir de leucòcits i de melsa.

L'elastasa de neutròfils és una proteïna marcadament bàsica. Té, en aquests dos teixits de font humana, tres isoenzims majoritaris i tres minoritaris (75). És interessant destacar que l'anàlisi d'aminoàcids mostra diferències significatives entre l'elastasa de neutròfils normals i leucèmics (76), però probablement no són importants, ja que

el comportament immunològic de les dues formes és idèntic.

És una glicoproteïna i probablement els isoenzims es diferencien en la part glucídica, o bé, en l'emascament dels aminoàcids en forma de les amides corresponents (77).

Conté una única cadena polipeptídica i el pes molecular oscil·la entre 22000-36000. Les diferències que existeixen entre aquestes determinacions es deuen a que tendeix a autodegradar-se ràpidament.

Especificitat de substrat: (78)

És bastant àmplia: és capaç d'hidrolitzar elastina, col·làgen, proteoglicans, azocaseïna, hemoglobina, fibrinògen, histona, diversos factors de la coagulació i el factor C₃ del complement.

Hidrolitza pel cantó carboxílic dels aminoàcids Ala, Gly i Ser.

L'elastina és una proteïna insoluble del teixit connectiu extremadament resistent a la degradació: no és hidrolitzable per tripsina o quimotripsina, sinó només per les elastases de diferents teixits. Per a que tingui lloc la hidròlisi, l'enzim s'ha d'adsorbir sobre el seu substrat mitjançant forces electrostàtiques generades per la basicitat de l'elastasa, concretament entre els grups positivament carregats de l'elastasa i els grups carboxils de l'elastina; al mateix temps es creen forces hidrofòbiques entre els residus no polars de les dues proteïnes (77).

Degrada també les proteoglicans dels cartílags, concretament sobre la part proteïca de la molècula.

A diferència de la col·lagenasa, presenta més activitat

sobre el col.làgen tipus II (de cartílag) que sobre el col.làgen tipus I (de tendons), mentre que l'especificitat de la col.lagenasa és inversa. L'elastasa, però, no degrada les cadenes α del col.làgen, sinó les regions extrahelicoidals. Això provoca l'alliberament i solubilització d'aquestes cadenes α , que són aleshores susceptibles a la degradació per la col.lagenasa.

El seu pH òptim és 8,5, fent servir elastinà com a substrat.

Sensibilitat a inhibidors:

És completament inhibida per DIPF i PMSF. Aquest dos inhibidors reaccionen estequiomètricament amb la serina del centre actiu de l'enzim. També és inhibida per l'inhibidor de tripsina de llavor de soja (STI) i el de llavor de lima (LTI).

No és afectada per EDTA, pepstatina, o cloromercuribenzoat. És, per tant, una serin-proteasa. Les clorometilcetones TPCK i TLCK no inhibeixen a elastasa en un grau apreciable, però sí altres clorometilcetones com les derivades d'alanina.

És inhibida per α_2 -macroglobulina i α_1 -antitripsina. També s'ha descrit un inhibidor citoplasmàtic. És interessant recalcar que és inhibida per el tiomalat d'or, compost que s'acumula en els lisosomes i que es fa servir en terapèutica per l'artritis reumatoide.

Localització subcel.lular:

Es troba present únicament en els grànuls azuròfils (79), concretament en la fracció menys densa d'aquests grànuls. És pot considerar, doncs, com una hidrolasa lisosomal,

ja que els grànuls azuròfils poden considerar-se com a lisosomes.

Presència en altres espècies:

És un enzim present en els PMN de totes les espècies estudiades.

L'activitat es tres vegades més alta en humans que en bovins i també es diferencia en els isoenzims (75). En conills també és un terç de la humana, però s'ha descrit una histonasa que possiblement sigui l'elastasa.

1.2.4.4. CATEPSINA G.

Inmunològicament s'ha identificat amb l'anomenat "enzim semblant a la quimotripsina" ("chymotrypsin-like enzim").

És també una proteïna molt bàsica, degut a un alt percentatge d'aminoàcids bàsics i amides. Existeixen a més diversos isoenzims, concretament tres.

El pes molecular oscil·la, segons el mètode de càlcul, entre 20-30000 D. Consta d'una sola cadena polipeptídica.

Especificitat de substrat:

Es capaç d'hidrolitzar hemoglobina, fibrinogen, caseïna, azocaseïna, col·lagen, proteoglicans i alguns factors de la coagulació. Sobre els proteoglicans del cartil·lag ataca, com l'elastasa, la part proteïca de la molècula.

Sobre el col·lagen ataca els extrems de la cadena polipeptídica i produeix múltiples productes, solubilitzant també el col·lagen. És també més actiu sobre el col·lagen tipus II.

Altres substrats són la cadena B de la insulina i diversos polipeptíds sintètics, tots ells substrats de la quimo-

tripsina (78).

El seu pH òptim és de 7,5-7,8 segons el substrat.

Sensibilitat a inhibidors:

És completament inhibida per DIPF i PMSE, encara que reacciona amb el DIPF més lentament que la quimotripsina. També es inhibida per STI i LTI.

No resulta inhibida per ECTA, pepstatina o 4-cloromercuribenzoat. És, doncs, una serin-proteasa.

És inhibida per α_2 -macroglobulina, α_1 -antitripsina i α_1 -antiquimotripsina. Es diferencia de la quimotripsina en que no és inhibida per l'ovomucoide de gall dindi. És l'únic enzim conegut que resulta inhibit per l' α_1 -antiquimotripsina (80) i aquest fet confereix un significat fisiològic a aquest inhibidor, fins ara ignorat.

Els resultats amb les clorometilcetones són contradictoris.

És també inhibida per el tiomalat d'or.

Presència en altres espècies:

Els leucòcits de cavall no tenen catepsina G., sino només elastasa. Existeix en aquest animal un potent inhibidor citoplasmàtic d'aquest emzim (81).

Els conills tampoc poseixen catepsina G.

1.2.4.5. CATEPSINA D_v

Està ampliament descrit que els leucòcits mononuclears contenen només activitat proteasa àcida, mentre que les preparacions de PMN mostren activitat predominantment a pH neutre amb un petit pic a la zona àcida.

Ishikawa i col. (82) van separar les activitats neutra

i àcida dels PMN mitjançant intercanvi iònic i van demostrar que l'activitat proteasa àcida era deguda sobretot a la denominada catepsina D.(E.C. 3.4.4.23).

L'alliberament de proteases en la inflamació juga un important paper en la destrucció dels teixits. Les proteases àcides catepsina D i catepsina B1 (E.C. 3.4.4.-) juguen un important paper en la degradació del cartílag de les articulacions (83). Per exemple, s'ha identificat a la catepsina D com un dels enzims presents en l'exudat de les genives inflamades, en concentracions proporcionals a la gravetat de la lesió (82).

La contribució dels diferents enzims en la inflamació és encara desconeguda, encara que els PMN contenen majoritàriament enzims actius a pH neutre capaços de degradar una ampla varietat dels components del teixit. L'existència de proteases àcides ha estat moltes vegades ignorada i inclús denegada, però no es pot despreciar la seva contribució al procés general.

La catepsina D és, doncs, una proteasa àcida intracel·lular present en els grànuls azuròfils dels leucocits PMN. Pertany al grup de les carboxil-proteases i la seva activitat es de 3-10 vegades més petita que l'activitat proteasa neutra. Malgrat això, és un dels principals enzims lisosomals i es troba present en els teixits inflamats. Quan és alliberada, la catepsina D és capaç d'atacar els complexos proteïna-polisacàrid de la matriu cartilaginosa (84).

Mostra un pH òptim de 3,6 fent servir hemoglobina com a substrat, però sobre proteoglicans és de 5. El pes molecular és de 42000 D. És una glicoproteïna i consta d'una sola cadena polipeptídica.

És fortament inhibida per pepstatina. El 90 % de l'activitat proteasa àcida dels PMN és catepsina D. No s'han escrit inhibidors citoplasmàtics. La unió de la pepstatina a la catepsina D és un procés depenent del pH, encara que l'afinitat és sempre molt elevada. La pepstatina és un inhibidor aïllat de teixit de mamífers i per tant, seria possible la seva activitat "in vivo". Ara bé, no s'han observat els seus efectes en processos com la destrucció del cartílag, bé perquè la catepsina D no actua en realitat en aquests processos, o bé perquè la pepstatina és excretada molt ràpidament i penetra poc en els teixits icèl.lules de l'organisme (63).

1.2.4.6. PROTEASES NEUTRES I INHIBIDORS CITOPLASMÀTICS.

Davies i col. (77) van indicar en els seus estudis sobre proteases neutres de PMN que la fracció postgranular contenia un potent inhibidor d'aquestes proteases. Va proposar, però, que com els PMN els obtenia d'exudats de teixits inflamats, era possible que l'inhibidor hagués estat captat per el plasma. Malgrat aixó, l'existència d'inhibidors citoplasmàtics va ésser confirmada més tard.

Kopitar i col. (85) van aïllar dos inhibidors citoplasmàtics de les proteases neutres, assajats sobre l'extracte granular. Un d'aquests inhibidors era de pes molecular alt (P.m. 43000) i l'altre de pes molecular baix (P.m. 12000). L'inhibidor de pes molecular gran representava el 80-90 % de la capacitat inhibitoria del citoplasma.

Aquests inhibidors són termolàbils i perden el 60 % de la seva activitat quan s'escalfen durant 5 minuts a 60° C.

El pH òptim és de 6-8; a pH 5 retenen el 40 % de l'activitat i són inactius a pH 3. Cal tenir en compte aquestes dades en tots aquells processos metabòlics on pugui haver una disminució del pH del microambient considerat. Els autors descriuen aquests inhibidors com a diferents de l' α_1 -antitripsina.

Steven i col. (86) van continuar els estudis sobre els inhibidors citoplasmàtics, confirmant els resultats de Kopitar i col. Van descriure que les cèl.lules contenen aproximadament 3,3 vegades d'inhibidor en el citoplasma més del necessari per a neutralitzar tota la proteasa neutra existent, (mesurada sobre col.làgen, però no sobre la part helicoidal de la molècula).

La inhibició era dependent de la concentració i era irreversible en temps curts, però en temps superiors a les dues hores desapareixia la inhibició. Els resultats suggereixen que l'activitat proteasa neutra que ells aïllen està limitada a un paper intracel.lular, ja que necessita una concentració de K^+ elevada. La funció de l'inhibidor seria protegir la cèl.lula en el cas de que la proteasa escapés dels grànuls. La única situació en que aquesta proteasa actuaria extracel.lularment seria quan la concentració de K^+ extracel.lular augmentés, el que passaria en el cas de la mort de gran nombre de cèl.lules. Inclús en aquest cas seria inactivada per l'inhibidor durant 1,5-2 hores, durant les quals el complex enzim-inhibidor seria fagocitat per altres PMN, impeding així la destrucció dels teixits.

1.2.4.7. DEGRADACIÓ DEL COL.LAGEN PER LES PROTEASES NEUTRES DE LEUCÒCITS.

El paper de la col.lagenasa i la gelatinasa en la degradació no pot ésser encara descrit amb seguretat, ja que el mecanisme d'activació és encara incert i poden ésser destruïts per l'elastasa i catepsina G, encara que es desconeix fins a quin grau.

Els llocs de trencament són diferents: els metallo-enzims ataquen a la regió helicoidal, mentre que les serin-proteases degraden només els pèptids terminals no helicoidals. La col.lagenasa és més activa sobre el col.lagen solubilitzat que sobre el tisular, mentres que l'elastasa i la catepsina G ataquen les regions terminals del col.lagen alliberant-lo i també degraden proteoglicans (72).

Recentment, Uitto i col.(73) van demostrar que un extracte de leucòcits humans presenta activitat proteasa neutra sobre el col.lagen de la membrana basal del cristal·lí de bou. Aquest col.lagen és designat com el tipus IV, diferent dels tipus I, II i III, mentre que aquesta nova col.lagenasa és activa sobre el tipus IV. Els autors consideren que és un enzim diferent de la col.lagenasa ja descrita.

Les dades d'inhibició que presenten suggereixen la presència de dues proteases: una serin-proteasa i una (o més) metallo-proteases.

1.2.4.8. PAPER FISIOLÒGIC DE L'ELASTASA I LA CATEPSINA G.

Sembla bastant probable que quasi tota l'activitat proteasa neutra dels leucòcits PMN humans sigui deguda a l'elas-

tasa i la catepsina G.

Com ja hem dit, l'elastasa degrada l'elastina i entre els dos enzims, són capaços d'hidrolitzar els proteoglicans i solubilitzar el col.lagen insoluble per fer-lo susceptible a una degradació posterior per part de la col.lagenasa.

Les activitats "in vivo" d'aquests dos enzims en el torrent circulatori venen regulades pels inhibidors del plasma α_2 -macroglobulina i α_1 -antitripsina. S'ha aïllat elastasa de pus en forma lliure i en forma de complexe amb aquests inhibidors, però no s'ha pogut aïllar en la circulació perifèrica. Això és degut, a que l'elastasa és immediatament retirada de la circulació per unió a aquests dos inhibidors i els complexes α_2 -macroglobulina/elastasa són ràpidament fagocitats per les cèl.lules del sistema reticle-endotelià. L'elastasa dels complexes amb α_1 -antitripsina és transferida a la α_2 -macroglobulina i posteriorment eliminada. L'eliminació de la catepsina G possiblement segueixi un proces semblant.

Malgrat això, fòra de la circulació, per exemple, en els primers estadis de la inflamació, els enzims seràn actius ja que no existiran aquests inhibidors. El mateix succeirà quan els inhibidors plasmàtics estiguin en concentracions anormalment baixes, com és el cas dels individus deficients en α_1 -antitripsina.

Els leucòcits neutròfils incubats "in vitro" amb complexos immunes antigen-anticos fagociten aquests complexos i secreten al medi diversos enzims, entre ells l'elastasa (7°). Aquest alliberament és específic per enzims dels grànuls azuròfils i no és acompanyat per la secreció d'enzims citoplasmàtics. Es creu que aquesta secreció és estimulada

per un component quimiotàctic del complement alliberat durant la interacció antígen-anticòs (22). Quan s'injecta a un animal un antígen i el complexe immune precipita en les parets dels vasos sanguinis, comença la típica reacció inflamatòria amb migració dels neutròfils els quals fagociten els complexos i té lloc una degradació de la membrana basal vascular que origina edema i hemorràgia. L'elastasa no sembla ésser essencial en aquest procés, però la catepsina G possiblement ho és.

Elastasa i catepsina G degraden "in vitro" diversos factors sanguinis: com que els neutròfils degranulen en presència de certes endotoxines, s'ha suggerit que aquestes proteases són les responsables de la deficiència de factors de la coagulació que sovint segueix a un shock per endotoxines.

Els individus deficientes en α_1 -antitripsina són particularment susceptibles a partir enfisema pulmonar. Es pot produir enfisema experimental tractant els animals amb proteases com papaína o amb extractes de neutròfils humans. La severitat de l'enfisema produït és directament proporcional a la quantitat de proteasa.

Un dels canvis més aparents en els pulmons enfisematosos és la destrucció de l'elastina. L'origen de les proteases que causen l'enfisema "in vivo" és encara incert. No provenen de bacteris infectius, sinó de les pròpies cèl·lules de l'individu, possiblement dels leucòcits que normalment es troben en els capil·lars pulmonars i que s'acumulen en major nombre en les infeccions alveolars i en individus fumadors.

En resum, l'elastasa i la catepsina G dels neutròfils

participen en el combat contra les infeccions bacterianes, la digestió dels complexos immunes i en la iniciació de la inflamació. Les primeres dues funcions es porten a terme mitjançant una digestió intrafagosomal i la tercera per secreció extracèl·lular dels enzims.(78).

1.2.5. INHIBIDORS PROTEICS DE PROTEASES.

Hi ha dos grans grups d'inhibidors proteics de proteases: (89)

A) Macroglobulines: Són proteïnes d'alt pes molecular presents en el plasma dels mamífers, sovint en formes múltiples. La principal és l' α_2 -macroglobulina (P.m.=720000) amb 4 cadenes polipeptídiques iguals, que es dissocia en parelles de cadenes per desnaturalització i a cadenes sencilles per reducció de ponts -S-S-. L' α_2 -macroglobulina és capaç d'unir-se a proteases dels 4 tipus i és estrany trobar endoproteases que no formin complexos amb ella.

El mecanisme és el següent: la proteasa hidrolitza un o més enllaços de l' α_2 -macroglobulina que provoquen un canvi conformacional en l'inhibidor que fa que aquest "atrapi" a la proteasa. Aquests enllaços hidrolitzats han d'ésser molts diversos perquè puguin ésser afectats per quasi totes les proteases. Els complexos α_2 -macroglobulina-proteasa són irreversibles; això vol dir que "invivo" totes les proteases circulants són eliminades a través d'aquest inhibidor.

B) Inhibidors per a proteases de diferents tipus:

Els inhibidors de carboxil, metalo i tiol-proteases són el menys estudiats, encara que n'hi han molts de descrits.

No hi ha una proposta definitiva pel mecanisme d'acció.

Inhibidors de serin-proteases: N'hi ha molts de descrits i el mecanisme és ben conegut. A la superfície de cada molècula d'inhibidor hi ha al menys un enllaç peptídic, el lloc reactiu, que interacciona específicament amb el lloc actiu de la proteasa. Els valors de K_{cat} i K_M pels inhibidors són molt més petits que pels substrats normals. Per això, la seva hidròlisi és extremadament lenta i el sistema es comporta com un equilibri $E + I \rightleftharpoons EI$, amb una constant d'equilibri molt alta (10^7 - 10^{13} M⁻¹). Tots aquests estudis mostren que el lloc reactiu de l'inhibidor reacciona amb el lloc actiu de la proteasa com si fos un substrat.

Com ja hem indicat, existeixen dues vies per a la degradació de proteïnes en cèl.lules de mamífers: la via lisosomal, responsable segurament de la degradació no selectiva, i la via no lisosomal, que degrada preferentment proteïnes de vida curta i anormal.

La majoria de les evidències per a aquesta hipòtesi dual prové d'experiments d'inhibició, els quals demostren que la degradació de proteïnes de vida mitja llarga és generalment més sensible a la inhibició que la degradació de proteïnes de vida curta.

Entre els molts agents que inhibeixen selectivament la degradació lisosomal de proteïnes de vida llarga, destaquen per la seva efectivitat l'amoníac i les bases dèbils.

Grinde i col. (47) van assajar nombroses amines, que afecten la funció lisosomal, i totes elles inhibeixen la degradació en hepatòcits en un 70-80%. Aquesta constància indica que s'havia arribat a una inhibició completa de la fun-

ció lisosomal. La degradació restant seria la no relacionada amb els lisosomes.

La natura d'aquesta via no lisosomal és desconeguda, però possiblement és la suma de les activitats de totes les proteases no lisosomals de la cèl.lula. La dificultat d'estudiar aquesta via és la falta d'inhibidors específics. Els principals són:

- Leupeptina i antipaina: inhibeixen en un 80-85% la degradació lisosomal i en un 15% la no lisosomal.

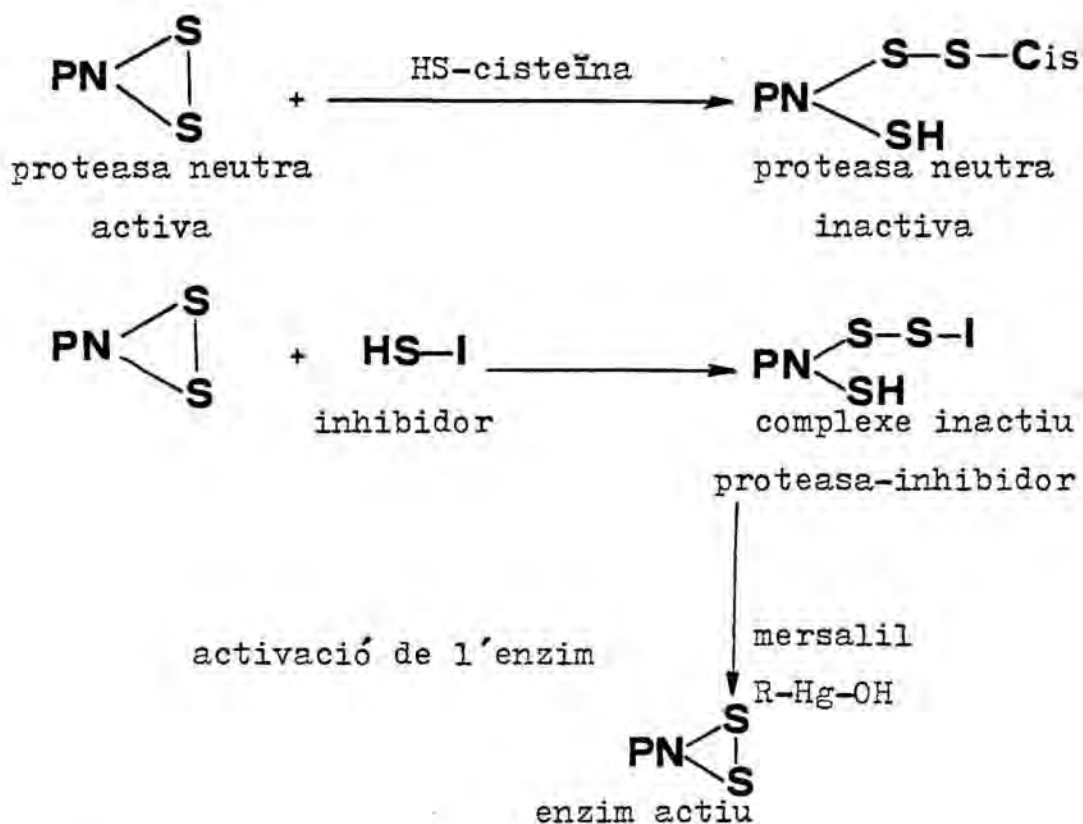
- Quimostatina: inhibeix en un 45% la degradació lisosomal i en un 50% la no lisosomal.

El mecanisme dels inhibidors citoplasmàtics és desconegut. L'únic cas descrit en que s'ha arribat a l'elucidació del mecanisme és el d'una proteasa neutra i el seu inhibidor, que s'ha localitzat en cèl.lules del tumor d'Ehrlich. La proteasa es troba a la fracció granular, mentre que l'inhibidor és citoplasmàtic.

Steven i col. (90) van demostrar que es forma un complex proteasa-inhibidor. La proteasa inactivada pot ésser activada per dos mecanismes:

- Agents oxidants de grups tiol, com el mersalil.
- Tripsina o altres proteases.

Segons aquests autors la proteasa latent no es troba en forma de zimògen, sinó que el procés d'inhibició i activació és el següent:



La tripsina activa a la proteasa destruint l'inhibidor.
 Possiblement, el cas de la col.lagenasa sigui el mateix,
 encara que no estigui demostrat.

1.3. SEPARACIÓ SUBCEL·LULAR.

1.3.1. FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR MITJANCANT CENTRIFUGACIÓ.

Si les partícules es diferencien en densitat o coeficient de sedimentació es podran separar per centrifugació. Cal recordar, però, que pot haver entre dues cèl·lules o orgànuls del mateix tipus variacions considerables en densitat i mida, de manera que la densitat o el coeficient de sedimentació d'un tipus de partícula són, en realitat, un promig.

El disseny de les condicions per a la separació de les partícules un art que una ciència i poden existir diferents aproximacions vàlides. És a dir, es poden intentar tres tipus de separació per centrifugació (56):

a) Centrifugació zonal i diferencial: diferències en la mida de la partícula.

b) Centrifugació isopícnica: diferències en la densitat.

c) Ús de gradients complexos que aprofiten al mateix temps les diferències en densitat i mida.

Els valors de densitat o el coeficient de sedimentació d'una partícula no es poden extrapolar d'un teixit a l'altre i, a més, com veurem més endavant, la densitat aparent d'una partícula dependrà molt del medi en que es dugui a terme la separació.

S'hauran també d'escollir els marcadors de cada tipus d'orgànuls de la mostra. és a dir, aquells enzims que es tro-

ben únicament en un sol tipus d'òrganul de les cèl·lules d'un teixit donat.

Si les partícules són idèntiques en coeficient de sedimentació i densitat, no podran ésser separades directament per centrifugació. En alguns casos, la solució del problema pot ésser modificar la densitat o la mida d'algun dels components.

1.3.1.1. CENTRIFUGACIÓ DIFERENCIAL.

Es basa en que les partícules es mouen a una velocitat determinada per la seva forma i la seva mida sota la influència de la força centrífuga.

El tub s'omple amb una suspensió homogènia de les partícules i, durant la centrifugació, aquestes es mouen cap al fons del tub on sedimenten. Idealment, la centrifugació dura fins que han sedimentat totes les partícules de mida més gran, de manera que s'obté un pellet d'aquestes partícules i un sobrenedant lliure d'elles. Aquest sobrenedant es centrifuga a velocitats més altes per obtenir les partícules més petites. Desgraciadament, els pellets que s'obtenen no són homogènis i la puresa de les preparacions així obtingudes dependrà de les diferències existents en les seves respectives velocitats de sedimentació.

La separació aconseguida per aquest mètode pot ésser millorada mitjançant el rentat dels pellets.

En realitat, per aquest mètode s'arriba a la separació de les 5 fraccions descrites per De Duve i col. a l'any 1955 en teixit hepàtic: nuclis, mitocòndries, lisosomes, microsomes i citoplasma.

1.3.1.2. CENTRIFUGACIÓ ZONAL.

Aquesta tècnica va ésser proposada en primer lloc per Brakke a l'any 1951. És, en essència, molt senzilla: un petit volum de la suspensió a separar es diposita sobre un gradient de densitat preformat molt suau, que serveix per estabilitzar la sedimentació de les partícules. La seva missió és anular l'efecte de convecció, de manera que, en centrifugar, el front de sedimentació format per el moviment de les molècules sigui el més estable possible.

Durant la centrifugació, les partícules es mouen amb velocitats que dependran, per una banda, de la seva forma i mida i, per l'altra, de la força centrífuga. Al final, les partícules es trobaran en una sèrie de bandes d'acord amb la seva velocitat de sedimentació relàtiva. La distància entre la banda i el punt d'aplicació de la mostra serà proporcional al coeficient de sedimentació del component que forma la banda. Això permet calcular els coeficients de sedimentació amb gran precisió, ja que la interacció entre partícules diferents és mínima.

La densitat de la part inferior del gradient ha d'ésser més petita que la densitat de les partícules més lleugeres de la mostra per a evitar el bandejament isopícnic de les partícules menys denses i aconseguir que les bandes formades esdeguin només a la velocitat de sedimentació de les diverses partícules.

1.3.1.3. CENTRIFUGACIÓ ISOPÍCNICA.

Les partícules subcel·lulars poden diferenciar-se tam-

bé en densitat, com ho va demostrar Harvey ja a l'any 1931. Aquest investigador treballava amb cèl.lules senceres: si una suspensió de cèl.lules vives és dipositada sobre una suspensió de densitat major que les cèl.lules i centrifugada, les cèl.lules bandejen i apareixen separades en diferents capes. Aquesta separació no és letal per a les cèl.lules, però si s'augmentava la velocitat de sedimentació les cèl.lules es trencaven i els nuclis s'associaven amb la fracció més densa.

La majoria de les primeres preparacions van ésser fetes senzillament suspenent les partícules en un líquid de densitat definida i centrifugant. Les partícules més denses que el medi sedimentaven, i les menys denses suraven. Aquesta tècnica era molt tediosa, especialment en el cas de que es volguessin separar més d'un tipus d'òrgànuls.

Per aquesta raó, investigadors posteriors van desenvolupar la tècnica de centrifugació isopícnica: Meselson i col. a l'any 1957 i De Duve i col. a l'any 1959.

En aquest tipus de separació, una suspensió de les partícules a separar és dipositada sobre un gradient de densitat, o bé resuspeses en el medi que formarà el gradient. Durant la centrifugació, les partícules descendiran o bé ascendiran fins a trobar un líquid de la seva pròpia densitat.

Com que es treballa en un medi líquid, la massa aparent de la partícula serà la diferència entre la seva massa real i la força ascensional que provoca el líquid que l'envolta. Quan s'arriba a l'equilibri, les partícules no tenen massa i per tant, no es mouen, encara que augmenti el temps de centrifugació. D'aquesta manera, les partícules poden ésser

recuperades en una sèrie de bandes, corresponents a les densitats de cadascuna.

Aquesta tècnica ha estat molt emprada en separacions biològiques. Malgrat la seva efectivitat, té un desavantatge: les partícules, en ésser exposades a altes concentracions del medi de gradient, poden experimentar diversos danys i donar lloc a l'aparició de bandes extres corresponents a les partícules no intactes.

La centrifugació isopícnica s'aplica normalment a dos tipus de problemes: el fraccionament de cèl.lules i orgànuls, i el de macromolècules.

La forma d'un gradient per a un solut determinat depen de la geometria de la centrífuga i de la força centrífuga aplicada. Segons aquests dos conceptes, es formen gradients més plans en rotors fixes que en basculants i, quan més gran és la força centrífuga, més pendent és el gradient. En aquest sentit, podem dir que quan més alta és la velocitat de centrifugació, més fines són les bandes, més pendent és el gradient i més gran és el risc de danyar els orgànuls degut a l'increment de la pressió hidrostàtica.

1.3.1.4. DENSITAT DE LES PARTICULES EN UN MEDI DE GRADIENT.

El medi en el qual tingui lloc el fraccionament produirà efectes, reversibles normalment, que afectaran tant a la velocitat de sedimentació com a la densitat de les partícules a separar.

El medi pot influir tant en la densitat com en la forma i mida de la partícula. És difícil conèixer com influeix en la forma, però els estudis dels canvis en la densitat

està més a l'abast de l'investigador.

En el cas de les partícules subcel·lulars complexes, aquestes es poden considerar com formades per tres compartiments: Un d'ells serà el que agrupa tot el material sòlid de la partícula, incluint les molècules d'aigua fermament unides a ella. El segon compartiment representa l'àrea de la partícula que és permeable a l'aigua, però no al material de gradient, i que permetrà l'entrada d'aigua fins a igualar la pressió osmòtica externa. El tercer compartiment és aquell permeable a l'aigua, però també al medi de gradient i per tant la seva densitat serà igual a la del medi on estigui resuspesa la partícula.

L'entrada del medi de gradient dins de la partícula es traduirà com un increment de la seva densitat aparent. Beaufay i col. van establir una sèrie d'equacions matemàtiques destinades a predir les densitats dels orgànuls en solucions de sacarosa de diversa densitat. Per tant, es dedueix que la densitat de la partícula canviarà considerablement segons la naturalesa i densitat del medi.

El tercer compartiment, és a dir, aquell que és permeable al medi, no té influència en el comportament de la partícula, ja que és com si aquesta estigués rodejada de medi de gradient. Una partícula en la qual el segon compartiment no existís, es comportaria en una separació isopícnica de manera dependent només de la fracció sòlida. És el cas de partícules totalment permeables.

De tota manera, els orgànuls més complexes no són totalment permeables i el seu comportament en un gradient de densitat dependrà de la seva permeabilitat al medi. Com a conseqüència d'aquest fet, en medis diferents la mateixa par-

tícula es comportarà de forma diferent segons si el medi és capaç de penetrar dintre d'ella o no. En general, un solut de pes molecular baix serà capaç de travessar millor les barreres cel·lulars que un de pes molecular alt, i incrementarà en major proporció la densitat relativa de la partícula, la qual bandejarà aleshores a densitats més altes. És, per exemple, el cas dels ribosomes, que, en gradients de sacarosa (P.m. = 342) bandegen a $d=1,43$, mentre que en Metrizamida (P.m. = 742) ho fan a $d=1,26$. Un altre cas és el nostre: els grànuls depolimorfonuclears presenten en sacarosa una $d=1,20$ i en gradients de Ludox una $d=1,05$.

En resum, la densitat aparent d'un orgànul dependrà de dos factors: la natura de l'orgànul, és a dir, la fracció que representin el 1^{er} i 2^{on} compartiment, i de la natura del medi de gradient.

1.3.1.5. ARTEFACTES.

En la centrifugació diferencial els danys a les partícules són pocs, perquè una partícula movent-se a velocitat uniforme no sofreix cap força neta actuant damunt d'ella, però la situació en la centrifugació isopícnica és més perillosa. Una partícula no uniforme suspesa en un medi líquid de la seva pròpia densitat mitja està sotmesa a forces considerables.

Els problemes més importants són:

-Danys causats per la sedimentació: és el cas d'una partícula en l'interior d'un pellet. En el cas de la centrifugació isopícnica no és d'interés.

-Danys causats per pressions hidrostàtiques altes: de-

gut a aquest fet, s'ha de tenir certa precaució en la interpretació de resultats en separacions portades a terme sota camps centrífugd molt alts.

-Danys causats per l'altaconcentració del medi de gradient: la sacarosa forma solucions d'alta pressió osmòtica i penetra en les membranes biològiques, per la qual cosa pot danyar les estructures més organitzades. El risc més petit correspon als soluts d'alt pes molecular com el Ludox, que no penetren en les membranes i exerceixen una pressió osmòtica molt baixa.

1.3.1.6. SOLUTS PER A GRADIENTS DE DENSITAT.

El criteri per a un medi ideal és (Hartman 1974):

- Cobrir l'interval de densitats adequat per a la separació en qüestió.

- Formar solucions de baixa viscositat que no afectin el normal comportament dels components de la mostra.

- Posseir alguna propietat, com l'índex de refracció, que permeti seguir al llarg del gradient la seva concentració, i, per tant, la densitat.

- No danyar el material biològic.

- Ésser fàcilment separable de les fraccions o bé no interferir en els assaigs a realitzar.

Els soluts existents es poden dividir en:

a) Sals de metalls alcalins: s'utilitzen només per a separar macromolècules com DNA, RNA, cromatina, ribosomes, lipoproteïnes, etc.

b) Molècules orgàniques hidrofíliques petites: La

sacarosa és el més important d'aquest tipus de compostos, ja que forma solucions de densitats molt àmplies, de poc efecte sobre els enllaços intermoleculars i té un preu a l'abast de tothom.

Els inconvenients més grans, són, en primer lloc, que normalment està impurificada per material biològic i s'ha de sotmetre a un tractament adequat i, en segon lloc, que la sacarosa a altes concentracions inhibeix certs enzims i pot danyar a estructures complexes com les mitocondries.

c) Compostos orgànics d'alt pes molecular: Els més importants són el Ficoll, el glicògen, l'albúmina, etc.

d) Altres tipus de soluts: Els gradients de Ludox seran discutits més endavant, ja que han sigut els emprats en aquest treball. Un altre solut important és la Metrizamida, una molècula covalent que forma solucions de tonicitat baixa. S'ha fet servir per a separar materials tan diversos com ribonucleoproteïnes i cèl.lules hepàtiques, ja que no és citotòxic.

1.3.1.7. EL LUDOX COM A MATERIAL PER A GRADIENTS DE DENSITAT.

El Ludox és sílica col.loidal estabilitzada amb sodi. Estracta d'una suspensió aquosa de partícules col.loidals formades per la polimerització de l'àcid monisilícic, obtingut a partir de SiO_2 dissol en aigua.

La a l'any 1968, Pertoft i col. (57) van establir l'aplicabilitat de les solucions de sílica en centrifugació en gradients de densitat en una investigació sistemàtica de les condicions adients per a la separació de cèl.lules, virus i altres partícules. Les aplicacions eren, però, li-

mitades pels efectes tòxics de la sílica. Van ésser aleshores descrits mètodes per evitar aquest efectes afegint polímers (dextrà, polietilenglicol, polivinilpirrolidona), que queden adsorbits sobre la superfície de les partícules de sílica i enmascaren d'aquesta manera la seva toxicitat.

El Ludox recobrt per una capa de polivinilpirrolidona (PVP) té moltes propietats que el fan adient per a les separacions isopícniques de cèl.lules i partícules subcel.lulars. L'ús de Ludox-PVP té molts avantatges sobre l'ús de Ludox sol: és més estable, té osmolalitat més baixa i no presenta toxicitat cap a les cèl.lules.

El Ludox-PVP presenta els següents avantatges sobre altres materials formadors de gradients: (50)

- Osmolalitat molt baixa: això fa possible treballar amb gradients isoosmòtics i completament ajustats a les condicions fisiològiques, degut a que el Ludox no interfereix amb les condicions del medi.

El Ludox es pot emprar dissolt en NaCl 0,9% o bé en sacarosa 0,25 M, de manera que les solucions obtingudes tindran la densitat desitjada degut al Ludox, i l'osmolalitat que requeria sense que hi hagin interferències entre els components del medi.

- Viscositat baixa: això permet l'ús de gradients fins 1,2 gr/ml. La viscositat és funció de la froça iònica i és més baixa en solució salina 0,9% que en aigua o sacarosa 0,25 M. Això fa que la formació del gradient sigui més ràpida en solució salina que en sacarosa sota les mateixes condicions.

- No és tòxic i permet la separació de cèl.lules sense pèrdua de viabilitat.

- És impermeable a les membranes biològiques, per la qual cosa les partícules es comporten segons la seva pròpia densitat. A més, és fàcilment eliminable de les fraccions.

- Formació espontània de gradients durant la centrifugació: al revés que molts altres materials, les solucions de Ludox són mòbils i formen gradients en temps de centrifugació curts. La mida de les partícules és prou gran perquè formi gradients a velocitats moderades. Això permet també barrejar directament la mostra amb el medi de gradient. És a dir, no és necessària la preparació de gradients preformats ja que el mateix solut es distribueix durant la centrifugació per formar el gradient. Com que extracta d'un col·loïd polidispers, les partícules de sílica sedimentaran a diferent velocitat i crearan un gradient de pendent molt suau, de manera que l'anàlisi per microscopia electrònica d'un gradient mostra que el material del fons del tub està enriquit en les partícules més grans. Els gradients de Ludox són metaestables, és a dir, canvien continuament durant la centrifugació. La centrifugació prolongada condueix a que la sílica sedimenti i formi un pellet dur al fons del tub.

Els factors que afecten a la forma del gradient són:

- Quan el Ludox està diluït amb NaCl 0,9% formarà un gradient més ràpidament que l'equivalent en sacarosa 0,25 M, degut a que la velocitat de sedimentació en solució salina és més ràpida ja que la viscositat és més baixa.

- Centrifugació i temps estan relacionats de manera que la forma del gradient ve determinada per el producte $g \times \text{min}$.

- La geometria del rotor i la mida del tub també te-

nen influència, de manera que, a mesura que l'àngul format pel tub i l'eix vertical del rotor es va fent més petit, el gradient es forma més rapidament.

- La concentració inicial de Ludox té un petit efecte sobre la forma del gradient, però la seva influència és marcada en la densitat del gradient.

Actualment existeix en el mercat un producte anomenat "Percoll" (Pharmacia), compost de partícules de sílica recobertes amb PVP.

1.3.1.8. APLICACIONS DELS GRADIENTS DE DENSITAT.

Les aplicacions dels gradients de densitat són realment innumbrables i han abarcat tot tipus de material biològic. Podem anomenar separacions de cèl.lules vives, orgànuls cel.lulars, components subcel.lulars de vegetals i bacteris, ribonucleoproteïnes, cromatina, àcids nucleics, proteïnes, lipoproteïnes, virus, etc.

Els pioners dels estudis de fraccionament cel.lular van ésser, sens dubte, C. de Duve i H. Beaufay. A la dècada de 1950 van publicar nombrosos treballs, ja clàssics, sobre la localització subcel.lular d'enzims que fins aleshores es consideraven associats a altres orgànuls. Així, de Duve a l'any 1959 va demostrar l'existència dels lisosomes com un grup separat de partícules diferents a les mitocòndries i suggeria que enzims com l'urat oxidasa o la catalasa podien pertanyer a una altra població de partícules, els anomenats peroxisomes (59, 60).

Un altre treball a destacar treballant ja amb Ludox-PVP (i no amb Percoll) és la purificació de lisosomes de cè-

l.lules HeLa per Wolff i Pertoft (61). Aquest treball és un estudi sistemàtic de la separació aconseguida de lisosomes i mitocòndries d'aquestes cèl.lules en gradients de Ludox-PVP en solucions de diferent densitat inicial i en diferents tipus de rotors.

Existeixen també nombrosos estudis de subfraccionament de diferents orgànuls per demostrar la seva heterogeneïtat. Entre ells, per la seva relació amb els temes que toquem en aquest treball, destaca el treball de Pertoft i col. (50) que van estudiar les relacions metabòliques que existeixen entre els lisosomes de fetge de rata i van demostrar que els lisosomes podien ésser dividits en una fracció lleugera ($d=1,06$ gr/ml) i una fracció pesada ($d=1,09$ gr/ml).

Quasi com a curiositat per a destacar fins a on arriben els estudis en aquest camp, val la pena senyalar un treball de Leighton i col. (62) en què es descriu un procediment per fraccionament subcel.lular que es portat a terme en absència de qualsevol diluent. L'homogenat de fetge de rata és sotmés directament a ultracentrifugació a 19000 rpm durant 15 hores. Amb aquest procés, els components de l'homogenat gradualment s'estratifiquen i formen un gradient de densitat continu. Els components queden aleshores en un ambient semblant al cel.lular i no són exposats a dilucions, rentats i canvis osmòtics inherents al fraccionament en medis artificials. Els autors donen a aquest sistema el nom de "gradient citoplasmàtic" degut a què és aquest el medi en que té lloc la separació. Els resultats són relativament positius: aconseguixen una certa resolució analítica dels pics però les distribucions són àmplies i es solapen.

1.3.2. SUBFRACCIONAMENT CEL·LULAR DE POLIMORFONUCLEARS.

1.3.2.1. GRÀNULS DE POLIMORFONUCLEARS.

El subfraccionament de PMN inclou l'homogenització de les cèl·lules. La centrifugació a 500-600xg dóna lloc al sediment corresponent a nuclis i cèl·lules sense trencar. La posterior centrifugació del sobrenedant a 27000xg sedimenta grànuls i mitocòndries.

Així, l'anomenada fracció granular conté en realitat mitocòndries i grànuls. Les mitocòndries són escases en relació als grànuls, però importants en quant al seu metabolisme.

Aquesta fracció està enriquida en hidrolases àcides, fosfatasa àcida, lisozima i peroxidasa. La presència d'aquests enzims, juntament amb la latència que presenten, permeten identificar els grànuls com similars als lisosomes.

Bainton i Farquhar (91) van descriure dos tipus de grànuls en PMN de conill, que procedeixen de diferents estadis de diferenciació i s'originen en parts diferents de l'aparell de Golgi:

- Azuròfils (o primaris): més grans, més densos, i formats durant l'estadi promielocític.

- Específics (o secundaris): formats durant l'estadi mielocític.

Wetzel, a l'any 1967. (91), va descriure un tercer tipus de grànuls: els terciaris. Aquest autor localitzava la fosfatasa àcida en els grànuls azuròfils i la fosfatasa alcalina en els específics, encara que per a altres autors,

la localització de la fosfatasa àcida és menys específica.

Proves histoquímiques mostren que la composició enzimàtica dels grànuls en PMN de conill és:

- Azuròfils: fosfatasa àcida, 5'-nucleotidasa, aril-sulfatases, peroxidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, etc.

- Específics: fosfatasa alcalina, altres autors descriuen també que contenen fosfatasa àcida, etc.

A l'any 1969, Baggiolini i col. (92) van aïllar quatre poblacions de components subcel·lulars de PMN de conill.

A) Grànuls azuròfils: contenen del 50-90% de diverses proteases àcides, per la qual cosa es poden qualificar com a lisosomes. També contenen peroxidasa, part de la lisozi-ma i alguns agents bactericides no identificats.

B) Grànuls específics: contenen fosfatasa alcalina, 2/3 de la lisozi-ma, lactoferrina i altres agents bactericides. No poden ésser considerats com a lisosomes, ja que no posseeixen hidrolases àcides.

C) Grànuls terciaris o partícules C: són menys densos. Contenen hidrolases àcides i formen possiblement una segona població de lisosomes.

D) Vesícules buides de baixa densitat: contenen la p-nitrofenilfosfatasa àcida tiol-dependent, què és l'activitat fosfatasa àcida no associada als lisosomes en PMN. L'origen citològic resta desconegut.

Bretz i Baggiolini van fer un estudi sobre la caracterització bioquímica i morfològica dels grànuls azuròfils i específics de leucòcits PMN humans (93).

Aquests grànuls presenten característiques semblants

als de conill, en quant a la formació i propietats citoquímiques, però difereixen en forma, mida i densitat electrònica.

Els autors aconseguixen el sufraccionament dels dos tipus de grànuls per sedimentació zonal en un rotor de titani B-XIV. El rotor s'omplia i es buidava mentre girava a 2000 rpm. La sedimentació es portava a terme a diferents velocitats de rotació durant 15 minuts (94).

L'altre sistema era per equilibració isopícnica en gradients de sacarosa en un rotor Beaufay. El rotor era omplert i buidat mentre girava entre 2000 i 5000 rpm. L'equilibri s'aconsegua centrifugant a 30000 rpm durant 2 hores (95).

Aquests dos sistemes els hi permetien una bona resolució dels dos tipus de grànuls. A més, caracteritzaven parcialment dos fraccions més: una subpoblació de lisosomes i una fracció membranosa.

Aquestes 4 fraccions eren:

- Grànuls azuròfils: són els més grans i densos, la seva velocitat de sedimentació és 3-4 vegades la dels grànuls específics i la seva densitat modal en sacarosa és 1,23 gr/ml.

Contenen tota la peroxidasa, gran part de les hidrolases lisosomals i la meitat de la lisozima present. És a dir, tenen una composició molt semblant als grànuls de PMN de conill. En les dues espècies poden ésser considerats com una classe de lisosomes primaris que contenen agents microbicides a més dels enzims digestius característics.

Les micrografies electròniques de les fraccions més pures mostren que són partícules de forma oval, amb una única membrana i una matriu uniforme. Entre les partícules in-

tactes s'observen restes de glicogen i material amorf, que possiblement prové del contingut dels grànuls.

Spitznagel i col. (96) descriuen que poden ésser fraccionats en dues subpoblacions: una contindria majoritàriament les hidrolases i fosfatasa àcida i l'altre seria més rica en peroxidasa, lisozima i una proteasa neutra no identificada.

- Grànuls específics: són més petits, menys densos i aparentment de forma més complexa que els azuròfils. La seva densitat modal en sacarosa és 1,19 gr/ml.

Contenen la meitat de la lisozima, però cap altra de les activitats pròpies dels grànuls azuròfils. A més, semblen desprovists de fosfatasa alcalina, al revés que els grànuls provinents de PMN de conill.

La resolució de la fosfatasa alcalina i la lisozima és pràcticament completa pels dos mètodes de separació (centrifugació zonal i isopícnica). Aquest resultat no coincideix amb certes conclusions propugnades per altres autors, a partir d'estudis bioquímics i citoquímics en els que la fosfatasa alcalina es localitza en cisternes provinents de l'aparell de Golgi (97).

Les micrografies electròniques de les fraccions més pures mostren unes partícules rodones, elipsoidals o allargades, amb membrana única i una matriu uniforme i menys densa.

- Petits lisosomes: els autors els identifiquen com les partícules C dels grànuls de PMN de conill. Contenen hidrolases àcides.

- Fracció de membrana: està caracteritzada per con-

tenir la fosfatasa àcida tiol-dependent no lisosomal, com en els PMN de conill, i la fosfatasa alcalina. Corresponen a la fracció menys densa.

Les micrografies electròniques mostren gran nombre de vesícules buides, de mida petita i forma generalment rodona. Mostren també contaminació per mitocòndries, el que demostra que els PMN tenen densitat més baixa que els grànuls. Probablement, l'origen d'aquestes vesícules vé de diferents compartiments membranosos de la cèl.lula, però especialment del plasmalema.

Avila i Convit (98) van portar a terme una sèrie d'estudis sota diferents condicions experimentals per a intentar determinar les propietats físiques dels grànuls azuròfils i específics humans.

Tant els grànuls azuròfils com els específics presenten la latència característica de l'estructura dels lisosomes (98). Els grànuls de leucòcits PMN humans i de conill d'Índies són molt sensibles al Tritó X-100, ja que els enzims mostren la màxima activitat quan els orgànuls són tractats amb un 0,01% del detergent, mentre que els lisosomes de fetge i medul.la òssia requereixen com a mínim una concentració del 0,04 i 0,03% de Tritó X-100 respectivament per a obtenir una activació total. Tant els azuròfils com els específics mostren un comportament semblant.

Els autors suggereixen per als grànuls específics una estructura similar a la dels lisosomes, però amb algunes característiques pròpies. Al mateix temps, els dos tipus de grànuls presenten un comportament semblant, la qual cosa indica una similaritat química entre ells. Aquest fet pot do-

nar una explicació bioquímica de la participació d'ambdós tipus de grànuls en el procés fagocític, en el qual tots dos tendeixen a fusionar-se amb el fagosoma.

Els grànula azuròfils presenten gran semblança amb els lisosomes: són susceptibles al trencament per òsmosi i són sensibles a tractaments que afecten la integritat de les lipoproteïnes de la membrana (detergents, congelació-descongelació).

Per la seva banda, els grànuls específics també mostren similituds amb els lisosomes: són també activats per detergents, congelació-descongelació i trencament mecànic, però es caracteritzen per el seu requeriment d'un medi iònic per a mantenir la integritat de la membrana. A més, són permeables a la sacarosa i són afectats per una pressió osmòtica alta, mentre que els grànuls azuròfils són impermeables a la sacarosa i no són afectats per una pressió osmòtica elevada. Cal dir, però, que els autors consideraven com a marcador dels grànuls específics a la fosfatasa alcalina, enzim que altres autors consideren que no està present en aquests tipus de grànuls en PMN humans.

Es creu que els grànuls específics són, doncs, estructures rodejades per una membrana impermeable als substrats. En algunes condicions, es comporten de manera diferent als grànuls azuròfils i això suggereix una composició bioquímica diferent. Aquests resultats potser són deguts al fet de que els grànuls azuròfils provenen de la cara còncava de l'aparell de Golgi i s'originen durant l'estadi de promielocit, mentre que els grànuls específics s'originen més tard, durant l'estadi de mielocit, a partir de la cara convexa de l'aparell de Golgi. La persistència dels dos tipus

de grànuls en els PMN madurs, juntament amb la seva dotació enzimàtica diferent, suggereix que tenen funcions independents (93).

La localització de la fosfatasa alcalina en PMN humans és molt controvertida. En PMN de conill està localitzada en els grànuls específics, però en PMN humans, els resultats són contradictoris:

- Com hem vist, Bretz i Baggiolini (93) postulen que està associada amb membranes, bé en l'interior o l'exterior de les vesícules que contenen també la fosfatsa àcida no lisosomal. Els PMN de conill contenen també un petit pic de fosfatasa alcalina extragranular (a més del corresponent als grànuls específics), que podria identificar-se com la mateixa fracció membranosa present en els PMN humans. Segons aquests autors, la fosfatasa alcalina de PMN humans no presenta latència sota l'acció de diversos detergents.

- Aquests resultats es contradiuen amb els d'Avila i col. (98) que troben que la latència de la fosfatasa alcalina en PMN humans és quasi tan evident com la de les hidrolases àcides i per tant, es trobaria a l'interior d'un orgànul, siguin o no els grànuls específics i no associada a estructures membranoses.

- Per últim, un recent treball de Smith i col. (99) localitza la fosfatasa alcalina en un orgànul nou de funció desconeguda: el fosfasoma.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. REACTIUS UTILITZATS

Els reactius usats en aquest treball van ésser sumministrats per les següents firmes comercials:

"Sigma Chemical Co"

AMP, ATP, glicerol, PPO, DTT, EDTA, EGTA, BSA, PMSF, G-1-P, G-6-P, UDPG, Micrococcus lysodeikticus, p-nitrofenil- β -D-glucurònid, STI, dextrà.

"Merck"

Polivinilpirròlidona, Tris, sulfat amònic, acetat magnèsic, sulfat cúpric, reactiu de Folin-Ciocalteu, glicerofosfat sòdic, tartrat sòdic-potàsic, àcid tricloroacètic, DCPIP, guaiacol.

"Carlo Erba"

Succinat sòdic

"Whatman"

DEAE-cel.lulosa (DE-32)

Paper de filtre 31ET

"Pharmacia Fine Chemicals"

Sepharose 4B

"Dupont"

Ludox HS-40

2.2. SEPARACIÓ DE LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS.

2.2.1. FONTS D'OBTENCIÓ DE LEUCÒCITS.

La sang humana es va obtenir de les sagnies portades a terme en malalts poliglobulinèmics i generosament cedida per l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

La poliglobulinèmia és una malaltia caracteritzada per l'augment del nombre d'eritròcits en sang, fins arribar àdhuc a valors de $6-10 \cdot 10^6$ eritròcits/mm³. En aquests malalts, els leucòcits són normals. El tractament que s'efectua a aquests pacients inclou sagnies de 1-1,5 l. en un mes, de manera que cada vegada se'ls extreu 400-500 ml. Nosaltres vam aprofitar aquesta sang, que es recollia sobre EDTA 200 mg/ml a pH 7,8 com anticoagulant, i que era traslladada al laboratori, on era separada tot seguit.

La sang de porc la vam obtenir de l'Escorxador Municipal de Barcelona. En el moment del sacrifici de l'animal, es recollia la sang que sortia per la jugular en ampolles de vidre que contenien 15 ml d'EDTA de la mateixa concentració que anteriorment. Era traslladada directament al laboratori on es procedia a la separació de les fraccions leucòcitàries.

La sang de pacients leucèmics s'obtenia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona. Es recollien uns 30 ml de sang que era transportada en fred al laboratori. En els casos en què la velocitat de sedimentació no era prou elevada, es procedia a realitzar una sedimentació sobre dextrà. Del sobrenedant obtingut, es separaven els leucòcits totals.

Com a norma, mai es barrejaven les sangs de dues persones

o de dos animals, a fi d'evitar reaccions serològiques que conduïssin a l'agregació.

2.2.2. SEPARACIÓ DE LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS.

El primer pas de la separació és l'obtenció d'un plasma ric en leucòcits totals.

Això es feia deixant reposar la sang en provetes com més estretes millor. Degut a les diferències entre les cèl·lules, els eritròcits sedimenten al final del tub, els leucòcits en una fina capa sobre aquells i en la part superior queda el plasma. Es recollia aleshores el plasma per succió mitjançant una pipeta connectada a un "quitasato".

En els casos en que es requeria una sedimentació ràpida, s'afegia a la sang una solució de Dextrà (P.m. 250.000) al 5% en NaCl 150 mM pH 7,4 en una proporció dextrà:sang de 1:6. El dextrà és un polímer de D-glucosa sintetitzat per diverses espècies de bacteris, especialment el Leuconostoc mesenteroides, en fer-lo créixer en un medi en sacarosa.

La funció del dextrà és afavorir l'aglomeració dels eritròcits, amb la qual cosa augmenta la seva velocitat de sedimentació i l'obtenció d'un plasma ric en leucòcits i relativament pobre en eritròcits s'assoleix de forma més ràpida. El sobrenedant obtingut contenia pràcticament tots els leucòcits i les plaquetes de la sang.

El sobrenedant obtingut es centrifugava a $170 \times g$ durant 5 minuts en una centrifuga MSE-Mistral (900-1000 rpm). En el sobrenedant d'aquesta centrifugació quedaven els limfòcits, que eren separats per a d'altres estudis que es duen a terme en el laboratori. El sediment contenia els polimorfonuclears, contaminats encara per gran nombre d'eritròcits.

Aquests s'eliminaven mitjançant un rentat amb solució salina hipotònica (NaCl 0,3%) en la qual es resuspensia el sediment de PMN, de manera que els eritròcits es lisaven mentre que les cèl.lules blanques són més resistents al tractament. El temps de contacte de les cèl.lules amb la solució hipotònica no devia excedir els 2-3 minuts. Si per causa del procés de separació, era necessari que romangués més temps, s'hi afegia igual volum de solució salina hipertònica (NaCl 1,5%), de manera que resultés una solució isotònica que no perjudicés la viabilitat de les cèl.lules. Els polimorfonuclears es recollien per centrifugació a 1000 rpm durant 5 minuts, amb la qual cosa els eritròcits lisats quedaven al sobrenedant.

L'operació es repetia 3 ò 4 vegades fina a eliminar la contaminació procedent dels eritròcits.

Així s'obtenia un sediment de polimorfonuclears d'elevada puresa i viabilitat.

Totes les operacions descrites fins ara es portaven a terme a temperatura ambient.

En el cas de sang de pacients leucèmics, es separaven els leucòcits totals, ja que, segons el tipus de leucèmia, la major part dels leucòcits pertanyien al mateix grup de cèl.lules. La separació es feia a partir del sobrenedant mitjançant 2 ò 3 centrifugacions a 1500 rpm durant 10 minuts i rentats amb solució salina hipotònica.

2.2.3. OBTENCIÓ DEL PELLET DE 27.000 x g.

El sediment de polimorfonuclears obtingut a l'apartat anterior es resuspensia en tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8 (10 ml de tampó/litre de sang) i s'homogeneïtzava mitjançant 10

ò 15 cops amb un homogeneïtzador Potter-Elvehjem manejat elèctricament.

L'homogeneïtzat es centrifugava a $600 \times g$ durant 10 minuts a 0°C en una centrífuga MSE-Mistral (1700 rpm). El sediment contenia la fracció nucleada, membranes i cèl.lules no trencades. El sobrenedant obtingut es centrifugava a $27000 \times g$ durant 15 minuts en una centrífuga Sorvall (15.000 rpm) a 4°C .

Mitjan çant aquest procés s'obtenia el sediment de $27000 \times g$, que contenia la fracció granular i mitocondrial i que era el punt de partida dels nostres estudis.

2.2.4. TÈCNIQUES HEMATOLÒGIQUES.

Els comptatges leucocitaris s'efectuaven de la següent manera:

La mostra es diluïa 1/20 amb líquid de Turck, el qual trenca els eritròcits i tenyeix lleugerament de blau els leucòcits. Si era necessària una dilució més elevada, la mostra es diluïa prèviament amb NaCl 0,9%.

La mostra colorejada es col.locava per capilaritat entre el portaobjectes i el cobreobjectes d'una càmera de Neubauer. Es comptaven aleshores les cèl.lules presents en els 16 quadres d'un dels quadrants en què és dividida la càmera. Es sumaven i el resultat es multiplicava per 10 per a obtenir el nombre de cèl.lules / mm^3 , ja que les mides de cada quadrant són $1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm}$. Es multiplicava per les dilucions fetes prèviament i s'obtenia, d'aquesta manera, el nombre de leucòcits/ mm^3 de la mostra.

2.3. MÈTODES DE PURIFICACIÓ D'ENZIMS.

2.3.1. PURIFICACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA.

La glicogen sintasa de múscul de conill ha estat purificada segons el mètode de Smith i col.laboradors (10), modificat per Takeda i col.

Extracció: Es sacrificaven 5 conills mitjançant un cop a la part posterior del cap i dessagnament per secció de la jugular. El múscul procedent dels lloms i potes posteriors dels conills s'extreia amb rapidesa i es col.locava seguidament en gel. Després de pesar-lo, s'addicionava per cada quilo de múscul, 2 l. d'una solució composta de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM pH 7,8 i s'homogeneïtzava en un triturador tipus Waring Blender durant 30 segona a baixa velocitat i 60 segons a velocitat mitjana.

L'homogeneïtzat es centrifugava durant 30 minuts a 9000 rpm en un rotor GSA d'una centrífuga Sorvall. El sobrenedant procedent de la centrifugació es filtrava a través de llana de vidre.

Precipitació amb etanol: El sobrenedant filtrat es baixava a la temperatura de 0-1°C amb un bany de gel i sal, agitant per tal de no arribar a la congelació. Tot seguit s'addicionava etanol del 96% fins a tenir una cincentració final del 30%. Es vital un control extremat de la temperatura, de manera que aquesta no superi els 4°C durant l'operació. En aquest procés precipita el glicogen, juntament amb tots els enzims associats amb ell, incloent la glicogen sintasa. Posteriorment es centrifugava durant 10 minuts a 9000 rpm a -20 °C.

Conversió a forma I: El precipitat que s'obté es resuspèn, utilitzant un homogeneïtzador de vidre/tefló submergit en gel, amb una solució de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, Na₂SO₄ 2 mM, mercaptoetanol 50 mM pH 6,8 fins a un volum final entre 800-1000 ml.

Un cop homogeneïtzat s'hi afegeix glicogen de fetge de conill a una concentració final de 0,25 mg/ml.

La suspensió és aleshores dialitzada durant 6 hores contra 8 l. de l'anterior solució, exceptuant el glicogen, amb un canvi de tampó a les 3 hores.

Després d'aquest procés, s'ajusta el pH de la solució, amb una solució de la mateixa composició que l'anterior, ajustada a pH 8,5. És molt important no parar-se en aquest punt. Després d'aquesta operació, la glicogen sintasa ha d'ésser al 100% en forma I.

Seguidament es fa una incubació a 30°C durant 45 minuts i es centrifuga a 9000 rpm durant 20 minuts per retirar els grumolls proteics formats.

Cromatografia en DEAE-cel.lulosa: L'origen i preparació del DEAE-cel.lulosa són molt crítics. El sobrenedant de l'última centrifugació s'aplica a la columna (4,5 cm de diàmetre x 45 cm d'alçaria), prèviament equilibrada, a una velocitat de 60 ml/hora. Posteriorment es renta amb uns 800 ml d'una solució de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, Na₂SO₄ 2 mM, mercaptoetanol 50 mM pH 7,8 a la velocitat de 60 ml/hora. Es continua amb un rentat amb la mateixa solució més NaCl 0,12 M a la velocitat de 100-120 ml/hora fins que tota l'activitat fosforilasa hagi estat eluïda. El volum d'aquest rentat és de 6 ò 7 l.

S'elueix l'enzim amb la mateixa solució a la qual s'ha

afegit NaCl 0,25 M a la velocitat de 100-120 ml/hora. A la solució eluïda de la columna amb activitat glicogen sintasa s'afegeix glicogen fins a una concentració final de 0,25 mg/ml.

Precipitació amb etanol: Un cop freda, entre 0-1°C, a la fracció procedent de la columna de DEAE-cel·lulosa s'hi adicionava etanol del 96% fins a una concentració final del 15%, sense que la temperatura no pugi mai dels 2°C. Després de 10 minuts amb agitació, es centrifugava durant 30 minuts a 9000 rpm a -10°C.

El precipitat obtingut es resuspèn en una solució de Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, Na₂SO₄ 2 mM, mercaptoetanol 50 mM pH 7,8 mitjançant un homogeneïtzador de vidre/tefló. Posteriorment es tornava a precipitar amb etanol exactament igual que com s'ha explicat i es centrifugava a -20°C a 9000 rpm durant 30 minuts.

Es resuspenia el precipitat amb 10-15 ml. de la mateixa solució a pH 6,8 més 25% de glicerol a temperatura ambient. Posteriorment es dialitzava a temperatura ambient contra 500 ml de la mateixa solució durant 1 hora.

Digestió amb amilasa: Aquest procés es fa amb α -amilasa purificada de saliva humana (veure apartat 2.3.4.). La relació emprada és 1:1 en pes de proteïna. La digestió es prolonga durant 1 dia i mig com a mínim, canviant el tampó a les 6 hores i, després, cada 12 hores.

A mesura que avança el procés s'aprecia un canvi en la viscositat de la suspensió, de manera que es veu un aclariment progressiu. Al mateix temps apareix un precipitat, que s'elimina un cop acabada la diàlisi mitjançant una centrifugació a 2000 rpm durant 15-20 minuts.

Cromatografia en Sepharosa 4B: La suspensió que procedia de la diàlisi es concentrava fins a uns 3 ml. S'aplicava a una columna de Sepharosa 4B (2,6 x 40 cm) que havia estat equilibrada amb una solució de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, Na₂SO₄ 2 mM, mercaptoetanol 50 mM pH 7,8 més 25 % de glicerol. S'elueïa la mostra amb el mateix tampó a una velocitat de 12 ml/hora i es recollien fraccions de 3 ml.

Es mesurava l'activitat de les fraccions i el seu contingut en proteïna. S'agrupaven les fraccions de més activitat i es concentraven fins a uns 2 ml. Aquesta última part es feia a temperatura ambient.

La solució enzimàtica obtinguda tenia una activitat de 11,5 U/ml.

2.3.2. PURIFICACIÓ DE LA GLICOGEN FOSFORILASA.

El mètode seguit per a preparar glicogen fosforilasa b a partir de múscul de conill és una adaptació del mètode proposat per Fischer i Krebs l'any 1958 (101).

Aquest mètode està dissenyat de manera que s'obtinguin rendiments alts i que l'enzim es trobi en la forma b, és a dir, en la forma dependent del nucleòtid cAMP.

Extracció: El múscul procedent dels lloms i de les potes posteriors de 4 conills s'extreïa ràpidament i es col·locava en gel. Seguidament se li afegia 2 l. de solució Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, PMSF 0,5 mM, mercaptoetanol 50 mM a pH 7,0.

S'homogeneïtzava seguidament en un triturador tipus Waring Blender durant 30 segons a baixa velocitat i 1 minut a velocitat mitjana. L'homogeneïtzat es centrifugava a 4°C durant 30 minuts a 9000 rpm en un rotor GS3 d'una centrífuga

Sorvall. El sobrenedant procedent de la centrifugació es filtrava a través de llana de vidre i s'obtenia aleshores l'extracte cru.

Els sediments obtinguts es maceraven amb aigua destil·lada en una relació 1:2 en pes/volum. La maceració es realitzava a temperatura ambient durant 45 minuts, remenant sovint per a facilitar l'extracció de l'enzim. A continuació es tornava a centrifugar la suspensió a 4°C a 9000 rpm durant 30 minuts. El sobrenedant obtingut, després d'éser filtrat, era afegit a l'extracte cru obtingut prèviament.

Precipitació àcida: L'extracte cru en fred es portava fins a pH 5,1 amb una solució d'àcid acètic 1 M. La solució així tractada es deixava reposar uns 5 minuts en gel i es centrifugava a 8500 rpm durant 20 minuts en un rotor GSA d'una centrífuga Sorvall. El sobrenedant obtingut es filtrava a través de paper i s'ajustava ràpidament fins a Ph 6,8 mitjançant l'addició de bicarbonat potàssic sòlid.

Precipitació amb $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: A la solució obtinguda pel procediment anterior s'afegia una solució de 475 gr/l. de sulfat amònic a pH 6,8 a raó de 700 ml. de solució per litre d'extracte. La mescla es deixava refredar a 4°C durant tota la nit. El precipitat obtingut es recollia per centrifugació a 8500 rpm durant 20 minuts i es dissolia ens uns 100-120 ml. d'una solució de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 amb un canvi de tampó.

Tractament a pH elevat: Un cop dialitzada la solució i comprovat que no conté sulfat, s'ajustava fins a pH 8,8 amb una solució de Tris 2 M. Aquesta mescla s'incubava durant 1 h. a 37°C. Després es tornava a ajustar acuradament a pH 7,0 amb àcid acètic 1 N, després d'haver refredat la solució amb gel.

Seguidament es centrifugava a 15000 rpm durant 15 minuts

per enretirar el lleuger precipitat que apareixia.

Cristal·lització i liofilització: Per a aconseguir la cristal·lització de la glicogen fosforilasa b s'afegia a la solució neutra i freda obtinguda a l'apartat anterior 1/100 volums d'una solució d'AMP 0,1 M i la mateixa quantitat d'acetat magnèsic 1 M, ambdues solucions a Ph 7,0.

Seguidament es refredava la mescla a 0°C i es deixava reposar en fred per a aconseguir que cristal·litzés l'enzim. Normalment al dia següent apareixien al fons del vas uns cristalls d'aspecte lletós, els quals es recollien per centrifugació a 0°C a 15000 rpm durant 15 minuts i es dissolien en Tris-HCl 1 mM pH 7,0 a 30°C. Es tornava a afegir AMP i acetat magnèsic de manera que quedessin a una concentració final de 1 i 10 mM respectivament. La solució es refreda a 0°C per a aconseguir la segona cristal·lització.

La recrystal·lització podia repetir-se diverses vegades (normalment 3 ò 4). Després de separar el cristalls de la última cristal·lització per centrifugació, es liofilitzaven en un aparell Cryobloc, provist d'una bomba de buit Torricelli.

Abans de la darrera cristal·lització calia fer una mesura de proteïna mesurant l'absorbància a 280 nm, ja que es coneix el coeficient d'extinció molar de l'enzim.

Un cop liofilitzats, els cristalls es conservaven en tubs ben tapats i amb dessecació a -30°C. En aquestes condicions mantenien la seva activitat durant mesos.

Amb aquest mètode vam obtenir 1800 mg. d'enzim liofilitzat a partir de 1600 g. de múscul.

2.3.3. PURIFICACIÓ DE LA GLICOGEN FOSFORILASA QUINASA.

La fosforilasa quinasa de múscul de conill ha estat purificada segons el mètode de Cohen (102) modificació de Brostrom (103).

Extracció: El múscul de dos conills procedent exclusivament dels lloms i les potes del darrera s'extreïa amb rapidesa i es dipositava seguidament en gel per fi d'evitar la contracció nerviosa.

Després de pesar-lo, s'homogeneïtzava amb 2,5 volums d'una solució d'EDTA 4 mM a pH 7,0 en un triturador Waring Blender durant 30 segons a baixa velocitat, 30 segons a mitjana i 30 segons a alta.

L'homogeneïtzat es centrifugava a 6500 rpm durant 45 minuts en el rotor GS 3 d'una centrífuga Sorvall i es decantava el sobrenedant per llana de vidre, amb la qual cosa s'obtenia l'extracte cru.

Precipitació àcida: La solució anterior s'acidulava amb àcid acètic 1 M fins a un cert grau d'enterboliment. Aquest es controlava prenent mostres de la suspensió amb una pipeta de 10 ml. i mirant la visibilitat dels números per la cara oposada de la pipeta. S'acidulava fins que els números no eren visibles, cosa que ocorria entre pH 5,5-5,6.

S'esperava 5 minuts i es centrifugava a 6500 rpm durant 40 minuts en el rotor GS 3 de la centrífuga Sorvall. El sediment es resuspensia en 45 ml. (1/3) d'una solució de β -glicerofosfat 100 mM, EDTA 4 mM, mercaptoetanol 30 mM pH 8,2 fent servir un homogeneïtzador de mà. Després es diluïa fins 120 ml. (2/3) amb β -glicerofosfat 50 mM, EDTA 2 mM, mercaptoetanol 30 mM pH 6,8.

Ultracentrifugació: La suspensió anterior es centrifugava a $78000 \times g$ (35000 rpm en el rotor 40 d'una ultracentrífuga Spinco L2) durant 120 minuts, decantant-se després cuidadosament el sobrenedant a través de llana de vidre.

Precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Al sobrenedant de la ultracentrifugació anterior s'afegia lentament la meitat del seu volum d'una solució de 475 gr/l. de sulfat amònic a pH 7,0. Una vegada afegit, es deixava reposar la suspensió 10 minuts en bany de gel i es centrifugava durant 10 minuts a 8500 rpm en un rotor GSA d'una centrífuga Sorvall.

El precipitat es resuspensia en un petit volum (2-4 ml.) de β -glicerofosfat 50 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM pH 6,8 i es dialitzava durant 1 hora contra 100 volums de la solució anterior com a mínim i amb un canvi de tampó als 30 minuts.

Un cop eliminat el sulfat per diàlisi, es centrifugava en una centrífuga Eppendorf (1500 rpm 2 minuts), obtenint-se una solució enzimàtica concentrada apta per a ésser purificada per filtració en gel.

Filtració en gel: El sobrenedant de la centrifugació s'aplicava a una columna de Sepharosa 4B (2,6 cm \times 40 cm), equilibrada amb β -glicerofosfat 50 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM pH 6,8, eluint-se a continuació amb aquest tampó a una velocitat de 12 ml/h. i recollint-se fraccions de 2 ml. Aquestes fraccions eren assajades per a determinar la seva activitat fosforilasa quinasa i fosforilasa.

Les fraccions que contenien fosforilasa quinasa, però no presentaven activitat fosforilasa, es reunien i concentraven per diàlisi al buit. La solució concentrada es dialitzava tota la nit enfront d'una solució de β -glicerofosfat 50 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM pH 6,8 més 10 % de glicerol i es guardava con-

gelada a -30°C .

S'obtenia d'aquesta manera una preparació d'aproximadament 2 mg/ml.

2.3.4. PURIFICACIÓ D' α -AMILASA SALIVAR HUMANA.

L' α -amilasa emprada en la purificació de la glicogen sintasa era purificada per un mètode anàleg al descrit per Bernfeld a l'any 1955 (104).

Recolecció de saliva: La saliva es recollia en uns pots que contenien un parell de gotes de n-octanol con antiescumant. La saliva obtinguda (uns 500 ml.) es centrifugava a 5000 rpm durant 30 minuts per a clarificar-la. El sobrenedant de la centrifugació es flitrava a través de llana de vidre i es conservava a 4°C .

— A partir d'aquest moment totes les operacions descrites es portaven a terme a 4°C .

Primer fraccionament amb acetona: Al flitrat del pas anterior s'afegia acetona lentament fina a arribar a una concentració final del 45%. L'addició es feia a una velocitat de 21 ml/min. El precipitat s'eliminava després de deixar reposar la mescla durant 15 minuts, mitjançant una centrifugació a 3000 rpm durant 15 minuts.

Es recollia el sobrenedant i se li afegia acetona fins a una concentració final del 75%. La velocitat d'addició era de 32 ml/min i el procés es feia amb agitació continua. Posteriorment es deixava reposar la mescla durant 15 minuts. Es tornava a centrifugar a 10000 rpm durant 15 minuts. El sobrenedant obtingut es recollia i es dissolia en uns 200 ml d'una solució d'acetat sòdic 0,07 M.

Segon fraccionament amb acetona: Es repetia exactament el procés anterior, excepte que les velocitats d'addició eren de 12 ml/ min i de 16 ml/min, respectivament.

El precipitat obtingut finalment es dissolia en uns 150 ml d'acetat sòdic 0,07 M.

Primera precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: S'afegia a la solució anterior sulfat amònic saturat i ajustat a pH 8,0. La concentració final havia d'ésser del 45,5%. S'agitava suaument durant 30 minuts i es separava el precipitat per centrifugació a 20000 rpm durant 20 minuts. El precipitat obtingut es dissolia en 50 ml d'una solució d'acetat sòdic 0,07 M.

Segona precipitació amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: La solució anterior es portava fins a una concentració final del 40% de sulfat amònic amb una solució saturada d'aquesta sal ajustada a pH 8,0. Es deixava agitant lentament durant 30 minuts i es centrifugava a 20000 rpm durant 30 minuts. El precipitat es dissolia en 20 ml d'acetat sòdic 0,2 M.

Tercera precipitació amb acetona: La solució anterior s'ajustava a pH 7,0 amb NaOH. Seguidament se li afegia acetona fins a una concentració final del 75% a una velocitat de 10,5 ml/min. El precipitat obtingut es recollia per centrifugació a 20000 rpm durant 15 minuts i es dissolia en 50 ml. d'aigua destil.lada. El propòsit d'aquest pas era eliminar el sulfat, el qual es queda en el sobrenedant.

Quarta precipitació amb acetona: A la solució anterior s'hi afegia acetona fins a una concentració final del 75% a una velocitat de 10,5 ml/min. El precipitat es recollia per centrifugació a 20000 rpm durant 15 minuts, i es dissolia en uns 5 ml d'una solució d'acetat sòdic 0,07 M a pH 8,4. És molt

important que el pH no sigui superior, ja que el pH final de la solució ha d'estar entre 8,0-8,4.

Cristal.lització: La solució anterior es col.locava en gel i es deixava cristal.litzar. Si això succeïa, es recollien els cristalls i es resuspenien en acetat sòdic 0,07 M. Es conservava congelada en fraccions a -30°C .

La preparació obtinguda per nosaltres tenia una riquesa de 1000 U/ml.

2.3.5. PURIFICACIÓ PARCIAL DE LA PROTEASA.

El sediment de 27000 xg obtingut a l'apartat 2.2.3 es resuspenia en un petit volum d'una solució de Tris-HCl 50 mM pH 7,8 i es sotmetia a un procés de congelació-descongelació tres vegades.

Seguidament es tornava a centrifugar a 27000 xg durant 15 minuts i el sobrenedant era l'extracte del qual partíem per començar la purificació. Els pellets d'aquesta centrifugació es resuspenien en la mateixa solució de Tris-HCl 50 mM pH 7,8 i es conservaven congelats. Es podien tornar a aprofitat en una posterior purificació, puix que encara conservaven part de la seva activitat proteasa.

El procés de purificació al qual es sotmetia a la proteasa constava d'un pas de cromatografia d'afinitat a través d'una columna de Sepharosa 4B acoblada amb l'inhibidor de lla-vor de soja de la tripsina (Soybean Trypsin Inhibitor, que abreviarem com STI).

La columna media 1x15 cm i estava prèviament equilibrada amb tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8. L'elució de l'extracte de polimorfonuclears dipositat a la columna es realitzava mitjançant un fraccionament a diferents pH amb la qual cosa eluïen

les proteïnes en diferents pics:

Primerament es feia un rentat de la columna amb el mateix tampó d'equilibrat i s'eluien totes aquelles proteïnes que no tenien cap afinitat per l'inhibidor de la tripsina. Normalment aquesta fracció no tenia activitat proteasa.

En segon lloc, es feia passar una solució de citrat sòdic 0,1 M a pH 6,0, que feia sortir un petit pic de proteïna. En altres purificacions aquest pas no es feia i es passava directament al següent.

Després es passava una solució d'acetat sòdic 0,1 M amb NaCl 0,1 M i pH 4,0. Amb aquest tractament sortia un tercer pic de proteïna, que ja tenia activitat proteasa.

Per últim es feia passar per la columna una solució de tampó acetat sòdic 0,1 M pH 3,0, amb la qual cosa sortia un altre pic de proteïna, que contenia la major part d'activitat proteasa.

La sortida dels pics de proteïna de la columna de cromatografia es feia llegint l'absorbència a 280 nm de les fraccions eluïdes. L'activitat de la proteasa es seguia mesurant la seva activitat sobre glicogen sintasa i sobre fosforilasa quinasa. Els resultats mostraven que ambdues activitats eluien juntes en aquest pas de purificació.

Abans de concentrar les fraccions que mostraven activitat, es tornava a ajustar el pH de la solució fins a pH 7,8.

Acoblament de la Sepharosa 4B amb l'inhibidor de soja per la tripsina:

El primer pas era l'activació de la Sepharosa 4B amb BrCN: es rentava bé la Sepharosa 4B amb aigua i es col.locava en un vas de precipitats amb un agitador magnètic. Se li afegia un volum igual d'aigua i es col.locava a l'interior del vas l'e-

lectrode del pHmetre. Seguidament s'afegia el BrCN finament dividit. La reacció es mantenia a pH 11 amb NaOH i de manera que la temperatura no superés els 20°C mitjançant l'aplicació exterior de gel. La reacció durava aproximadament 10-15 minuts i, quan el pH es mantenia ja constant, s'afegia gran quantitat de gel d'aigua destil·lada en el vas i es rentava la Sepharosa amb abundant tampó fred.

S'afegia aleshores ràpidament igual volum de Soybean Trypsin Inhibitor en tampó de NaHCO₃ 0,1 M pH 9,5 (20 mg STI/ml de Sepharosa). La mescla es deixava a 4°C en agitació suau i continua durant 16-20 hores. Finalment es rentava amb aigua i posteriorment amb tampó.

2.4. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES.

2.4.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLICOGEN SINTASA.

L'activitat de l'enzim glicogen sintasa ha estat mesurada mitjançant la incorporació de radioactivitat al glicogen, a partir de UDP-C¹⁴-glucosa, seguint el mètode descrit per Thomas i col.

La solució d'assaig conté UDP-C¹⁴-glucosa 6,6 mM, glicogen 10 mg/ml, EDTA 5 mM, Na₂SO₄ 10 mM i Tris-HCl 50 mM pH 7,8. La radioactivitat específica oscil.lava entre 100000 i 200000 cpm/ μ mol UDPG. Amb aquesta solució s'assajava l'activitat de la forma I, independent de glucosa-6-fosfat. El Na₂SO₄ és una conegut activador de la forma I de la glicogen sintasa.

Per a la realització de l'assaig es seguia el següent esquema operatiu: Sobre 40 μ l. de la mescla d'assaig descrita s'hi afegien 20 μ l. de la mostra a assajar i es deixava incubar a 30°C durant 20 minuts, temps en el qual es transformava com a màxim el 10% del substrat. En aquestes condicions la reacció era linial.

Per aturar la reacció es prenen 50 μ l. de la mescla i es dipositaven sobre un quadrat de 2x2 cm de paper de filtre Whatman, tipus 31ET, que tot seguit era submergit en etanol al 66% fred. Aquest procés fa precipitar el glicogen, que queda dipositat sobre el paper de filtre. Els restants components, especialment l'UDP-C¹⁴-glucosa no incorporat al glicogen, són eliminats mitjançant tres rentats succesius en etanol al 66% durant 30, 110 i 10 minuts. Els papers eren després submergits durant 3 ò 4 minuts en acetona per facilitar

l'assecat. Aquest es feia mercès una estufa de butà. Un cop secs, cada paper era introduït en un vial amb toluè-PPO al 0,5% com líquid de centelleig i es mesurava la radioactivitat incorporada en cada cas mitjançant un comptador de centelleig líquid, model Isocap/300 (Nuclear Chicago).

L'activitat glicogen sintasa es defineix com μ mols d'UDPG incorporats al glicogen per minut i per ml., és a dir:

$$U/ml = \frac{40 \cdot c}{R \cdot t}$$

c = cpm de l'assaig.

R = radioactivitat específica de la mescla d'assaig.

t = temps d'incubació.

L'activitat específica es defineix com μ mols d'UDPG incorporats per minut i mg. de proteïna, és a dir:

$$A.E. = \frac{40 \cdot c}{R \cdot t \cdot P}$$

P = proteïna de la mostra en mg/ml.

2.4.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFORILASA b.

L'activitat de l'enzim glicogen fosforilasa era mesurada per la incorporació de C^{14} -glucosa al glicogen a partir de C^{14} -glucosa-1-fosfat, segons el mètode descrit per Gilboe i col. (105).

La solució d'assaig conté: C^{14} -glucosa-1-fosfat 150 mM, glicogen 20 mg/ml i tampó de maleat sòdic 0,1 M a pH 6,5. La radioactivitat específica de la mescla oscil.lava de 2500 a 3500 cpm/ μ mol de glucosa-1-P.

Per la realització de l'assaig es procedia de la manera següent: A 40 μ l. de la mescla d'assaig s'hi afegien 20 μ l.

de la mostra. S'incubaven a 30°C durant el temps necessari perquè es transformés com a màxim el 10% del substrat present a la mescla d'assaig (15 minuts en el nostre cas). Passat el temps d'incubació, es treien 50 μ l. i es dipositaven sobre un paper de 2x2 cm Whatman tipus 3LET i es submergia en etanol del 66% fred. Els rentats, assecat i comptatge dels papers es portaven a terme de manera idèntica a la de l'assaig de glicogen sintasa.

L'activitat fosforilasa b es defineix com μ mols de glucosa-1-fosfat incorporats al glicogen per minut i per ml., és a dir:

$$U/ml = \frac{40 \cdot c}{R \cdot t}$$

c = cpm de l'assaig.

R = radioactivitat específica de la mescla d'assaig.

t = temps d'incubació.

L'activitat específica es defineix com μ mols de G-1-P incorporats per minut i mg. de proteïna, és a dir:

$$A.E. = \frac{40 \cdot c}{R \cdot t \cdot P}$$

P = proteïna de la mostra en mg/ml.

2.4.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFORILASA QUINASA.

L'activitat de l'enzim fosforilasa quinasa va ésser mesurada per dos mètodes:

a) Mètode descrit per Cohen (106): es basa en mesurar l'increment d'activitat de l'enzim fosforilasa b degut a l'acció de la fosforilasa quinasa. La mescla d'assaig conté fos-

forilasa b 4,7 mg/ml diluïda en β -glicerofosfat 50 mM, EDTA 2 mM pH 7,0 amb mercaptoetanol 5 mM, CaCl_2 0,37 mM, ATP 3 mM, MgCl_2 10 mM i tampó Tris-HCl 53,3 mM a pH 6,8 ò 8,6 segons l'assaig que s'efectués.

Per a la realització de l'assaig es seguia el següent esquema operatiu: sobre 75 μ l. de la mescla d'assaig descrita s'afegien 10 μ l. de la mostra a assajar i s'incubava a 30°C durant 15 minuts, temps durant el qual la reacció era linial.

Acabat el temps d'incubació, es prenen 10 μ l. de la mescla i es dipositaven en 400 μ l. de maleat sòdic 0,1 M - albúmina bovina 0,1% a pH 6,5 per diluir l'enzim.

La dilució esmentada s'assajava per activitat fosforilasa en ausència d'AMP tal com s'ha descrit en l'apartat 2.4.2.

b) Mètode descrit per Huang i col.(107): es basa en la incorporació de P^{32} a l'enzim fosforilasa b per acció de la fosforilasa quinasa. La mescla d'assaig conté: fosforilasa b 6 mg/ml, Tris-HCl 56 mM, β -glicerofosfat 56 mM pH 6,8, CaCl_2 0,28 mM, MgAc_2 14 mM, ATP 4,2 mM i (γ - P^{32}) ATP necessari per a obtenir 2×10^6 cpm/tub.

L'assaig a pH 8,6 era idèntic, excepte en el que pertoca al tampó, que en aquest cas era de Tris-HCl 56 mM pH 8,6.

Per a la realització de l'assaig es procedia de la següent manera: 20 μ l. de la mostra a assajar s'incubaven juntament amb 50 μ l. de la mescla d'assaig a 30°C durant 15 minuts, període durant el qual la reacció era linial.

Acabat el temps d'incubació, es separava el (γ - P^{32}) ATP que no havia reaccionat de la proteïna fosforilada mitjançant una cromatografia ascendent en paper ITLC, tipus SG.

Aquest paper estava tallat en tires de 1,5x10 cm i s'hi disposaven a 1,5 cm de la base 10 μ l. de TCA al 20% i, seguidament, alíquotes de 20 μ l. de la mescla de reacció. Les tires es col·locaven en un recipient que contenia una solució de KCl 0,2 M en TCA al 5% com a líquid cromatogràfic. El TCA precipitava la proteïna i el KCl facilitava la separació del (γ - P^{32}) ATP lliure, que pujava amb el front.

Un cop desenvolupada la cromatografia ascendent, els papers s'assecaven sota una estufa de butà. Seguidament es tallava un tros de 2,5 cm de cada tira (1,5 cm per sobre i 1,0 cm per sota del punt d'aplicació de la mostra) i s'introduïa en un vial que contenia 10 ml de toluè-PPO al 0,5% com a líquid de centelleig. La radioactivitat era mesurada amb un comptador de centelleig líquid, model Isocap/300 (Nuclear Chicago).

Les unitats de fosforilasa quinasa es defineixen com μ mols de fosforilasa b monòmer convertides en fosforilasa a monòmer per minut.

L'activitat específica de la fosforilasa a, en ausència d'AMP, es va considerar com 54 U/mg prot, i el pes molecular del monòmer de glicogen fosforilasa com 90000. D'aquesta manera es pot passar fàcilment d'unitats de fosforilasa a a mols de monòmer segons la fórmula:

$$\mu \text{ mols/min} = \frac{U}{\text{min}} \frac{1 \text{ mg}}{54 U} \frac{1 \text{ mol}}{90 \text{ mg}} = \frac{U/\text{min}}{4860 U/\mu \text{ mol}}$$

essent: μ mols/min les unitats d'activitat fosforilasa quinasa i U les unitats de fosforilasa a.

L'activitat específica de la fosforilasa b quinasa s'obtenia segons la fórmula següent:

$$A.E. = \mu \text{ mol/min/mg} = \frac{\mu \text{ mols/min}}{0,01 \text{ ml} \cdot P}$$

P = concentració en proteïna de la mostra (mg/ml).

2.4.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PROTEASA.

Es mesuren les variacions d'activitat glicogen sintasa i fosforilasa β quinasa en presència de la proteasa.

Determinació de l'activitat proteasa sobre glicogen sintasa.

Es tracta de mesurar la disminució d'activitat de la glicogen sintasa degut a l'acció de la proteasa. L'esquema operatiu a seguir és el següent: 50 μ l. de glicogen sintasa purificada forma I (1,5 mg proteïna/ml; 25 U/mg) i diluïda convenientment amb Tris-HCl 50 mM EDTA 1 mM pH 7,8 més glicogen 5 mg/ml, s'incuben amb 50 μ l. de la mostra a assajar a 30°C. A temps discrets es treuen alíquotes de 20 μ l. i es dipositen sobre 50 μ l. de tampó Tris-HCl 50 mM EDTA 1 mM pH 7,8 més glicogen 5 mg/ml més STI 1 mg/ml per a aturar la reacció. Posteriorment s'assaja l'activitat glicogen sintasa de cada punt afegint 30 μ l. de la solució sobre 60 μ l. del test glicogen sintasa I.

L'activitat proteasa es defineix com la disminució d'unitats de glicogen sintasa per minut i per ml.

Una unitat de proteasa és, doncs, la quantitat d'enzim necessari per inactivar una unitat de glicògen sintasa en les condicions descrites.

Determinació de l'activitat proteasa sobre fosforilasa β quinasa.

Es mesura l'increment d'activitat de la fosforilasa b quinasa degut a l'acció de la proteasa.

L'esquema operatiu a seguir és el següent: 10 μ l. de fosforilasa b quinasa purificada (1 mg/ml) s'incuben a 30 °C amb 50 μ l. de la mostra a assajar, prèviament diluïda si és necessari i 50 μ l. de tampó β -glicerofosfat 50 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM pH 6,8.

A temps determinats es treuen alíquotes de 10 μ l. i es dipositen sobre 200 μ l. de tampó β -glicerofosfat 125 mM; EDTA 2 mM, DTT 1 mM, BSA 1 mg/ml pH 6,8 més STI 1 mg/ml. Posteriorment, aquestes dilucions s'assajen per activitat fosforilasa quinasa, tal com s'indica a l'apartat 2.4.3.

L'activitat proteasa es defineix com l'increment d'unitats de fosforilasa b quinasa per minut i per ml.

Una unitat de proteasa és, doncs, la quantitat d'enzim necessari per incrementar en una unitat l'activitat de la fosforilasa quinasa en aquestes condicions.

2.4.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA ÀCIDA.

Encara que la fosfatasa àcida és de distribució cel·lular bastant ubiqua, es troba en concentracions elevades en els lisosomes. Per aquest fet i degut a la senzillesa de la tècnica i a la facilitat d'adquisició dels reactius necessaris per a portar-la a terme, vam fer servir la determinació d'aquesta activitat enzimàtica com a marcador lisosomal.

La fosfatasa àcida és un enzim d'àmplia especificitat sobre diversos substrats naturals i sintètics. La tècnica més usual i la seguida per nosaltres fa servir com a substrat el p-nitrofenilfosfat que, per acció de l'enzim, passa a p-nitrofenol, el qual, en medi alcalí, presenta un color groc

fàcilment mesurable.

La reacció és la següent:



la quantitat de p-nitrofenol alliberat és directament proporcional a l'activitat enzimàtica de la mostra.

Per l'assaig enzimàtic vam fer servir el "kit" comercialitzat per la casa Boehringer.

L'esquema operatiu a seguir és el següent: El substrat és una solució de p-nitrofenilfosfat sòdic 5,5 mM en tampó citrat/NaOH 50 mM pH 4,8.

Es col·locava a cada tub 250 μ l. de substrat i es deixava al bany a 30°C durant 3 ò 4 minuts a fi de que s'atemperés. S'afegia posteriorment 100 μ l. de la mostra a assajar i es deixava incubar a 30°C durant 30 minuts. La reacció s'aturava afegint 2,5 ml. de NaOH 0,02 N amb la qual cosa el p-nitrofenol format a la reacció virava d'incolòr a groc.

Simultàniament s'assajava un blanc amb medi de gradient en lloc de mostra, en el cas de que s'estigués assajant la distribució enzimàtica a través del gradient.

La reacció es seguia colorimètricament mesurant l'increment d'absorbància a 405 nm enfront del blanc.

Es va definir una unitat de fosfatasa àcida com el nombre de mmols de p-nitrofenol alliberats en 1 minut.

2.4.6. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT β -GLUCURONIDASA.

Aquest enzim, a diferència de la fosfatasa àcida, és exclusivament lisosomal i el va escollir per aquesta raó. Té un pH òptim àcid i es pot assajar de diverses formes. El mètode escollit per nosaltres fa servir p-nitrofenil- β -D-

glucurònid com a substrat, de manera que, sota l'acció de l'enzim, s'allibera p-nitrofenol en quantitat directament proporcional a l'activitat enzimàtica (108). El p-nitrofenol es mesura fotomètricament.

La tècnica operativa és la següent: En un tub es col·loquen 100 μ l. del substrat p-nitrofenil- β -D-glucurònid 40 mM, 150 μ l. de tampó acetat 100 mM pH 4,0, 50 μ l. d'aigua destil·lada i 200 μ l. de la mostra a assajar. Aquesta quantitat de mostra és l'adequada per a obtenir una activitat enzimàtica mesurable i podia variar segons l'activitat que presentés. S'agitava vigorosament i s'incubava a 30°C durant 2 hores.

Per aturar la reacció s'afegien 2 ml. d'una solució de glicina 0,2 M, SDS 0,2% pH 11,7 i 500 μ l. d'aigua destil·lada. S'agitava vigorosament i es deixava reposar durant 10 minuts. La reacció es seguia per fotometris a 420 nm., lleigint enfront d'un blanc d'aigua destil·lada.

Per calcular les activitats es feia una corba de calibració amb p-nitrofenol. Es preparaven concentracions creixents de p-nitrofenol des de 2,5 μ g./ml. fins a 50 μ g./ml. a les quals s'afegia 150 μ l. de tampó acetat 100 mM pH 4,0, aigua destil·lada, i, seguidament, 2 ml. d'una solució de glicina-SDS i 500 μ l. d'aigua destil·lada. S'agitava vigorosament, es deixava reposar durant 10 minuts i es llegia a 420 nm. S'obtenia d'aquesta manera una recta que permetia calcular el p-nitrofenol alliberat per la mostra problema a partir de la densitat òptica obtinguda.

L'activitat en unitats/l. es definia com el nombre de nmols de p-nitrofenol alliberats per minut i per ml. de mostra:

$$U/l = \frac{\text{nmols p-nitrofenol}}{t(\text{min}) \cdot \text{ml mostra}}$$

2.4.7. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT SUCCINAT DESHIDROGENASA.

La succinat deshidrogenasa actua en la cèl.lula en la reacció:

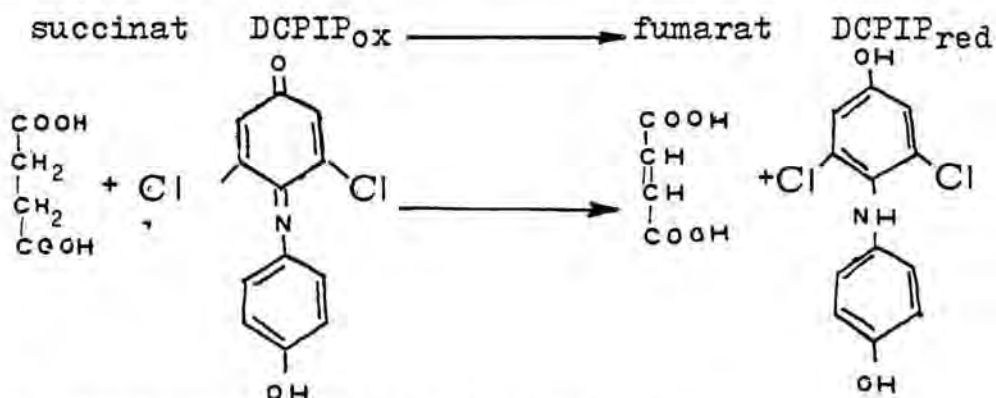


àcid succínic

àcid fumàric

Aquesta reacció pertany al cicle de Krebs i té lloc, tant, a la mitocòndria.

Hi han diversos mètodes per l'assaig d'aquesta activitat, però el que vam fer servir usa com a acceptor de protons un compost d'origen sintètic: el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). La reacció és la següent:



El mètode experimental és el següent:

El reactiu conté: K_2HPO_4 50 mM, KCN 1 mM, DCPIP 0,04 mM, succinat sòdic 20 mM a pH 7,6. L'assaig es realitzava segons el següent esquema: 3 ml. del reactiu es col.locaven en un tub i es deixaven al bany a 30°C durant 3-4 minuts a fi de que s'atemperessin. S'afegia 100 μl . de la mostra a assajar, s'agitava ràpidament i es deixava incubant el temps necessari per a que la reacció tingués lloc. En el nostre cas, les ac-

tivitats procedents del gradient eren baixes i vam allargar el temps d'incubació fins a 24 hores, si era necessari.

Per a aturar la reacció es submergien els tubs en gel i ràpidament es procedia a la lectura espectrofotomètrica a 600 nm. Com que el que es detecta és una pèrdua d'intensitat del color blau del reactiu, calia ajustar l'espectrofotòmetre a $A = 0,5$ amb el reactiu original i mesurar els decrements en cada cas.

Cada cop que es feia la reacció, es feien blancs amb el medi de gradient enlloc de mostra.

Es defineix una unitat de succinat deshidrogenasa com el nombre de μ mols de succinat sòdic oxidats en 1 minut, de manera que:

$$U/ml = \frac{\mu \text{ mols de succinat oxidat}}{\text{min} \cdot \text{ml}}$$

com que la reacció és 1 mol de succinat: 1 mol de DCPIP, podem dir que:

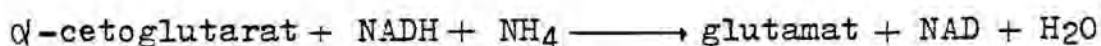
$$U/ml = \frac{\mu \text{ mols de DCPIP oxidat}}{\text{min} \cdot \text{ml}}$$

essent l'extinció molar del DCPIP $\epsilon = 16100$.

2.4.8. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLUTAMAT DESHIDROGENASA.

Es va fer servir per a aquest assaig el "kit" de "Laboratorios Knickerbocker S.A.E.", amb algunes modificacions en la tècnica operativa per a adaptar-lo a la mesura d'activitats més baixes que les normals en sèrum.

La glutamat deshidrogenasa catalitza la següent reacció:



la disminució de NADH en el medi és directament proporcional a l'actat glutamat deshidrogenasa present.

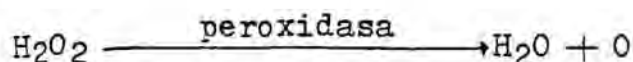
Liig és el següent:

La escla de reactiu conté: NADH 0,27 mM, ADP 1 mM, α -cetoglut 7 mM, EDTA 3 mM i NH_4Cl en tampó de trietanolamina 40 pH 8,0.

Sgeix a 1 ml de reactiu, 50 μ l. de la mostra a assajar i cuba a 30°C durant 1 hora. S'atura la reacció col·locant els tubs en gel i es llegeix ràpidament l'absorbància a 340 nm. fa servir un blanc amb medi de gradient en lloc de most

2.4.9. ERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PEROXIDASA.

La reacció implica l'oxidació del guaiacol (incolor) a un comp colorejat, oxidació que té lloc al produir-se la descomposició del peròxid d'hidrògen per acció de la peroxidasa:



La peroxidasa és un enzim de cinètica sigmoïdea i no segueix per tant, la de tipus Michaelis-Menten. Degut a aquest fet, l'assaig és una mica particular.

La escla de reacció conté guaiacol 20 mM en tampó fosfats 0,1M pH 7. A 1 ml. d'aquest reactiu, s'afegeix 100 μ l. de la mostra a assajar, s'enrasa el colorímetre a $A = 0,05$ ($A_{436 \text{ nm}}$), i esixa atemperar la cubeta a 30°C. Seguidament s'afegeix 10 μ l d' H_2O_2 12,3 mM i comença la reacció. Quan $A = 0,05$ s'engega el cronòmetre i, quan arriba a $A = 0,15$, es para, essent temps emprat inversament proporcional a l'activitat de la mostra.

En el cas dels gradients, només les fraccions més riques en peroxidasa es podien mesurar d'aquesta manera, ja que les demés tardaven molt temps en arribar a $A = 0,05$. Com que el que interessava era tenir activitats relatives i poder localitzar l'activitat en el gradient, en alguns casos es va substituir aquest mètode, massa llarg i lent, per una incubació a 30°C de 30 minuts, després de la qual es llegia l'absorbància a 436 nm, enfront d'un blanc que contenia medi de gradient enlloc de mostra.

2.4.10. DETERMINACIÓ DE LISOZIMA.

La lisozima és un enzim que contenen només certes cèl·lules especialitzades en la fagocitosi, com són els leucòcits polimorfonuclears i els macròfags.

L'acció de la lisozima és trencar el component polisacàrid de les parets cel·lulars d'alguns bacteris, amb la qual cosa, aquestes moren per no tenir un suport mecànic que les protegeixi. La lisozima hidrolitza específicament l'enllaç glucosídic entre l'àcid N-acetilmuràmic i la N-acetilglucosamina.

L'assaig es basa en fer servir com a substrat una suspensió de Micrococcus lysodeikticus, de manera que, a mida que actua la lisozima, disminueix l'absorbància mesurada a 450 nm (109, 110).

L'esquema operatiu a seguir és: A 1 ml. d'una suspensió de Micrococcus lysodeikticus de 0,2 mg/ml s'afegeixen $100 \mu\text{l}$. de la mostra a assajar i s'incuba a 30°C durant 2 hores. La reacció es para submergint els tubs en gel i llegint la disminució d'absorbància a 450 nm.

La suspensió substrat es prepara suspenent 10 mg del mi-

croorganisme en 5 ml. d'una solució de NaCl 0,9% i enrasant amb forta agitació fins a 50 ml. amb tampó fosfats 1/15 M a pH 7,0.

Per poder assajar aquesta activitat enzimàtica, va ésser necessari montar un gradient amb el doble de mostra de la que normalment es posava (és a dir, 4×10^9 cèl.lules), si no, no és detectava activitat.

2.4.11. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA ALCALINA.

La fosfatasa alcalina és un enzim d'àmplia especificitat sobre substrats naturals i sintètics, com la fosforilasa àcida, de la qual es diferencia en el seu pH òptim, que en aquest cas és bàsic.

No té localització lisosomal, sinò que se la descriu com a associada a moltes membranes. La seva localització en polimorfonuclears ha estat especialment controvertida, sense que els diferents autors es posin d'acord sobre aquest punt. (apartat

Malgrat aquest fet, vam voler assajar aquesta activitat en els nostres gradients.

L'esquema operatiu és semblant al de la fosfatasa àcida, encara que variant el pH de la reacció. Fem servir com a substrat p-nitrofenilfosfat sòdic, el qual és hidrolitzat amb la qual cosa s'allibera p-nitrofenol, compost colorejat a pH bàsic.

La tècnica a seguir és la següent: A 250 μ l. de p-nitrofenilfosfat sòdic 5,5 mM en tampó de glicina 50 mM, MgCl₂ 0,5 mM pH 10,5, s'afegeixen 50 μ l. de la mostra a assajar. S'incuba la reacció a 30°C durant 30 minuts i s'atura la reacció afegint 2,5 ml. de NaOH 0,02 M a cada tub.

Es llegeix l'absorbència a 405 nm enfront d'un blanc que conté medi de gradient enlloc de mostra.

2.4.12. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PROTEIN-QUINASA.

L'activitat protein-quinasa es va determinar en tots els casos pel mètode d'Huang, Robinson i col. Aquest mètode es basa en la determinació de la transferència del grup fosfat terminal de l'ATP marcat amb P^{32} a les proteïnes substrat i la separació de la proteïna fosforilada amb P^{32} de l'(γ - P^{32}) ATP lliure mitjançant precipitació àcida de les proteïnes i cromatografia en capa fina.

El medi de reacció contenia: β -glicerofosfat sòdic 25 mM a pH 7,0, DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,48 mM, acetat magnèsic 8 mM i (γ - P^{32})ATP 0,125 mM.

Per a la determinació de l'activitat protein-quinasa dependent d'AMP cíclic s'afegia AMP cíclic 0,02 mM.

La tècnica operativa era: Alíquotes de 40 μ l. de la mescla de reacció es col·locaven en un bany a 30°C. Un cop atemperats se'ls afegia 10 μ l. de la solució a assajar, s'agitava enèrgicament i s'incubaven durant un temps adequat per a que la reacció fos linial (uns 10 minuts).

La reacció s'aturava afegint 10 μ l. d'àcid acètic a cada tub i agitant enèrgicament.

La separació de l'(γ - P^{32})ATP de la proteïna fosforilada es feia mitjançant cromatografia ascendent en capa fina en paper ITLC, tal com s'ha indicat en l'apartat 2.4.3. per a l'activitat fosforilasa quinasa.

2.5. GRADIENTS DE DENSITAT.

2.5,1. DIÀLISI DEL LUDOX.

Per a aconseguir un bon recobriment de les partícules de sílica del Ludox per part de la polivinilpirrolidona cal emprar Ludox dialitzat a fi d'eliminar els ions sodi que estableixen la solució i deixar lliures els polímers d'àcid silícic, de càrrega neta negativa. Aquest interacciona bé amb la polivinilpirrolidona, de manera que aquesta pot envoltar les partícules de sílica.

La diàlisi es fa enfront de 20 volums d'aigua tridestil·lada durant 6 hores amb agitació continua i a temperatura ambient, canviant l'aigua a cada hora. Com a conseqüència, es formen sovint agregats que queden adherits a les parets del tub de diàlisi. En treure el Ludox del tub, cal no aprofitar aquests agregats, que podrien interferir en la formació del gradient.

Amb el temps, en les solucions de Ludox, es poden formar petits cristalls de sílica que poden ésser fàcilment eliminats mitjançant filtració a través d'un paper de filtre.

El problema amb el qual ens vam trobar és que mostres de Ludox provinents de diàlisis diferents, mostraven densitats diverses, degudes al diferent grau de dilució que havien sofert durant la diàlisi. Per aquesta raó, basar-se en el percentatge de Ludox en la preparació dels gradients va ésser insuficient i a cada diàlisi es va imposar la necessitat de fer un estudi del percentatge de Ludox equivalent a l'esperat en cada cas. Aquest estudi es feia comparant els respectius índexs de refracció i densitats.

2.5.2. PREPARACIÓ DE GRADIENTS DE LUDOX-PVP-NACl.

El medi estava compost de Ludox HS-40 dialitzat en la proporció desitjada i PVP al 3,75% (p/v).

Per a preparar el medi, es barrejava inicialment la PVP amb el volum de Ludox corresponent. S'agitava amb una vareta de vidre fins que quedava una solució homogènia i viscosa.

Després s'afegia la solució de NaCl al 0,9% fins a completar el volum final i s'homogeneïtzava la solució amb un agitador magnètic.

Aquesta solució té un pH de 9. Per últim, s'havia d'ajustar el pH a $\text{pH}=7,5 \pm 0,2$, per a respectar les condicions fisiològiques. Es feia servir HCl 1 N. En afegir l'àcid es formaven petits grumolls (més nombrosos quant més alta és la proporció de Ludox), que es dissolien ràpidament amb l'agitació.

En els experiments finals es van fer servir medis de gradient de densitat inicial 1,025 g/ml. i $i_r = 1,3440$, que s'obtenien amb un 8% de Ludox HS-40 (p/v), d'índex de refracció 1,3545.

Per el fraccionament de la mostra es va procedir, igual que en el cas de gradients de Ludox-PVP-sacarosa, resuspenent directament la mostra en el medi. Les condicions més idònies per a la separació van ésser 15000 rpm durant 75 minuts.

2.5.3. PREPARACIÓ DE GRADIENTS DE LUDOX-PVP-SACAROSA.

El medi es preparava a partir de Ludox HS-40 en la proporció adequada i volums iguals de sacarosa 0,48 M i aigua destil·lada. La preparació es feia barrejant els tres compo-

nents en el següent ordre: Ludox, aigua destil.lada i PVP al 10% en sacarosa 0,48 M. D'aquesta manera la sacarosa queda isosmòtica i la concentració final de FVP és aproximadament del 3,75%.

Se li afegia al medi EDTA (sal sòdica) fins a una concentració final del 0,1%, doncs està descrit que evita l'agregació (veure apartat 3.5.9.).

El pH d'aquesta solució és 9-9,5. Es baixa per addició de HCl 1 N fins a pH $7,5 \pm 0,2$. Es formen també petits grumolls que desapareixen amb l'agitació.

Per a la separació dels orgànuls, la mostra es resuspensionava directament en 9 ml. de medi de gradient. Les condicions de centrifugació que van ésser escollides finalment van ésser de 15000 rpm durant 90 minuts, degut a que els gradients amb sacarosa es formen més lentament que aquells que contenen NaCl.

2.5.4. MÈTODE D'OBTENCIÓ DE FRACCIONS A PARTIR DE GRADIENTS DE DENSITAT.

Essencialment, hi han tres maneres de fraccionar un gradient. Els tres mètodes per a fraccionar un gradient són (56):

a) Un líquid dens és bombejat a la base del gradient a través d'un tub capil.lar. El gradient és aleshores desplaçat cap adalt i extret a través d'un capil.lar.

b) La base del tub pot ésser foradada i el gradient recuperat per l'orifici. La velocitat de goteig pot ésser control.lada col.locant un tub capil.lar a la sortida de l'orifici i una vàlvula adequada.

c) Un capil.lar és introduït fins el final del tub. Un altre capil.lar és introduït a la part superior del tub i

per ell es bombeja aire que impulsa al gradient a sortir per el tub llarg.

En el cas de gradients de Ludox, el mètode de punció basal no és adequat, ja que al fons del tub es forma un sediment sòlid de sílica que impedirà la recollida normal de gotes i interferiria en les mesures dels índex de refracció de les fraccions.

Vam fer servir aleshores el mètode d'injectar aire per un capil·lar dins del tub del gradient de manera que no toqués la part superior del gradient, mitjançant una bomba peristàltica. Les fraccions es recollien mitjançant un altre tub capil·lar que arribava fins el fons del tub, vigilant que no toqués el sediment de Ludox. El sistema es semblant a un sifó. D'aquesta manera es recollien fraccions de 18 gotes (aproximadament $300 \mu\text{l}$.) en tubs Eppendorf.

Com s'explica a l'apartat 3.1., s'afegia seguidament a cada fracció $25 \mu\text{l}$. d'una solució de Tritó X-100 al 2% (concentració final: 0,1%), s'agitava vigorosament i es deixava reposar 15 minuts a temperatura ambient.

Posteriorment es procedia a la separació de la sílica de cada fracció mitjançant una centrifugació en una centrífuga Beckman L2 a 35000 rpm ($80000 \times g$) durant 45 minuts.

Finalment les fraccions eren congelades i descongelades tres cops per a facilitar el trencament dels orgànuls i la sortida dels enzims atrapats en el seu interior (veure apartat 3.1.).

Les fraccions es conservaven congelades fins els assaigs corresponents.

2.5.5. DETERMINACIÓ DE LA DENSITAT DE LES FRACCIONS.

La densitat de cada fracció fou determinada mesurant l'índex de refracció mitjançant un refractòmetre d'Abbe (Carl Zeiss). Aquest índex de refracció fou relacionat amb la densitat mitjançant una corba patró.

S'ha de tenir en compte que les mesures de densitat es varen fer per pesada. Les pesades en diferents balances o fent servir pipetes autmàtiques diferents, donaven lloc a oscil·lacions en les mesures de densitat que podien arribar a ésser importants.

Malgrat aquest fet, es va establir una correlació aproximada entre l'índex de refracció i la densitat en el cas de Ludox-PVP-sacarosa i Ludox-PVP-NaCl. (taula II). Com es pot observar, els índex de refracció dels gradients de Ludox-NaCl són més baixos que els de densitat similar de Ludox-sacarosa.

2.5.6. MODIFICACIONS DELS ASSAIGS DE LES DIFERENTS ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES EN ASSAJAR-LES EN LES FRACCIONS DEL GRADIENT.

En intentar assajar les fraccions del gradient, aviat ens vam adonar que havíem de modificar els assaigs, degut a que les activitats eren bastant baixes.

Les tres modificacions que vam portar a terme van ésser:

a) Afegir Tritó X-100 a les fraccions, abans de separar la sílica. Se'ls hi va afegir 25 μ l. d'una solució de Tritó X-100 al 2%, de manera que la concentració final a la fracció era del 0,1%.

b) Congelar i descongelar les fraccions tres vegades abans de dur a terme els assaigs.

GRADIENTS DE LUDOX-PVP-SACAROSA

ρ (gr/ml.)	índex de refracció
1,020	1,3465
1,030	1,3480
1,040	1,3495
1,050	1,3505
1,060	1,3515
1,070	1,3540
1,080	1,3550
1,090	1,3560

GRADIENTS DE LUDOX-PVP-NaCl

ρ (gr/ml.)	índex de refracció
1,005	1,3390
1,010	1,3430
1,020	1,3435
1,025	1,3450
1,035	1,3445
1,040	1,3450
1,046	1,3460
1,050	1,3470

Taula II: Correlació entre índex de refracció i densitat.

c) Allargar, si era necessari, els temps d'incubació. Això va ésser necessari, especialment, en el cas de la succinat deshidrogenasa i de la proteasa.

2.6. ALTRES MÈTODES.

2.6.1. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA.

Les determinacions de proteïna es van fer seguint dos mètodes: el mètode de Lowry (111) i l'espectrefotomètric.

a) Mètode de Lowry: s'aplicava en el cas d'extractes crus o fraccions parcialment purificades. L'esquema operatiu a seguir és el següent: es preparaven dilucions de les mostres i es portaven fins a un volum de 1,5 ml. amb aigua destil·lada. Seguidament s'afegia a cada tub 25 μ l. d'una solució de deoxicolat sòdic a l'1% i es deixava reposar 10 minuts. S'afegia aleshores 500 μ l. d'àcid tricloroacètic al 24% i el precipitat de proteïna que es forma es recollia per centrifugació a 3000 rpm durant 30 minuts a 0°C en una centrífuga MSE-Mistral. Es decantava ràpidament el sobrenedant i el sediment es dissolia en 1 ml. de reactiu C (50 ml de solució al 2% de Na_2CO_3 en NaOH 0,1 N més 5 ml. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ més 5 ml. de tartrat sòdic-potàsic al 2%). Es deixava reposar durant 10 minuts i s'afegia a cada tub 100 μ l. de reactiu E de Folin-Ciocalteu 1 N. Es deixava desenvolupar el color durant 30 minuts i es llegia l'absorbància a 660 nm. Simultàniament es feia una corba patró amb seroalbúmina bovina preparada a concentracions des de 0-500 μ g./ml.

b) Espectrefotomètric: s'aplicava en els casos d'enzims purs dels quals es coneixia el coeficient d'extinció. D'aquesta manera es podia calcular ràpidament la concentració en proteïna de preparacions de glicogen fosforilasa b (coeficient d'extinció 13,4) mitjançant l'expressió següent:

$$\text{mg/ml} = \frac{A_{280} \times \text{dilució}}{1,3}$$

2.6.2. PREPARACIÓ DE FOSFORILASA b LLIURE D'AMP.

L'eliminació de l'AMP de les solucions de glicogen fosforilasa b destinades a mesurar activitat fosforilasa quinasa s'aconseguia mitjançant un tractament amb carbó actiu.

La solució de l'enzim es preparava dissolent uns 50 mg de cristalls liofilitzats de l'enzim en 1 ml. d'una solució de β -glicerofosfat 50 mM, EDTA 2 mM a pH 7,0 amb mercaptoetanol 50 mM. Es pulveritzaven bé els cristalls, es deixava dissoldre a 30°C durant 5 ò 10 minuts i es centrifugava per a eliminar la proteïna desnaturalitzada en una centrífuga Eppendorf a 15000 rpm durant 2 minuts.

A la solució transparent així obtinguda s'afegia Norita A (carbó actiu) en una proporció 1:1 en pes. Es deixava aleshores incubant a 30°C durant 1 hora com a mínim amb agitació freqüent. La separació del carbó actiu es feia per centrifugació a 12000 rpm durant 20 minuts en el rotor SM 24 d'una centrífuga refrigerada Sorvall. Normalment es necessitava una segona centrifugació en una centrífuga Eppendorf per a eliminar tot el carbó actiu.

Amb el sobrenedant obtingut, lliure de carbó actiu i d'AMP, s'examinava la relació d'absorbància a 260/280 nm, que testimoniava la validesa del tractament i que devia ésser més petita que 0,6.

2.6.3. ELECTROFORÈSI EN GEL.

Preparació dels gels:

Per a la preparació dels gels es va seguir la tècnica descrita per Shapiro i col. Eren gels formats de poliacrilamida al 5% (p/v), amb una relació acrilamida/bis-acrilamida de 30:1 (p/p) i en presència de SDS. Per a la seva obtenció partíem de les següents solucions:

- a) Acrilamida 22,2% i bis-acrilamida 0,6%.
- b) Tampó fosfats 0,2 M pH 7,2 amb SDS al 2%.
- c) Solució extemporània de persulfat amònic a la concentració de 15 mg/ml.
- d) N,N,N',N'-tetrametiletilè diamida (TEMED).

Es mesclaven 4,5 ml. de la solució (a) amb 4,0 ml. de la solució (b) i 10,5 ml. d'aigua destil·lada. Tot seguit s'hi afegia 1,0 ml. de la solució (c) i 20 μ l. de TEMED.

Els tubs que havien de contenir els gels eren de vidre Pyrex de 5 mm de diàmetre interior i de 10 cm de longitud, completament nets i secs. Els tubs col·locats en posició vertical s'omplien ràpidament amb la mescla esmentada abans de que aquesta comencés a polimeritzar, fins a uns 2 cm de l'extrem del tub. Sobre la superfície de la solució es dipositava una capa d'aigua per tal d'evitar que l'extrem del gel adquirís forma còncava per efecte del menisc. La gelificació es completava en unes dues hores.

Preparació i aplicació de les mostres:

Les mostres proteïques que s'aplicaven a cada gel eren prèviament incubades durant 3 minuts a 100°C amb una solució (Sample Buffer) que contenia tampó fosfats 0,01 M pH 7,2, SDS a l'1% (p/v), DTT 0,01 M, glicerol al 10% i blau de bromofe-

no1 al 0,002% (p/v). La relació en la dilució de les mostres era de 20-40 gr de proteïna en 200 μ l. de la solució.

L'electroforèsi es realitzava en un aparell apte per a contenir simultàniament 12 gels (Medical Research Apparatus).

De 20-40 μ l. de les mostres preparades eren dipositades acuradament sobre l'extrem superior del gel, formant una capa que no s'havia de barrejar amb la solució que els cobria. La solució dipositada a les cubetes que cobrien els electrodes contenia també fosfat 0,1 M pH 7,2 amb SDS a l'1%.

S'aplicaven 8 mA per gel i el procés es perllongava fins que el front assenyalat per el colorant estigués aproximadament a 1 cm del final del gel.

Tinció i destinció de les mostres:

Un cop finalitzada l'electroforèsi, cada gel era extret del tub, se li marcava el front amb un fil de coure i es submergia en el colorant adequat. Aquest estava compost per Blau de Coomassie tipus R-250 500 mg/ml, metanol 25% i àcid acètic al 10%. El procés de tinció durava 2 hores com a mínim.

La solució decolorant estava composta de metanol al 10% i àcid acètic al 14%.

3. RESULTATS

3.1. ESTUDI DE LA LATÈNCIA DE LA PROTEASA.

El fet, aviat comprovat, que un procés de congelació-descongelació de la fracció P₂₇, de la qual s'aïllava l'activitat proteasa, incrementava el rendiment de la purificació, feia sospitar en gran manera l'origen compartimentat del nostre enzim.

Tant amb la perspectiva d'aquest estudi com pel fet més pràctic de millorar, sempre que fos possible, el rendiment de les purificacions (no podem oblidar que les cèl.lules sanguinies són de disponibilitat relativament limitada) vam emprendre un estudi sobre l'efecte d'un procés controlat de congelació-descongelació i sobre l'ús del detergent Tritó X-100 en l'alliberament de la nostra activitat enzimàtica a partir dels orgànuls que la contenien.

Ambdós processos desintegren les membranes dels lisosomes, permetent la sortida de les activitats enzimàtiques atrapades en el seu interior, mentre que no afecten a altres orgànuls cel.lulars.

Nombrosos detergents es poden fer servir amb aquesta finalitat, entre ells es Tritó X-100, la digitonina, el deoxicolat sòdic, l'Emasol 4130, etc. Tots ells actuen sobre els lípids de les membranes, desorganitzant-los i destruint així les estructures que formen. El Tritó X-100 és l'emprat més comunament, degut a la seva elevada efectivitat i a que no inhibeix cap de les activitats enzimàtiques involucrades en el nostre estudi, contràriament a d'altres detergents.

El procediment que vam seguir per a portar a terme l'estudi va ésser com s'explica a continuació:

S'obtenien dues fraccions de P₂₇, procedents del mateix nombre de cèl.lules, tal com s'ha indicat en l'apartat corresponent.

Un dels dos pellets es resuspenia amb cura en un volum determinat V de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8. L'altre pellet es resuspenia en el mateix volum V de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8 més Tritó X-100 al 0,1%.

Les dues mostres es centrifugaven a 15000 rpm durant 15 minuts en una centrífuga Sorvall i els sobrenedants obtinguts es conservaven a 4°C per a un assaig posterior a realitzar el mateix dia; els vam anomenar T₀ i S₀, indicant la lletra "T" la presència de Tritó X-100 i la lletra "S", la seva absència. El subíndex indicava les tandes de congelació-descongelació que havia sofert la mostra.

Els dos sediments obtinguts de la centrifugació abans esmentada es van resuspendre en el mateix volum inicial V de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8 amb o sense Tritó X-100, segons el cas. Cada una de les mostres es va congelar i descongelar simultàniament i, posteriorment, es va centrifugar a 15000 rpm durant 15 minuts. D'aquesta manera obteniem els sobrenedants T₁ i S₁.

Aquest procés de resuspensió amb el tampó corresponent, seguit per un procés de congelació-descongelació i posterior centrifugació es va repetir fins a obtenir 10 mostres "T" i 10 mostres "S".

Aquestes mostres es van assajar utilitzant glicogen sintasa com a substrat per tal de mesurar l'activitat proteasa. La proteïna es va mesurar per el mètode de Lowry.

Els resultats es mostren a la taula 1. A la vista de les dades obtingudes era clar que l'ús del Tritó X-100 in-

Taula 1 COMPARACIÓ ENTRE L'ACTIVITAT PROTEASA
 PROCEDENT DEL SEDIMENT DE 27000xg AMB
 O SENSE TRACTAMENT AMB TRITÓ X-100.

"S" indica mostra preparada sense Tritó X-100.

"T" indica mostra preparada amb Tritó X-100.

El subíndex indica cicles de congelació-descongelació abans d'ésser assajada la mostra.

Fracció	mU/ml	mU/mg $\cdot 10^{-2}$
S ₀	7,37	1,89
S ₁	19,76	8,59
S ₂	4,05	3,24
S ₃	5,37	2,38
S ₄	7,15	4,77
S ₅	10,82	5,87
S ₆	12,63	6,01
S ₇	13,23	7,11
S ₈	11,37	8,20
S ₉	12,86	9,52
Fracció	mU/ml	mU/mg $\cdot 10^{-2}$
T ₀	51,18	12,18
T ₁	46,16	12,13
T ₂	28,15	11,73
T ₃	10,39	4,95
T ₄	4,34	2,99
T ₅	2,32	2,11
T ₆	7,48	6,80
T ₇	5,57	6,55
T ₈	3,80	4,01
T ₉	6,90	5,11

crementava el rendiment de l'extracció de l'enzim en els tres primers cicles de congelació-descongelació en quasi un 200%, esgotant d'aquesta manera, en gran part, el contingut d'enzim dels orgànuls, ja que, en posteriors cicles, l'activitat recuperada era molt més baixa.

En absència del detergent, el rendiment de l'extracció és molt més baix. És també més regular al llarg del cicle de 10 congelacions-descongelacions, observant-se progressivament un increment en l'activitat recuperada a mesura que el procés avança, tal com s'indica a la figura 1.

La qüestió que se'ns presentava en aquest moment era veure si l'increment en el rendiment observat en afegir Tritó X-100 era el mateix si es centrifugava després de cada cicle de congelació-descongelació, o bé, si es prescindia d'aquest pas i es congelava i descongelava directament tres vegades la mostra, i posteriorment es centrifugava.

Vam operar com segueix:

a - El P₂₇ corresponent a 1 l. de sang de porc es va resuspendre en 2,5 ml. de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8 més Tritó X-100 al 0,1%. Es va congelar i descongelar, i posteriorment, centrifugar, a 15000 rpm durant 15 minuts. S'obtenia així el sobrenedant S₁.

El pellet obtingut es resuspensia en uns altres 2,5 ml. del mateix tampó i es proseguia de la mateixa manera, obtenint al final un sobrenedant S₂.

El pellet obtingut es resuspensia en uns altres 2,5 ml del mateix tampó i finalment s'obtenia el sobrenedant S₃.

Es reunien els tres sobrenedants S₁, S₂ i S₃ i la mostra final la vam anomenar S.

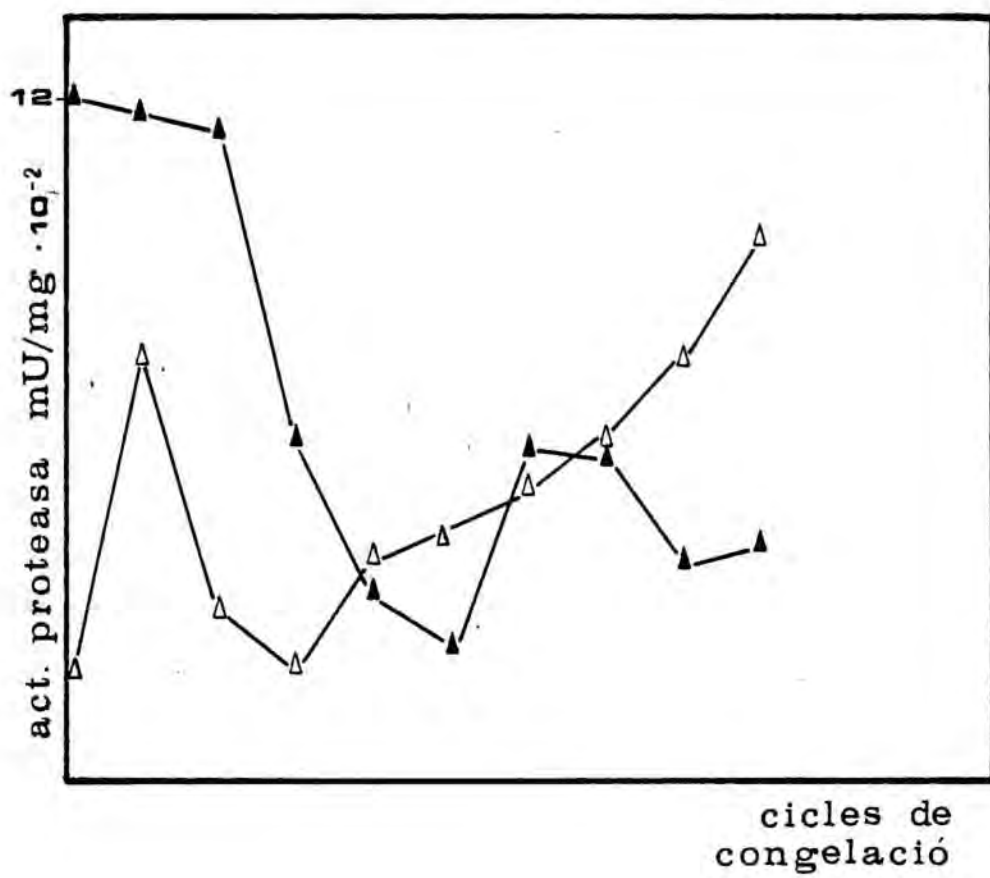
b - El P₂₇ corresponent a 1 l. de sang processada junt

Figura 1 REPRESENTACIÓ GRÀFICA DELS RENDIMENTS
EN ACTIVITAT PROTEASA OBTINGUTS AL
LLARG DE 9 CICLES DE CONGELACIÓ EN
PRESENCIA O ABSÈNCIA DE TRITÓ X-100.

El tractament utilitzat per a les dues mostres
va ésser paral·lel, excepte en que una d'elles va
ésser tractada amb Tritó X-100

Els símbols (▲) indiquen tractament amb Tritó X-100.

Els símbols (△) indiquen manca de Tritó X-100.



amb l'anterior es va resuspendre en 7,5 ml. de tampó Tris - HCl 50 mM pH 7,8 més Tritó X-100 al 0,1%. La mostra es va congelar i descongelar tres vegades i seguidament es va centrifugar a 15000 rpm durant 15 minuts.

S'obtenia d'aquesta manera la mostra anomenada S'.

Es van valorar aleshores S i S' sobre glicogen sintasa i es va determinar la proteïna de les dues mostres.

Prèviament s'havia assajat el possible efecte del Tritó X-100 sobre l'activitat i estabilitat de la glicogen sintasa. Els resultats van demostrar que no era afectada en absolut. Es van assajar, doncs, les mostres S i S' del procés anteriorment explicat i els resultats obtinguts van mostrar unes variacions menyspreables quant al rendiment d'ambdós processos.

3.2. ESTUDI D'UN INHIBIDOR CITOPLASMÀTIC DE L'ACTIVITAT PROTEÀSICA PRESENT EN EL SOBRENEDANT DE 27000xg DE LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS DE PORC I HUMANS.

3.2.1. CAS DELS POLIMORFONUCLEARS DE PORC.

Un litre de sang de porc va ésser processat com s'indica a l'apartat 2.2.2. i es va obtenir el P₂₇ i l'S₂₇, procedents de l'última centrifugació a 27000xg durant 15 minuts.

Es va mesurar el volum de l'S₂₇ i, un cop determinat, es va resuspendre el P₂₇ en el mateix volum de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8 per tal de tenir l'activitat proteàsica en una relació adequada respecte al sobrenedant. El sediment resuspès va ésser congelat i descongelat tres cops i posteriorment centrifugat a 27000xg durant 15 minuts.

50 μ l. del sobrenedant d'aquesta darrera centrifugació es van assajar sobre 50 μ l. de glicogen sintasa en presència de 50 μ l. de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8, com a control d'inactivació. Simultàniament es va assajar el possible poder inhibitori de l'S₂₇ de la següent manera: a 50 μ l. de glicogen sintasa se'ls va afegir 50 μ l. de l'extracte lisosomal i 50 μ l. de l'S₂₇.

Per tal d'intentar saber si aquest possible inhibidor era de naturalesa termoestable o termolàbil, es va assajar un cop bullit a 100°C durant 5 minuts segons el mateix esquema operatiu esmentat.

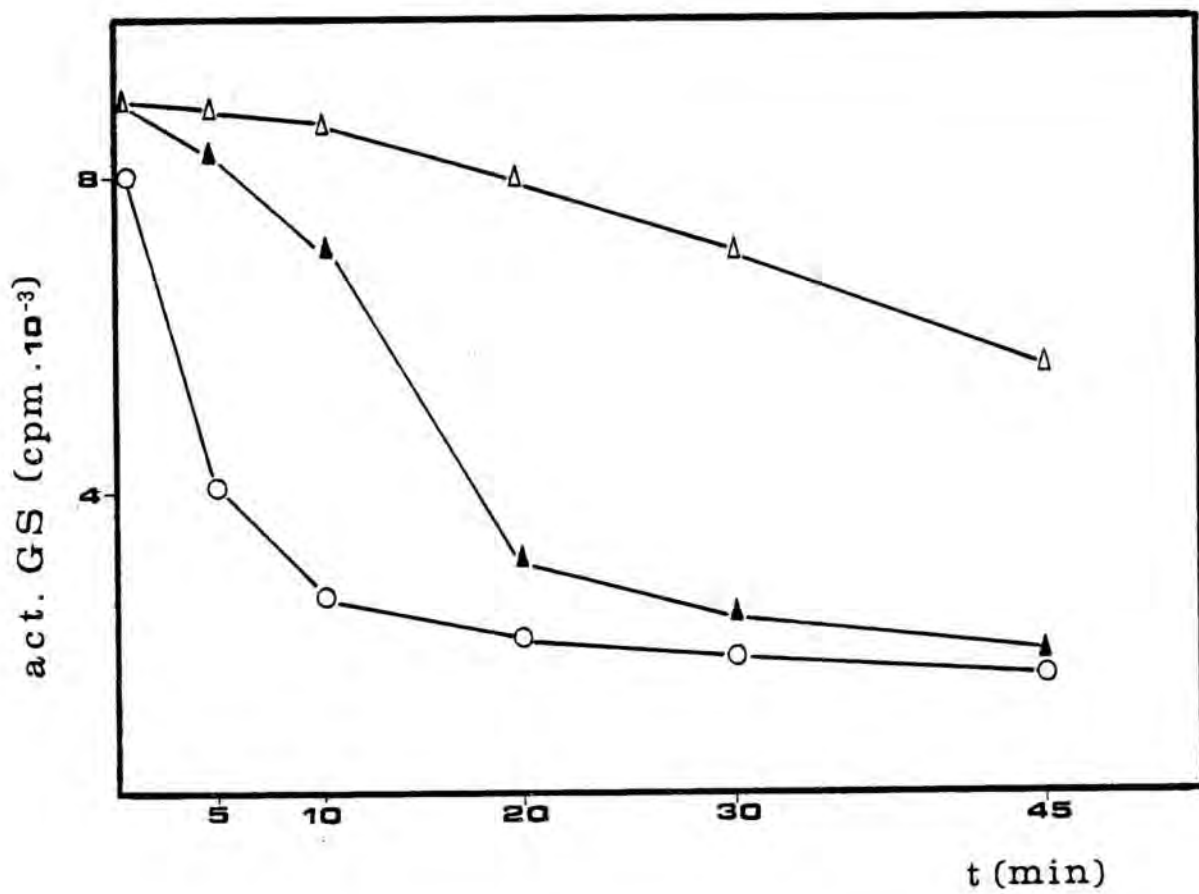
Simultàniament s'assajava l'S₂₇ sobre glicogen sintasa per a comprovar que era mancat de tot tipus d'activitat sobre la glicogen sintasa.

La figura 2 ens mostra que, mentre que en absència de

Figura 2 ACCIÓ D'UN INHIBIDOR TERMOLÀBIL DE LA
PROTEASA PRESENT EN EL SOBRENEDANT DE
LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS DE PORC.

Les fraccions assajades P₂₇ i S₂₇ procedien de la mateixa mostra de sang. Van ésser assajades amb glicogen sintasa com a substrat.

Els símbols (O) indiquen activitat GS en presència de P₂₇. Els símbols (Δ) indiquen activitat GS en presència de P₂₇ i S₂₇. Els símbols (▲) indiquen activitat GS en presència de P₂₇ i d'S₂₇ bullit a 100°C durant 5 minuts.



sobrenedant de 27000xg, el P₂₇ té una activitat proteàsica normal, el fet de què l'S₂₇ estigui present en la mescla de reacció inhibeix parcialment la inactivació de la glicogen sintasa.

Aquest efecte inhibitori desapareix quasi totalment quan el sobrenedant de 27000xg que conté l'inhibidor es bull. Aquest fet indica que aquest inhibidor és probablement de naturalesa proteïca.

3.2.2. CAS DELS POLIMORFONUCLEARS HUMANS.

L'estudi de l'inhibidor en sang humana va presentar respecte a la sang procedent de porc, dues característiques diferencials a destacar.

En primer lloc, si la sang humana sofria una preparació idèntica a la sang de porc, especialment pel que es refereix als volums de resuspensió de les cèl.lules abans de la homogeneïtzació de les mateixes, i el volum de resuspensió del P₂₇, el sediment de procedència humana mostrava més activitat inhibidora de la glicogen sintasa que la mateixa fracció provinent del porc.

Potser degut a aquesta raó, en assajar l'S₂₇, les cèl.lules humanes com a font d'un possible inhibidor de l'activitat proteasa, l'efecte inhibitori era molt menys marcat que en el cas de cèl.lules de porc. Això es pot observar a la figura 3. També en aquest cas, com succeïa en el porc, l'efecte inhibitori desapareix quan es bull l'S₂₇.

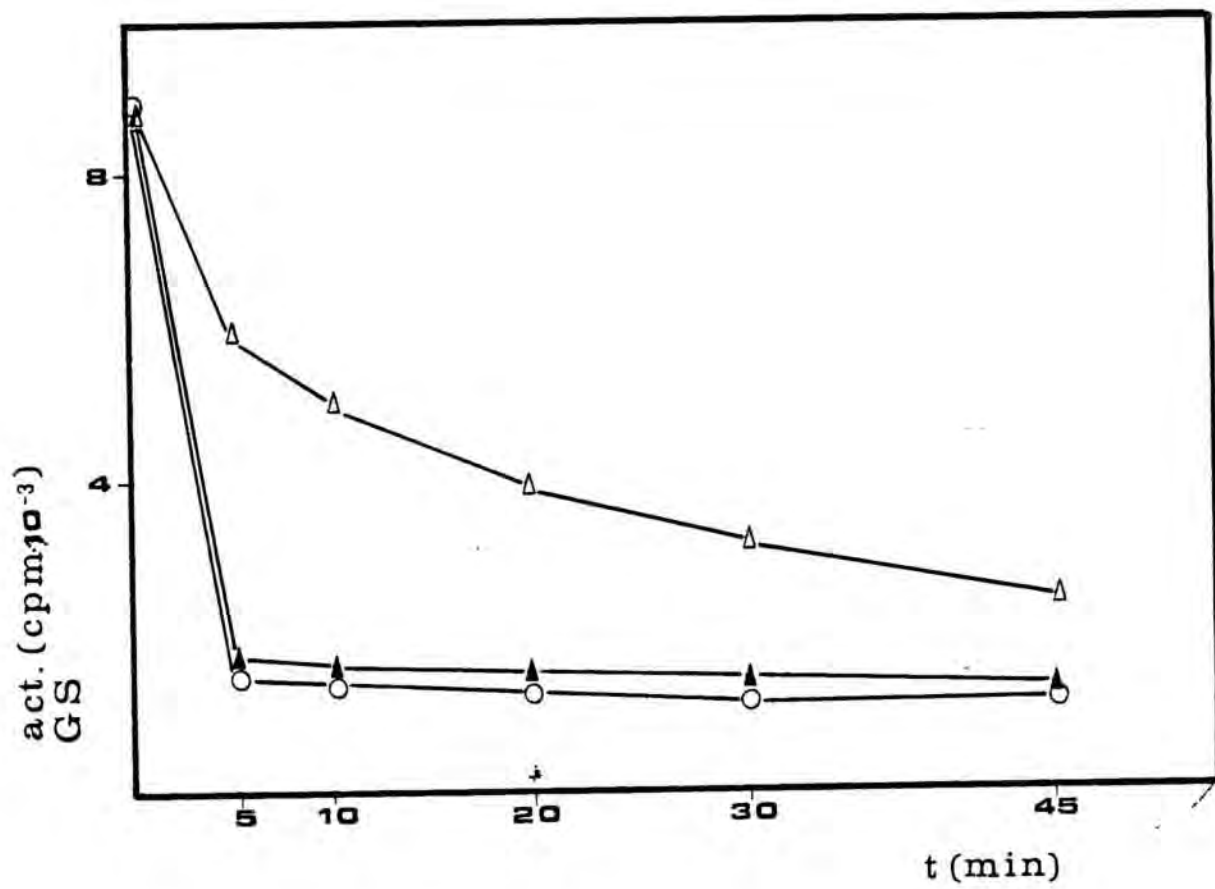
És a dir, podem concloure que la relació inhibidor/proteasa no és la mateixa en polimorfonuclears de porc i humans, sinó que en el porc aquesta relació és més elevada.

Encara que no són dades quantitatives, aquesta afirma-

Figura 3 ACCIÓ D'UN INHIBIDOR TERMOLÀBIL DE LA
PROTEASA PRESENT EN EL SOBRENEDANT DE
LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS HUMANS.

Les fraccions assajades P₂₇ i S₂₇ procedien de la mateixa mostra de sang. Van ésser assajades amb GS com a substrat.

Els símbols (O) indiquen l'activitat GS en presència de P₂₇. Els símbols (A) indiquen l'activitat GS en presència de P₂₇ i S₂₇. Els símbols (▲) indiquen l'activitat GS en presència de P₂₇ i d'S₂₇ bullit a 100°C durant 5 minuts.



ció es despren del fet que els processos de separació i assaig de les mostres han estat realitzats en idèntiques condicions en ambdós casos.

3.3. ESTUDI DE LES ACTIVITATS FOSFATASA ÀCIDA, β -GLUCURONIDASA, SUCCINAT DESHIDROGENASA I PROTEASA DE LES DIFERENTS FASES DE SEPARACIÓ DE LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS DE PORC.

Es van mesurar les activitats fosfatasa àcida, β -glucuronidasa, succinat deshidrogenasa i proteasa de les diferents fases de la separació dels leucòcits PMN. Aquestes fases es van numerar per a la seva identificació com s'explica a continuació:

1: Homogeneïtzat de polimorfonuclears.

2: Sediment de la centrifugació a 600xg: és la fracció nuclear.

3: Sobrenedant de la centrifugació a 600xg.

4: Sediment de la centrifugació a 27000xg: és la fracció granular, que conté principalment els diferents tipus de grànuls i les mitocondries.

5: Sobrenedant de la centrifugació a 27000xg: és la fracció citoplasmàtica.

Es van assajar simultàniament les activitats d'aquestes fraccions abans i després d'haver estat congelades, per poder comparar els dos tractaments en relació a les activitats més importants que van constituir els marcadors enzimàtics assajats al llarg del treball. Els mètodes d'assaig van ésser tal com s'explica a l'apartat de Mètodes.

Com es veu a la taula 2, les activitats fosfatasa àcida i β -glucuronidasa són una mica més elevades en el cas de les mostres congelades degut al fet que són enzims liso-

Taula 2 TAULA D'ACTIVITATS FOSFATASA ACIDA, β -GLUCURONIDASA, SUCCINAT DESHIDROGENASA I PROTEASA DE LEUCOCITS POLIMORFONUCLEARS DE PORC.

Els assaigs de totes les fraccions es va fer paral·lelament,

Les fraccions són:

- 1- Homogenat de polimorfonuclears.
- 2- Sediment de la centrifugació a 600xg.
- 3- Sobrenedant de la centrifugació a 600xg.
- 4- Sediment de la centrifugació a 27000xg.
- 5- sobrenedant de la centrifugació a 27000xg.

La lletra "C" indica que la mostra ha estat congelada. La lletra "D" indica que no ha estat congelada.

La recuperació s'expressa com el percentatge d'activitat recuperada respecte a la fracció precedent.

FRACCIÓ	Proteïna mg/ml	Rec.	FOSFATASA ÀCIDA		β -GLUCURONIDASA		SUCCINAT DH		PROTEASA			
			U/ml	Rec	U/mg	U/l	Rec	mU/mg	U/ml	U/mg	U/l	mU/mg
1C	12,5	-	1,37	-	0,11	17,9	-	1,43	12,1	0,97	0,47	37,6
2C	9,3	102	1,07	96	0,11	11,3	103	1,22	13,0	1,40	3,19	343,2
3C	3,5		0,24		0,07	7,2		2,05	0,3	0,08	0,51	146,5
4C	0,8	86	0,17	95	0,22	3,6		4,48	0,9	1,16	6,72	8407,5
5C	2,2		0,05		0,02	4,2	107	1,90	0,3	0,14	0,45	207,2
1D	12,5	-	1,13	-	0,09	16,7	-	1,34	7,7	0,62		
2D	8,5		1,03		0,12	8,9		1,05	14,2	1,68		
3D	3,5	96	0,18	106	0,05	6,6	93	1,88	2,4	0,71		
4D	0,8	86	0,11	86	0,14	3,4		4,11	1,8	2,33		
5D	2,2		0,04		0,02	4,0	111	1,83	1,9	0,84		

somals i, per aquesta raó, presenten una latència elevada.

En canvi, la succinat deshidrogenasa, com a enzim mitocondrial que és, no presenta latència, sinó que, en les mostres congelades, l'activitat és una mica més baixa que en les que no han estat sotmeses a aquest procés, degut al fet que la congelació repercuteix desfavorablement en l'activitat de l'enzim.

En el cas de la proteasa, vam realitzar l'assaig en les mostres sotmeses a congelació, ja que l'estudi fet sobre la latència de l'enzim aconsellava aquest pas prèviament a l'assaig.

Vam calcular també el % de rendiment, definit com el percentatge de recuperació aconseguït en una fase de la separació. És a dir, la fracció 1 dóna lloc per centrifugació a les fraccions 2 i 3, i, de la mateixa manera, la fracció 3 dóna origen a les fraccions 4 i 5. Idealment, tota l'activitat de la fracció original s'hauria de recuperar en les fraccions obtingudes a partir d'ella. Això és el que definim com el 100% de recuperació.

Aquesta dada ha estat calculada per a la fosfatasa àcida i per a la β -glucuronidasa i, per a ambdós enzims, és molt bona. En el cas de la succinat deshidrogenasa no ha estat calculada, car la mateixa tècnica de l'assaig dóna lloc a oscil·lacions molt més grans que ocasionen errors en el càlcul del % de recuperació.

Els resultats van demostrar, com ja era d'esperar, que per a tots els enzims estudiats, la major part de l'activitat resta a la fracció 4, que correspon al P₂₇, mentre que la fracció 5, que correspon al citoplasma (S₂₇), és molt pobre en tots ells.

3.4. ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA b QUINASA DE MÚSCUL DE CONILL PER ACCIÓ DE LA PROTEASA DE POLIMORFONUCLEARS DE PORC. CARACTERITZACIÓ DE L'EFECTE.

3.4.1. ACCIÓ DE LA PROTEASA DE LEUCÒCITS HUMANS SOBRE LA FOSFORILASA b QUINASA PURIFICADA DE MÚSCUL DE CONILL

L'activitat proteasa neutra present en el sediment de 27000xg de leucòcits polimorfonuclears es va descobrir per la seva capacitat d'inactivar a la glicogen sintasa. Però, quan es va provar la seva especificitat de substrat, es va veure clarament que era també capaç d'activar la fosforilasa b quinasa de manera semblant a com ho feia la tripsina, encara que precisa una concentració de proteïna més elevada.

Si bé aquesta activitat és perfectament detectable en extractes lisosomals de polimorfonuclears, tots els assaigs de caracterització que es presenten en aquest treball han estat portats a terme amb la proteasa semipurificada, és a dir, després del pas de cromatografia d'afinitat a través d'una columna de Sepharosa-STI (apartat 2.3.5.).

Les figures 4 i 5 i la taula 3 ens mostren les principals característiques d'aquesta reacció, que són les següents:

- Ésser una reacció extraordinàriament ràpida: en 2 minuts ja ha arribat quasi al màxim d'activació, essent la relació entre les concentracions de proteïna d'ambdós enzims de $P/PhK = 1/5$.

- Ésser visible tant en l'assaig de la fosforilasa b quinasa practicat a pH 6,8 com a pH 8,6, és a dir, sobre

Figura 4 ACCIÓ DE LA PROTEASA DE POLIMORFONUCLEARS HUMANS SOBRE LA FOSFORILASA b QUINASA DE MÚSCUL DE CONILL.

Els símbols (○) corresponen al control d'activitat fosforilasa b quinasa en absència de proteasa.

Els símbols (▲▲) corresponen a una relació en proteïna de proteasa/fosforilasa quinasa (P/PhK) de 1/2,5.

Els símbols (▼▼) corresponen a una relació P/PhK de 1/5.

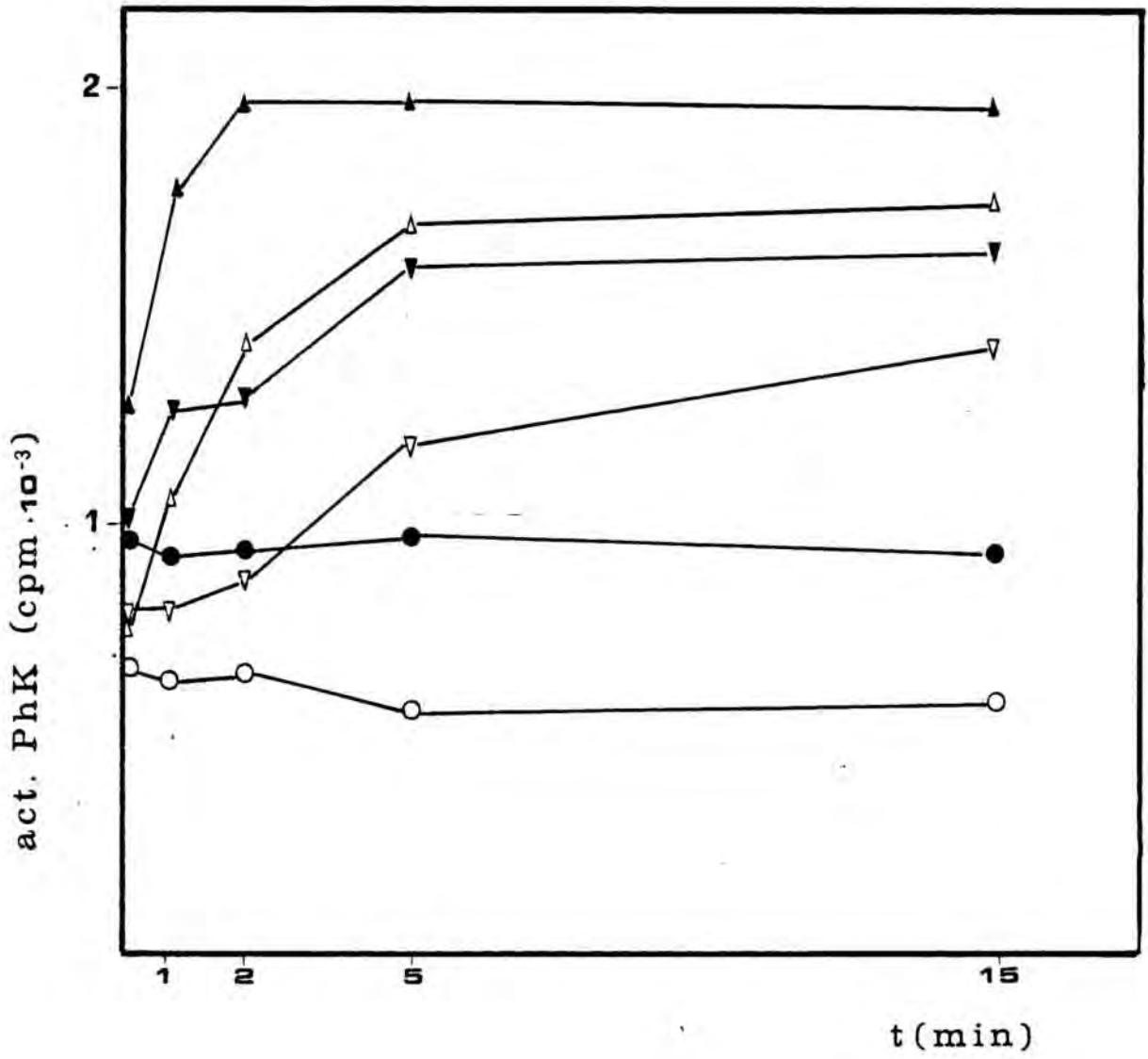
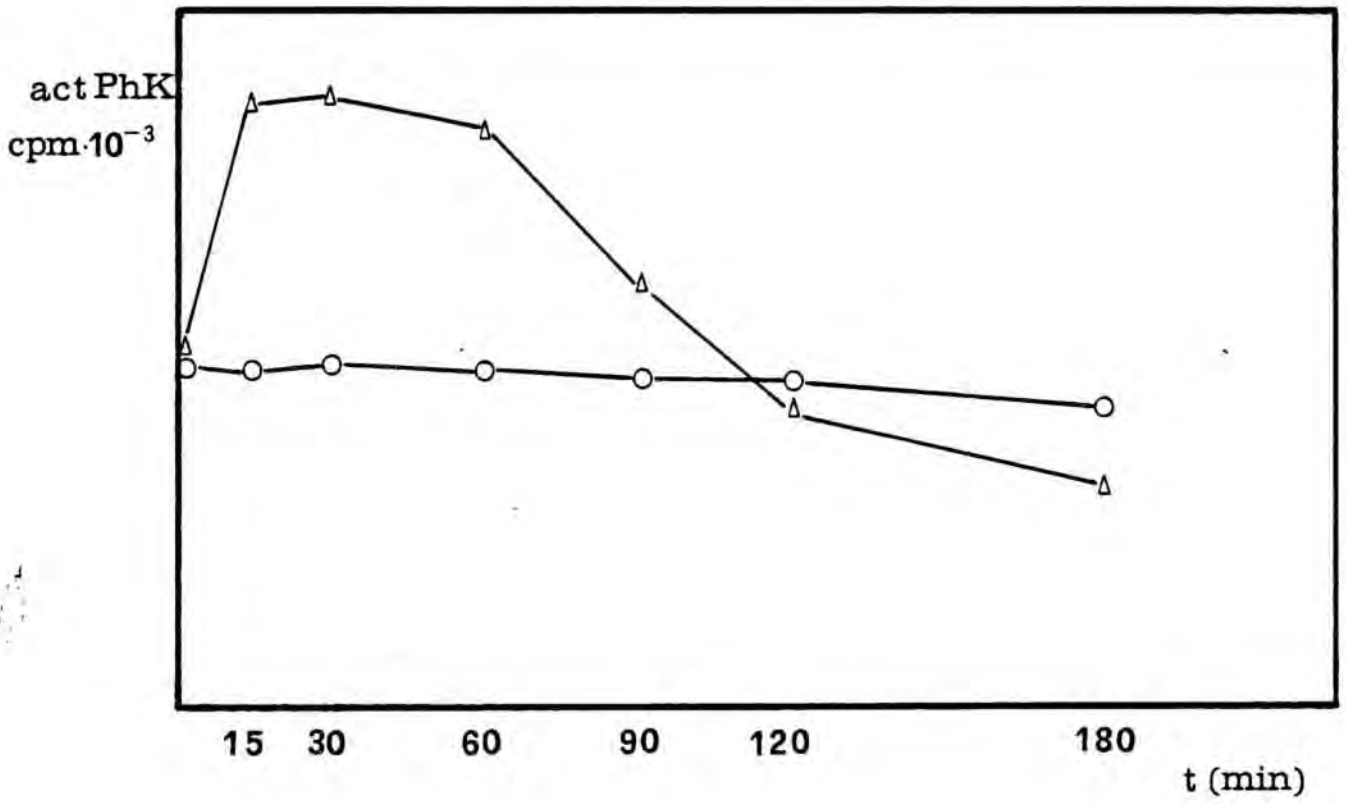


Figura 5 EFECTE DE LA PROTEASA SOBRE LA FOSFORILASA b QUINASA A TEMPS D'INCUBACIÓ LLARGA.

L'assaig es va fer en presència d'un tampó que contenia EDTA i DTT per augmentar l'estabilitat de la fosforilasa b quinasa.

Els símbols (O) corresponen al control de fosforilasa b quinasa en absència de proteasa.

Els símbols (Δ) corresponen a l'acció de la proteasa fent servir una relació P/PhK de 1/9.



Temps (minuts)	P/PhK = 1/2,5	P/PhK = 1/5
0	38	38
2	42	43
5	49	50
15	56	68

Taula 3 MODIFICACIÓ DE LA RELACIÓ D'ACTIVITAT FOSFORILASA QUINASA MESURADA A pH 6,8/pH 8,6 PER ACCIÓ DE LA PROTEASA.

La relació d'activitat a pH 6,8/8,6 es calcula segons l'expressió següent:

cpm en l'assaig a pH 6,8

cpm en l'assaig a pH 8,6 x relació de dilucions

El temps indicat és el d'incubació de la proteasa amb la fosforilasa quinasa.

la forma activa i inactiva de l'enzim. Malgrat aquest fet, l'activació és més visible a pH 6,8 (més vegades d'activació), per la qual cosa va ésser l'assaig a pH 6,8 l'emprat en posteriors estudis.

- Modificar la relació d'activitats a pH 6,8/pH 8,6, segons s'observa a la taula 3.

- Mantenir-se durant períodes de temps relativament llargs. Tal com es descriu a la figura 5, als 60 minuts d'incubació encara es manté una activació per sobre de l'activitat normal de la fosforilasa b quinasa. Segons sembla, a partir de les dues hores, la proteòlisi és més àmplia i es produeix aleshores una disminució de l'activitat. En tot cas, la desaparició de l'estat activat de la fosforilasa b quinasa és lent i s'allarga per espai de quasi 2 hores.

3.4.2. ESTUDI SOBRE L'EFFECTE DE LA PROTEASA SOBRE LA FOSFORILASA b QUINASA A DIFERENTS CONCENTRACIONS DE PROTEASA.

En el nostre intent de caracteritzar la proteasa de leucòcits polimorfonuclears, vam fer un estudi de l'activació que sofria la fosforilasa b quinasa sota l'acció de diferents concentracions de proteasa, en vistes de trobar una relació de proteïna proteasa/fosforilasa b quinasa que donés lloc a una activació linial i que seria l'emprada per nosaltres en posteriors estudis.

L'assaig es va fer normalment, segons la tècnica descrita a Mètodes, fent servir quantitats creixents de proteasa des de 1,1 μ g. a 22 μ g., que suposaven una relació proteasa/fosforilasa b quinasa (P/PhK) des de 1/1 a 1/20.

Figura 6 ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA QUINASA EN PRE-
SÈNCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE PROTE-
ASA AL LLARG DEL TEMPS.

L'activitat de la fosforilasa quinasa es va mesurar
a pH 6,8 i a pH 8,6.

Els símbols (O) corresponen a una relació $P/PhK = 1/20$.

Els símbols (▼) corresponen a $P/PhK = 1/10$.

Els símbols (∇) corresponen a $P/PhK = 1/5$.

Els símbols (▲) corresponen a $P/PhK = 1/3$.

Els símbols (△) corresponen a $P/PhK = 1/2$.

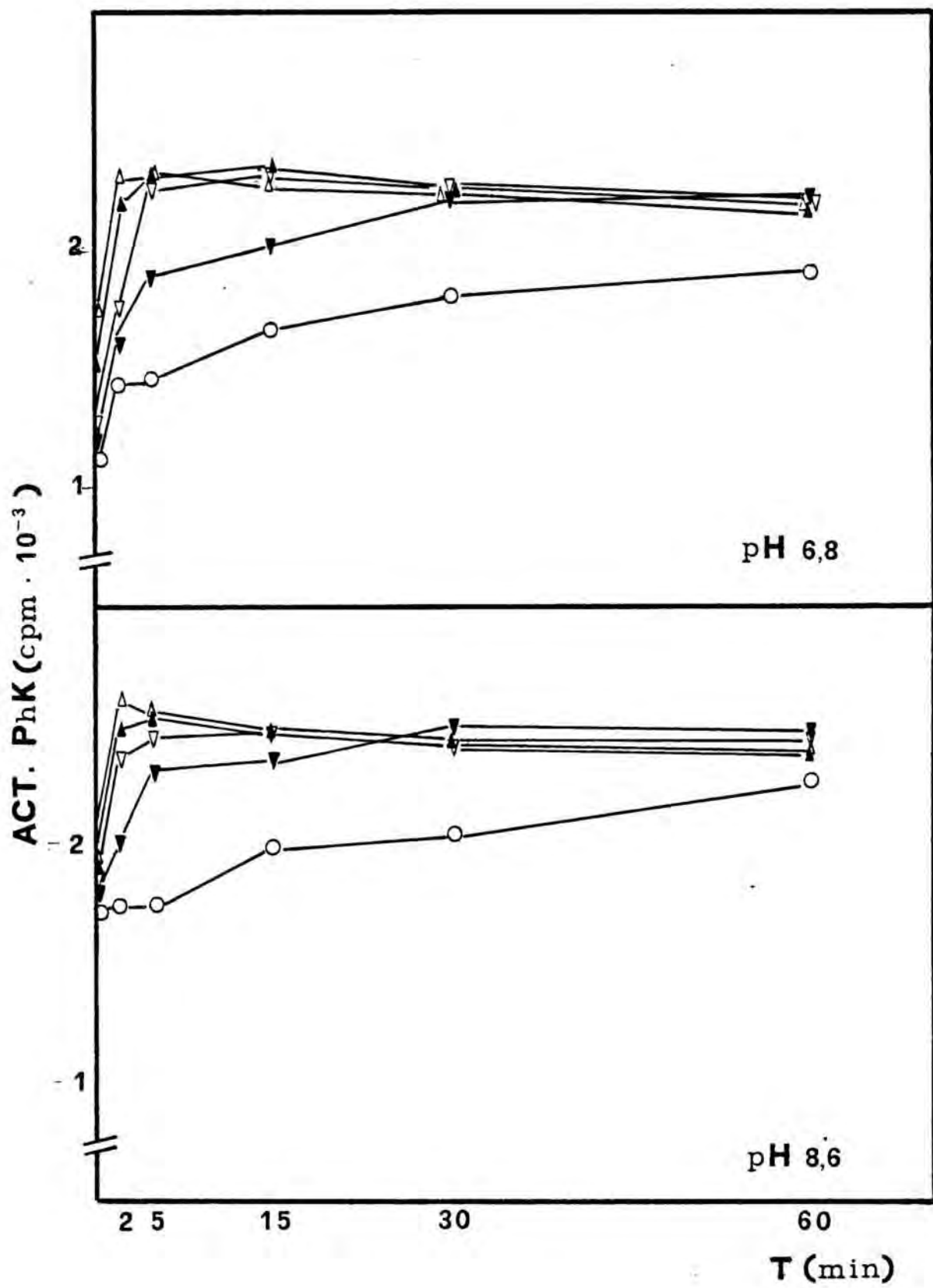
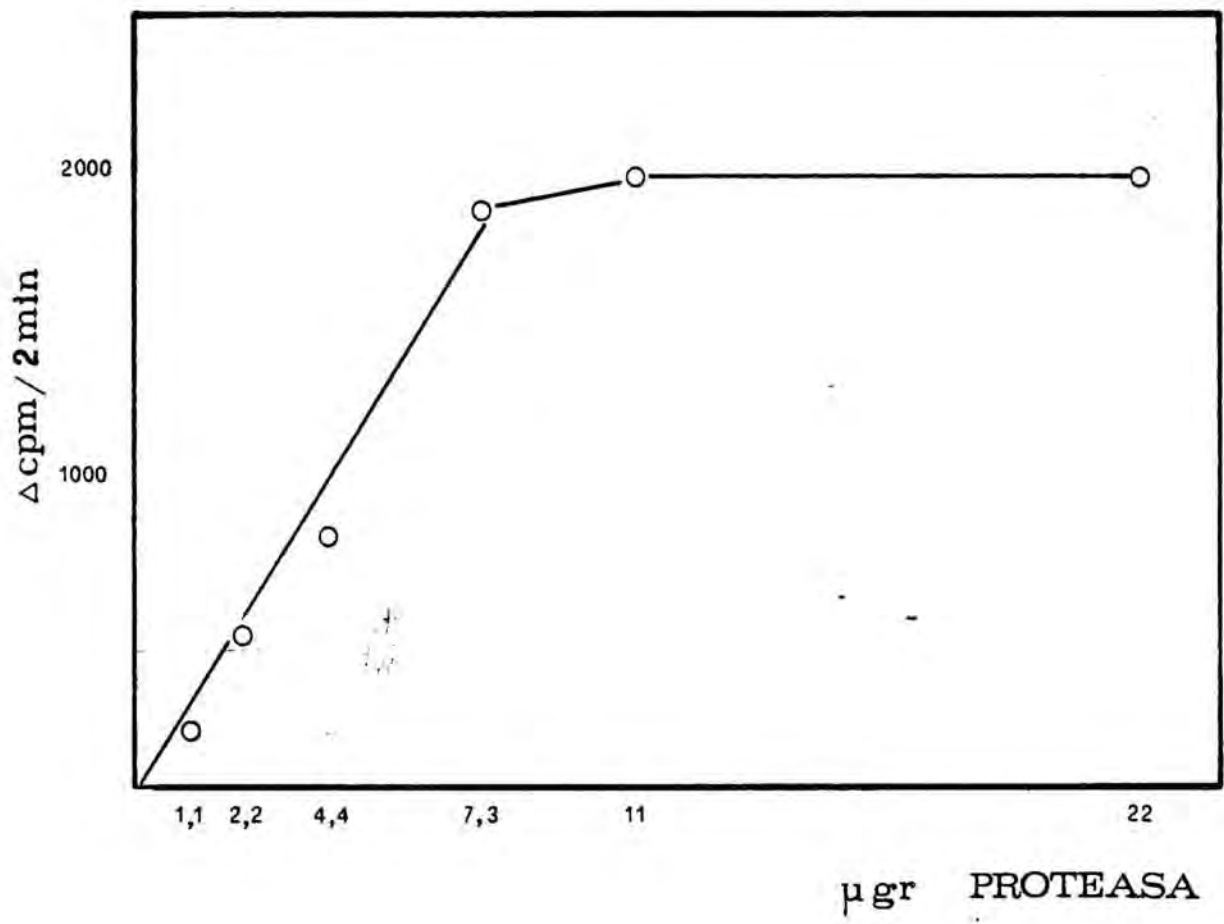


Figura 7 EFECTE DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE PROTEASA SOBRE L'ACTIVITAT FOSFORILASA QUINASA.

En la gràfica estan representades les activacions aconseguides en 2 minuts d'incubació de la fosforilasa quinasa en presència de proteasa.



Els resultats mostrats a la figura 6, on es representen per a facilitar la comprensió de la gràfica només les relacions $P/PhK = 1/2, 1/3, 1/5, 1/10$ i $1/20$, mostren que l'activació de la fosforilasa b quinasa és dependent de les concentracions de proteasa a l'assaig. El mateix efecte es pot veure a pH 8,6, encara que, com s'ha recalcat ja a l'apartat 3.4.1., l'activació a aquest pH és menor.

La figura 7 representa l'activació enfront de la concentració de proteasa amb l'objectiu de determinar fins a quin punt la reacció és lineal. Els resultats demostren que l'activació manté la linialitat fins a una concentració de $7,3 \mu g.$ de proteasa, és a dir, de manera que la relació P/PhK en proteïna sigui de $1/20$ a $1/3$. A concentracions més grans de proteasa, es perdia la linialitat.

A la vista d'aquests resultats, en els experiments posteriors es va emprar una relació proteasa/fosforilasa b quinasa de $1/9$ a $1/10$.

3.4.3. EFECTE DE POSSIBLES INHIBIDORS DE LA PROTEASA.

Com s'ha remarcat a l'apartat 1.2.2., les endopeptidases es classifiquen segons el seu mecanisme catalític, segons el qual es divideixen en: serin-proteases, tiol-proteases, carboxil-proteases i metalo-proteases. Els criteris per tal d'assignar a cada enzim la seva classificació corresponent es basen sobretot en estudis d'inhibició, els quals són, amb poques excepcions, específics per a cada tipus d'endopeptidases.

Els criteris més emprats comunament per a assignar a cada proteasa la seva categoria es resumeixen a l'esquema

En el nostre cas vam, per tant, assajar l'activitat pro-

teasa sobre fosforilasa β quinasa en presència de diversos inhibidors en un intent d'atorgar al nostre enzim un tipus determinat de mecanisme catalític.

Aquest era un punt de gran importància en la caracterització de l'enzim i decidir per tant si és un enzim descrit ja sota un altre nom o bé un enzim nou.

Els assaigs d'inhibició de proteases es porten a terme fent una preincubació de la proteasa amb el possible inhibidor durant 1 hora, prèviament a l'assaig de l'activitat proteasa.

Abans dels assaigs corresponents, vam fer un estudi previ de l'activitat de la proteasa després de la preincubació, és a dir, si aquesta afectava d'alguna manera el nostre enzim. Vam comprovar que l'activitat proteàsica enfront de la fosforilasa quinasa no es veia en absolut modificada per una preincubació d'1 hora a 30°C en presència de tampó β - glicerofosfat 125 mM Tris-HCl 125 mM a pH 6,8.

Els assaigs es van portar a terme segons el següent esquema operatiu: S'incubava la proteasa en presència de l'inhibidor a assajar durant 1 hora a 30°C. Després d'aquest pas, s'assajava la proteasa així tractada sobre fosforilasa β quinasa, tal com s'indica a l'apartat corresponent. Es feia paral·lelament un control d'estabilitat amb fosforilasa β quinasa i un control positiu amb proteasa sense tractar amb cap inhibidor, però sotmesa a la preincubació.

El tampó de preincubació i el d'assaig sobre fosforilasa β quinasa no contenia EDTA ni DTT, per evitar possibles interferències. En assaigs posteriors a temps llargs d'incubació es van incloure aquests dos compostos, ja que la fosforilasa β quinasa es mostra molt més estable en la seva

INHIBIDOR	% ACTIVITAT PROTEASA		
	2 min	5 min	15 min
Cap	100	100	100
PMSF 1 mM	0	0	0
STI 1 mg/ml	0	0	16
EDTA 1 mM	90	91	111
EGTA 1 mM	104	102	93
EDTA 2 mM DTT 2 mM	63	64	94
DTT 2 mM	98	97	95
Pepstatina 1 μ g/ml	94	75	82
TPCK 5 mM	65	60	58
TLCK 5 mM	53	42	45
TLCK 10 mM	40	38	37

Taula 4 PERCENTATGES D'INHIBICIÓ PROVOCATS PER LA PREINCUBACIÓ DE LA PROTEASA EN PRESENCIA DE DIFERENTS INHIBIDORS.

L'assaig es porta a terme amb una preincubació de la proteasa amb l'inhibidor a assajar i posterior assaig sobre la fosforilasa quinasa.

Les concentracions indicades són en la mescla d'assaig.

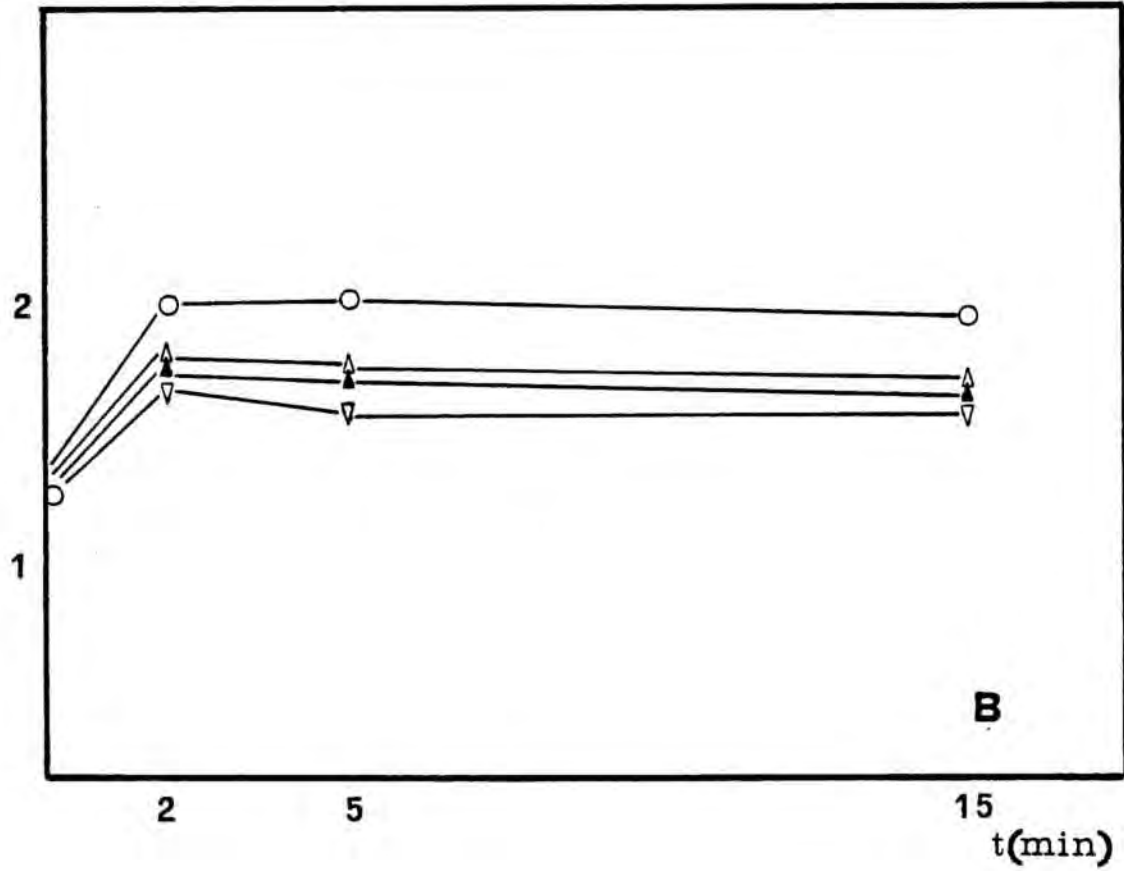
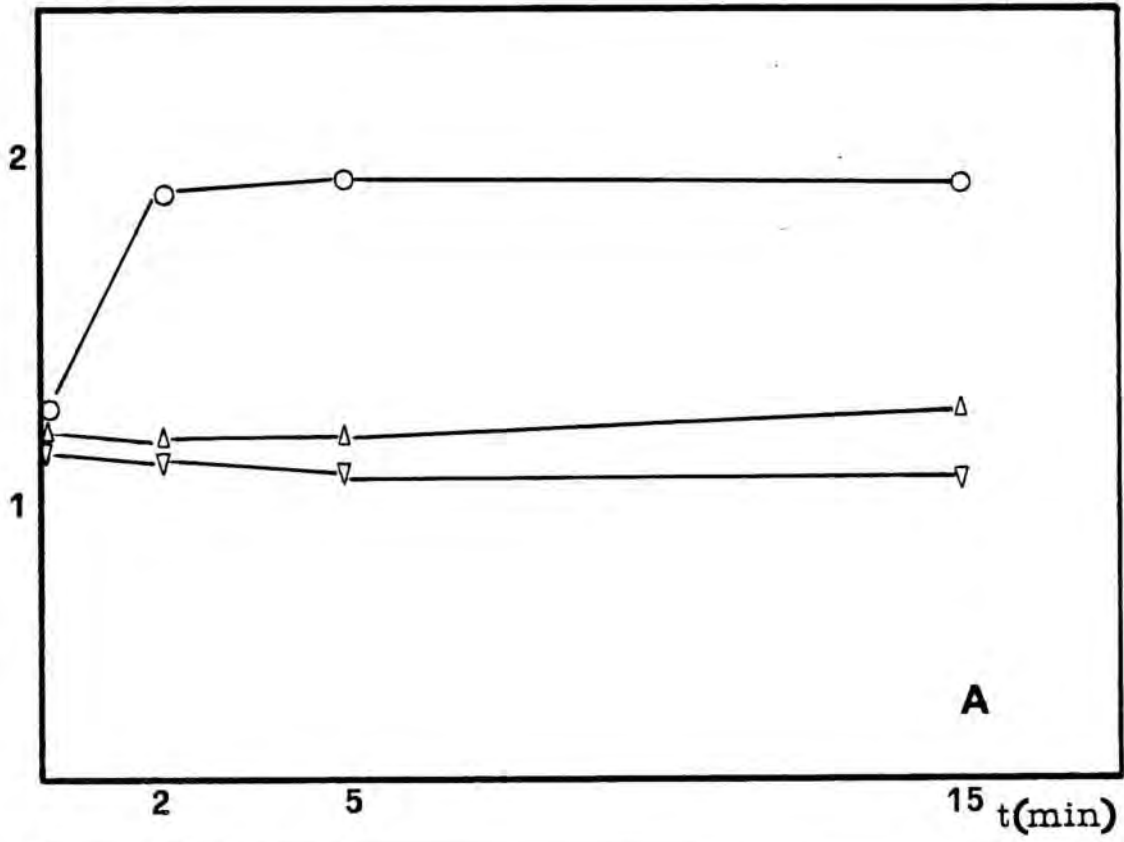
Els temps indicats són els d'incubació proteasa-fosforilasa quinasa.

Figura 8 REPRESENTACIÓ GRÀFICA DE L'ACCIÓ DE DIFERENTS INHIBIDORS SOBRE L'ACTIVITAT PROTEASA.

Gràfica A: Els símbols (O) corresponen a un control en presència de proteasa. Els símbols (Δ) corresponen a l'activitat en presència de PMF 1 mM. Els símbols (∇) corresponen al STI 1 mg/ml.

Gràfica B: Els símbols (O) corresponen a un control en presència de proteasa. Els símbols (Δ) indiquen TPCK 5 mM. Els símbols (\blacktriangle) corresponen a TLCK 5 mM. Els símbols (∇) corresponen a TLCK 10 mM.

act. PhK (cpm · 10⁻³)



presència. Es va demostrar que ni l'EDTA ni el DTT influeixen sobre l'activitat proteasa.

Els resultats s'exposen a la figura 8 i a la taula 4:

- En elles s'observa que els únics inhibidors totals són el PMSF i el Soybean Trypsin Inhibitor (STI), que la inhibeixen en un 100%.

- DTT, un activador de tiol-proteases i inhibidor de metalo-proteases, pràcticament no inhibeix, tant sol, com juntament amb EDTA.

- EDTA i EGTA van ésser assajats, ja que moltes proteases són activables per calci i, molt especialment, la descrita com a activadora de la fosforilasa b quinasa (13). Els resultats mostren que pràcticament no són inhibidors. Per a una discussió més àmplia, veure l'apartat 3.4.5.

- Pepstatina, un inhibidor específic per a les carboxipeptidases, es va mostrar totalment inactiu.

- Finalment, les dues clorocetones assajades, tosil-fenil-clorometilcetona (TPCK) i tosil-lisil-clorometilcetona (TLCK), descrites com a inhibidors de certes serin-proteases, es mostren parcialment actives, arribant a inhibicions del 37% en 15 minuts d'assaig en el cas concret de la TLCK a concentració 10 mM.

Podem, doncs, concloure després d'aquest estudi, que el nostre enzim és una proteasa pertanyent al grup de les serin-proteases.

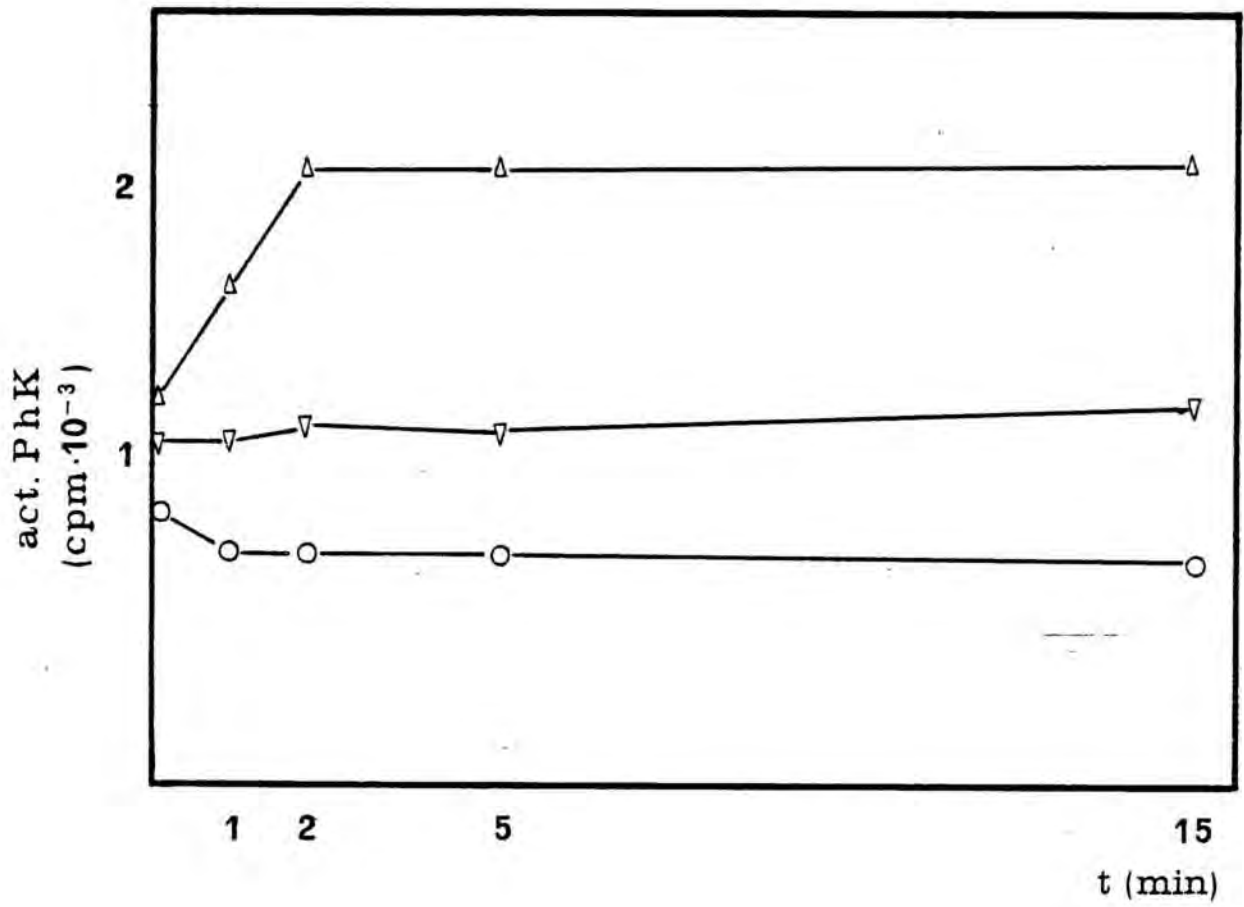
3.4.4. PROVA D'INHIBICIÓ PER SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR.

Com s'ha observat en l'apartat corresponent als inhibidors, tant el PMSF a concentració 1 mM com el Soybean Tryp-

Figura 9 EFECTE DE L'INHIBIDOR DE LLAVOR DE SOJA DE LA TRIPSINA SOBRE LA PROTEASA DURANT LA INCUBACIÓ AMB FOSFORILASA QUINASA.

La mescla d'assaig contenia: proteasa 10 g, fosforilasa quinasa 40 g i Soybean Trypsin Inhibitor 100 g.

Els símbols (O) corresponen al control fosforilasa quinasa ~~en presència de proteasa~~. Els símbols (X) corresponen al control d'activitat proteasa. Els símbols (V) corresponen a l'activitat proteasa en presència de STI.



sin Inhibitor 1 mg/ml., afectaven profundament l'activitat del nostre enzim. Però aviat vam observar una sorprenent diferència entre ambdós compostos.

L'assaig amb inhibidors ha estat fet, com ja s'ha indicat, mitjançant una preincubació durant la qual el possible inhibidor bloqueja el centre actiu de l'enzim, impedit després en el posterior assaig que el substrat, en el nostre cas, la fosforilasa b quinasa, ocupi aquest lloc. D'aquesta manera s'obtenien, tant amb un compost com amb l'altre, inhibicions de pràcticament el 100%.

Però també es varen assajar les accions d'aquests dos inhibidors durant la pròpia incubació proteasa-fosforilasa b quinasa, i les resultats obtinguts van ésser totalment diferents.

L'assaig es va portar a terme, en els dos casos, afegint a la mescla de reacció que contenia els dos enzims, l'inhibidor a assajar en concentració final de: PMSF 1 mM i STI 2 mg/ml (que corresponia a 10 vegades la concentració en proteïna de la proteasa).

El PMSF va mostrar en aquest assaig una absoluta falta de poder inhibitori, ja que la proteasa mantenia activitats pròximes al 100% en els 15 minuts de duració de l'assaig.

Per la seva banda, el STI es va mostrar com un bon inhibidor tal com s'observa a la figura 9.

Els percentatges d'inhibició aconseguits per ambdós compostos en aquests assaigs es mostren a la taula següent:

Inhibidor	Percentatge d'activitat proteasa		
	2 min	5 min	15 min
Cap	100	100	100
PMSF 1 mM	95	97	99
STI 2 mg/ml	18	20	49

És difícil donar una explicació a aquest fet, i és possible que es degui a una qüestió de concentracions. Aquest punt requeriria, en tot cas, un estudi més àmpli que fes servir concentracions variables de l'inhibidor i del substrat i calculés les K_i corresponents.

3.4.5. ESTUDI SOBRE LA INFLUÈNCIA DEL CALCI EN L'ACTIVITAT DE LA PROTEASA.

El fet ja esmentat de què el calci es mostra com a activador de certs enzims proteolítics i l'existència d'una proteasa dependent de calci amb activitat sobre la fosforilasa β quinasa, ens va portar a estudiar aquest punt malgrat el fet de que ni l'EDTA ni l'EGTA semblaven afectar el nostre enzim.

L'estudi es va fer sotmetent la nostra proteasa a concentracions variables d'EGTA i, posteriorment, a concentracions variables de CaCl_2 . Aquestes es van calcular sobre una concentració basal de Ca^{2+} 1 mM neutralitzada amb EGTA 1 mM, per partir de concentracions iguals de calci en cada punt.

Efactor	% d'activitat proteasa		
	2 min	5 min	15 min
EGTA 55 μ M	100	90	78
EGTA 100 μ M	106	88	72
EGTA 500 μ M	100	102	90
EGTA 1 mM	112	104	93
EGTA 2 mM	98	110	98
EGTA 5 mM	112	111	105
Ca ²⁺ 55 μ M	90	85	84
Ca ²⁺ 100 μ M	87	82	70
Ca ²⁺ 500 μ M	76	71	72
Ca ²⁺ 1 mM	96	72	65
Ca ²⁺ 2 mM	96	78	60

Taula 5 PERCENTATGES D'ACTIVITAT PROTEASA EN PRESENCIA DE DIVERSES CONCENTRACIONS DE CALCI O EGTA.

Les concentracions indicades són les existents a la mescla d'assaig.

Les concentracions de Ca²⁺ (CaCl₂) han estat calculades sobre una concentració basal de Ca²⁺ neutralitzada amb EGTA 1 mM.

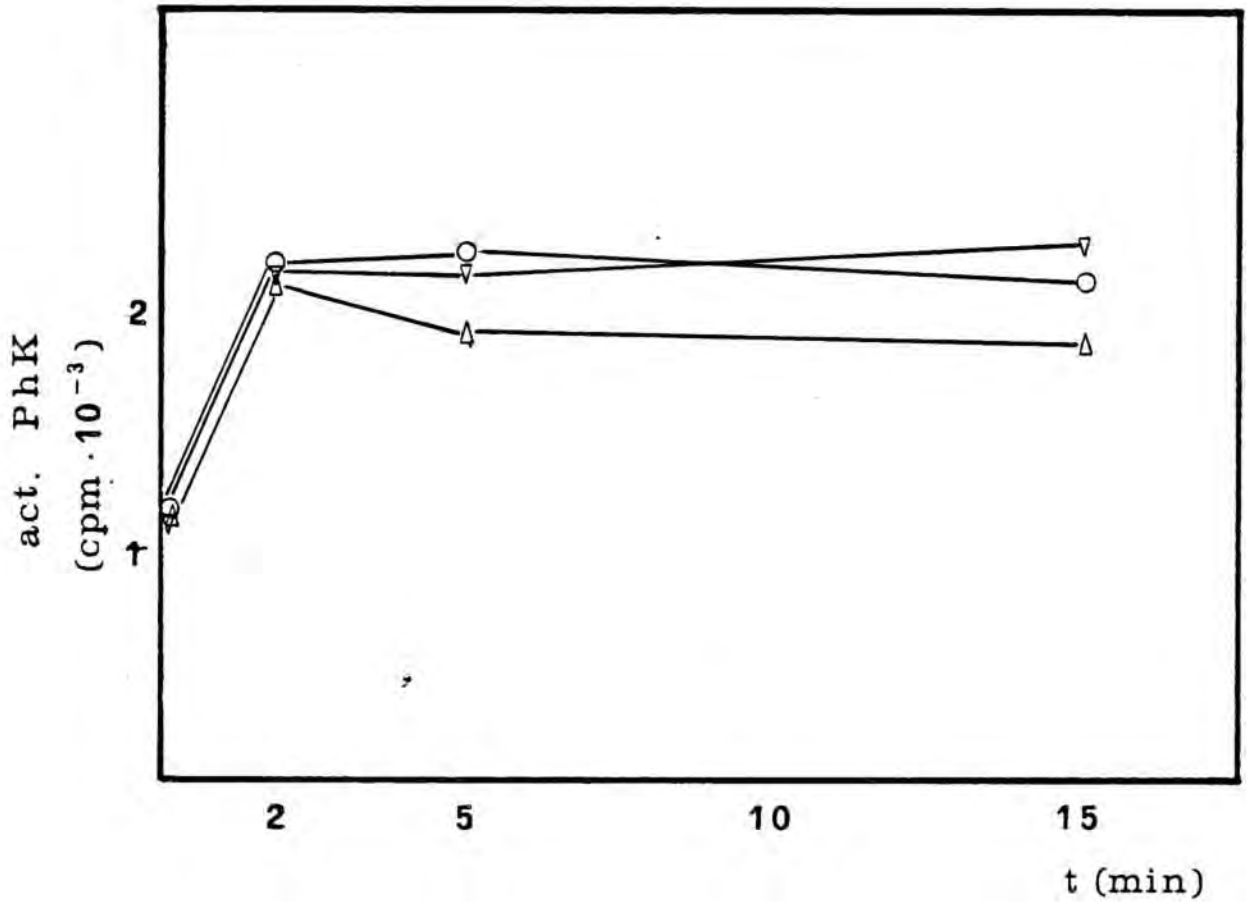
Figura 10 REPRESENTACIÓ GRÀFICA DE L'EFECTE DEL CALCI
I DE L'EGTA EN L'ACTIVITAT DE LA PROTEASA.

L'assaig es va portar a terme fent una preincubació de la proteasa amb la concentració corresponent de calci o EGTA durant 1 hora a 30° C.

Els símbols (O) corresponen al control d'activitats proteasa en absència de qualsevol efector.

Els símbols (V) corresponen a l'activitat en presència de EGTA 1 mM (concentració existent a la mescla d'assaig).

Els símbols (A) corresponen a l'activitat en presència de Ca^{2+} 2 mM (concentració neta a l'assaig).



L'assaig de les diferents concentracions de calci i EGTA es va fer, com en el cas dels inhibidors, amb una preincubació de la proteasa amb l'EGTA i/o el Ca^{2+} durant 1 hora, prèviament a l'assaig de l'activitat proteàsica sobre fosforilasa b quinasa.

Els resultats es mostren a la figura 10 i, més àmpliament, a la taula 5.

Veiem, doncs, que l'EGTA no té cap efecte sobre la proteasa a concentracions netes a l'assaig d'aquest compost entre $55 \mu\text{M}$ i 5mM . El Ca^{2+} es va assajar també a concentracions creixents compreses entre $55 \mu\text{M}$ i 2mM i va mostrar, sorprenentment, un lleuger efecte inhibitori sobre l'activitat proteasa, efecte que requeriria un estudi molt més profund i que ja queia fora dels objectius del treball.

3.4.6. CORBA DE pH ÒPTIM.

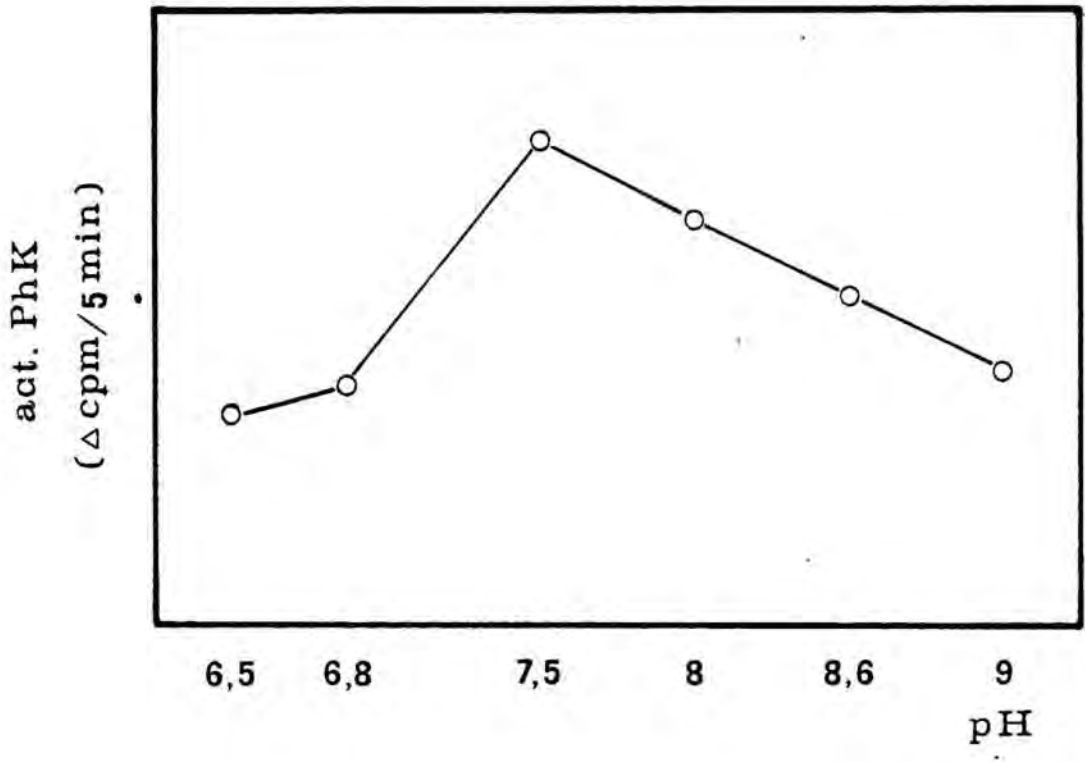
Es va fer un estudi del pH òptim de la proteasa fent servir com a substrat la fosforilasa b quinasa. La raó d'aquest assaig era prosseguir en la caracterització de l'enzim. Amb caseïna com a substrat, havia mostrat un pH òptim molt àmpli, de 7 a 8,5, aproximadament.

L'assaig es va dur a terme seguint el protocol usual per a la mesura d'activitat. Els tampons en els quals es va portar a terme la reacció van ésser en tots els casos de Tris HCl 125mM , β -glicerofosfat 125mM a pH 6,5; 6,8; 7,5; 8,0; 8,6 i 9,0.

No vam assajar en presència de tampons ajustats a pH més petits de 6,5 o més grans que 9,0, ja que la proteasa havia demostrat clarament ésser del tipus neutre, assajada sobre caseïna.

Figura 11 CORBA DE pH ÒPTIM DE LA PROTEASA.

Tots els assaigs es van fer emprant com a tampó una solució composta de Tris-HCl 125 mM β -glicerofosfat 125 mM ajustada al pH corresponent.



En la figura 11 podem observar els resultats: la proteasa es mostra activa atots els pH assajats, amb el punt de major activitat a pH 7,5. Aquest fet concorda amb el pH òptim proposat.

3.4.7. ESTUDI DE L'ACCIÓ DE LA PROTEASA SOBRE LA FOSFORILASA b QUINASA MITJANCANT GELS DE POLIACRILAMIDA.

El fet de visualitzar mitjançant electroforèsi en gel quin era l'efecte estructural de l'acció del nostre enzim sobre les diverses subunitats de la fosforilasa quinasa era de gran importància per a completar l'estudi que estàvem portant a terme.

Es va fer paral·lelament el seguiment de l'activitat de la proteasa observant els canvis esdevinguts en l'estructura de l'enzim en els gels, i els canvis esdevinguts en l'activitat de l'enzim.

L'assaig d'activitat es va fer normalment, fent servir com a tampó en la incubació β -glicerofosfat 50 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM a pH 6,8, per tal d'afavorir l'estabilitat de la fosforilasa b quinasa durant la incubació.

La tècnica descrita per a la preparació i realització dels gels està descrita a l'apartat 2.6.3. A temps discrets es treien alíquotes de la mescla d'assaig i es col·locaven en solució Sample Buffer a la qual s'hi havia afegit STI a una concentració de 70 μ g/ml., és a dir, més petita que la normalment emprada, per tal de que aparegués en el gel com una banda prima. Les mostres eren bullides immediatament a 100°C durant 3 minuts per evitar, en qualsevol cas, que la proteasa seguís actuant un cop aturada la reacció.

Simultàniament s'extreien alíquotes per a mesurar l'

activitat fosforilasa b quinasa.

Els resultats es mostren a les figures 12 i 5. La fotografia mostra que la proteòlisi és immediata i que té lloc exclusivament sobre les subunitats α i α' de la fosforilasa quinasa sense afectar les subunitats β i γ . Aquest efecte és simultani a l'increment d'activitat de la fosforilasa b quinasa.

A temps més llargs d'incubació, és a dir, superiors a 2 hores, s'observa l'aparició d'una banda intermitja entre les subunitats β i γ , que és testimoni de que la subunitat β també es degrada, encara que molt més lentament que la α . Aquest fet és acompanyat per la davallada en l'activitat de la fosforilasa b quinasa.

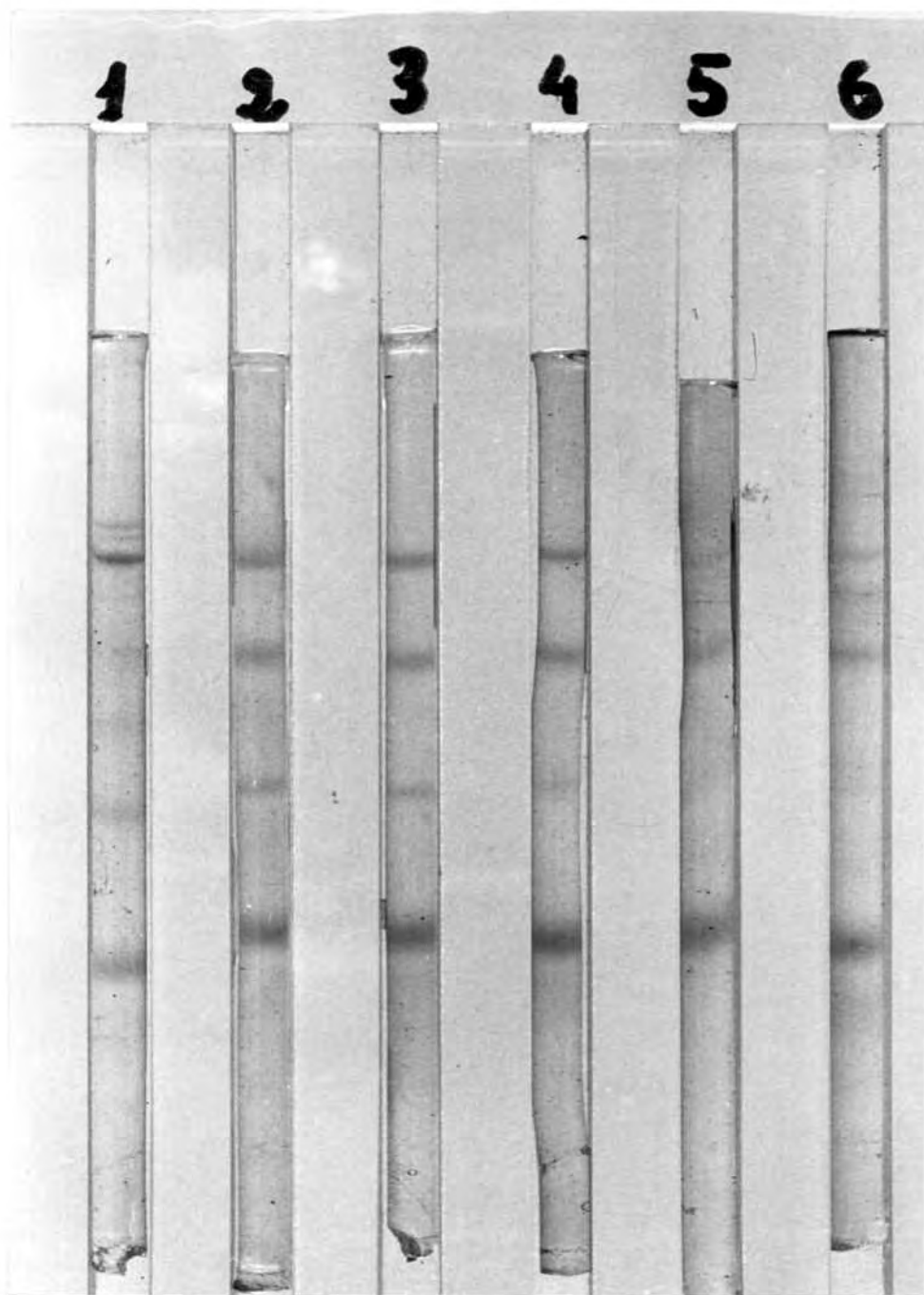


Figura 12 GELS DE POLIACRILAMIDA

- 1 $t=0m$
- 2 $t=2$
- 3 $t=15$
- 4 $t=60$
- 5 $t=120$
- 6 $t=180$

3.5. FORMACIÓ DE GRADIENTS DE LUDOX-POLIVINILPIRROLIDONA.

Un dels objectius d'aquest treball era la determinació de la localització subcel·lular de la proteasa aïllada dels leucòcits polimorfonuclears. La tècnica que vem posar a punt per aconseguir-ho va ésser la de centrifugació en gradients de densitat, i el solut escollit per a aquesta finalitat va ésser el Ludox HS-40, envoltat de partícules de polivinilpirrolidona (PVP).

Les característiques principals d'aquesta tècnica i les propietats del Ludox-PVP com a medi de gradient han estat ja descrites a l'apartat 1.3.

Prèviament a la separació de les fraccions subcel·lulars dels leucòcits, vam realitzar un estudi sobre les condicions de centrifugació, que s'exposen tot seguit.

3.5.1. ESTUDI SOBRE LA INFLUÈNCIA DE LA PVP EN LA PREPARACIÓ DEL MEDI DE GRADIENT.

Ja han estat descrits en aquest treball els avantatges de l'ús de Ludox recobert amb PVP sobre les solucions de Ludox sol. Entre elles, s'ha de destacar que el Ludox-PVP és més estable, especialment en solucions salines fisiològiques, té una osmolalitat més baixa, probablement degut a que disminueix la càrrega de la superfície de les partícules de sílica o bé a que queda emmascarada, i presenta baixa toxicitat cap a les cèl·lules.

Vam estudiar l'efecte que produïa la PVP sobre el pendent del gradient, de manera que fos una comprovació de que

el Ludox s'havia recobert bé.

El medi va ésser preparat tal com s'indica a l'apartat 2.5.3.

A la figura 13 se'ns mostra l'efecte de la PVP en gradients formats a 15000 rpm i diferents temps de centrifugació: 1 hora; 1 h 30 min.; 2 h.; 2 h 30 min. i 3 h. El pendent del gradient es va mesurar seguint l'índex de refracció de les fraccions corresponents.

Com s'aprecia en els 5 casos, podem veure que l'efecte de la PVP és molt marcat i la seva presència condueix a l'obtenció d'uns gradients de pendent més suau i continuat, degut a la més baixa velocitat de sedimentació de les partícules de sílica. Aquesta característica els fa més adients per a una bona separació ja que la resolució que s'obté és més fina.

A mesura que augmentem la velocitat de centrifugació i el temps, els gradients adquireixen un pendent més brusc. En el cas de velocitats de centrifugació molt elevades (per exemple, 25000 rpm durant 3 h: assaig no representat), va desapareixent l'efecte suavitzant de la PVP, ja que el gradient es va fent menys sensible a la seva presència. En aquests casos, pràcticament no se'ls pot donar el nom de gradient i l'efecte de la PVP és quasi nul.

3.5.2. INFLUÈNCIA DEL TIPUS DE CENTRÍFUGA.

Degut a la complexitat dels assaigs enzimàtics a realitzar en les fraccions del gradient, no era convenient per a nosaltres excedir d'un determinat volum de medi, facilitant així la determinació de les diverses activitats dels enzims.

Figura 13 GRADIENTS DE LUDOX I LUDOX-PVP A 15000 RPM I
DIFERENTS TEMPS DE CENTRIFUGACIÓ.

Gràfica A: 15000 rpm 1 hora.

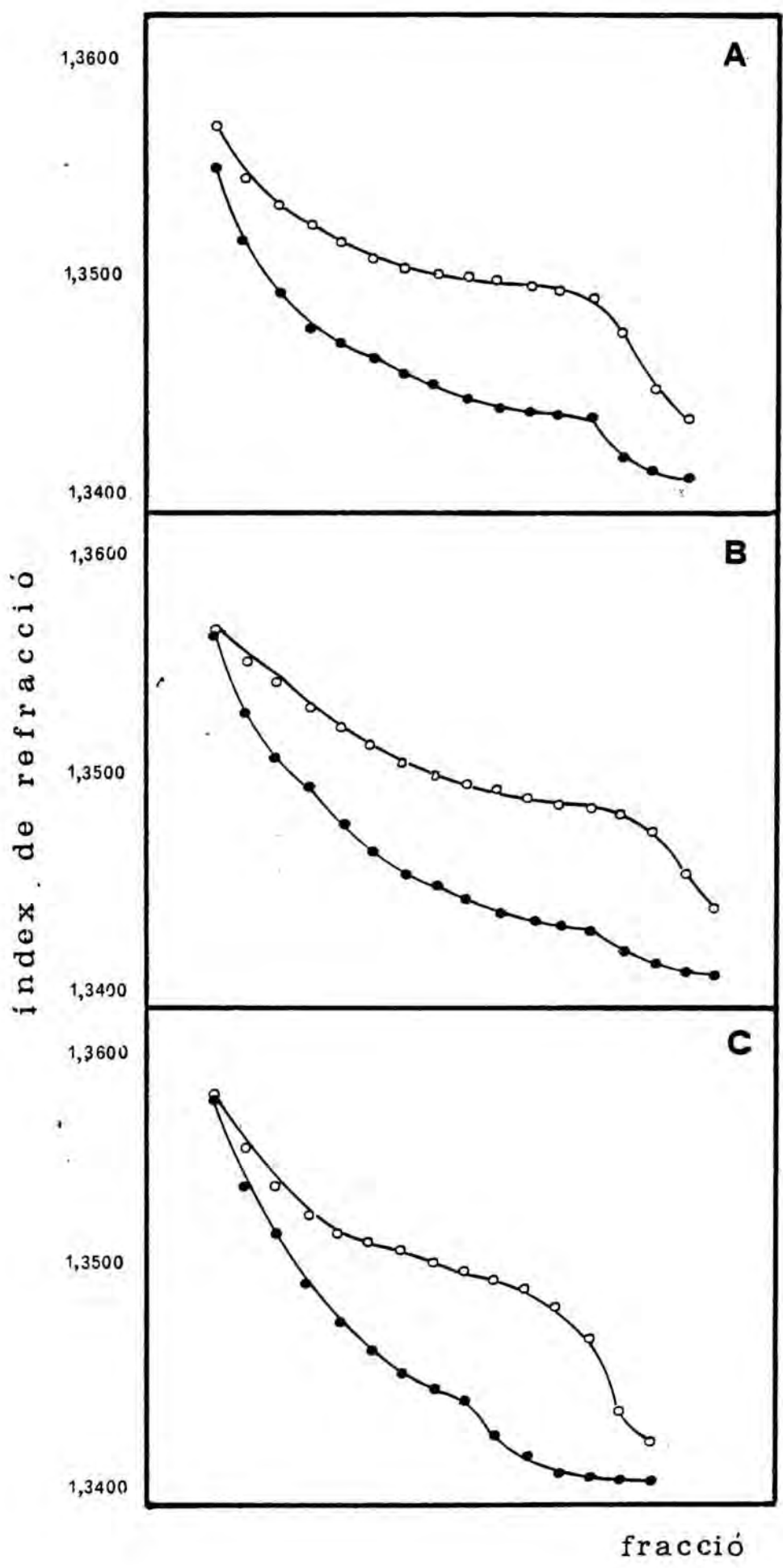
Gràfica B: 15000 rpm 1 hora 30 minuts.

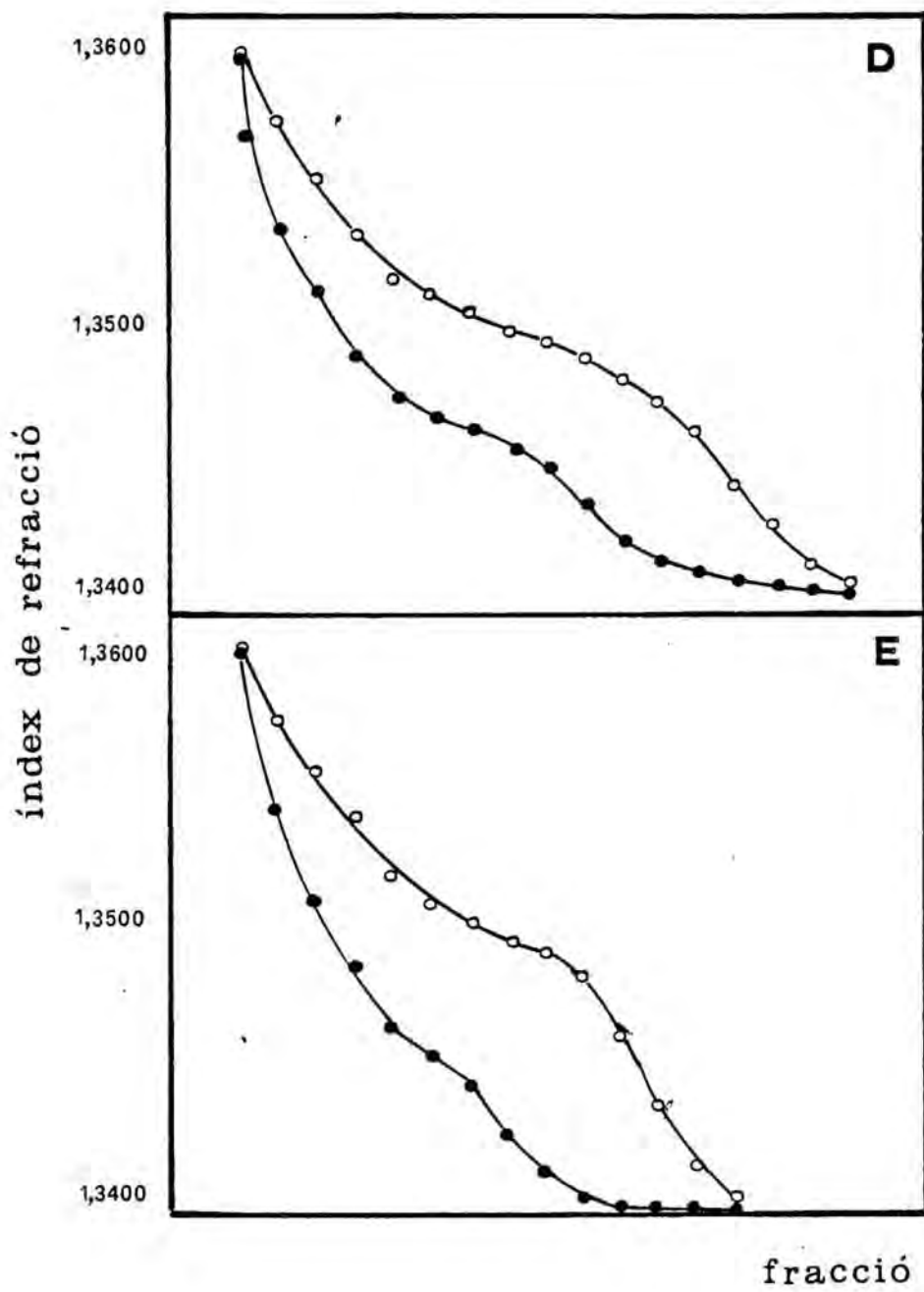
Gràfica C: 15000 rpm 2 hores.

Gràfica D: 15000 rpm 2 hores 30 minuts

Gràfica E: 15000 rpm 3 hores.

Els símbols (●) corresponen als gradients de Ludox. Els símbols (○) corresponen als gradients de Ludox-PVP.





cia en l'ús d'una centrífuga en particular.

En el nostre cas, vem fer servir en tots els gradients exposats en aquest treball l'ultracentrífuga Beckman L2 i el rotor Ty 40, les característiques dels quals s'han descrit prèviament.

3.5.3. EFECTE DE LA VELOCITAT I TEMPS DE CENTRIFUGACIÓ.

Amb la intenció de saber la importància del temps i la velocitat de centrifugació a un percentatge de Ludox determinat, vam córrer simultàniament diversos gradients idèntics, parant la centrífuga a temps definits i deixant els altres tubs córrer més temps.

En la figura 14 veiem la importància de la centrifugació. El medi de gradient conté un 10% Ludox, 3,75% PVP en sacarosa 0,48 M, pH 7,5.

Vam comprovar que, a mesura que s'allargava el temps de centrifugació, el pendent del gradient s'anava fent més accentuat, de forma que aquest efecte és més visible a partir de les 2 h 30 min de centrifugació. Es passa, doncs, de pendents pràcticament horitzontals en 1 hora de centrifugació, en els quals, en la part intermitja del gradient (fraccions 4-12) només disminueix l'índex de refracció en 0,0035 unitats, a pendents molt acusats en 3 hores de centrifugació, en els quals l'índex de refracció disminueix en 0,0105 unitats en les mateixes fraccions, és a dir, tres vegades més.

En la figura 15 podem observar la gran diferència que existeix entre dos gradients correguts paral·lelament a 20000 rpm durant 2 h. i 3 h. En aquesta figura comprovem que, en centrifugar, les partícules de Ludox comencen a formar el

Figura 14 EFECTE DEL TEMPS DE CENTRIFUGACIÓ EN LA PENDENT D'UN GRADIENT DE LUDOX-PVP-SACAROSA.

El medi de gradient estava format per un 10% de Ludox (v/v), i 3,75% de PVP en sacarosa 0,48M tal com s'explica a mètodes.

La centrifugació va ésser feta en una ultracentrifugadora Beckman L2 rotor Ty 40 a 15000 rpm.

Els símbols (∇) (▲) (△) (●) i (○) corresponen a temps de centrifugació de 1 h, 1h 30 min, 2 h, 2 h 30 min i 3 h respectivament.

índex de refracció

1,3400

1,3500

1,3600

fracció

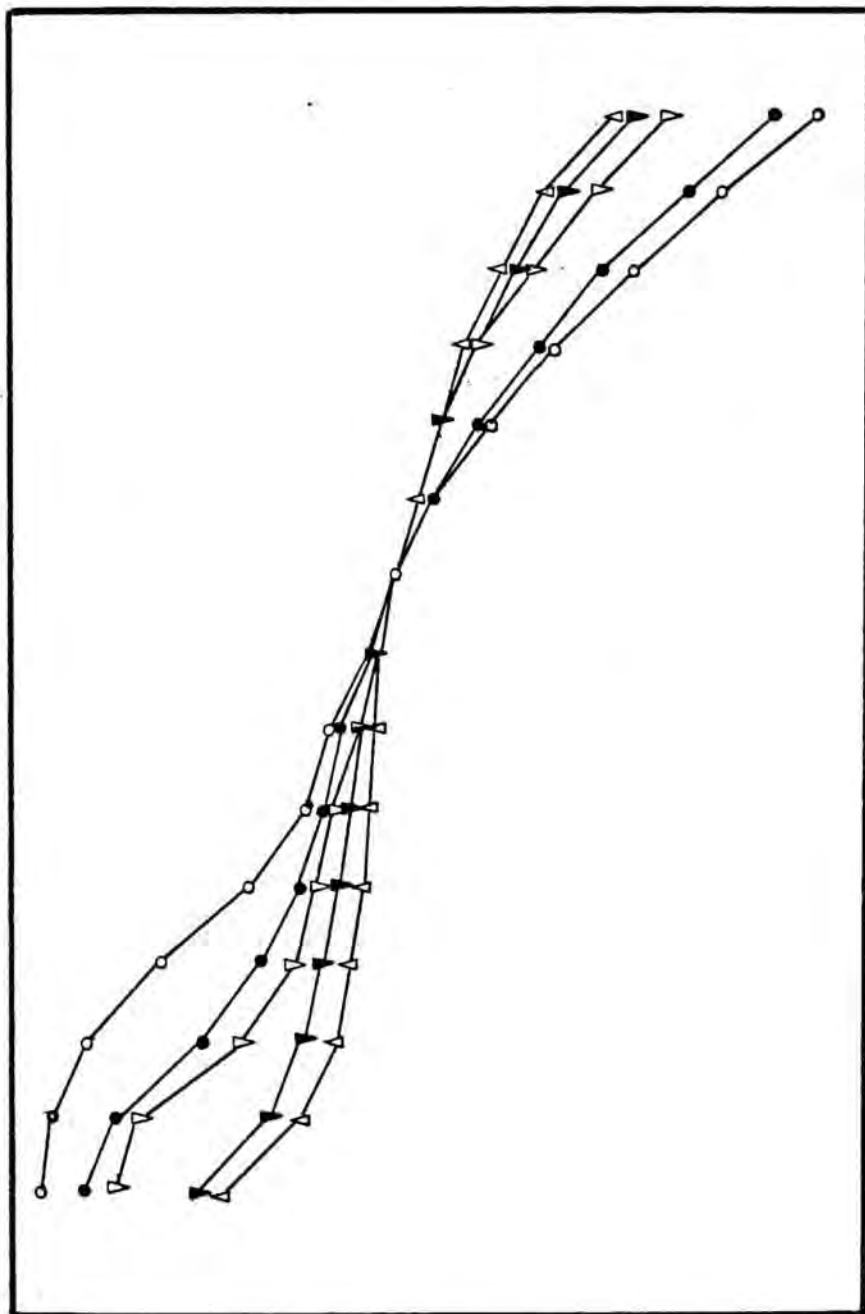
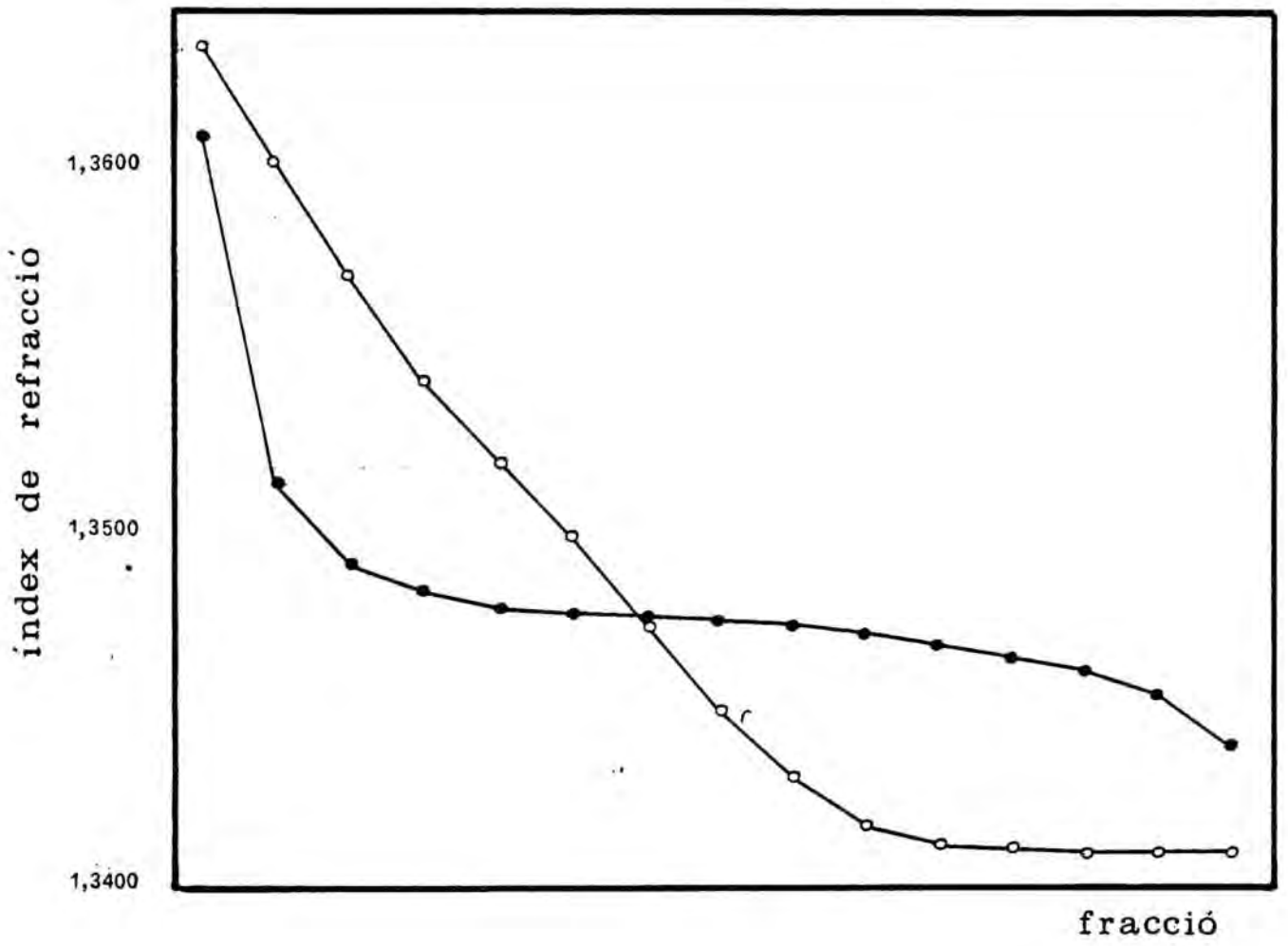


Figura 15 EFECTE DEL TEMPS DE CENTRIFUGACIÓ EN LA PENDENT D'UN GRADIENT DE LUDOX-PVP-SACAROSA.

El medi de gradient és idèntic al de la figura anterior.

Els símbols (●) corresponen a la centrifugació feta a 20000 rpm durant 2 h. Els símbols (○) corresponen a la centrifugació feta a 20000 rpm durant 3 h.



Amb aquesta idea, i tenint en compte el material disponible al laboratori, vam fer un estudi sobre els gradients aconseguits variant el tub on es formava el gradient.

Les condicions de centrifugació van ésser les següents:

a) Ultracentrífuga Beckman L2, rotor Ty 40, angle format pel tub respecte l'eix vertical del rotor: 26° , tub de policarbonat (ref. 339573) de mida 5/8 x 3 polzades.

Centrifugació a 15000 rpm durant 90 minuts (equivalent a 15000xg al mig del tub). Volum emprat: 9 ml. de medi de gradient Ludox-PVP-sacarosa.

b) Centrífuga Sorvall RC-5 refrigerada, rotor SM 24, angle format pel tub respecte l'eix vertical del rotor: 28° , tub de policarbonat (ref 223) de mida 13 x 106,3 mm amb adaptador (ref. 46)

Centrifugació a 15000 rpm durant 90 minuts (equivalent a 20000xg al mig del tub). Volum emprat: 9 ml. del mateix medi de gradient.

Un cop realitzada la centrifugació, es va mesurar l'índex de refracció de les diferents fraccions.

Els resultats van demostrar que les diferències entre els dos gradients eren molt petites (dades no representades) sobretot pel que es refereix al pendent del gradient. Els extrems del gradient són sempre més variables degut al fet que en el fraccionament del gradient és possible que es toqui una mica el sediment de sílica que es diposita al final del tub o a altres factors deguts a falles manuals en el fraccionament del gradient.

En aquestes mateixes condicions, es van fer córrer dos gradients amb mostra. L'assaig de les activitats fosfatasa àcida i succinat deshidrogenasa no van mostrar cap diferèn-

gradient espontàniament, i, a mesura que la centrifugació s'allarga, la part superior del tub queda desprovista pràcticament de Ludox (i_r molt baix), el qual s'acumula al fons del tub (i_r molt elevat) i forma un coixí sòlid d'elevada densitat (fraccions 1-3).

3.5.4. EFECTE DE LES DIFERENTS DENSITATS DE PARTIDA EN GRADIENTS DE LUDOX-PVP-SACAROSA.

En l'estudi de la influència de la densitat inicial del medi de gradient va ésser variada únicament la concentració de Ludox, mantenint constant la de PVP i les condicions de centrifugació.

L'efecte dels diferents percentatges de Ludox es pot observar a la figura 16.

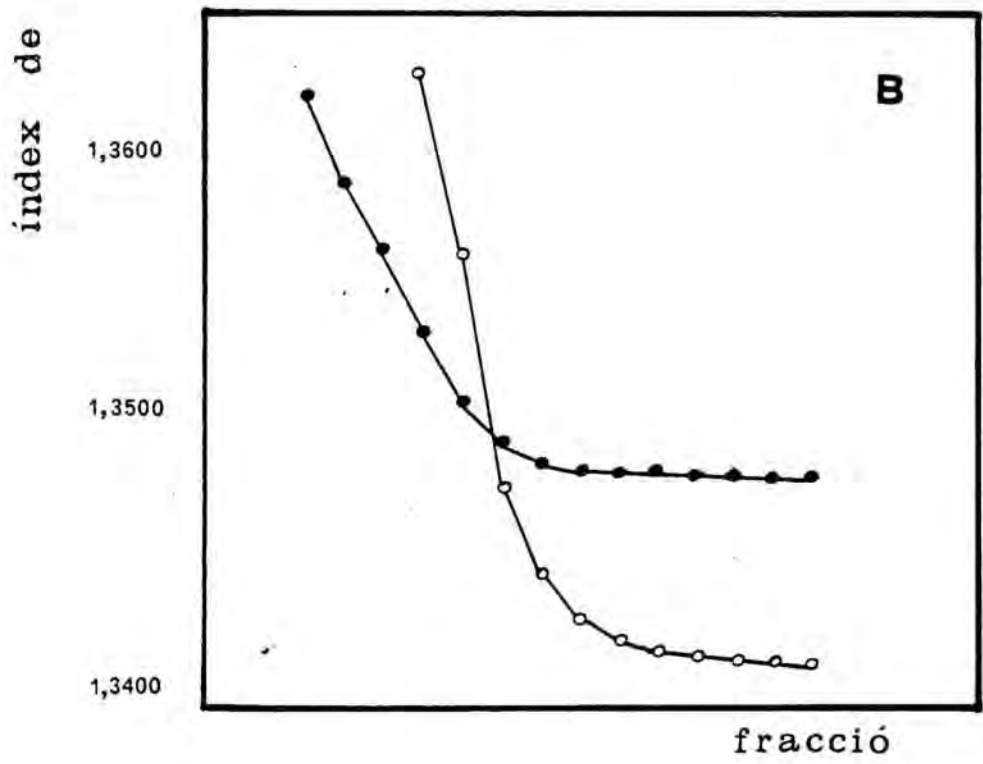
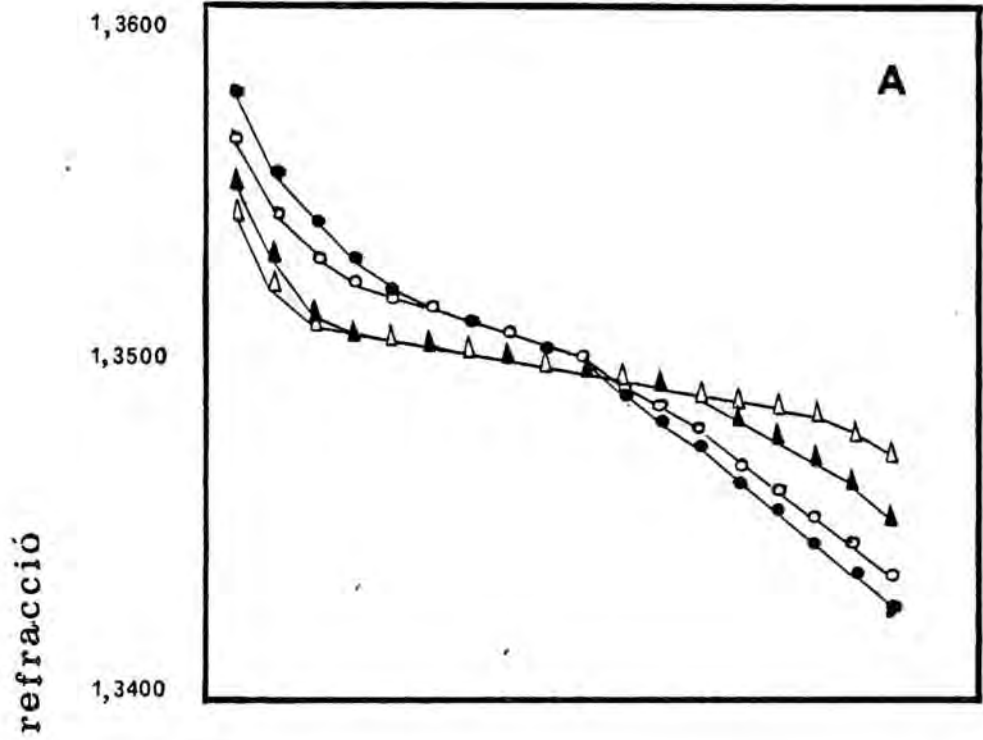
A la gràfica superior es veuen els efectes produïts fent la centrifugació a 15000 rpm durant 90 minuts. Podem veure que, a concentracions de Ludox entre el 2 i el 10%, les diferències no són molt grans, però l'efecte es veu, com en el cas de la velocitat de centrifugació, en el pendent del gradient, més que en la densitat. És a dir, s'escurça la zona linial del gradient a mesura que augmentem la concentració inicial de Ludox.

A mesura que extremem les condicions, aquests efectes es fan més exagerats. Així, en la gràfica inferior de la figura 17, observem els diferents gradients obtinguts a 25000 rpm durant 3 hores a partir de solucions inicials que contenen un 2,4% i un 10,4% de Ludox. Podem observar que el sediment de sílica es forma al fons del tub i ocupa quasi la tercera part del tub, mentre que la part superior té una

Figura 16 EFECTE DE LA DENSITAT INICIAL DEL MEDI EN
GRADIENTS DE LUDOX-PVP-SACAROSA.

Gràfica A: Centrifugació a 15000 rpm durant 90 minuts.
Els símbols (Δ), (\blacktriangle), (O) i (\bullet) corresponen respectivament a
uns percentatges de Ludox en el medi de partida de 2,4%; 4%;
6%; 10,4%.

Gràfica B: Centrifugació a 25000 rpm durant 3 hores.
Els símbols (\bullet) corresponen al medi amb un 2,4% de Ludox.
Els símbols (O) corresponen al medi amb un 10,4% de Ludox.



densitat inicial molt baixa.

3.5.5. EFECTE DE LA DENSITAT INICIAL EN GRADIENTS DE LUDOX-PVP- NaCl .

Com en el cas dels gradients de Ludox-PVP-sacarosa, en començar l'estudi dels de Ludox-PVP- NaCl , es va imposar la necessitat de veure com variava la forma del gradient en variar el percentatge de Ludox existent en la mostra de partida.

Aquesta anàlisi es va fer muntant gradients que contenen el 4% Ludox (densitat inicial = $1,010 \text{ gr/cm}^3$), 6% ($d=1,017$), 12% ($d=1,04$), 14% ($d=1,046$) i 16% ($d=1,050$).

Els gradients els vam córrer i fraccionar paral·lelament. Els índex de refracció van ésser mesurats el mateix dia i en les mateixes condicions.

Com veiem a la figura 17 les diferents densitats inicials ténen una influència bastant marcada en la forma del gradient. A mesura que augmentem la densitat del medi inicial, augmenta la densitat mitja del gradient. Aquest fet és molt més marcat que no pas en els gradients de Ludox-PVP-sacarosa.

També la densitat inicial té un cert efecte sobre el pendent del gradient, de forma que és més fort en aquells gradients que contenen un percentatge de Ludox més elevat.

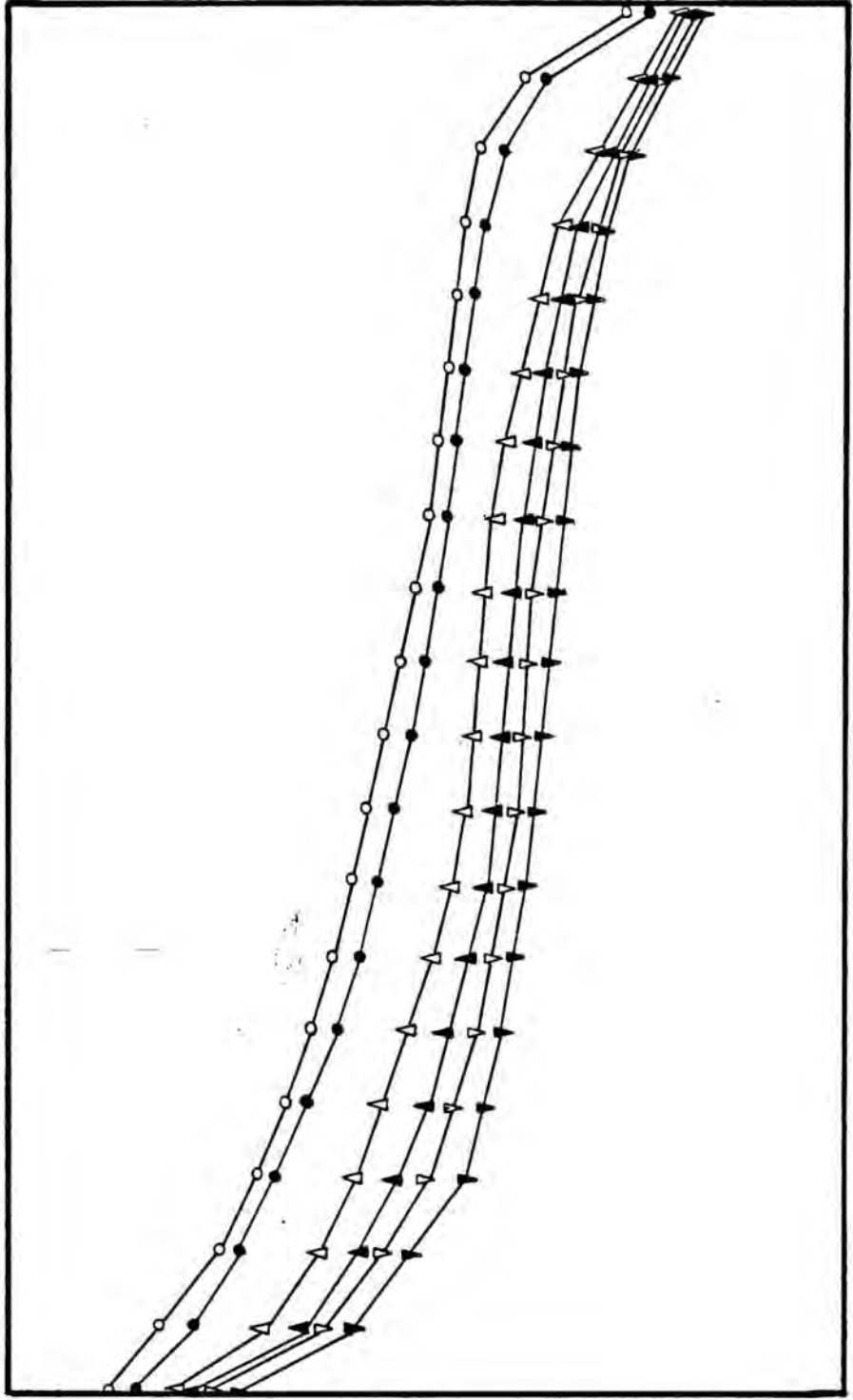
3,5,6, PROVA DE DISTORSIÓ DEL GRADIENT.

Quan vam començar a aplicar mostra als gradients, ens vam plantejar la qüestió de si la quantitat de mostra que posàvem era adequada perquè la separació fós bona. El pro-

Figura 17 EFECTE DE LA DENSITAT INICIAL DEL MEDI EN GRADIENTS DE LUDOX-PVP- NaCl .

La centrifugació, va ésser feta a 15000 rpm durant 75 minuts.

Els símbols (∇), (∇), (\blacktriangle), (\triangle), (\bullet) i (\circ) corresponen a uns percentatges de Ludox del 4%, 6%, 10%, 12%, 14% i 16%, respectivament.



fracció

1,3550

índex de refracció

1,3450

1,3350

blema radica en què quantitats massa grans de mostra no es poden emprar perquè ocasionen una distorsió molt forta de la forma del gradient, de forma que, en una zona del gradient on el tub control presenta pendent, el tub control pot no presentar-ne.

L'altre problema que vam intentar resoldre era el de si seria més convenient fer servir per a la separació subcel·lular el pellet de 27000xg (que anomenàvem P27), o bé el sobrenedant prèvi de 600xg (anomenat S6). L'avantatge d'utilitzar l'S6 com a mostra de partida pel subfraccionament radicava en què no era necessària una resuspensió i s'evitaven així, en gran part, els problemes generats en una deficient resuspensió que donaria lloc a agregats, o bé a una resuspensió exagerada que ocasionava una parcial destrucció dels orgànuls.

L'avantatge d'utilitzar el P27 com a mostra de partida radicava sobretot en el fet d'eliminar d'aquesta manera el citoplasma cel·lular amb totes les activitats enzimàtiques a ell associades, partint d'aquesta manera d'una mostra inicial menys impurificada. A aquest avantatge general s'afegeia el particular d'haver escollit com un dels marcadors mitocondrials la glutamat deshidrogenasa, que es troba certament a la mitocondria, però també al citoplasma, amb la qual cosa deixava d'ésser un marcador adient si partíem de l'S6 per a formar el gradient.

Amb aquestes consideracions presents, vam montar tres gradients en les mateixes condicions:

- El primer d'ells era el tub control i contenia 9 ml de medi de gradient Ludox-PVP-sacarosa al 10,4% de Ludox.
- Al segon se li va aplicar com a mostra el P27 corres-

ponent a 1/2 l. de sang, resuspenent-lo directament en el medi de gradient mitjançant un homogeneïtzador Potter-Elvehjem. El volum total era de 9 ml.

- El tercer gradient es va formar tenint com a mostra de partida l'S₆. A cada tub s'hi van aplicar 8 ml. del medi de gradient més 1 ml. d'S₆, que corresponia a un volum original de sang de 1/2 l., barrejant després el tub de manera que quedés una mescla homogènia.

Els tubs que contenien mostra es van muntar i mesurar per duplicat.

La centrifugació va ésser feta a 15000 rpm durant 90 minuts.

La figura 18 ens mostra com, amb aquesta quantitat de mostra, les diferències entre el gradient original i el problema P27 són mínimes, de manera que el material de partida no distorsiona el gradient en absolut.

La lleugera diferència entre l'original i el problema amb S₆ pot ésser deguda a que aquest últim estava format per 8 ml. de medi i 1 ml. de mostra, enlloc de 9 ml. de medi, la qual cosa podia fer disminuir una mica la densitat inicial del medi de gradient. En tot cas, no es perd en cap punt el lleuger pendent típic d'un gradient format en aquestes condicions.

Davant d'aquests resultats, vam escollir com a mostra de partida el P27 i aquest ha estat el que hem fet servir en tots els resultats exposats fins ara.

Necessitàvem, però, una manera de controlar la quantitat de mostra que posàvem a cada gradient. Aviat vam comprovar que partir sempre del mateix volum de sang no era un bon sistema, ja que la quantitat de cèl.lules pot variar d'una

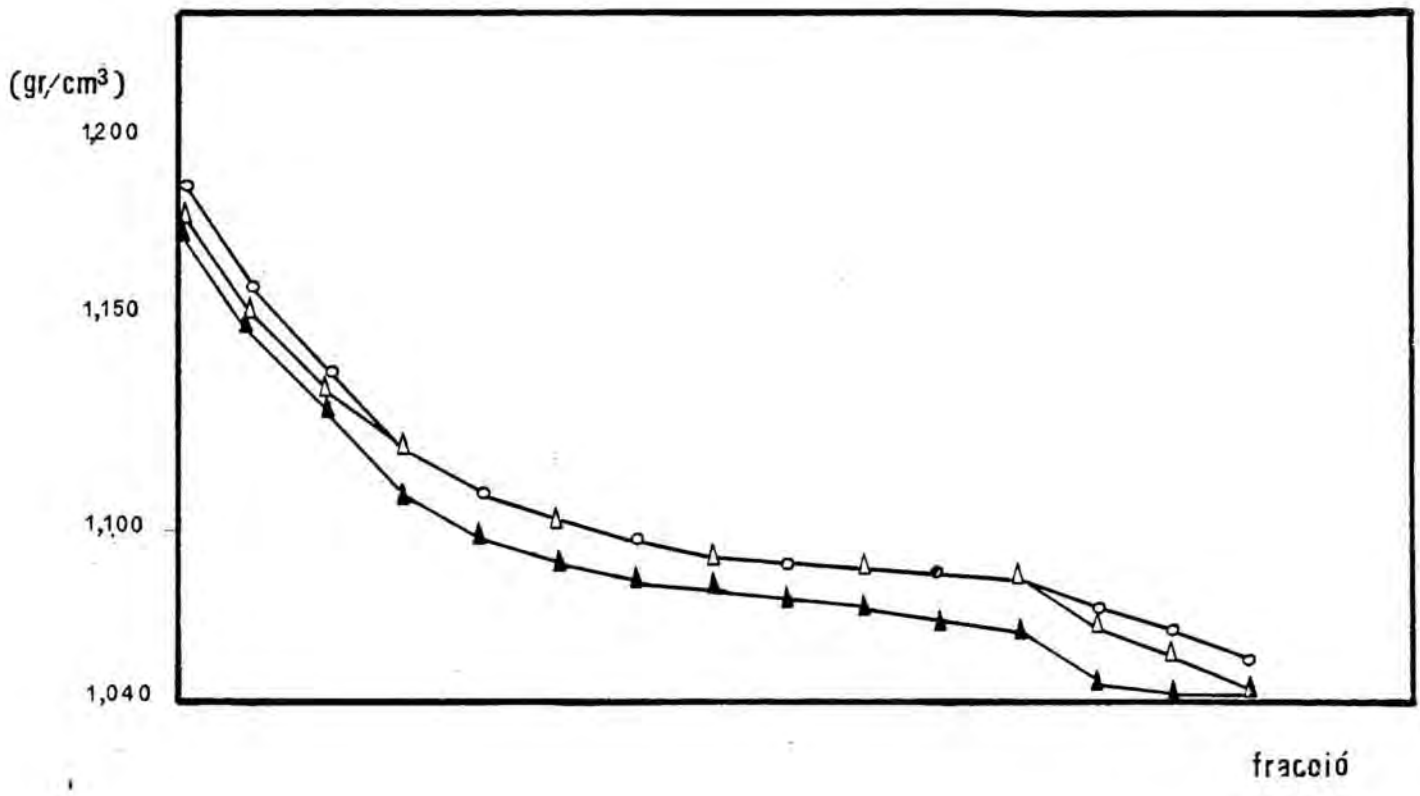
Figura 18 PRVA DE DISTORSIÓ DEL GRADIENT EN PRESENCIA
DE LA MOSTRA.

Els gradients van ésser fets de Ludox (10,4% p/v)-FVP-sacarosa a 15000 rpm durant 90 minuts.

Els símbols (O) corresponen al gradient control.

Els símbols (Δ) corresponen al gradient amb el P₂₇ com a mostra.

Els símbols (\blacktriangle) corresponen al gradient amb el S₆ com a mostra.



sang a una altra i, sobretot, la separació pot ésser més o menys perfecta en cada cas, donant lloc a una variació bastant important en el rendiment de l'obtenció de leucòcits.

Vam decidir, doncs, fer un comptatge de leucòcits, el P27 de les quals col·locàvem en el gradient. El comptatge s'efectuava un cop separats leucòcits polimorfonuclears i limfòcits. Cada litre de sang donava lloc a $4,5-8 \times 10^9$ polimorfonuclears.

Aplicàvem a cada gradient el P27 provinent de 2×10^9 cèl·lules, que consideràvem un marge segur perquè no es distorsionés el gradient.

3.5.7. ESTUDI SOBRE L'EFECTE DE RESUSPENDRE LA MOSTRA DIRECTAMENT EN EL MEDI DE GRADIENT O PRÈVIAMENT EN SACAROSA 0,25 M.

La bibliografia consultada diferia en la manera d'aplicar la mostra al gradient. És a dir, trobàvem casos en què la resuspensió s'efectuava directament en el medi i, durant la centrifugació, cada partícula migrava cap a dalt o cap baix cercant la zona la densitat de la qual coincidia amb la seva pròpia densitat.

En altres casos, la resuspensió de la mostra es feia en un petit volum de sacarosa 0,25 M, és a dir, isotònica, i es dipositava acuradament sobre el gradient, sobre el qual surava degut a la seva menor densitat. En aquests casos, la introducció de les partícules en el medi era paral·lela i s'aturava en el punt on coincidien la densitat del medi i de la partícula.

Per tal d'intentar veure veure si aquest fet tenia alguna incidència en la distribució dels orgànuls cel·lulars,

vam muntar dos gradients paral·lels:

a) El P27 corresponent a 2×10^9 cèl.lules va ésser re-suspès en 1 ml. de sacarosa 0,25 M i dipositat sobre 8 ml. de medi de gradient Ludox-PVP-sacarosa al 10,4% de Ludox.

b) El P27 corresponent a 2×10^9 cèl.lules va ésser re-suspès en 9 ml. de medi de gradient.

Es van córrer els gradients a 15000 rpm durant 90 minuts i es van assajar per activitat fosfatasa àcida i succinat deshidrogenasa. Els resultats que ens mostra la figura 19 demostren que el tipus de resuspensió no té una influència gran sobre la sepració, si bé en el cas en què la mostra ha estat resuspesa prèviament en sacarosa, el gradient és una mica més curt i a la part superior queda una banda totalment buida a simple vista, que correspon a la sac que contenia la mostra de partida.

Aquest fet demostra que les partícules, tant mitocòndries com grànuls, han arribat en els dos casos a la seva posició d'equilibri.

3.5.8. COMPARACIÓ DE LA SEPARACIÓ DE LA SÍLICA DE LES FRACCIONS DEL GRADIENT MITJANCANT CENTRIFUGACIÓ O PER FILTRES MILLIPORE.

El Ludox és un material tòxic per a les cèl.lules i els orgànuls. Un cop recobertes de sílica per la PVP, deixen d'ésser tòxiques, però el procés de recobriment manual no és perfecte.

Nosaltres, davant el perill de què el Ludox produís interferències en els assaigs enzimàtics portats a terme en les fraccions del gradient, vam optar per la separació de la sílica abans d'assajar les diferents activitats.

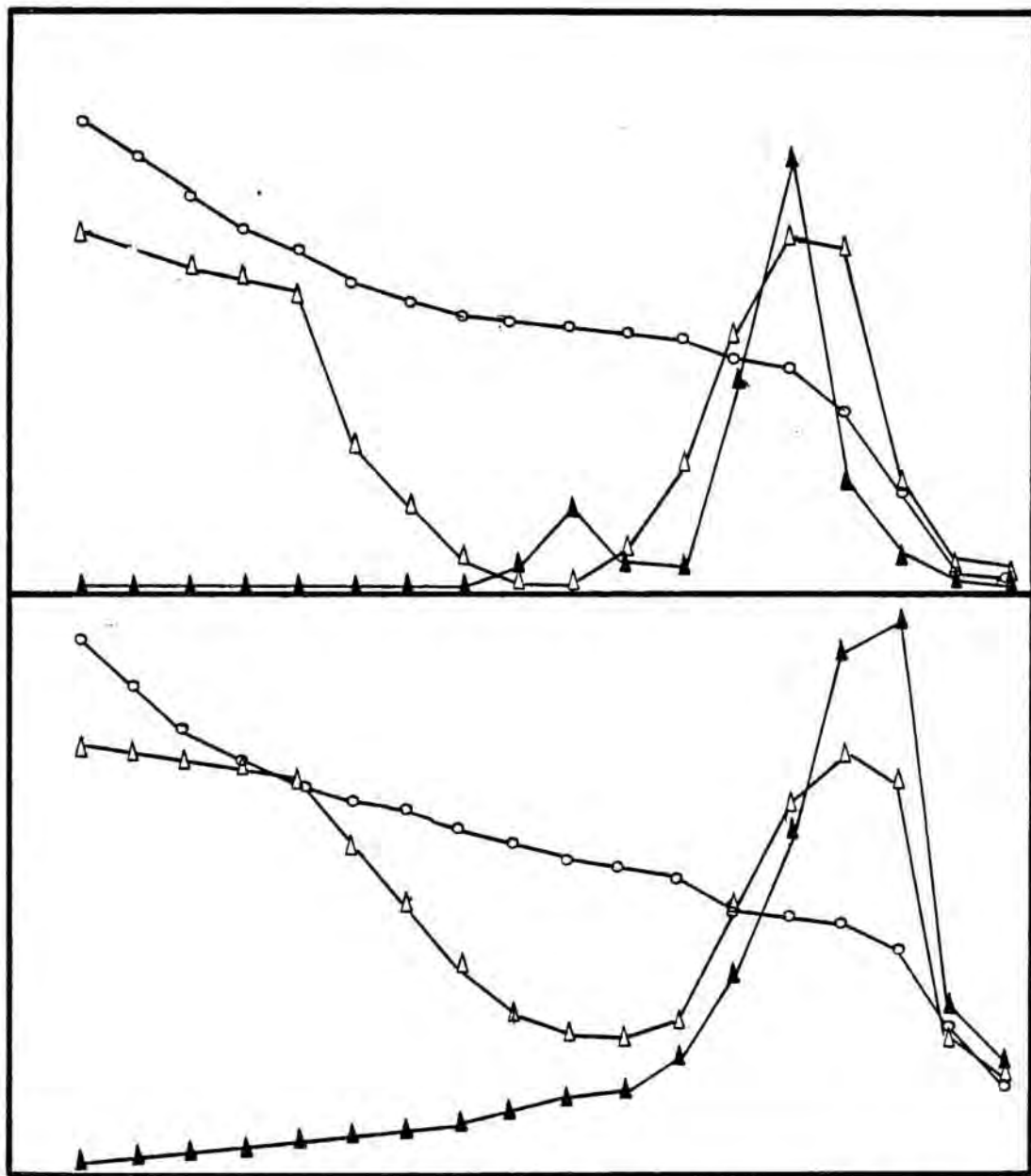
Figura 19 EFECTE DE LA RESUSPENSIO DE LA MOSTRA DIRECTAMENT EN EL MEDI O PREVIAMENT EN SACAROSA 0,25 M.

Gràfica superior: Resuspensió de la mostra en 1 ml. de sacarosa 0,25 M i dipositada sobre la part superior del gradient.

Gràfica inferior: Resuspensió de la mostra directament en el medi del gradient.

Els símbols (O) corresponen a l'índex de refracció de les fraccions. Els símbols (Δ) corresponen a l'activitat fosfatasa àcida. Els símbols (\blacktriangle) corresponen a l'activitat succinat deshidrogenasa.

act. relativa



índex de refracció

El mètode més emprat per separar el Ludox de les preparacions de cèl.lules senceres és el rentat sucesiu amb solucions isotòniques i sedimentació de les cèl.lules a baixa velocitat.

Per orgànuls subcel.lulars, així com per a bacteris i virus, que són massa petits per a sedimentar a baixa velocitat, els materials biològics poden ésser separats de la sílica per centrifugació a altes velocitats. La sílica sedimenta i la mostra queda sobre el pellet dur que queda en el fons del tub.

L'altre mètode és separar la sílica de les fraccions mitjançant flitres Millipore amb ajuda d'una xeringa. D'aquesta manera, les partícules de sílica travessen el filtre, mentre que els orgànuls subcel.lulars queden atrapats en el filtre. Aquest mètode té l'avantatge d'ésser més ràpid que l'anterior.

Per comparar ambdós sistemes, vam fer córrer paral·lelament dos gradients de Ludox (10,4%)-PVP-sacarosa amb mostra provinent de la mateixa sang. Després van ésser fraccionats normalment i la sílica de cada fracció separada per un dels dos mètodes explicats seguidament:

- Centrifugació a 35000 rpm (80000xg) durant 1 h. 30 m. Més endavant, el temps va ésser escurçat a 45 minuts sense que hi hagués cap disminució en l'efectivitat de la separació. Es recollia el sobrenedant i es conservava en tubs Eppendorf. A cada fracció se l'hi afegia Tritó X-100 fins a una concentració final d'aproximadament 0,1%.

- Filtració a través de filtres Millipore. Posteriorment els filtres van ésser rentats amb 500 μ l. de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8 més Tritó X-100 durant 30 minuts i

les fraccions conservades en tubs Eppendorf.

Les fraccions d'ambdós gradients van ésser congelades i descongelades tres cops simultàniament.

Per comprovar les diferències en el rendiment dels dos mètodes, vam assajar activitat fosfatsa àcida per ésser la més fàcilment detectable i, per altra banda, vam mesurar la proteïna de la fracció.

Els resultats es mostren a la figura 20. Observem que els perfils d'activitat fosfatasa àcida dels dos gradients són bastant semblants, amb dos pics en els extrems del gradient i oscil·lacions més petites en la part intermitja del mateix. Clarament s'aprecia, però, que les fraccions de les quals s'ha separat la sílica per centrifugació, mostren en tots els casos una activitat més elevada (de 1 a 2 cops) que en les fraccions tractades amb filtres Millipore.

El perfil de proteïna continguda en els dos gradients se'ns mostra a la figura 20. També en aquest cas observem que són bastant similars, però el rendiment obtingut en la separació mitjançant centrifugació és, en tots els casos, unes 2,5 vegades més alt que en el cas dels filtres.

Aquests resultats van portar a la conclusió de que amb la separació de la sílica mitjançant centrifugació a altes velocitats s'obtenen rendiments molt més alts que mitjançant filtres. En el nostre cas, aquest era un avantatge de gran importància, ja que havíem de detectar, al llarg del treball, activitats enzimàtiques de poca magnitud dintre del metabolisme cel·lular i que, per tant, són poc importants quantitativament.

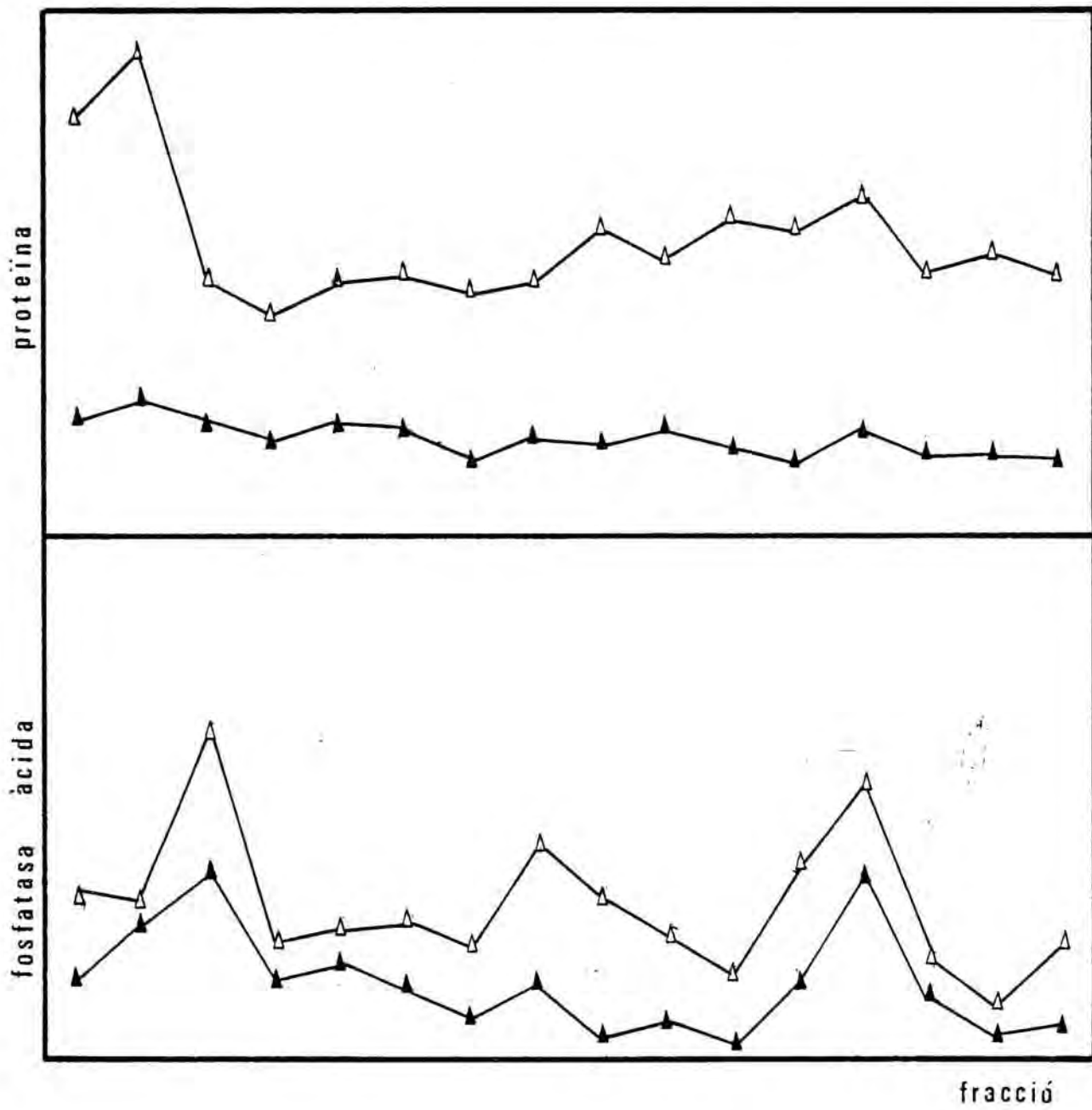
La separació de la sílica va ésser, doncs, portada a terme en tots els casos mostrats en aquest treball, per cen-

Figura 20 COMPARACIÓ DELS RENDIMENTS EN ACTIVITAT ENZIMÀTICA I EN PROTEÏNA DEL PROCÉS DE SEPARACIÓ DE LA SÍLICA DE LES FRACCIONS MITJANÇANT CENTRIFUGACIÓ O PER FILTRES MILLIPORE.

Gràfica superior: Perfil de proteïna d'un gradient de Ludox-PVP-sacarosa. Els símbols (Δ) corresponen a la separació de la sílica per centrifugació a 35000 rpm 90 minuts.

Els símbols (\blacktriangle) corresponen a la separació de la sílica per filtres Millipore.

Gràfica inferior: Perfil d'activitat fosfatasa àcida d'un gradient de Ludox-PVP-sacarosa. Els símbols emprats tenen la mateixa significació que a la gràfica superior.



trifugació en una ultracentrífuga Beckman L2 o L5-65B a 35000 rpm durant 45 minuts.

3.5.9. PROBLEMA DE LA FORMACIÓ D'AGREGATS: EFECTE DE L'EDTA I L'HOMOGENEÏTZACIÓ.

Tant en el cas dels gradients de Ludox-FVP-sacarosa, com en els de Ludox-FVP-NaCl (encara que menys en aquest cas), se'na va presentar el problema de la formació d'agregats durant la centrifugació isopícnica de la mostra. Aquests agregats es mostraven dispersos per tot el tub on s'havia format el gradient, però especialment en les zones superior i inferior, que eren aquelles en què bandejaven els orgànuls, com es veurà més endavant.

En resuspendre la mostra en el medi de gradient o bé prèviament en sacarosa 0,25 M, la resuspensió semblava perfecta a simple vista, ja que no s'observava cap mena de grumoll, sinó que es veia com una suspensió totalment homogènia. Malgrat aquest fet, un cop portada a terme la centrifugació, s'observaven aquests agregats que, encara que no interferien de manera notòria en la separació, segons es desprenia dels corresponents assaigs enzimàtics, sempre impedia que el gradient fos considerat com a perfecte.

Estava descrit (61) que en la separació de lisosomes i mitocondries de cèl.lules HeLa, mitjançant gradients de Ludox-FVP-sacaros, es feia servir EDTA (sal sòdica) a una concentració final del 0,1% per evitar l'agregació de les partícules. Nosaltres vam incloure EDTA ja en els primers experiments. Malgrat aquest fet, es formaven grumolls i vam intentar descobrir si l'efecte de l'EDTA era beneficiós

o no.

Les cèl.lules HeLa són cèl.lules provinents de teixits cancerosos i el seu comportament no tenia per què ésser idèntic al mostrat pels orgànuls provinents de leucòcits. A aquest fet s'afegia el que, en casos d'altres tipus de fraccionaments subcel.lulars, s'hi afegien cations divalents per evitar la formació d'agregats.

Així doncs, per intentar resoldre aquesta qüestió vam fer tres gradients paral·lels:

- a) El primer medi contenia 0,1 % EDTA.
- b) Sense EDTA, és a dir, tan sols Ludox-PVP-sacarosa.
- c) Afegir 0,1 mM acetat magnèsic en lloc d'EDTA.

La resuspensió de la mostra es va fer en tots tres casos de manera idèntica, mitjançant tres cops en un homogeneïtzador de vidre/tefló Potter-Elvehjem, mentre es mantenia submergit en gel.

El gradient es va formar a 15000 rpm durant 90 minuts.

El resultat d'aquest experiment va ésser negatiu, ja que no s'apreciava cap diferència a nivell visual entre les tres gradients. En tots ells, s'observaven uns petits agregats a les zones on bandegen les partícules subcel.lulars.

Aleshores vam posar la nostra atenció en la resuspensió de la mostra en el medi de gradient.

El fet de fer la resuspensió directament en el medi o en sacarosa 0,25 M (veure apartat 3.5.7.) no semblava tenir cap efecte en aquest sentit. Ara bé, el fet de com es portava a terme la resuspensió sí que influïa en l'aspecte del gradient.

Una millor resuspensió de la mostra s'aconseguia augmen-

tant el nombre de cops efectuats amb l'homogeneïtzador Potter-Elvejheim. Però aquest fet també implicava un dany més gran als orgànuls subcel·lulars, com s'apreciava en les distribucions enzimàtiques. Això s'observava especialment en el pic superior de fosfatasa àcida (veure apartat 3.6.1), el qual es feia més intens si la resuspensió de la mostra era més brusca.

La interpretació que vam fer del doble pic de fosfatasa àcida va ésser la següent: la major part de l'activitat queda a la part inferior del tub, degut a que es troba localitzada majoritàriament en els grànuls de diferent classe que es troben en els leucòcits. Els pics de fosfatasa àcida que acompanya les mitocòndries en la part superior del gradient és degut en part a que és una activitat molt abundant a la cèl·lula i relativament ubíqua en la seva distribució, però també al percentatge d'activitat que s'escapa en trencar-se una certa part dels grànuls. És aquesta la que augmenta si la resuspensió de la mostra es fa de manera massa brusca.

Vam haver, doncs, d'arribar a un equilibri entre aquests dos fets, de manera que l'estructura dels grànuls s'afectés el menys possible, però que, al mateix temps, la resuspensió de la mostra fos com més perfecta millor.

Finalment, vam establir les condicions de resuspensió de la mostra en 7-8 cops d'homogeneïtzador vidre/tefló fets manualment i amb molta cura, sense brusquedats i mantenint tot el temps l'homogeneïtzador amb la mostra submergit en gel.

3.6. FRACCIONAMENT SUBCEL·LULAR MITJANCANT GRADIENTS DE DENSITAT.

3.6.1. EFECTE DE LA DENSITAT EN EL BANDEJAMENT DE GRÀNULS I MITOCÒNDRIES EN GRADIENTS DE LUDOX-PVP-SACAROSA.

En l'intent de separar la fracció granular i la mitocondrial de leucòcits polimorfonuclears, vam provar diferents densitats del medi inicial per tal de poder escollir la més idònia per a portar a terme la separació.

Cada un dels medis es va fer variant la concentració o percentatge de Ludox inicial, però sense variar cap de les altres condicions que influeixen en la forma del gradient.

Es van provar diverses concentracions de Ludox, concretament 2,4%, 4%, 6%, 8%, 10,4% i 20% de Ludox. Ja l'aspecte exterior que oferien va permetre eliminar els de densitat més baixa, els quals mostraven tota la mostra sedimentada al fons del tub, i el de densitat més elevada, el qual forma un sediment de Ludox al fons del tub molt gros.

Es van prendre com a marcadors per a seguir els gradients la fosfatasa àcida per a la fracció lisosomal i la succinat deshidrogenasa per a la mitocondrial. Ambdós marcadors són fàcilment detectables, d'assaig barat i per al qual disposàvem dels reactius necessaris sense limitació en el nostre laboratori.

La confecció dels gradients i l'assaig de les activitats dels marcadors es van fer tal com s'indica a Mètodes.

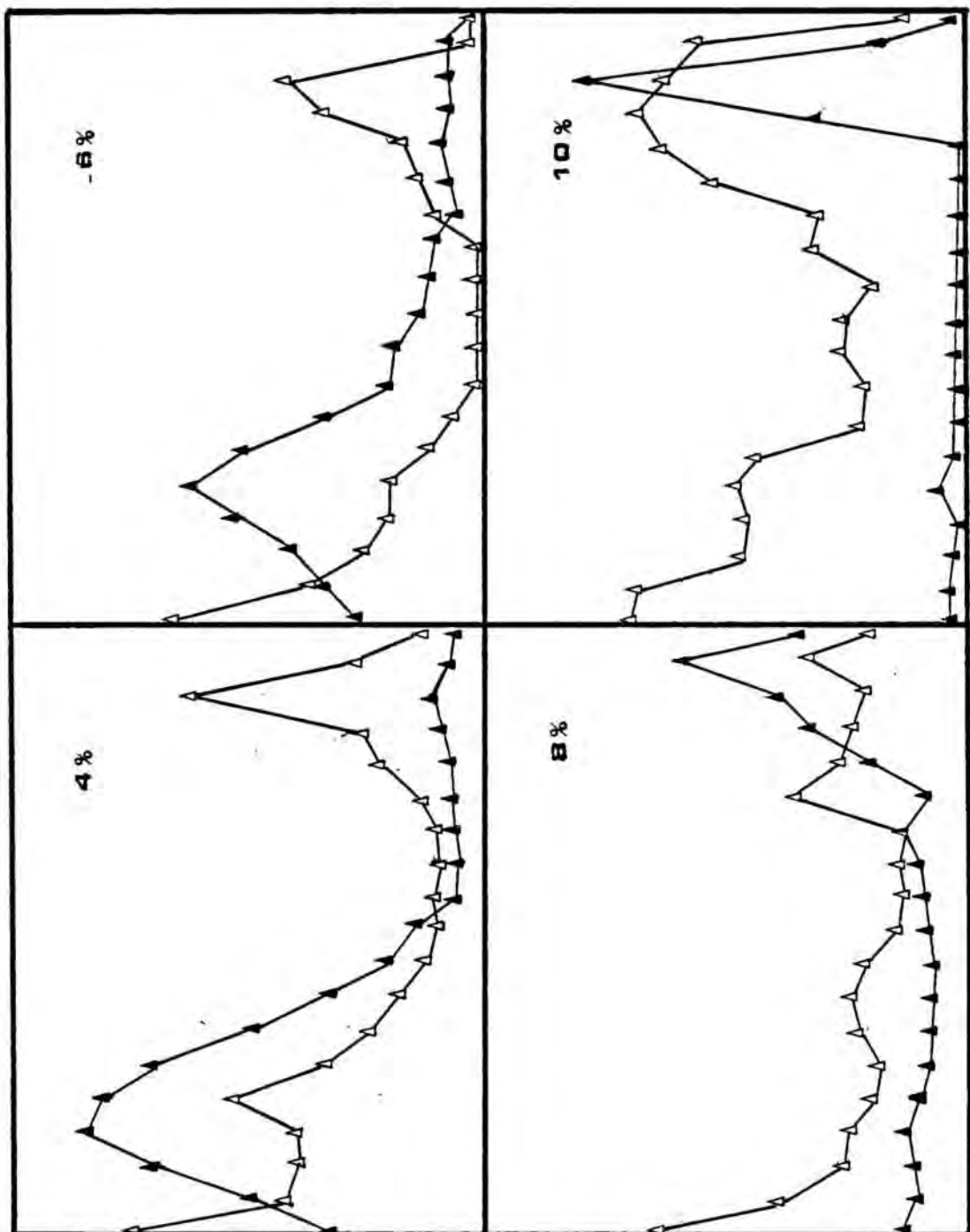
Els resultats obtinguts en els gradients de 4,6,8 i 10,4% de Ludox es mostren a la figura 21. Veiem aquí que,

Figura 21 EFECTE DE LA DENSITAT INICIAL EN EL BANDEJAMENT DE GRÀNULS I MITOCÒNDRIES EN GRADIENTS DE LUDOX-PVP-SACAROSA.

La centrifugació es va fer paral·lelament a 15000 rpm durant 90 minuts. Els percentatges de Ludox en el medi van indicats a la gràfica.

Els símbols (Δ) corresponen a activitat fosfatasa àcida. Els símbols (\blacktriangle) corresponen a activitat succinat deshidrogenasa.

act. relativa



fracció

fracció

a mida que augmenta la densitat inicial del medi, es produeix un corriment de la banda del succinat deshidrogenasa des de la part inferior del tub a la part superior. El pic de fosfatasa àcida, que es troba inicialment molt limitat al fons del tub es va fent més ample a mesura que augmentem la densitat, però sense desplaçar-se de la seva posició.

La separació que s'observa de les dues fraccions cel·lulars és completa i satisfactòria. El pic de fosfatasa àcida que es solapa amb el de succinat deshidrogenasa és, com ja s'ha indicat a l'apartat 3.5.9., degut a que es tracta d'un enzim relativament ubicu i a que una certa proporció dels orgànuls es trenca i deixa lliure part del seu contingut. Com que la fosfatasa àcida és un enzim molt abundant, aquesta activitat fugida és fàcilment detectable.

3.6.2. COMPARACIÓ DELS GRADIENTS DE LUDOX-PVP-SACAROSA I DE LUDOX-PVP- NaCl .

Un cop establertes les condicions de formació de gradients en medis de Ludox-PVP-sacarosa, no estàvem del tot satisfets dels resultats aconseguits. La presència de grumolls repartits pel gradient i la impossibilitat de fer entrar la mostra en el vertader gradient ens va portar a intentar fer la prova amb gradients de Ludox-PVP- NaCl .

Encara que el volum de les partícules de sílica solvatades és més petit en presència de NaCl 0,15 M (0,9%) que en sacarosa 0,25 M, la velocitat de sedimentació de les partícules és més ràpida degut a la baixa viscositat del Ludox en solució salina. Així, un medi de Ludox-PVP- NaCl forma gradient fins i tot de 2 a 3 vegades més ràpid que l'equi-

valent de Ludox-PVP-sacarosa (5%).

Per tal de poder fer una comparació vàlida, vam muntar dos gradients en paral·lel i amb el mateix percentatge de Ludox, un de Ludox-PVP-sacarosa i un de Ludox-PVP-NaCl, segons la metodologia descrita a Mètodes. Es van fer córrer a 15000rpm durant 75 minuts.

L'aspecte exterior era bastant diferent:

- Encara que en els dos casos hi havia agregats, en els gradients de Ludox-PVP-NaCl eren més petits i poc visibles.

- Als gradients de Ludox-PVP-sacarosa s'observaven, com sempre, les dues bandes superior i inferior del gradient, però absolutament cap en la part mitjana del gradient. En els gradients de Ludox-PVP-NaCl s'observaven les dues bandes majoritàries, però també nombroses bandes molt fines que disminuïen en nombre i visibilitat a mesura que ens aproximàvem a la meitat del tub, i que testimoniaven una penetració millor de la mostra en el medi de gradient i una major diversitat en la densitat dels orgànuls, com és d'esperar en una mostra.

Per aquestes dues raons, els gradients compostos de Ludox-PVP-NaCl van ésser considerats com més apropiats per a aconseguir una bona separació subcel·lular i amb ells es va portar a terme la major part del treball aquí exposat.

Les raons per les quals un medi a base de Ludox-sacarosa semblava ésser menys adient per al material biològic podrien ésser una viscositat massa elevada per al comportament normal de les partícules, i que, en gradients de Ludox-NaCl es més petita.

3.6.3. ESTUDI DE L'EFECTE DE LA SACAROSA I MEDI DE GRADIENT SOBRE LA GLICOGEN SINTASA I SOBRE LA PROTEASA

Prèviament a l'assaig de l'activitat proteàsica del gradient, es va fer un estudi sobre el possible efecte del medi de gradient sobre l'activitat de la mateixa proteasa o bé sobre la glicogen sintasa, fent-la més resistent a l'atac de la proteasa.

El sediment de 27000xg corresponent a 250 ml. de sang va ésser resuspès en 8 ml. de medi de Ludox-PVP-sacarosa. Es va separar una alíquota de 500 μ l. a la qual es va afegir 25 μ l. de Trixtó X-100 al 2% i es va congelar i descongelar 3 cops.

Paral·lelament, el sediment de 27000xg de 250 ml. de sang va ésser resuspès en 8 ml. de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,8 0,1% Trixtó X-100. Es va separar una alíquota de 500 μ l. i es va congelar i descongelar 3 cops.

El control de glicogen sintasa també es va fer per duplicat en presència de tampó o de medi de gradient.

Els resultats van demostrar que la glicogen sintasa és tan estable en un medi com a l'altre. Quant a la proteasa, malgrat ésser una mica menys activa en presència del medi, presenta una activitat perfectament mesurable.

El mateix es va fer amb medi Ludox-PVP-NaCl i els resultats no van mostrar cap alteració en l'activitat dels dos enzims.

3.6.4. EFECTE DEL PERCENTETGE DE LUDOX EN EL BANDEJAMENT DE GRANULS I MITOCONDRIES EN GRADIENTS DE LUDOX-PVP-NaCl.

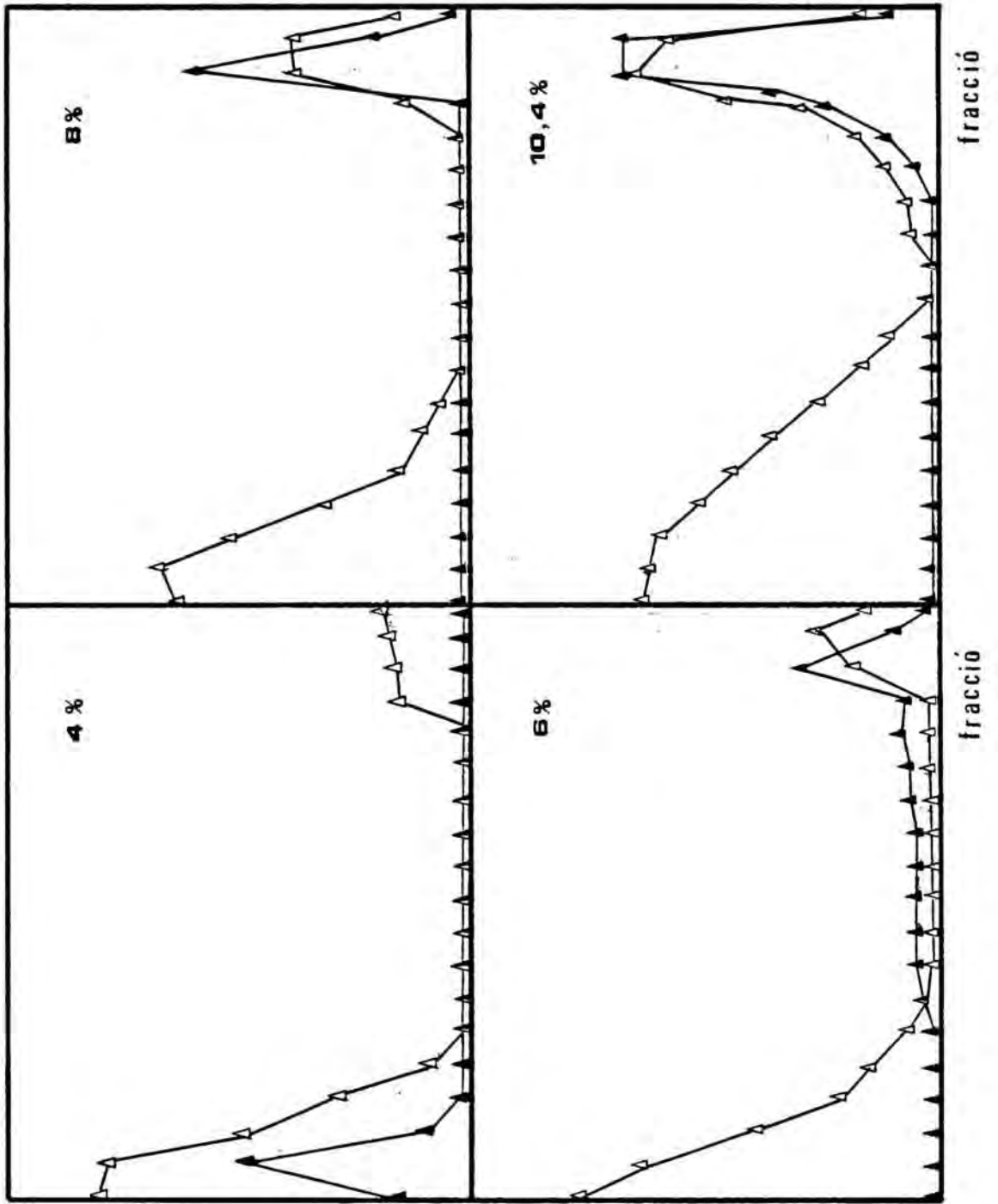
Per a fer aquest estudi, es van seguir els mateixos criteris

Figura 22 EFECTE DE LA DENSITAT INICIAL DEL MEDI EN EL BANDEJAMENT DE GRANULS I MITOCONDRIES EN GRADIENTS DE LUDOX-PVP-NaCl.

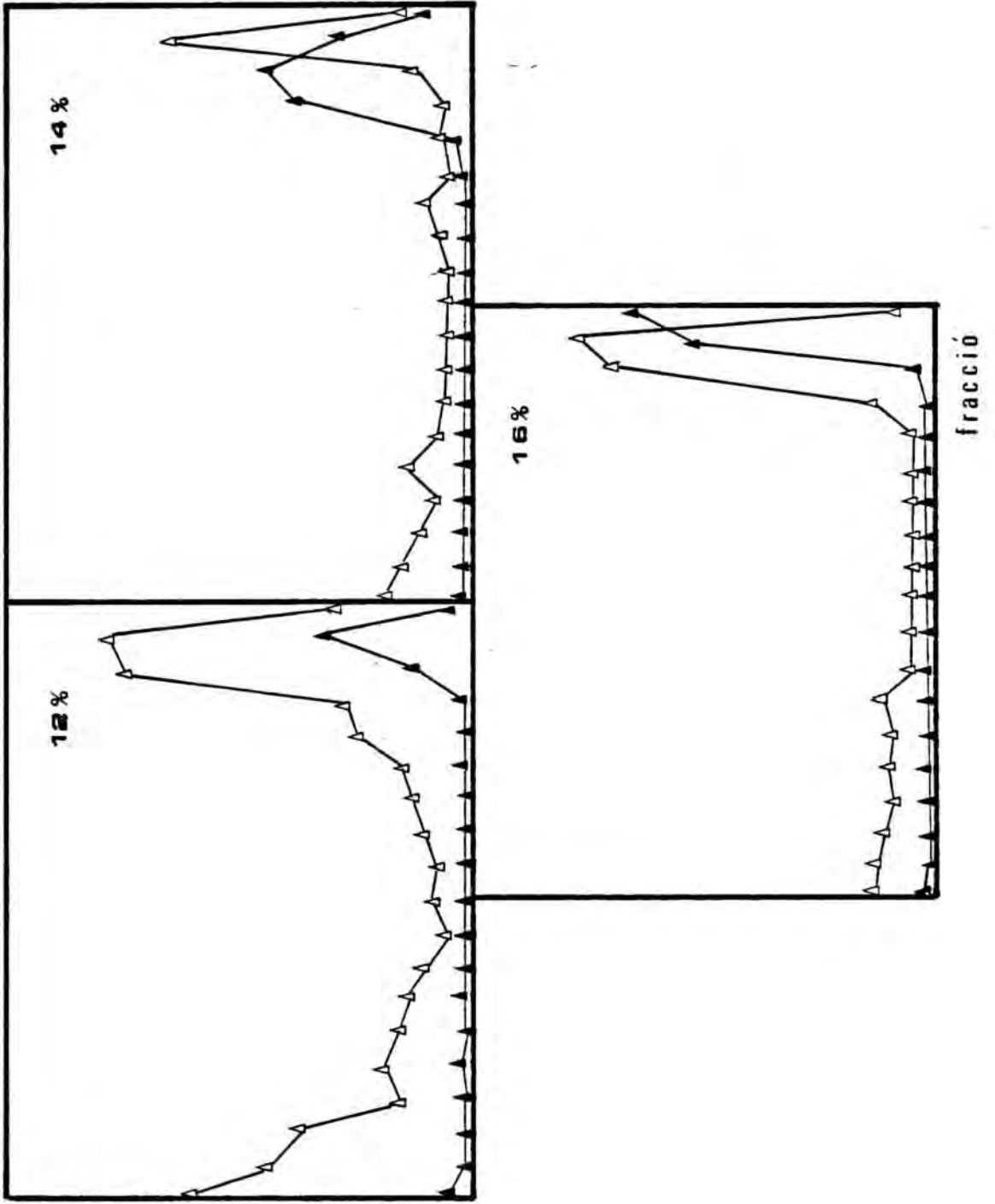
La centrifugació es va fer a 15000 rpm durant 75 minuts. Els percentatges de Ludox en el medi van indicats a cada gràfica.

Els símbols (Δ) corresponen a activitat fosfatasa àcida. Els símbols (\blacktriangle) corresponen a activitat succinat deshidrogenasa.

act. relativa



act. relativa



que a l'apartat 3.6.1., de manera que es van muntar paral·lelament diversos gradients de diferents densitats inicials.

Les densitats i percentatges de Ludox oscilaven del 4 al 16% de Ludox. La centrifugació es va fer a 15000rpm durant 75minuts. Vam escollir també com a marcadors la fosfatasa àcida (fracció granular) i la succinat deshidrogenasa (fracció mitocondrial).

La figura 22 ens mostra clarament el corriment de les bandes cap a la part superior del gradient (a la dreta de la figura) a mesura que s'augmenta la densitat del medi.

Hi havia en tots els casos dos pics de fosfatasa àcida (veure apartat 3.5.9.), dels quals, el que tenia importància per a nosaltres és el de l'esquerra.

El pic de succinat deshidrogenasa està localitzat en els gradients de densitat inferior al fons del tub, juntament amb el de fosfatasa àcida, però s'aconsegueix que migri a la part superior del gradient, mentre que la major part de la fosfatasa àcida resta en la part inferior del tub. A densitats encara més elevades, també el pic de fosfatasa àcida comença a migrar cap a la part superior del gradient.

D'acord amb la bibliografia (93) els grànuls de polimorfonuclears representen una fracció de densitat més elevada que les mitocondries, mentre que a la majoria de la resta d'espècies cel·lulars, és la inversa, essent els lisosomes (ja no grànuls) més lleugers que les mitocondries.

3.6.5. DISTRIBUCIÓ DELS ÒRGANULS SUBCEL·LULARS DE LEUCÒCITS POLIMORFONUCLEARS DE PORC EN GRADIENTS DE LUDOX-PVP-NaCl AL 8% LUDOX.

Un cop determinat un percentatge de Ludox que va semblar adequat per als nostres propòsits, vam portar a terme l'assaig dels enzims marcadors corresponents, per tal d'obtenir la distribució subcel.lular completa.

El gradient escollit va ésser del 8% de Ludox (densitat inicial: 1,025 gr/cm³) en vistes als resultats de l'apartat 3.6.4., ja que el pic corresponent a les mitocondries estava ben separat del pic majoritari de fosfatasa àcida, i aquest estava ben ubicat al fons del tub, sense sofrir un gran desplaçament cap a la part superior.

Com que un gradient, per raó del seu volum, no permetria més de 3 ò 4 assaigs degut al petit volum de les fraccions, es van córrer diversos gradients paral.lament.

Quan es feien gradients nous en dies diferents per assajar altres activitats, sempre s'assajaven també alguns dels enzims marcadors ja localitzats per a establir un control que permetés relacionar sense dubtes tots els resultats.

Els marcadors escollits van ésser:

- Mitocòndries: succinat deshidrogenasa i glutamat deshidrogenasa.

- Grànuls específics: peroxidasa i β -glucuronidasa. Gran part de la fosfatasa àcida es troba també en aquests tipus de grànuls.

- Grànuls azuròfils: lisozima. Aquest enzim, com es descriu a l'apartat 1.2.3., es reparteix entre els dos tipus de grànuls, el pic de lisozima que no va acompanyat de les diverses activitats fosfatases és el corresponent a grànuls azuròfils.

- Fosfatasa alcalina: sovint es presenta associat a

membranes en general. En polimorfonuclears, s'ha descrit una localització molt similar a la de la fosfatasa àcida.

- Vam assajar també l'activitat enzimàtica problema, la proteasa, tant sobre glicogen sintasa com sobre fosforilasa quinasa.

També es va assajar l'activitat protein-quinasa, dependent i independent d'AMP cíclic sobre caseïna i histona com a substrats.

Tots els assaigs enzimàtics es descriuen a Mètodes.

La figura 23 ens mostra els resultats finals:

- S'aconsegueix una separació molt bona de mitocòndries i grànuls. Les primeres es localitzen a la part superior del gradient i els segons a la part inferior.

- Hi ha una bona concordància en la localització dels marcadors d'una mateixa espècie subcel.lular. Així, els pics de succinat deshidrogenasa i glutamat deshidrogenasa són plenament coincidents. Els diversos marcadors dels grànuls també es solapen molt bé.

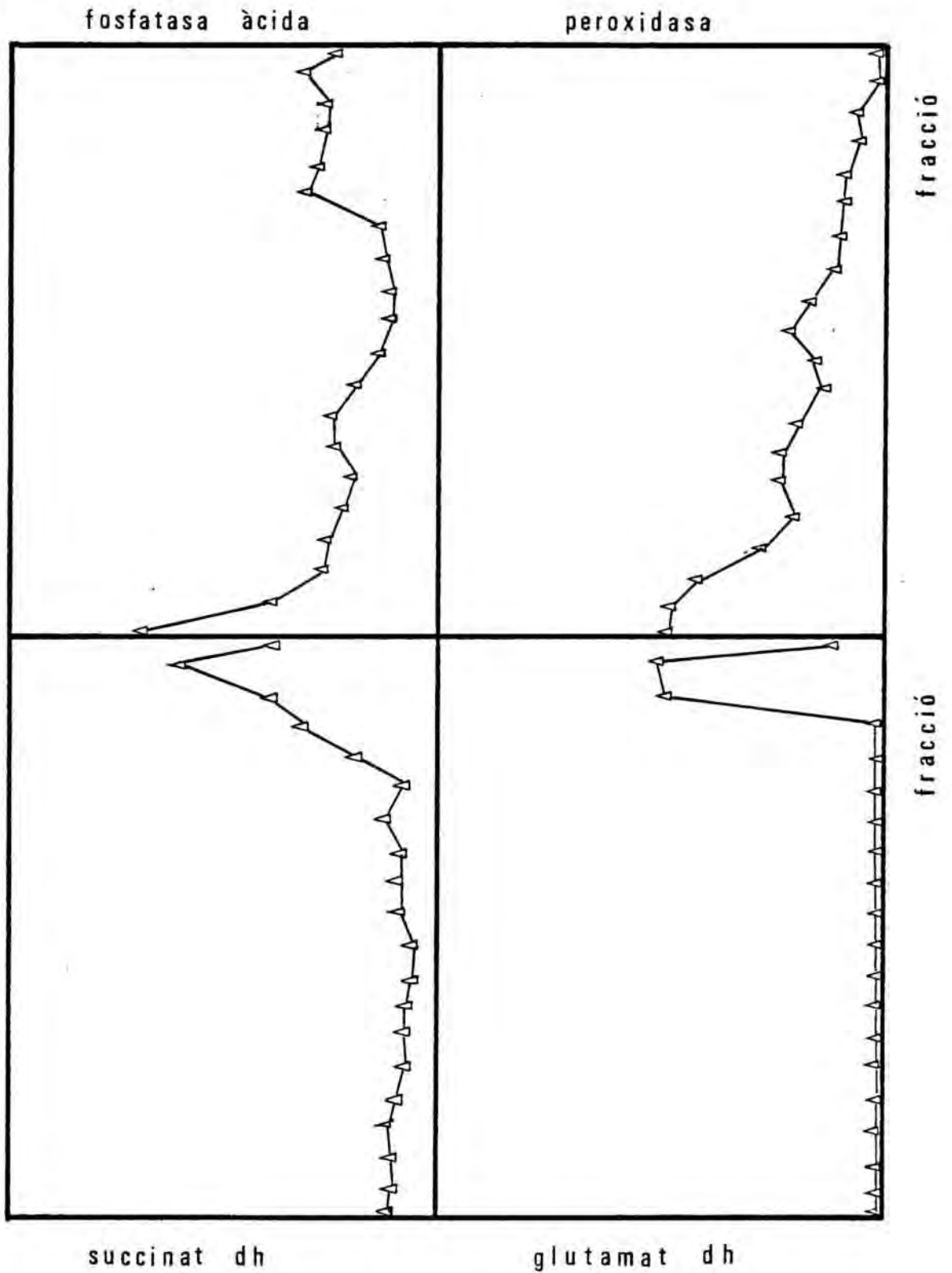
- No sembla que s'aconsegueixi la separació entre diferents tipus de grànuls. Les activitats típiques dels grànuls azuròfils i específics es solapen. Els grànuls específics (lisozima) tenen una densitat més petita que els azuròfils (peroxidasa i lisozima). Per tant els grànuls azuròflis venen senyalats per els dos pics solapats d'aquest dos enzims, mentre que els específics, corresponen al segon pic de lisozima sense cap altre marcador. Els perfils dels dos enzims presenten un petit pic a la part menys densa del gradient, a més del pic principal més dens. Els resultats mostren que aquest segon pic és més important en el cas de la lisozima, però és difícil dir si correspon als grànuls

Figura 23 SUBFRACCIONAMENT CEL.LULAR DE LEUCÒCITS
POLIMORFONUCLEARS DE PORC MITJANCANT GRA-
DIENTS DE LUDOX-PVP- NaCl .

Els gradients estaven formats per Ludox (8% v/v)-
PVP- NaCl . La centrifugació va ésser feta a 15000 rpm
durant 75 minuts.

El fraccionament del gradient i tractament de les
fraccions està especificat a l'apartat de Mètodes, ai-
xí com els diversos assaigs realitzats.

act. relativa



succinat dh

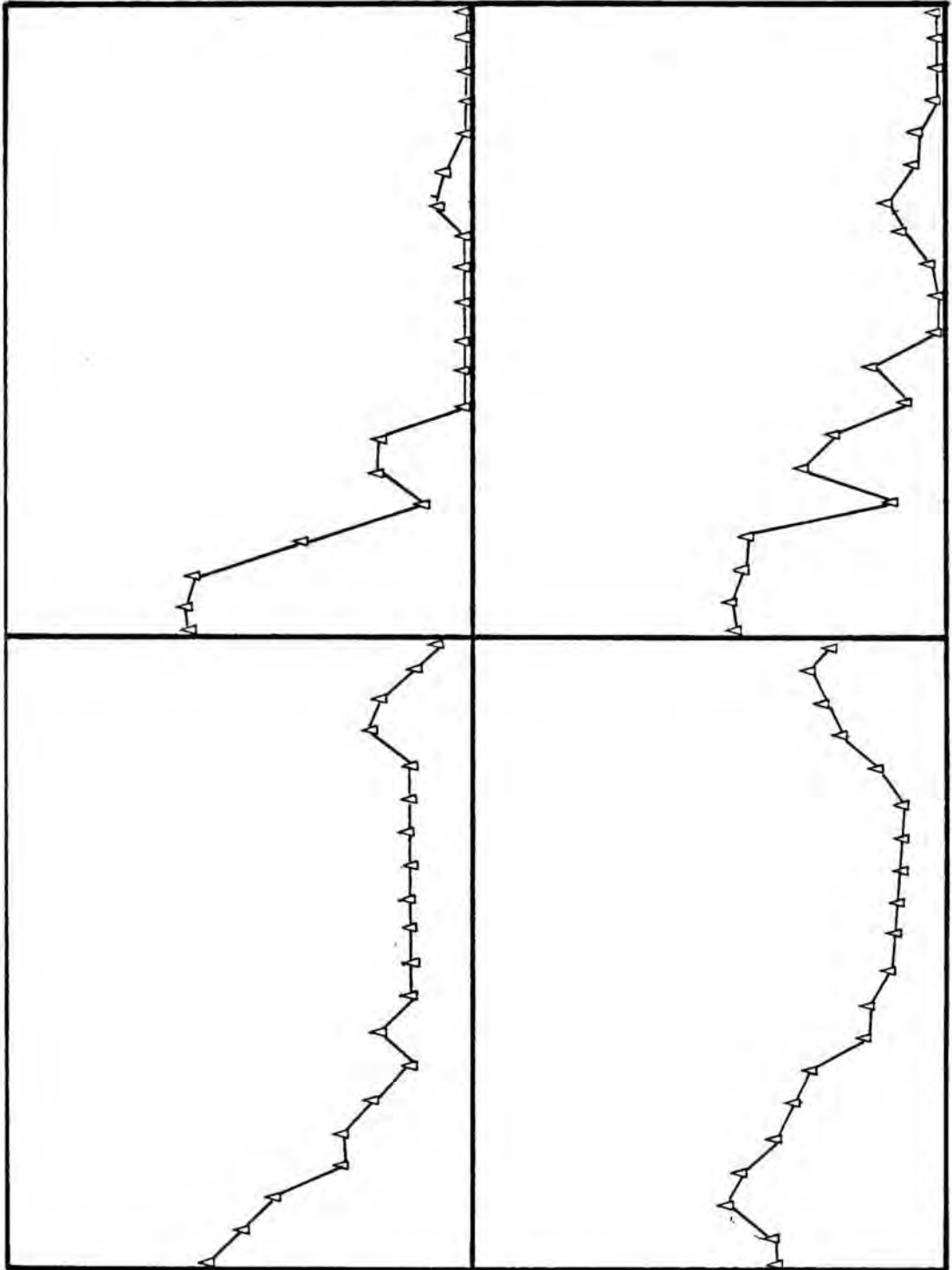
glutamat dh

act. relativa

act. relativa

GS.- proteasa

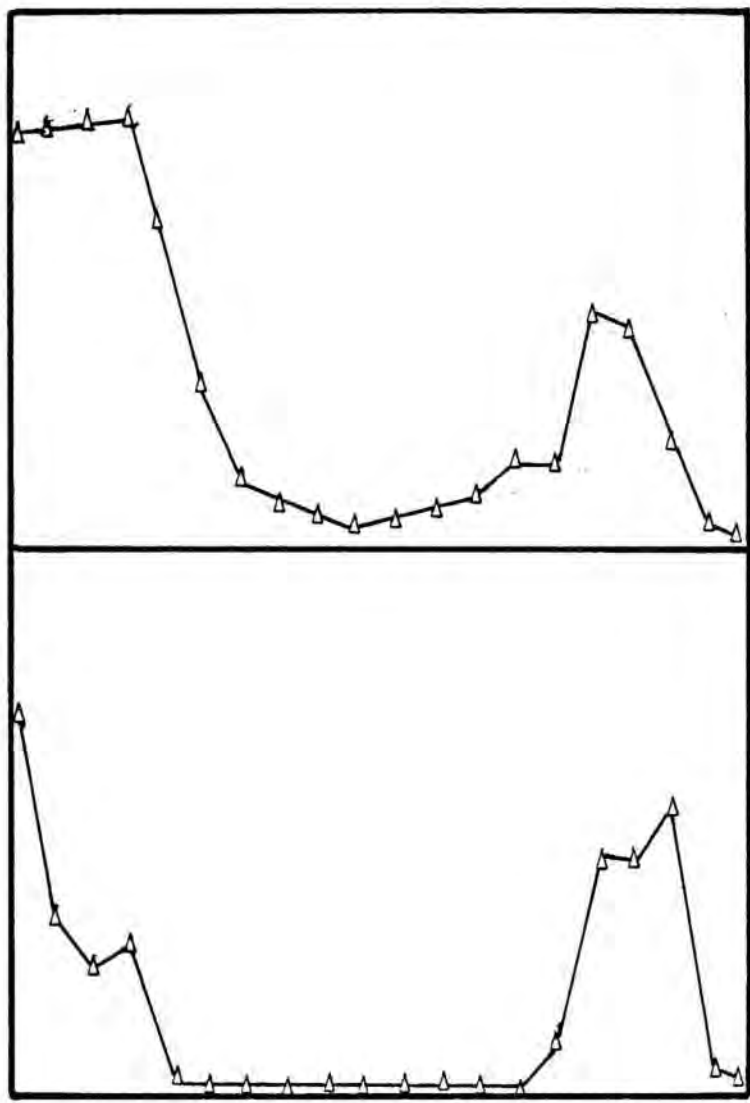
PhK - proteasa



β -glucuronidasa

lisozima

act. relativa



fosfatasa alcalina

casein-quinasa (+AMPc)

act. relativa

fracció

específics, i aleshores hauriem aconseguit la separació dels dos tipus de grànuls, o bé és un petit reste d'activitat escapada dels orgànuls, com és el cas del petit pic de la peroxidasa.

- L'activitat proteasa, tant sobre la glicogen sintasa com sobre la fosforilasa b quinasa, es solapa amb el pic corresponent a la fracció granular sense poder determinar amb seguretat en quin tipus de grànuls es localitza.

- Hi ha activitat protein-quinasa tant a la fracció g granular com a la mitocondrial, encara que, en aquesta última, la relació histona/caseïna és més baixa que en els grànuls.

En la figura es mostra només el perfil d'activitat protein-quinasa sobre caseïna en presència d'AMP cíclic. El perfil sobre caseïna (-AMPc) i histona (+AMPc) també va ésser determinat i els resultats eren tots similars, excepte en la diferència entre la relació histona/caseïna feta anteriorment.

DISCUSSIO'

Aquest treball és un aprofundiment de l'estudi d'una proteasa neutra aïllada de leucòcits PMN de porc i humans.

Com ja hem comentat, es tracta d'una proteasa neutra, que va ésser identificada en els estudis portats a terme per tal de descobrir la raó de perquè, en els homogenats de PMN humans, no tenia lloc la transformació de la forma D de la glicogen sintasa a la forma I.

Els primers assaigs que es van portar a terme anàven encaminats a millorar el rendiment que s'obtenia en les purificacions de la proteasa. Es partia, per a obtenir-la, de l'extracte lisosomal obtingut a partir del P₂₇, que correspon a la fracció granular. Per a millorar el rendiment es va assajar l'eficàcia de dos mètodes: la congelació-descongelació i l'ús de detergents com el Tritó X-100.

Ja s'havia observat previament a l'inici d'aquest treball que els sediments de P₂₇ utilitzats en una purificació podien tornar a resuspendre's i congelar-se i l'extracte obtingut d'aquests pellets usats, tornava a mostrar activitat proteasa. Aquesta característica respon al concepte de latència d'un enzim.

La latència és una característica dels lisosomes, com he descrit àmpliament en la bibliografia. Es tracta de la propietat dels enzims lisosomals d'augmentar la seva activitat després de tractaments, com la congelació-descongelació, o l'ús de detergents, que destrueixen les membranes dels lisosomes perquè desorganitzen els fosfolípids que les componen. Es creu que els lisosomes resulten afectats degut a la seva estructura senzilla, com un sac d'enzims, mentre que altres òrgànuls més complexos com les mitocòndries, no són tan fàcilment desorganitzats.

Aquest fet ja suggeria que el nostre enzim podia ésser d'origen lisosomal: la seva localització subcel·lular serà descrita més tard.

Vam aprofitar aleshores aquesta característica per determinar quin era el tractament concret adequat per aconseguir la major activitat proteasa possible a partir del sediments de 27000 xg dels PMN. Un estudi sistemàtic del nº de cicles de congelació-descongelació que calia fer i de la concentració de Tritó X-100 que es faria servir, van fixar aquest tractament en 3 taules de congelació-descongelació en presència d'un tampó que contenia Tritó X-100 en una concentració del 0,1 %.

El primer objectiu del treball era la caracterització parcial de l'acció de la proteasa sobre la fosforilasa b quinasa. L'acció de la proteasa sobre la fosforilasa b quinasa produïa una activació de l'enzim, al contrari que l'acció so-

bre la glicogen sintasa, la qual es traduïa com una pèrdua d'activitat.

Aquesta caracterització comprenia l'estudi de com procedia la reacció al llarg del temps i sota diverses concentracions de proteasa, l'efecte de possibles inhibidors, el possible paper del calci, la determinació del pH òptim i l'acció proteolítica del nostre enzim sobre l'estructura i les subunitats de la fosforilasa b quinasa.

L'efecte de la proteasa sobre l'activitat de la fosforilasa b quinasa va mostrar bastantes analogies amb l'activació de fosforilasa b quinasa per tripsina descrita ja fa anys.

La tripsina s'ha utilitzat en estudis per determinar l'estructura de la fosforilasa b quinasa i la importància de les diverses subunitats del enzim. La nostra proteasa provoca un efecte semblant, com havíem observat en experiments previs en els quals havíem sotmés a la fosforilasa b quinasa a l'acció de la tripsina. L'activació que aconseguim és extraordinàriament ràpida, com en el cas de la tripsina. Es diferencia d'aquest enzim en què és necessària una concentració de proteïna molt més gran, en què l'activació aconseguida és més petita i en el model de degradació en gels.

L'acció de la proteasa sobre l'estructura de la fosforilasa b quinasa es caracteritza per una ràpida desaparició de les subunitats α i α' , donant lloc a l'aparició d'una nova banda intermitja entre β i γ . Aquest aspecte és idèntic a l'acció de la tripsina. Ara bé, en aquest cas, la subunitat β també desapareix en 15 minuts d'incubació, enca-

ra que més lentament que la α , i dóna lloc a 2 noves bandes i a un engrossiment de la banda intermitja.

En el cas de la proteasa, el model de proteòlisi romaní invariable durant més de 90 minuts d'incubació, és a dir, l'estructura que s'observava en els gels constava de la subunitat β , la γ i una banda intermitja entre les dues. Aquesta situació era acompanyada per una lenta desaparició de l'activació a partir dels 15 minuts i que s'allargava fins a les 2 hores, temps en que arribava als nivells normals d'activitat. No s'observava en els gels cap variació en les bandes, però podia tractar-se d'un canvi no visible a simple vista.

Aquesta acció específica sobre la subunitat és molt similar a l'efecte de la quimotripsina sobre la fosforilasa quinasa (comunicació personal de l'autor). És a dir, la proteasa sembla comportar-se de manera semblant a la quimotripsina, més bé que a la tripsina.

Però, en un posterior assaig, vam voler extreure les condicions de la incubació, per tractar de demostrar que era realment una proteòlisi limitada a les subunitats α i α' . Temps d'incubació superiors a les dues hores mostraven una degradació lenta i parcial de la subunitat β . Aquest fet podria ésser interpretat de dues formes:

- la proteasa era capaç de degradar a la fosforilasa β quinasa extensament, encara que l'atac a la subunitat β era molt menys espectacular que l'atac a la subunitat α .

- la preparació de proteasa que vam utilitzar a l'assaig estava parcialment purificada i, per tant, podia

contenir alguna altra serin-proteasa (l'únic pas de purificació havia estat la cromatografia d'afinitat en Sepharosa-STI, en la qual podien quedar igualment retengudes altres serin-proteases). Aquesta(es) proteasa(es) present en petites concentracions en la mostra, podia actuar sobre l'estructura de la fosforilasa β quinasa, si el temps d'incubació era prou llarg.

Aquesta desaparició de β va acompanyada per la pèrdua definitiva d'activitat fosforilasa β quinasa per sota dels nivells normals.

Per resoldre aquest punt, caldria disposar de la proteasa purificada al màxim.

La classificació de les proteases es fa segons criteris d'inhibició específics per a cada tipus.

El nombre d'inhibidors específics per a diverses proteases i grups de proteases és molt gran, tant de compostos químics com aïllats de la naturalesa. En aquest cas, vam fer servir només els més característics de cada grup de proteases i els resultats van ésser fora de tot dubte: ni la pepstatina (inhibidor de carboxil-proteases) ni el DTT (inhibidor de les metalo-proteases i activador de les tiol-proteases) tenien cap efecte sobre l'activitat de la fosforilasa quinasa, mentre que el PMSF i l'STI provicaven un 100% d'inhibició.

Aquest estudi amb inhibidors va demostrar que realment es tractava d'un enzim pertanyent al grup de les serin-proteases. Aquest era ja un punt bastant clar, ja que tenia

afinitat per una columna de Sepharosa-STI, l'inhibidor específic de les serin-proteases.

Una caracterització més àmplia de l'enzim inclouria l'estudi de l'efecte d'altres inhibidors, especialment per comparar-la amb altres proteases de leucòcits ja descrites, com l'elastasa i la catepsina G, i també amb la tripsina i la quimotripsina.

El pH òptim de la proteasa sobre fosforilasa b quinasa va resultar ésser 7,5. Aquesta dada concorda amb el pH òptim descrit fent servir caseïna i histona com a substrats. La corba de pH òptim sobre la glicògen sintasa no ha estat definitivament determinada, però es tracta clarament d'una proteasa neutra, ja que el pH del tampó d'assaig de l'activitat sobre glicogen sintasa és de 7,8.

Aquest pH és l'esperat, ja que la majoria de serin-proteases presenten pH òptim compresos entre 7 i 9.

Un altre punt estudiat en aquest treball ha estat l'efecte de l'ió Ca^{2+} i l'EGTA sobre l'activitat de la proteasa.

Les proteases, i el procés proteolític en general, relacionades amb el nivell de calci intracel.lular estan d'actualitat, ja que s'han descrit sistemes, com el dels enzims que participen en la degradació dels fosfolípids, que són dependents de calci.

Per altra banda, existeix una proteasa activable per calci que té un efecte activador de la fosforilasa b quinasa. Aquesta proteasa presenta una activitat òptima en presència de 1 mM de Ca^{2+} , i, per tant, es questiona el relleu fisiològic d'aquest fenomen, ja que la concentració de Ca^{2+} del múscul en contracció és de 10^{-5} M.

La nostra proteasa, però, no va resultar afectada per la presència de calci en concentracions des de 55 μM fins a 2 mM, ni per EGTA en concentracions des de 55 μM fins a 5 mM. Sembla, per tant, que no es tracta del mateix enzim descrit anteriorment.

La manera com seria regulada l'activitat de la nostra proteasa no és coneguda.

Podem resumir els resultats obtinguts en el primer objectiu del nostre treball de la següent manera:

Hem caracteritzat parcialment l'acció d'una proteasa neutra de leucòcits polimorfonuclears sobre la fosforilasa quinasa de múscul esquelètic de conill. Es tracta d'una proteasa amb capacitat d'activar a la fosforilasa b quinasa al doble de la seva activitat normal, que modifica la relació d'activitats a pH 6,8/pH 8,6 i que és semblant a la quimotripsina en la seva acció sobre l'estructura de l'enzim. És una proteasa neutra pertanyent al grup de les serin-proteases, i no afectada per la presència del calci.

Hi ha diversos punts a discutir encara en aquest aspecte:

1) Localització de la proteasa en diversos teixits: la seva presència és més evident en polimorfonuclears humans, però també es troba en leucòcits polimorfonuclears de porc. Dades preliminars indiquen que també està present en limfòcits humans i de porc, igualment que en els diversos estadis de desenvolupament de mieloblasts i limfoblsts que es troben en els diferents tipus de leucèmies. Referent a això, hem d'indicar que en la leucèmia mieloide crònica tampoc hi havia transformació de la forma D a la I, com en el cas dels polimorfonuclears humans normals, mentre que en els altres tipus de leucèmies sí que es detectava conversió.

No ha estat estudiada la seva presència en altres teixits.

2) S'ha de tenir en compte que l'enzim està parcialment purificat i que podria tractar-se en realitat de dues proteases, de manera que una d'elles fos específica per a la glicogen sintasa i l'altra per a la fosforilasa b quinasa. Dades preliminars en pasos posteriors de purificació encara en estudo semblen indicar que es tracta del mateix enzim i així ho considerarem en aquesta discussió.

3) No podem descartar la possibilitat de què es tracti d'un enzim ja descrit sota un altre nom i amb unes altres propietats. Entre aquests possibles candidats es troba l'elastasa. No s'ha descrit, però, que l'elastasa tingui activitat sobre cap proteïna enzimàtica, exceptuant alguns factors de la coagulació i del complement.

4) Activitat sobre altres enzims. Dades obtingudes en el laboratori indiquen que no és capaç de modificar l'activitat d'altres enzims relacionats amb el metabolisme del glicogen, com la fosforilasa a i b i la protein-quinasa independent d'AMPc, ni tampoc d'altres enzims, com la làctic deshidrogenasa.

El segon objectiu d'aquest treball va ésser la determinació de la localització subcel.lular de la proteasa, encara que, com ja hem dit, certes dades suggerien que tenia una localització lisosomal. Aquest és l'orgànul on és d'esperar trobar una proteasa, però el fet és que s'han descrit nombroses proteases de localització no lisosomal: mitocòndria, citoplasma, nucli, etc. En el nostre cas, en la fracció corresponent al sedimnt de 27000xg s'hi troben grànuls i lisosomes, per tant, calia separar aquestes dues fraccions.

Aquest objectiu es va portar a terme mitjançant gradients de densitat en Ludox-FVP. Aquest solut reuneix un gran nombre d'avantatges sobre els demás medis de separació subcel.lular, entre els quals destaquen la manca de toxicitat, l'estabilitat de les solucions i el fet de formar gradients espontàniament, amb la qual cosa la manufactura dels gradients es simplifica molt.

Han estat descrits nombrosos exemples de separació d'orgànuls en gradients de Ludox-FVP en diferents tipus de cèl.lules. Per altra banda, s'ha descrit la composició subcel.lular dels leucòcits polimorfonuclears mitjançant centrifugació en gradients de sacarosa. No coneixem, però, cap

cas que utilitzi el Ludox-PVP com a medi per fraccionar polimorfonuclears.

Malgrat els exemples de separació existents en la bibliografia, existeixen moltes diferències de mida i densitat entre els orgànuls d'un teixit o un altre. També s'observen grans diferències en la densitat aparent que presenta un mateix orgànul col·locat en un medi de gradient o un altre. Degut a aquestes consideracions, va ésser necessari, abans d'intentar fraccionar els polimorfonuclears, fer primerament un estudi de les condicions de centrifugació i després veure com variava la distribució dels enzims marcadors al llarg del gradient en variar les condicions de formació.

El Ludox-PVP pot fer-se servir resuspès en sacarosa 0,25 M o bé en NaCl 0,9%. Hi ha nombrosos exemples de la utilització dels dos tipus de medi. Nosaltres vam començar fent servir la solució de Ludox-PVP-sacarosa, de la que disposavem de més dades bibliogràfiques.

Els primers experiments sobre la influència de les condicions de centrifugació en la forma del gradient van ésser portades, doncs, a terme amb aquest medi. Es va assajar sistemàticament la influència de la velocitat i temps de centrifugació, densitat inicial de la mostra i tipus de centrifuga.

S'intentava obtenir un gradient de pendent suau, de típica forma de "S" amb una zona intermitja on les diferències de densitat fossin petites, de manera que orgànuls de densitats semblant es col·loquessin en bandes separades. El pendent no devia ésser massa pla, doncs aleshores una matei-

xa fracció es trobava distribuïda per tot el gradient, ni tampoc massa fort, doncs això suposava que dues densitats bastant diferents es trabarien juntes en el gradient i diferents orgànuls bandejarien junts.

Un cop determinades les condicions de centrifugació teòricament bones, es va intentar fraccionar la mostra. Els resultats fent servir Ludox-PVP-sacarosa no van ésser del tot satisfactoris, doncs es formaven nombrosos agregats i la mostra apareixia comprimida en dues bandes massa compactes per a ésser reals.

Es van assajar aleshores els gradients a base de Ludox-PVP-NaCl. Les condicions de centrifugació es van variar lleugerament, doncs aquests gradients es formen més ràpidament que en presència de sacarosa.

No es van repetir aquells assaigs que s'havien dut a terme amb Ludox-PVP-sacarosa i havien donat resultats negatius o bé prou satisfactoris (velocitat i temps de centrifugació, efecte de resuspendre la mostra directament en el medi o no, etc). Però el que es va tornar a estudiar va ésser la influència de la densitat inicial del medi, ja que era el factor que tenia més importància en la posterior distribució dels orgànuls. Aquest factor és el que determina la densitat en la zona mitja i els extrems del gradient i, per tant, el lloc on bandejarà cada tipus d'orgànul d'acord amb la seva pròpia densitat, que ha de coincidir amb la del medi que l'envolta.

És curiós senyalar que, segons els resultats obtinguts en aquest treball, la influència de la densitat inicial del medi és diferent segons el tipus de gradient. Així, en el

cas de Ludox-PVP-sacarosa, l'efecte és més evident sobre el pendent que sobre la densitat del gradient, mentre que amb Ludox-PVP-NaCl, l'efecte és més important sobre la densitat obtinguda i, en canvi, el pendent és similar en tots els casos.

Els gradients de Ludox-PVP-NaCl van resultar ésser més satisfactoris que els de Ludox-PVP-sacarosa, ja que la mostra apareixia més ben distribuïda i s'observaven menys agregats. Vam escollir, doncs, aquests per a portar a terme l'objectiu previst de la localització subcel.lular de la proteasa.

Prèviament a aquests últims experiments, es van fer proves en ambdós tipus de gradients, sobre l'efecte de la densitat inicial del medi en la distribució a través del gradient de les activitats fosfatasa àcida i succinat deshidrogenasa, marcadors de lisosomes i mitocondries, respectivament. En tots dos casos, es va observar que inicialment, les dues activitats bandejaven juntes en el fons del tub del gradient i, a mida que anava augmentant la densitat, el pic de succinat deshidrogenasa anava desplaçant-se cap a la part superior del gradient, menys densa. Aquest fet estava d'acord amb la bibliografia, que descriu que, en leucòcis PMN, les mitocondries són menys denses que els grànuls (orgànuls semblants als lisosomes), mentre que en la majoria dels altres teixits, les mitocondries són més denses que els lisosomes.

Un fet que primerament ens va sorprendre va ésser que, en subfraccionament de leucòcits en gradients de sacarosa, les densitats aparents dels grànuls oscil.laven entre 1,18-

1,22 gr/ml, mentre que les densitats que nosaltres obteníem eren molt més baixes, de l'ordre de 1,04-1,08 gr/ml. L'explicació d'aquest fet és senzilla: la densitat aparent d'un orgànul depen del medi en el qual es trobi resuspès. La sacarosa, una molècula petita, pot penetrar dintre de l'estructura de l'orgànul, augmentant aleshores la seva densitat, mentre que el Ludox, compost de partícules de sílica recobertes amb PVP, és incapaç de travessar les membranes, per la qual cosa la densitat aparent amb la qual es comporta és molt més baixa que en el cas de gradients de sacarosa.

Per a definir la distribució dels diferents orgànuls dins del gradient, s'han d'escollir marcadors enzimàtics adequats. Es tracta d'enzims, la localització dels quals està ben definida i que estan presents únicament en un sol tipus d'orgànul, de manera que el lloc on es localitzi aquesta activitat correspondrà a les fraccions on ha bandejat l'orgànul corresponent.

El fraccionament aconseguït per nosaltres és satisfactori en quant aconseguïx l'objectiu proposat de separació entre grànuls i mitocondries, però no és prou bò en quant al subfraccionament dels grànuls en els seus dos subtipus existents: azuròfils i específics. Els resultats en aquest cas no són tan bons. Els grànuls específics venen determinats pel pic de lisozima que no conté peroxidasa, mentre que aquell pic on coincideixen ambdues activitats indica la localització dels grànuls azuròfils.

En la distribució s'observen dos pics, un més important que l'altre, de lisozima, i aquesta situació és més evident que en el cas de la peroxidasa. Aquest segon pic de lisozima pot representar el pic corresponent als grànuls específics, però, més probablement, es tracta d'un reste d'activitat procedent d'orgànuls destruïts.

Els resultats han indicat que es tracta d'una proteasa present en la fracció granular, de manera que podem descartar la possibilitat d'una localització mitocondrial.

En quant al tipus de grànul en el qual es troba localitzada la proteasa, no podem donar un resultat concret. Ara bé, les dades de que disposem inclinen a pensar que pot estar present en els grànuls azuròfils, en primer lloc perquè el punt més alt d'activitat proteasa es troba limitat a les zones més denses del gradient, i en segon lloc perquè les dues serin-proteases neutres descrites de PLN, elastasa i catèpsina G, estan localitzades en aquest tipus de grànuls.

No es pot descartar, però, que estrobi en grànuls específics.

La principal objecció que presenta la localització de la proteasa en els grànuls azuròfils és el pH òptim neutre que presenta. Els grànuls azuròfils s'assimilen als lisosomes d'altres cèl.lules i deuen tenir un pH entre 5-6. No es coneix el pH intern dels grànuls específics.

El fet de trobar una proteasa neutra en un lisosoma ja ha estat descrit altres vegades i l'exemple més proper que tenim és el cas de l'elastasa i la catèpsina G. Apart d'aquesta consideració, s'ha descrit en altres teixits dife-

rents als PMN, l'existència de grànuls similars als lisosomes, que contenen només proteases neutres. És possible que també existeixin en els leucòcits.

En quant a les diferents funcions en què aquesta proteasa podria participar, podrien ésser, de manera totalment especulativa, les següents:

1) Degradació extracel.lular: seria similar al cas de l'elastasa i consistiria en que fos alliberada al medi extracel.lular. Com que en aquest no es troba glicogen ni els enzims a ells associats, l'acció sobre aquests enzims seria pura casualitat.

2) Degradació intragranular: apart del procés citoplasmàtic, el glicogen també es degrada intralisosomalment. S'ha localitzat aquest polisacàrid en l'interior de grànuls i lisosomes per microscopia electrònica.

Aquesta degradació lisosomal ha d'ésser bastant ràpida i quantitativament important, com ho proven les malalties d'acumulació intralisosomal del glicogen. El grànul ha de disposar dels enzims necessaris per a degradar totalment el glicogen, incluint les zones ramificades. La glicogenosi tipus II, una de les malalties més greus d'aquest grup d'enzimopaties, és deguda al dèficit en $\alpha(1,4)$ glucosidasa àcida, que va separant els residus de glucosa units per enllaços $\alpha(1,4)$.

El glicogen que es degrada en el lisosoma correspon a aquell que s'acumula en quantitats excessives o desordenadament i no és, per tant, útil per a la cèl.lula. Els

factors que regulen el ritme de degradació són desconeguts, però es tracta d'un procés d'autofàgia.

Dins la cèl.lula, el glicogen està associat als enzims del seu metabolisme, especialment la glicogen sintasa. És possible aleshores, que aquests enzims es trobin també en el lisosoma, de manera que aquest sigui el seu camí de degradació, en el qual podria intervenir la nostra proteasa.

3) Degradació citoplasmàtica: encara que la proteasa estigui localitzada en els grànuls, podria actuar en l'exterior d'aquests orgànuls.

Aquest procés podria estar relacionat amb la mort cel.lular, que acabaria amb la desaparició dels components cel.lulars per alliberament dels enzims hidrolítics que contenen els grànuls. L'aparició de la proteasa amb les seves dues activitats, implicaria una activació de la degradació del glicogen i una inhibició de la síntesi, amb la qual cosa l'objectiu final de degradació del polisacàrid s'aconseguirà més ràpidament.

També es possible que l'actuació de la proteasa estigui relacionada amb la fisiologia normal de la cèl.lula. Si la nostra proteasa té un paper regulador és molt probable que estigui relacionat amb els nivells d'enzim en la cèl.lula i no amb la regulació de la seva activitat, ja que la proteòlisi és un mecanisme irreversible i tant la glicogen sintasa com la fosforilasa b quinasa disposen de sistemes de regulació per modificació covalent molt més vàlids.

La proteasa podria jugar un paper semblant al grup de proteases específiques per als enzims del piridoxal descrites per Katunuma. Encara que no es coneixen els mecanismes

d'activació d'aquestes proteases, sembla que constitueixen el primer pas de la degradació d'aquestes proteïnes. Com ja s'ha explicat, la degradació tindria lloc en diverses etapes: la primera consistiria en una proteòlisi limitada per part d'aquestes proteases específiques, i la segona, en que les proteïnes transformades d'aquesta manera entrarien després en el procés de degradació general de proteïnes de la cèl.lula. Mentre que aquesta degradació inespecífica no seria regulable, el primer pas, que correspon a les proteases específiques, sí que podria ésser regulable i variar segons les necessitats de la cèl.lula en cada moment.

Un altre punt a destacar és que la proteasa és activa sobre la forma I de la glicogen sintasa (forma defosforilada), però pràcticament no presenta activitat sobre la forma D (forma fosforilada). Això suggereix que el grau de fosforilació podria influir en la velocitat de degradació de la glicogen sintasa per part de la proteasa. Tindriem aleshores un sistema de regulació de la proteòlisi més complexe.

En aquest sentit, són de gran importància els inhibidors citoplasmàtics que s'han descrit per a la majoria de les proteases intracel.lulars, sigui quina sigui la seva localització. L'existència d'aquests inhibidors pot indicar dues coses:

a) Existeixen per evitar qualsevol accident que provoqui la presència en el citoplasma de proteases, amb el conseqüent perill per a la integritat cel.lular. Aquest fet podria ésser provocat per algun succés que alterés la compartimentació de la cèl.lula.

Això suposa que, excepte en casos anormals o

patològics, no hi ha contacte entre el contingut dels grànuls i el citoplasma i que els inhibidors són senzillament una mesura de seguretat que, si les condicions són normals, no es trobaran mai en situació d'haver d'actuar.

b) L'altra possibilitat és que, en alguns casos, hi hagi realment un trasvàs d'enzims granulars cap al citoplasma. El paper dels inhibidors en aquesta situació seria molt més important que en la situació comentada anteriorment. Es tractaria de què els inhibidors regulessin, segons el seu nivell, l'activitat d'uns enzims proteolítics que, per la seva banda, regularien el nivell d'altres proteïnes cel·lulars, enzimàtiques o no. En una situació com aquesta, importarien dues coses: el nivell de proteasa existent en el citoplasma i el nivell d'inhibidor. De l'equilibri dels dos factors dependria l'activitat final i el què la proteasa pogués manifestar la seva activitat.

Aquesta hipòtesi dóna gran importància a l'estudi dels inhibidors, principalment en dos aspectes: com seria la seva regulació i quina seria la seva especificitat. L'estudi dels inhibidors està encara molt retrasat, però es pot assegurar que el seu nivell ha d'estar finament regulat per mecanismes fins ara desconeguts. Per altra banda, un estudi més profund dels inhibidors permetrà saber fins a quin punt arriba la seva especificitat.

Si realment s'arribés a poder dir que els inhibidors són específics per a cada proteasa, seria un punt molt important per a pensar que estarien implicats en una regulació molt més complexa que la protecció de la cèl·lula davant d'una sèrie d'activitats proteolítiques incontro-

lades.

Per acabar aquesta discussió, exposarem quines serien les perspectives de treball a curt termini en aquest camp. Segons el que ha estat exposat, hi han certs punts que cerquen una resposta vàlida per a completar la nostra informació:

- Presència de la proteasa en altres teixits: és a dir, veure si existeix en ells i el perquè no actua de la mateixa manera que ho fa en leucòcits.

- Activitat de la proteasa sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa b quinasa d'altres teixits, amb un interès especial en els corresponents als leucòcits PMN.

- Aclarir el fet de si es tracta o no d'una proteòlisi límit: per això és necessari poder disposar d'una proteasa totalment purificada.

- Aclarir el fet de si es tracta d'una sola proteasa amb activitat sobre els dos enzims, o si són dues proteases diferents.

- Comparar les seves propietats amb les d'altres enzims ja descrits. Aquests estudis es fan en base a l'especificitat de substrat, especialment fent servir pèptids sintètics, i a estudis amb inhibidors específics.

- Profunditzar en l'estudi de l'inhibidor citoplasmàtic. Una raó de perquè l'activitat proteasa no és detectable en altres teixits pot ésser que l'inhibidor existeixi en una proporció més gran.

CONCLUSIONS

1-Ha estat identificada una proteasa neutra de leucòcits polimorfonuclears humans i de porc amb capacitat per activar a la glicogen fosforilasa b quinasa de múscul esquelètic de conill.

2-El rendiment de l'obtenció de proteasa va ésser millorat en un 200% tractant el sediment de 27000xg amb Tritó X-100 al 0,1% i sotmetent-lo a tres cicles consecutius de congelació-descongelació.

3-L'activitat de la proteasa de polimorfonuclears sobre la fosforilasa b quinasa és semblant a l'activació d'aquest enzim produïda per la tripsina o la quimotripsina en alguns aspectes.

4-L'activació de la fosforilasa b quinasa produïda per la proteasa es caracteritza per ésser una reacció extraordinàriament ràpida, de manera que en dos minuts d'incubació s'arriba al màxim d'activació (proteasa/fosforilasa b quinasa=1/5 en proteïna).

5-L'activació de la fosforilasa b quinasa es produeix tant sobre la forma activa (pH 6,8) com sobre la forma inactiva (pH 8,6), encara que és més visible a pH 6,8.

La proteasa modifica el percentatge d'activitat a pH 6,8/pH 8,6 de manera que incrementa des d'un 38% fins a un 68% en 15 minuts d'incubació.

6-La proteasa és activa a concentracions de proteasa/fosforilasa b quinasa més grans que 1/20. La reacció d'activació manté la linialitat en dos minuts d'incubació fent servir una relació des de 1/3 fins a 1/20.

7-L'assaig en presència de diversos inhibidors específics per els diversos tipus de proteases, va mostrar un 100% d'inhibició en presència de PMSF 1 mM i STI 1 mg/ml. Inhibidors com les clorometilcetones TPCX i TLCK produïen un 42% i un 55% d'inhibició, respectivament, en concentració 5 mM. Els demés inhibidors assajats es van mostrar inactius.

Per tant, l'enzim es classifica clarament dins del grup de les serin-proteases.

8-La proteasa de leucòcits polimorfonuclears es va mostrar com a independent de calci a concentracions entre 55 μ M i 2 mM, a diferència de l'anomenat "factor activant de la quinasa" que és òptimament actiu en presència de 1 mM de Ca^{2+} .

9-La proteasa va presentar, sobre fosforilasa b quinasa, un pH òptim d'activitat de 7,5.

10-El seguiment de la reacció de proteòlisi mitjançant gels de poliacrilamida al 5%-SDS van mostrar que s'afectava inicialment la subunitat α i també la α' de la fosforilasa β quinasa. Aquest model proteolític romania inalterable durant dues hores d'incubació.

L'activació de la fosforilasa β quinasa és paral·lela a la desaparició de la subunitat α .

11-El medi de gradient compost de Ludox-FVP-NaCl va demostrar ésser més adient per a la separació d'òrgànuls citoplasmàtics que el compost de Ludox-FVP-sacarosa.

12-Les condicions òptimes de concentració del medi de gradient per separar mitocòndries i grànuls van ésser: Ludox (8% v/v)-FVP (3,75% p/v) en NaCl 0,9% ajustat a pH 7,5.

13-Les condicions de centrifugació que es van fixar van ésser de 15000 rpm durant 75 minuts ($T = 4^{\circ}\text{C}$) en el rotor Ty 40 d'una centrífuga Spinco L2.

14-La quantitat de mostra idònia per a un gradient de $V = 9$ ml, es va fixar com el sediment de 27000xg corresponent a 2×10^9 cèl.lules polimorfonuclears, quantitat que no distorsionava el gradient.

15-El mètode escollit per a separar la sílica de les fraccions va ésser la centrifugació a 35000 rpm durant 45 minuts.

16-Un canvi en la densitat inicial del medi de gradient (percentatge de Ludox), mantenint constants les condicions de separació, ocasionava un desplaçament de les activitats enzimàtiques a través del gradient.

17-S'aconsegueix en gradients de Ludox-PVP-NaCl una bona separació de grànuls i mitocondries, com ho evidencien els perfils dels seus enzims marcadors: succinat deshidrogenasa i glutamat deshidrogenasa per la mitocondria, i fosfatasa àcida, β -glucuronidasa, peroxidasa i liozima pels diferents tipus de grànuls. Els marcadors d'una mateixa fracció cel.lular coincidien en la seva localització en el gradient.

18-El mètode emprat no arriba a discriminar clarament els grànuls azuròfils i específics, com ho evidencien els perfils dels seus marcadors: liozima-peroxidasa pels azuròfils i liozima pels específics.

19-L'activitat proteasa apareix associada a la fracció granular, tant assajada sobre fosforilasa b quinasa com sobre glicogen sintasa.

20-En el citoplasma es troba un inhibidor de l'activitat proteasa, de naturalesa termolàbil.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Takeda Y., Brewer H.B., Larner J. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 8943-8950.
- (2) Soderling T.R., Hickenbottom J.P., Reimann E.M., Ankder F.L., Walsh D.A., Krebs E.G. (1976). *J. Biol. Chem.* 245, 6317-6328.
- (3) Huang K.P., Huang F.L., Glismann W.H., Robinson J.C. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 162-170.
- (4) Salavert A., Roach P.J., Guinovart J.J. (1979), *Biochim. Biophys. Acta* 570, 231-238.
- (5) Soderling T.R. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 4359-4364.
- (6) A. Salavert. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona. Juny 1980.
- (7) Takeda Y., Larner J., (1976) *J. Biol. Chem.* 250, 8951-8956.
- (8) Hayakawa T., Perkins J.P., Krebs E.G. (1973) *biochemistry* 12 (4), 574-580.
- (9) Cohen P. (1973) *Eur. J. Biochem.* 34, 1-14.
- (10) Cohen P., Burchell A., Foulkes J.G., Cohen P.T.W., Wanzman T.C., Nairn A.C. (1978). *FEBS Lett.* 92 (2), 287-293.
- (11) Cohen P., Cohen P.T.W., Shenolikar S., Nairn A.C., Perry

- S.V. (1979) Eur. J. Biochem. 100, 329-337.
- (12) Cohen P., Antoniuw J.F. (1973) FEBS Lett. 34, 43-47.
- (13) Meyer W., Fischer E.H., Krebs E.G. (1964) Biochemistry 3 (8), 1033-1039.
- (14) Huston R.B., Krebs E.G. (1968) Biochemistry 7 (6), 2116-2122.
- (15) Drummond G.I., Duncan L. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3097.
- (16) Dayton W.R., Reville W.J., Goll D.E., Stromer M.H. (1976) Biochemistry 15 (10) 2159-2k67.
- (17) Waxman L., Krebs E.G. (1978) J. Biol. Chem. 253 (17) 5888-5891.
- (18) Cohen P., Picton C., Klee C.B. (1979) FEBS Lett. 104 (1), 25-30.
- (19) Hedekov G.J., Esmann V., Rosell-Perez M. (1966) Biochem. Biophys. Acta. 130, 393-400.
- (20) Gella F.J., Cussó R., Domingo A., Rosell-perez M. (1978) J. Biochem. 9, 701-707.
- (21) Gella F.J., Cussó R. (1980) Rev, Esp. Fisiologia 36 1-6.
- (22) Pegueroles F., Cussó R. (1979) J. Biochem. 10, 989-994.
- (23) Rosell-Perez M., Esmann V. (1965) Acta Chem, Scand.

- 19, 679-685.
- (24) Plesner L., Salsas E., Wang P., Rosell-Perz M., Esmann V. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 268, 344-353.
- (25) Cussó R., Domingo A., Rosell-Perez M. (1975) *Rev. Esp. Fisiol.* 31, 309-316.
- (26) Solling H., Esmann V. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81, 119-128.
- (27) Dean R.T. "Cellular Degradative Processes". (1978).
- (28) Goldberg A.L., Dice J.F. (1974) *Ann. Rev. Biochem.* 835-867.
- (29) Goldberg A.L., Li J.B. (1974)
- (30) Goldberg A.L., St John A.C. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 747-933.
- (31) Schimke R.T. (1970).
- (32) Pine M.J. (1967) *J. Bacteriol.* 93, 1527.
- (33) Prouty W.F., Goldberg A.L. (1972) *Nature New Biol.* 240 147.
- (34) Rabinowitz M., Fisher J.M. (1964) *Biochim. Biophys. Acta.* 91, 313.
- (35) Wikman-Coffelt J., Zelis R., Fenner C., Mason D.T. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5206.

- (36) Yu F.L., Feigelson P., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2833-2837.
- (37) Traiser K. A., Colowick S.P. (1961) Biochim. Biophys. Acta. 94, 169.
- (38) Graves D.J. Mann S., Ann S., Philip G., Oliveira R.J. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6090.
- (39) Fritz P.J., Vesell E.S., White E.L., Pruitt K.M. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62, 558-565.
- (40) Katuruma N. (1973) Curr, Top, Cell. Regul. 7, 37-51
- (41) Goldberg A.L., Dice J.F. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43 835-69.
- (42) Milman G., Portnoff L.S., Tiemeier D.C. (1975) J. Biol. Chem. 250, 13993-99.
- (43) Flatt J.P., Blackburn G.L. (1974) Am. J. Clin. Nut. 27, 175.
- (44) Fulks R., Li J.B., Goldberg A.L. (1975) J. Biol. Chem. 250, 290-298.
- (45) Kram R., Tomkins G.M. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1659-63.
- (46) Miller L.L., (1965) Fed. Proc. 24, 737-43.
- (47) Grinde B., Seglen P.O. (1980) Biochim. Biophys, Acta 632, 73-86.

- (48) Hasilik A, (1980) TIBS , set. 1980. 237-240.
- (49) Beaudet A.L., Caskey C.T. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 619.
- (50) Pertoft H., Warmegrad B. (1978) Biochem. J. 174, 309-317.
- (51) Wang C.C., Touster O. (1975) J. Biol. Chem, 4896-4902.
- (52) Dean R.T. (1977) Biochem. J. 168, 603, 605.
- (53) Katunuma N. (1977) TIBS juny 1977. 122-125.
- (54) Schimke R.T., Doyle D. (1970) ann. Rev, Biochem. 929-975.
- (55) Katunuma T., Schott S.E., Holzer H. (1972) Eur. J. Biochem. 27, 520.
- (56) "Manual of Laboratory Techniques" vol. 3 Wolff-Wolff
- (57) Pertoft H, Laurent. T.C., Laas T., Kajedal L. (1978) Analitical Biochem. 88, 271-282.
- (58) Percoll:Density Marker Beads. Pharmacia Fine Chemicals.
- (59) Baudhuin P., Beaufay H., Rahman-Li Y., Sellinger O.Z. Wattiaux R., Jacques P., de Duve C. (1964) Biocem. J. 92, 179-183.
- (60) Baufay H., Jacques P., Baudhuin P., Sellinger O.Z., Berthet J., de Duve C. (1964) 92, 184-204.

- (61) Wolff D.A., Pertoft H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 286, 197-204.
- (62) Leighton F., Lopez F., Zemelman V., Morales M.N. , Wal-
sen O. (1977) *Method. Surveys in Biochem.* 6, 197-215.
- (63) Barrett A.J. (1971). *Tissue Proteinases.*(ed. A.J. Ba-
rrett and J.T. Dingle). North Holland.
- (64) *Methods in Biology* vol. XIX.
- (65) Lazarus G.S., Daniels J.R., Lian J., Burleigh M.C. (1972)
Amer. J. Path. 68, 565-578.
- (66) Sopata I., Danciewicz A.M. (1974) *Biochim. Biophys. Ac-
ta.* 370, 510-523.
- (67) Janoff A., Blondin J. (1973) *Lab. Invest.* 29 454-457.
- (68) Rindler-Ludwig R., Braunsteiner H. (1975) *Biochim. Bio-
phys. Acta.* 379, 606-617.
- (69) Murphy G. Reynolds J.J., Bretz U., Baggilini M. (1977)
Biochem. J. 162, 195-197.
- (70) Gross J., Lapiere C.M. (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
U.S.A. 48, 1014-1022.
- (71) Hoffstein S., Sobermen R., Glodstein I., Weissmann G.
(1976) *J. Cell. Biol.* 68, 781-787.
- (72) Murphy G., Bretz U., Baggiolini M., Reynolds J.J. (1980)
Biochem. J. 192, 517-525.

- (73) Sopata I., Danciewicz A.M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370, 510-523.
- (74) Sopata I., Wize J., (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 571 305-312.
- (75) Schmidt W., Havemann K. "Proteases and biological Control" (ed. Reich-Rifkin-Shaw) Cold Spring Harbour.
- (76) Feinstein G., Janoff A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 403, 493-505.
- (77) Davies P., Rita G.A., Krakauer K., Weissmann G. (1971) *Biochem. J.* 123, 559-569.
- (78) Starkey P.M. (1977) "Proteinases in Mamalian Cells and Tissues" Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- (79) Dewald B., Rindler-Ludwig R., Bretz U., Baggiolini M. (1977) *J. Exp. Med.* 141, 709-723.
- (80) Baugh R.J., Garner D.L., Johnson D.A., Travis J. "Proteases and biological control" Cold Spring Harbour.
- (81) Werb Z., Reynolds J.J. (1975) *Biochem. Journal* 151, 373-385.
- (82) Ishikawa I., Cimasoni G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 480, 228-240.
- (83) Morrison R.I.G., Barrett A.J., Dingle J.T., Prior D. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 302, 411-419.

- (84) Dingle J.T., Barrett A.J., Weston P.D. (1971) *Biochem. J.* 123, 1-13.
- (85) Kopitar M., Lebez D. (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 571-581.
- (86) Steven F.S., Milsom D.W., Hunter A.A. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67, 165-169.
- (87) Uitto V.J., Schwartz D., Veis A. (1980) *Eur. J. Biochem.* 105, 409-417.
- (88) Ohlsson K., Olsson I. (1974) *Eur. J. Biochem.* 42, 519-527.
- (89) Laskowski M., Kato I. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 593-626.
- (90) Steven F.S., Podrazky V., Itzhaki S. (1978) *Biochim. Biophys Acta* 524, 170-182.
- (91) "Lysosomes" tom I.
- (92) Baggiolini M.; Hirsch J.G., de Duve C. (1970) *J. Cell. Biol.* 45, 586.
- (93) Bretz U., Baggiolini M. (1974) *J. Cell. Biol.* 63, 251-269.
- (94) Baggiolini M., Hirsch J.G., de Duve D. (1969) *J. Cell. Biol.* 40, 529.
- (95) Olsson I. (1969) *Exp. Cell. Res.* 54, 325.

- (96) Spitznagel J.K., Dalldorf F.G., Leffell M.S., Folds J.D.
(1973) *J. Clin. Invest.* 52, 80.
- (97) Bainton D.F., Ulllyot J.L., Farquhar M.G. (1971) *J. Exp. Med.* 134, 907.
- (98) Avila J.L., Convit J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 293
409-423.
- (99) Smith G.P., Peters T.J. (1980) *Clinica Chimica Acta*
103, 193-201.
- (100) Takeda Y., Larne J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8951.
- (101) Fischer E.H., Krebs E.G. (1958) *J. Biol. Chem.* 231-265.
- (102) Cohen P. (1973) *Eur. J. Biochem.* 34, 1.
- (103) Brostrom C. (1971) *J. Biol. Chem.* 241, 1961.
- (104) Bernfeld P., (1955). *Methods on Enzymology*. vol I,
149.
- (105) Gilboe D.P., Larson K.L., Nuttall F.Q. (1972) *Anal. Biochem.* 47, 20.
- (106) Cohen P. (1973). *Eur. J. Biochem.* 34, 1.
- (107) Huang K.P., Huang F.L., Glinesman W.H., Robinson J.C.
(1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 162-170.
- (108) Bergmeyer. Vol. 2, pag 932.
- (109) *Methods on Enzymology*. Vol. I.

(110) Biochimija. 32, 618 (1967).

(111) Lowry O.H., Rosebrough N.V., Farr D.L., Randall R.J.
(1951) J. Biol. Chem. 193, 265.