

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

**Determinació dels Paràmetres
Estructurals d'una Glicoproteïna
amb Activitat de Grup Sanguini A**

JOAN ESTELRICH I LATRÀS

3. PROPIETATS FISICOQUÍMIQUES

3.1. ABSORCIÓ A L'ESPECTRE ULTRAVIOLETA

En solució amortidora PBS la glicoproteïna antigènica mostra en la zona ultravioleta l'espectre que s'indica en la figura 50. La glicoproteïna estava present a concentració de 0.951 mg/mL. Hom pot observar una gran zona d'absorbància amb un pic a 213 nm, que correspon a l'enllaç peptídic i també als sucres presents; pels voltants de 280 nm s'aprecia un lleuger pic. Limitant l'espectre d'absorció entre 250 i 300 nm (figura 51) ja s'observa, de forma més clara, un màxim, encara que força aplanat, a 276.5 nm, amb una absorbància de 0.402 i que correspon als aminoàcids cromòfors.

En altres determinacions s'ha comprovat que la forma aplanada del màxim fa que els valors més alts d'absorbància puguin correspondre a longituds d'ona que fluctuen entre 274 i 278 nm.

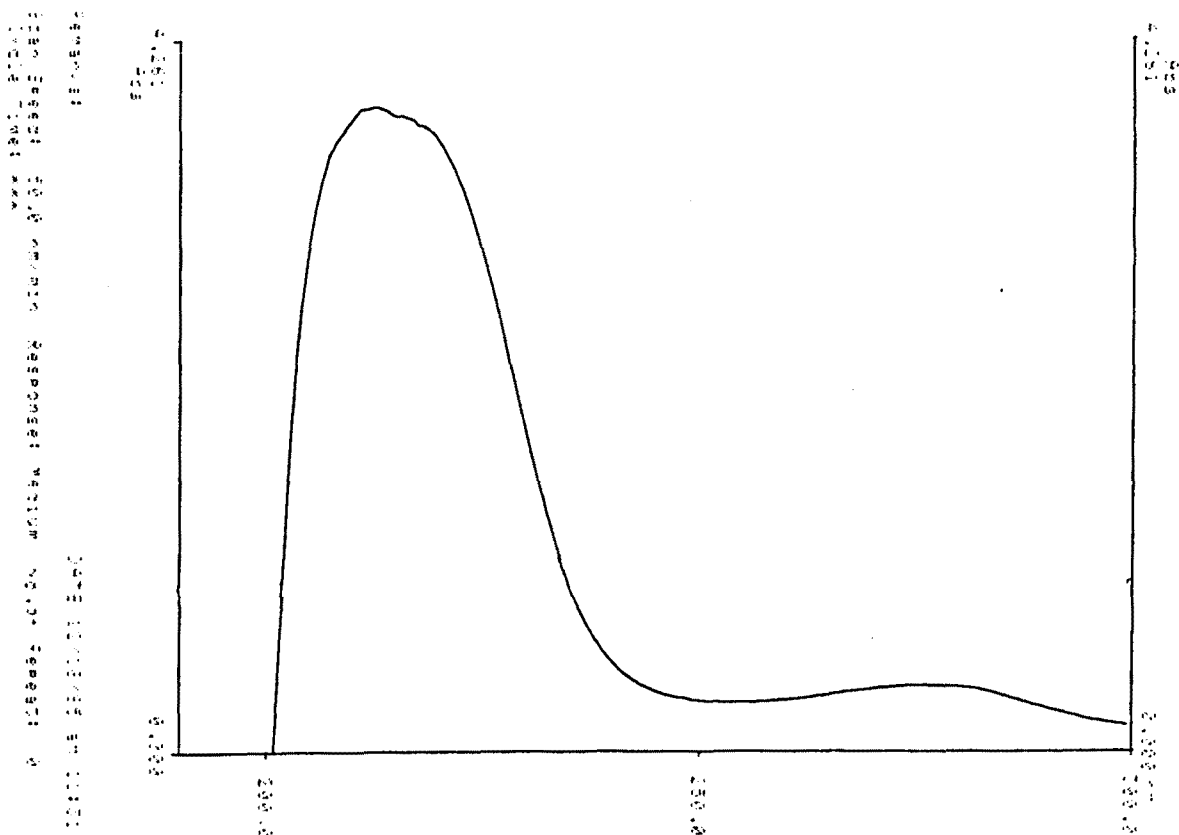


FIGURA 50.- Espectre d'absorció en la zona U.V. (de 190 a 300 nm) de la glicoproteïna determinat en un espectrofotòmetre Hitachi 150-20.

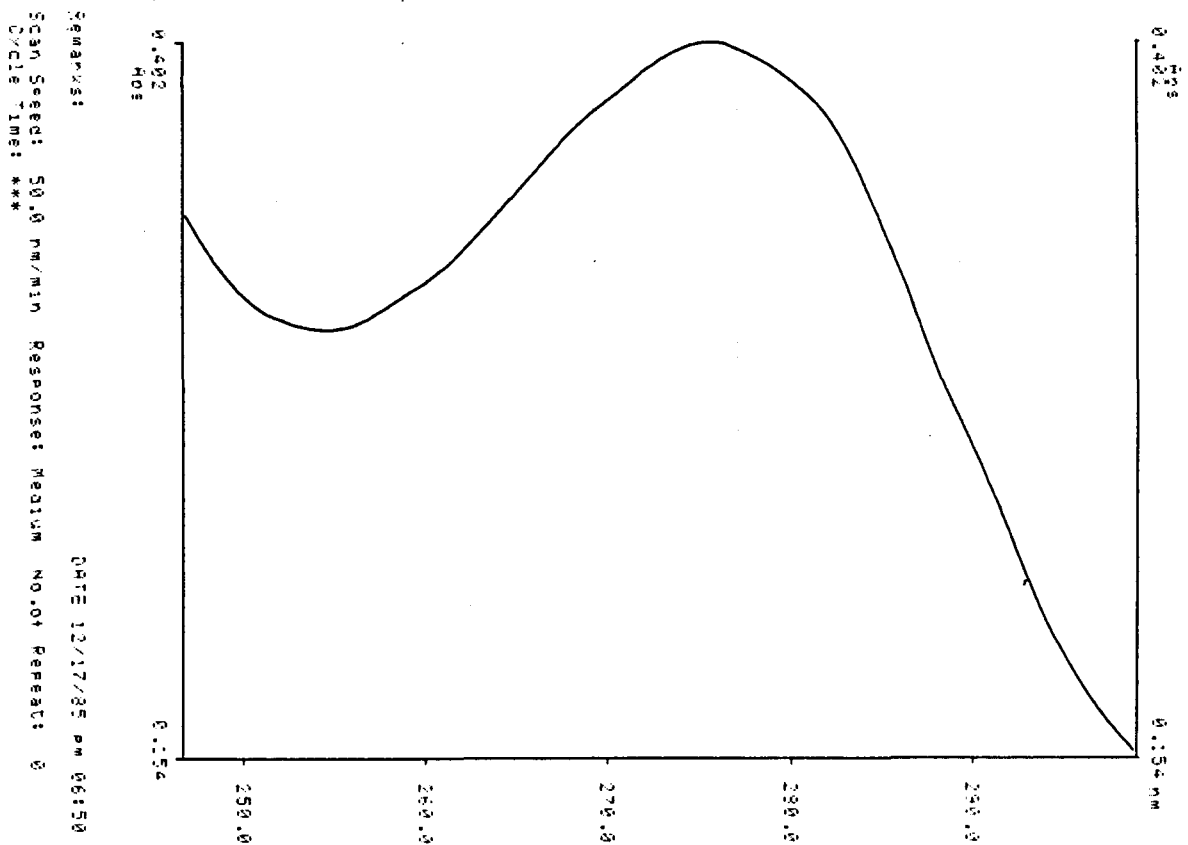


FIGURA 51.- Espectre d'absorció de la glicoproteïna entre 250 i 300 nm, determinat en un espectrefotòmetre Hitachi 150-20.

3.1.1. CORRECCIÓ DE L'ABSORBÀNCIA PRODUÏDA PER L'ESPARGIMENT DE LA LLUM

L'absorbància aparent deguda a solucions proteïques comprén un component degut a l'espargiment de la llum. Aquest component pot determinar-se en la zona U.V. de l'espectre segons la relació de Rayleigh, que estableix que la turbidesa és inversament proporcional a la λ de la radiació incident elevada a una potència n , variant aquest exponent entre valors de 4 a 1, i que és dependent de la relació de la λ de la radiació incident i el tanany, forma i naturalesa de la interfase de les macromolècules dissoltes (KOCH 1961).

Així, la determinació dels valors de l'absorbància en la zona visible de l'espectre permet l'extrapolació a la zona U.V. i la substracció del component de l'absorbància degut a l'espergiment de la llum dona la verdadera absorbància.

Aquesta extrapolació s'ha fet segons la metodologia descrita per WINDER i GENT (1971) enfrontant el logaritme de l'absorbància al logaritme de la longitud d'ona (en la zona visible de l'espectre); la recta obtinguda en la zona lineal s'extrapola a la longitud d'ona desitjada.

Per aquest càlcul s'ha partit d'una solució de glicoproteïna en solució amortidora PBS a concentració de 1.032 mg/mL. Aquesta solució presentava una absorbància de 0.435 a 280 nm. Els valors d'absorbància es determinaren a cada interval de 2 nm entre 550 i 300 nm. Segons s'observa a la figura 52 hi ha una linealitat entre els valors compressos entre 550 (log = 2.740) i 400 nm (log = 2.602). Així, fent ús d'aquests punts s'obté una recta que a 280 nm presenta un valor logarítmic equivalent a una absorbància de 0.028.

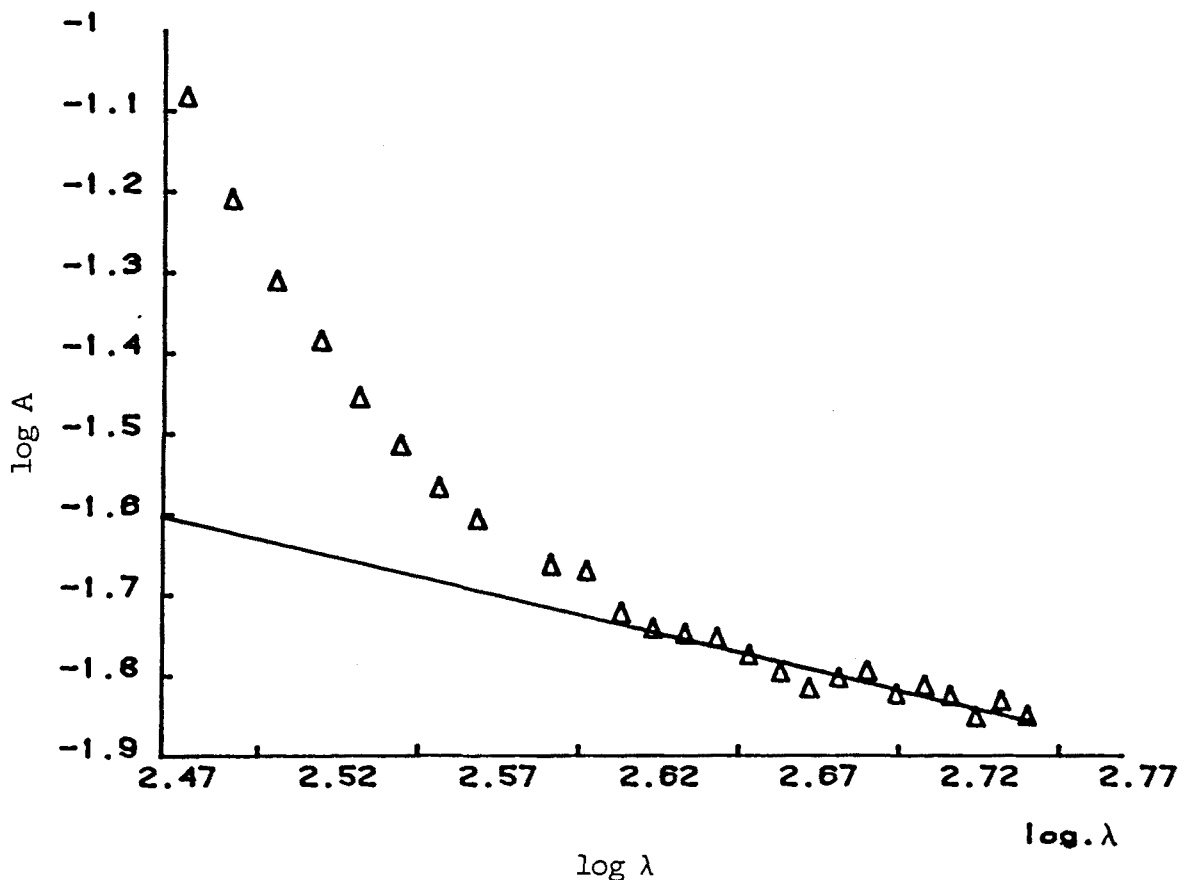


FIGURA 52.- Gràfica del logaritme de l'absorbància vs el logaritme de λ . Amb la recta obtinguda entre 550 i 400 nm s'ha realitzat l'extrapolació a 280 nm. El valor del pendent de la recta proporciona l'exponent n .

Segons això el component de l'espargiment en l'absorbància representa el 6.44% d'aquesta.

A partir del pendent de la recta es té el valor de l'exponent n , que en aquest cas és igual a 1.077, corresponent aital exponent a una molècula amb forma d'el·lipsoide (HELLER et al., 1946).

3.1.2. DEPENDÈNCIA DE LA TURBIDESA AMB LA LONGITUT D'ONA

El paràmetre experimental que descriu la dependència de la turbidesa amb la λ en una solució de macromolècules és el valor n obtingut del pendent negatiu de la gràfica que enfronta el logaritme de l'absorbància amb el logaritme de la λ experimental. Aquest paràmetre depèn de l'increment de l'índex de refracció i del canvi d'aquest índex en funció de la λ i del tamany i forma de les macromolècules en solució.

CAMERINI-OTERO i DAY (1978) han obtingut una sèrie d'expressions relacionades amb l'exponent n , vàlides per a molècules esfèriques, en vareta isotròpica o en cabdell monoestadístic.

Aquestes expressions contenen les funcions d'interferència entre partícules, $Q(\lambda)$, i llur relació amb l'exponent n , i les propietats refractives obtingudes per relacions matemàtiques del tipus Cauchy.

L'expressió que els autors finalment obtenen és:

$$- d \log A / d \log \lambda = n = 4 - 2 \frac{d \log n_0 \lambda}{d \log \lambda} - 2 \frac{d \log \{(\delta n(\lambda)/\delta c)_\mu\}}{d \log \lambda} - \frac{d \log Q(\lambda)}{d \log \lambda}$$

on A és l'absorbància, λ la longitud d'ona, $n_0(\lambda)$ l'índex de refracció del solvent, $(\delta n(\lambda)/\delta c)_\mu$ l'increment de l'índex de refracció a potencial químic constant dels components, i $Q(\lambda)$ és un valor que depèn de les dimensions de les molècules i que oscil·la entre 0 i 1.

L'expressió anterior pot simplificar-se de la manera següent:

$$n = 4 + \alpha_1 + \alpha_2 - \beta$$

Els valors α_1 i α_2 s'obtenen de:

$$\alpha_1 = \frac{4 \times 2.31 \cdot 10^3 \text{ nm}^2}{0.9922\lambda^2 + 2.2 \cdot 10^4 \text{ nm}^2} \quad \alpha_2 = \frac{4 \times 2.2 \cdot 10^4 \text{ nm}^2}{0.925\lambda^2 + 2.2 \cdot 10^4 \text{ nm}^2}$$

i el valor de β s'obté per substracció de $4 + \alpha_1 + \alpha_2$ el valor de l'exponent n .

Aquest valor β expressa la contribució del tamany i la forma de la molècula que produeix l'espargiment de la llum.

En la taula 30 s'indiquen els valors de les constants de dispersió que afecten l'exponent n .

Els elevats valors de β , conseqüència d'un valor baix de n , impliquen una estructura força expandida.

λ	n_0	λ/n_0	α_1	α_2	$4+\alpha_1+\alpha_2$	β
400	1,3432	297,8	0,056	0,507	4,563	3,486
410	1,3424	305,4	0,054	0,492	4,546	3,469
420	1,3416	313,1	0,052	0,477	4,529	3,452
430	1,3408	320,7	0,050	0,462	4,512	3,435
440	1,3400	328,4	0,049	0,447	4,496	3,419
450	1,3393	336,0	0,047	0,432	4,479	3,402
460	1,3387	343,6	0,045	0,417	4,462	3,385
470	1,3380	351,3	0,043	0,402	4,445	3,368
480	1,3375	358,9	0,042	0,387	4,429	3,352
490	1,3369	366,5	0,040	0,372	4,412	3,335
500	1,3364	374,1	0,037	0,357	4,394	3,317
510	1,3359	381,8	0,036	0,342	4,378	3,301
520	1,3355	389,4	0,035	0,327	4,362	3,285
530	1,3351	397,0	0,033	0,312	4,345	3,268
540	1,3347	404,6	0,031	0,297	4,328	3,251
550	1,3343	412,2	0,030	0,282	4,312	3,235

TAULA 30.- Constants de dispersió que afecten l'exponent n . El valor de l'índex de refracció s'ha obtingut de $n_0(\lambda) = 1.3345(0.9922 + 2.31 \cdot 10^3/\lambda^2)$ segons la λ .

3.1.3. COEFICIENT D'ABSORCIÓ ESPECÍFICA

El coeficient d'absorció específica de la glicoproteïna s'ha determinat en tres mostres que després de desecades al buit en presència de clorur càlcic fins assolir un pes constant, s'han solubilitzat en solució amortidora PBS. Les concentracions de les mostres de partida eren 2.63, 2.17 i 1.48 mg/mL. Fent dilucions a 1/2 amb la mateixa solució amortidora s'han obtingut 5 solucions de cada mostra de partida. De cada solució s'han pres tres alíquotes i s'ha determinat l'absorbància a 280 nm, calculant el valor mig per a cadascuna de les 15 mostres a valorar.

La recta que correlaciona l'absorbància amb la concentració (figura 53) fent que aquesta passi per l'origen és

$$y = 0.4234 \cdot x \quad (r = 0.999)$$

on y és l'absorbància a 280 nm i x la concentració en mg/mL.

Els límits de confiança del pendent de la recta (b) es calculen segons

$$b \pm t(n-2, \alpha)SE(b)$$

on el valor de t ve donat per la llei d'Student-Fisher amb $15 - 2 = 13$ graus de llibertat i $SE(b)$ és l'error estàndard de l'estimació del pendent, que en aquest cas val 0.0027.

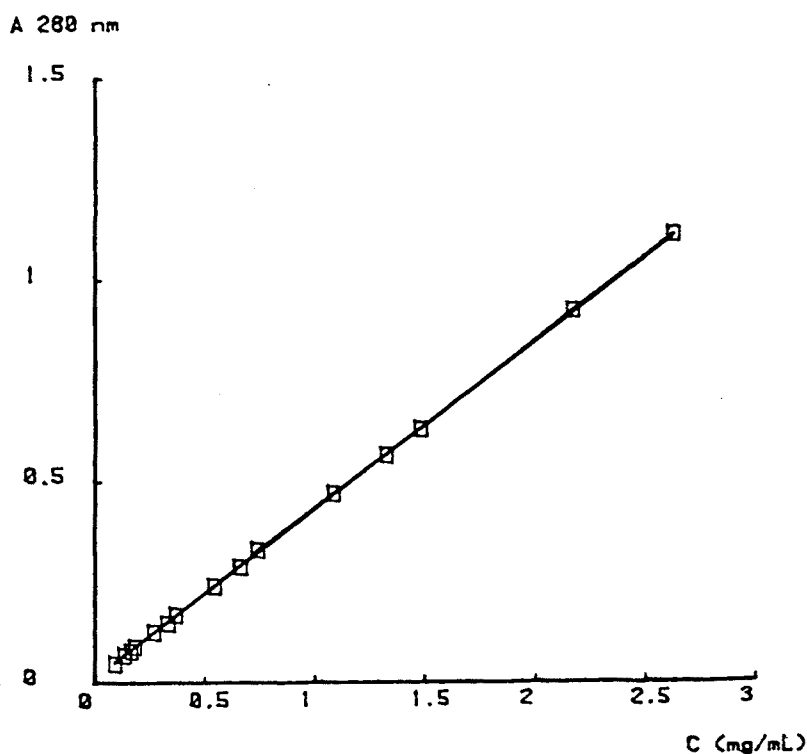


FIGURA 53.- Determinació de la relació absorbància a 280 nm vs con-

Calculant l'absorbància que correspon a una concentració de 10 mg/mL i com el pas de llum de la cubeta és d'1 cm, es té un valor del coeficient d'absorbància igual a $0.4234 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Amb uns límits de confiança del 99% es té una forquilla compresa entre 0.4315 i 0.4153.

3.1.4. ESPECTROSCOPIA DERIVATIVA

L'espectroscopia derivativa (principalment de la segona i quarta derivada) ha estat emprada per a resoldre la complexitat d'un espectre en la regió de l'ultravioleta pròxim (240-320 nm) i així poder determinar la contribució dels tres cromòfors dels aminoàcids aromàtics i la influència del solvent sobre aquests cromòfors.

L'espectre d'absorció degut a canvis d'estat electrònics d'un residu aromàtic en aquesta regió hauria de correspondre a un pic estret produït per una única transició. En realitat al estar la proteïna dissolta en un medi aquòs, l'aigua, que és fortament polar, fa que les bandes de l'absorció s'eixamplin, i això unit a la pertorbació produïda per les transicions vibracionals i rotacionals, fan que els pics siguin més amples i que, d'aquesta manera, es produeixi un solapament dels pics.

Sempre i quan un pic segueixi una corba gaussiana, la intensitat de la derivada n -sima és inversament proporcional a la potència n -sima de l'amplitud de la banda. Així, l'anàlisi per derivades afavoreix les bandes estretes en detriment de les amples. Teòricament, a major ordre de derivació correspon una resolució més gran, però també es produeix una disminució de la relació senyal/soroll de fons. La intensitat de les bandes en la corba derivada és directament proporcional al tamany dels intervals diferencials emprats, però el soroll de fons és independent, essent 2^n vegades el nivell de soroll original. Així doncs, l'elecció de l'ordre de derivació és un compromís entre aquests dos factors oposats (PADROS et al., 1984).

Amb la quarta derivada, ultra la contribució individual dels cromòfors, poden esbrinar-se els efectes del solvent sobre les dues bandes principals de vibració de la tirosina.

Amb la segona, que ha estat l'emprada, pot obtenir-se la contribució de la fenilalanina i la relació entre el triptofan i la tirosina.

La determinació s'ha realitzat amb una mostra glicoproteínica dissolta en solució amortidora PBS, a concentració de 0.68 mg/mL.

L'espectre de la segona derivada s'ha obtingut amb un espectrofotòmetre Hitachi 150-20, amb una amplitud d'esclatxa de 1 nm, una velocitat de registre de 50.0 nm/min i un interval de derivació de 2 nm.

En la figura 54 es mostra l'espectre obtingut. Els pics es troben a 256, 261, 263, 267, 271, 278, 295 i 296.5 nm. Les valls a 252.5, 258, 262, 264.5, 268, 276, 283, 290.5, 296 i 298 nm.

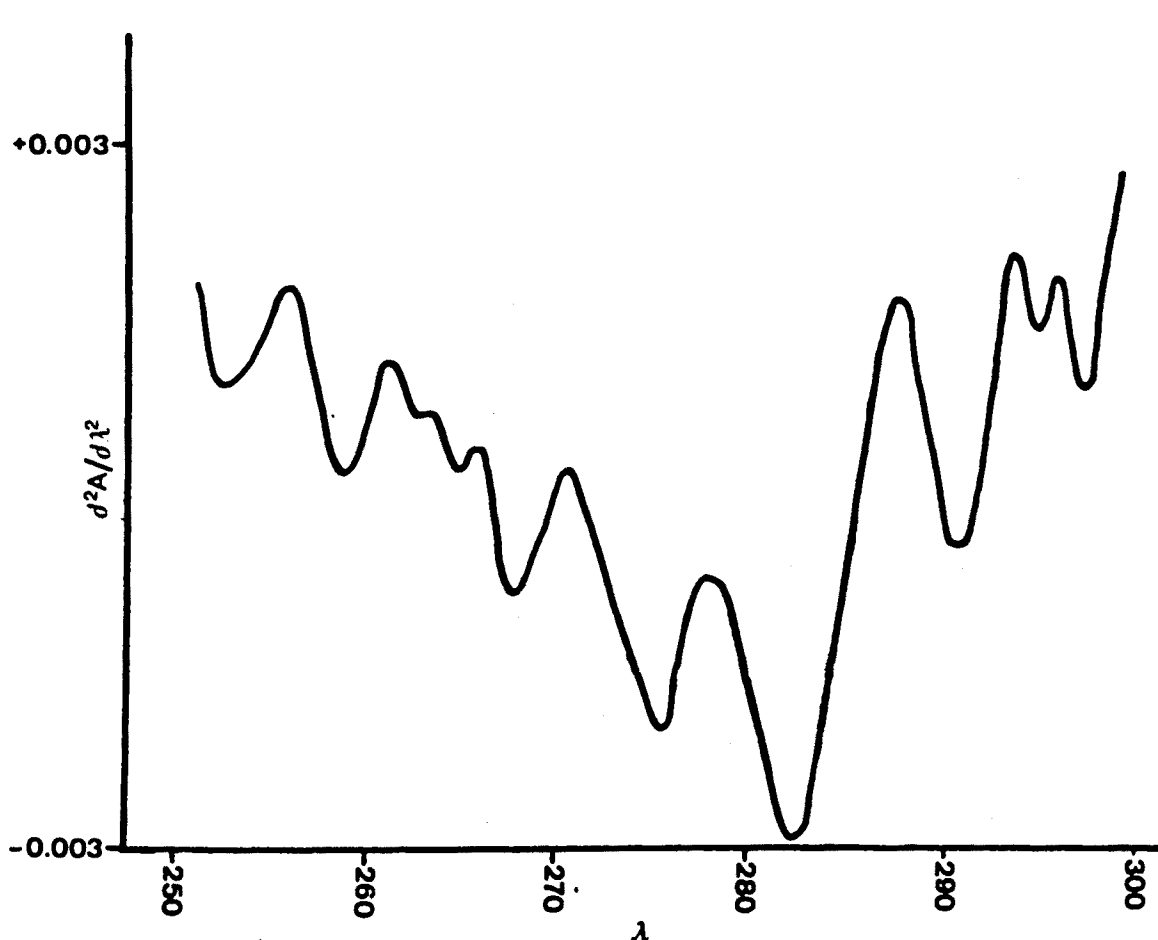


FIGURA 54.- Espectre de la segona derivada entre 250 i 300 nm d'una solució en PBS de la glicoproteïna a $c = 0.68$ mg/mL.

Les valls i pics crompressos entre 250 i 265 nm cal atribuir-los únicament a la fenilalanina, mentre que, per sobre de 270 nm també es troben les contribucions espectrals de la tirosina i el triptofan (BALESTRIERI et al., 1978). En aquells casos en que la relació Trp/Tyr és superior a 1, la diferència entre el pic a 295 nm i la vall a 290.5 nm està relacionada amb el contingut en triptofan, però si la relació Trp/Tyr és menor o igual que 1, el valor numèric d'aquesta diferència està alterat, car la tirosina presenta una banda positiva entre el pic a 295 nm i la vall a 290.5 nm.

La informació més directa envers el contingut de tirosina i triptofan, s'obté del valor de la segona derivada a 276 nm. A aquesta λ , el triptofan presenta un pic i la tirosina una vall, predominant a concentracions iguals d'ambdós aminoàcids la vall de la tirosina. En l'espectre obtingut s'observa la vall a 276 nm, de la qual cosa hom dedueix que la relació Tyr/Trp ≥ 1 i, per tant, no pot valorar-se el triptofan per la mesura directa de la diferència entre el pic a 295 nm i la vall a 290.5 nm.

SERVILLO et al. (1982) han obtingut la relació entre el contingut en triptofan i tirosina, per una part, i les distàncies entre valls i pics, per altre; en concret, es determina la relació a/b on a és la diferència de valors entre 287 i 283 nm, i b la diferència entre 295 i 290.5 nm. Aquesta relació equival a

$$\frac{a}{b} = \frac{Ax + B}{Cx + 1}$$

on x és la relació molar Tyr/Trp, i A, B i C uns paràmetres, que, pel mètode dels mínims quadrats en relacions no lineals, basat en l'algoritme de Marquardt, i en proves fetes en solució amortidora de fosfats 0.05 M pH 6.5 en clorhidrat de guanidina 6M, són iguals a $A = 0.21 \pm 0.01$, $B = 0.66 \pm 0.1$ i $C = 0.080 \pm 0.05$.

Amb les dades obtingudes de l'espectre es tenen unes diferències $a = 9.63$ i $b = 7.26$ ($a/b = 1.33$). Portant aquest valor a l'anterior equació hom té un valor de $x = 2.11$, valor que, tinguent en compte que la solució no desnaturalitzant emprada (PBS) forneix unes diferències més marcades que no pas un medi desnaturalitzant, com és ara amb el que s'han determinat els paràmetres A, B i C, no és gaire diferent a l'obtingut amb la hidròlisi alcalina (cf. apartat 1.2.3).

3.1.5. VARIACIÓ DE L'ESPECTRE D'ABSORCIÓ A L'ULTRAVIOLETA EN FUNCIÓ DEL pH

La variació de l'espectre a l'UV en funció del pH s'ha determinat a partir d'una solució de glicoproteïnes en aigua a concentració de 1.20 mg/mL. A un volum de 0.5 mL d'aquesta solució, s'han afegit 2.00 mL de la solució amortidora corresponent (concentració final de la glicoproteïna = 0.30 mg/mL). Com a blanc s'ha emprat un volum de 2.00 mL de la solució amortidora corresponent al que hom afegeix 0.50 mL d'aigua bidestil·lada. Després de realitzar la lectura de l'absorbància entre 200 i 300 nm, s'ha determinat el pH de la solució.

Les solucions amortidores emprades i el pH final assolit han estat els següents:

- àcid clorhídric-clorur potàsic pH = 0.80
- àcid clorhídric-clorur potàsic pH = 1.88
- citrats pH = 5.29
- fosfats pH = 7.21
- Tris-HCl pH = 7.55
- borats pH = 8.89
- glicina pH = 9.94

En la figura 55 s'observa els diferents espectres obtinguts, així com l'amplificació d'aquest espectre entre 250 i 300 nm. Es de destacar la gràfica anormal que es produeix quan la glicoproteïna es troba a pH 5.29. El captament notablement diferenciat, en comparació amb els altres pH, pot deure's a la interacció solvent-solut, molt afavorida per la forta polaritat del citrat. Determinat l'espectre a pH 5.05, però en solució amortidora d'acetats, s'obté una gràfica semblant a la obtinguda amb els altres pH.

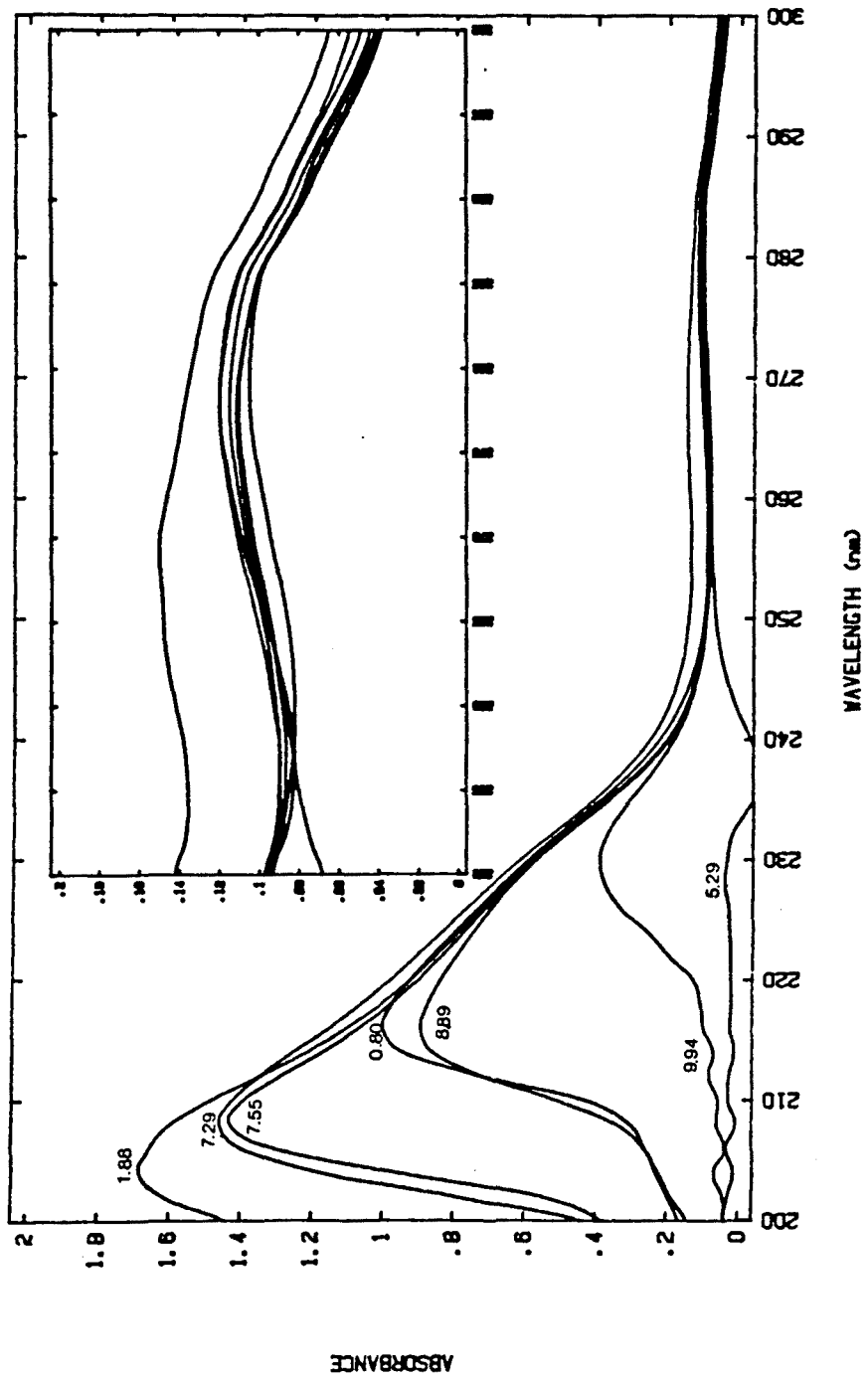


FIGURA 55.- Variació de l'espectre d'absorció de la glicoproteïna en la zona de l'UV en funció del pH. En la part interior es mostra aquesta variació des de 250 fins a 300 nm.

3.1.6. IONITZACIÓ DELS GRUPS FENÒLICS

La ionització dels grups fenòlics (presentes en la tirosina) és fàcilment determinable per mesura dels canvis d'absorció a 295 nm produïts per la conversió dels grups fenòlics no ionitzats a ions fenolat. La ionització de la tirosina es produeix quan el protó del grup -OH és extret ($pK_a = 10.9$). Les diferències espectrals poden, com ja s'ha dit, determinar-se de forma molt sensible monitoritzant l'absorbància a 295 nm, on la variació del coeficient d'absorció molar és igual a 2330.

Les solucions a determinar s'han obtingut afegint a 0.50 mL d'una solució de glicoproteïna en aigua ($c = 1.20$ mg/mL), 2.00 mL de diferents solucions amortidores de glicocola a diferents pH. La solució de referència es componia de 2.00 mL de la solució amortidora i 0.50 mL d'aigua. El pH s'ha determinat després de la mescla. El marge de pHs emprats anava de 7.75 fins a 13.50. A partir de les solucions amb pH superior a 12, l'absorbància sempre s'ha determinat als 60 s de realitzada la mescla, car a aquests pH l'absorbància és temps-dependent (TANFORD et al., 1955).

La figura 56 mostra la variació de l'absorbància a 295 nm en funció del pH. S'observa clarament una corba en dues fases: en la primera - fins a un pH de 10.20 - es valoren les tirosines que es troben en la part externa de la molècula i fàcilment accessible al medi solvent; en la segona - a partir d'un pH de 11.75 - es valoren les tirosines que es troben en l'interior de la molècula.

En base a les diferències d'absorbància, 0.030 en la primera fase, i 0.045 en la segona, es pot afirmar que la relació de les tirosines entre l'interior i l'exterior de la molècula és aproximadament de 1:1.5.

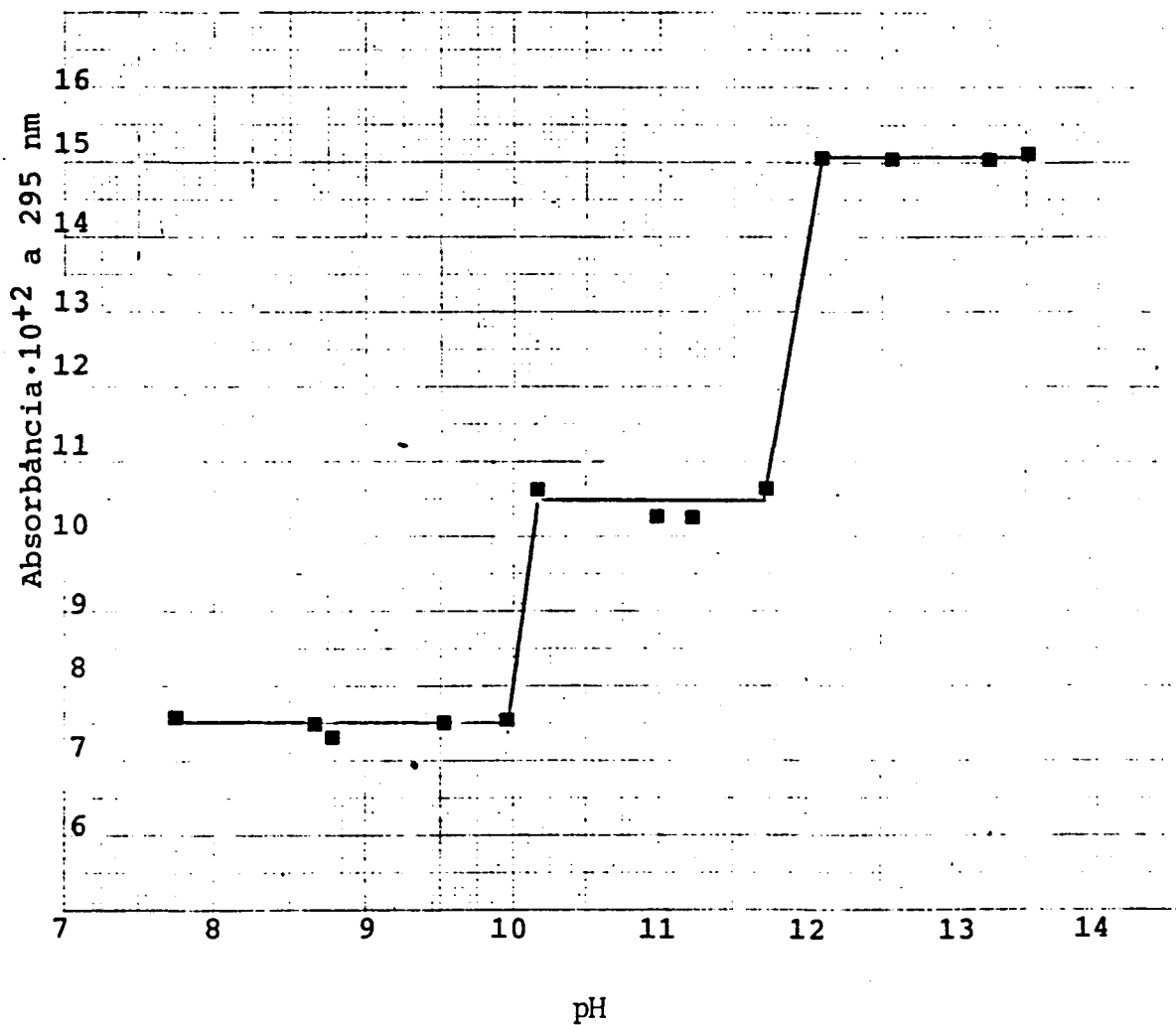


FIGURA 56.- Variació de l'absorbància a 295 nm en funció del pH del medi valorat. Els diferents valors de pH s'han assolit amb solució amortidora de glicocola.

3.2. ABSORCIÓ A L'ESPECTRE INFRAROIG

La glicoproteïna dispersada en bromur potàssic proporciona, en un espectrefotòmetre Perkin Elmer 1430, l'espectre infraroig de la figura 57.

Aquest espectre, molt més definit que l'obtingut amb la solució aquosa de les glicoproteïnes específiques i no específiques (figura 19) es caracteritza per les següents bandes d'absorció:

- 3380 cm^{-1} pròpia del grup -OH i que pot enmascarar la vibració tensional dels grups -NH- i NH_2 de les parts peptídiques i glucídiques de la molècula.
- 2800 cm^{-1} , que pot assignar-se al grup -CH- aromàtic.
- 1640 cm^{-1} , vibració tensional del grup C=O , propi de l'estructura amida I.
- 1250 i 1070 cm^{-1} apareixen unes bandes que poden deure's els enllaços C-O i C-O-H , característics dels derivats glucídics o be de l'amida III.
- les dues bandes principals que resten, a 850 i a 530 cm^{-1} , són de difícil assignació.

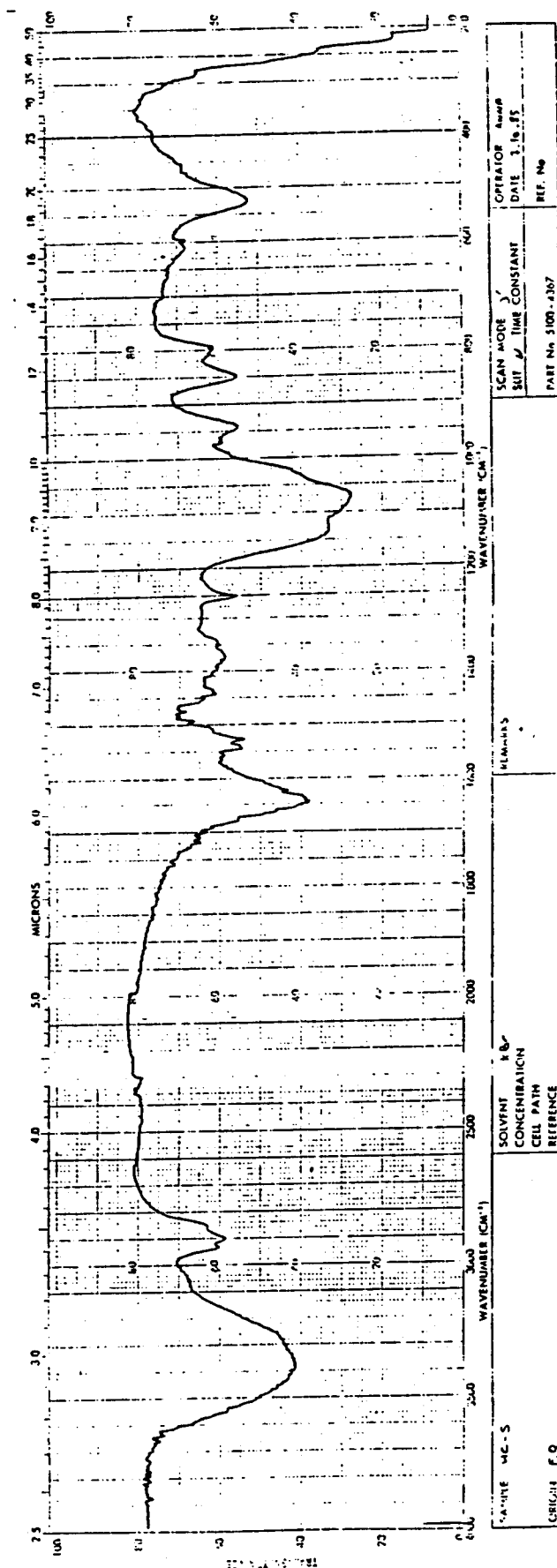


FIGURA 57.- Espectre infra-roig de la glicoproteina antigenica.

3.3. DISPERSIÓ ROTATÒRIA ÒPTICA (D.R.O.)

El poder rotatori òptic de la glicoproteïna s'ha determinat en un polarímetre Perkin-Elmer P-23, fent ús d'una esclatxa variable de 3 a 1 nm, cubetes de 1 i 0.1 cm de pas de llum, i mantenint el sistema a una temperatura constant de $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

En l'interval de 600 a 300 nm s'empren solucions de glicoproteïna en PBS, compresses entre 2.0 i 3.5 mg/mL, i de 350 a 220 nm, l'interval emprat de concentracions fou de 0.1 a 1.0 mg/mL.

Tant les solucions amortidores com les glicoproteïniques havien estat prèviament filtrades per filtres Durapore HVLP (Millipore) de $0.22 \mu\text{m}$ de porus.

La rotació específica del residu mig corregida, $[\text{m}']$, fou calculada a partir de la rotació específica fent ús de

$$[\text{m}'] = \frac{3}{n^2 + 2} [\alpha] \frac{M}{100}$$

on n és l'índex de refracció del solvent a una determinada longitud d'ona, que, determinat en un refractòmetre Hilger & Sons (Hilger, Londres) ha proporcionat un valor de 1.3330 a 20°C i a $\lambda = 546 \text{ nm}$; M és el pes molecular del residu mig, en aquest cas val 103.62, segons s'ha determinat en l'anàlisi d'aminoàcids descrit en l'apartat 1.2.2.

En la taula 31 s'indiquen els valors obtinguts de rotació específica (α) i de rotació específica del residu mig corregida $[\text{m}']$. El màxim valor s'obté a 235.4 nm, on $[\text{m}'] = 958^\circ\text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$.

En la figura 58 hom representa l'espectre de D.R.O. de la glicoproteïna de 300 a 220 nm. No s'han pogut fer lectures de longituds d'ona més baixes per deficiències operatives en el sistema monocromador.

Amb els valors de D.R.O. s'han determinat, per altre part, l'equació de Drude i les dues equacions de Moffitt-Yang, així com també s'ha realitzat la comparació de l'espectre obtingut amb els espectres calculats teòricament segons els diferents percentatges de les conformacions α -hèlix, β -fulla o cabdell monoestadístic (cf. Apartat 4.3. Conformació de la molècula).

λ	$-(\alpha)$	$-(m)$	λ	$-(\alpha)$	$-(m)$
345	82,1	67,6	246	724	596
340	97,0	79,8	245	813	670
335	104,5	85,5	244	873	719
330	112	91,2	243	918	755
325	115,5	94,7	242	948	780
320	119	98,3	241	970	798
315	123	101	240	993	817
310	127	104	239	1040	860
305	164	135	238	1070	884
300	179	147	237	1140	940
295	194	160	236	1150	946
290	209	172	235	1160	952
285	239	197	234	1160	952
280	291	240	233	1150	946
275	328	270	232	1150	946
270	343	283	231	1140	940
265	381	313	230	1130	927
260	485	399	229	1090	900
255	590	485	228	1070	880
254	612	504	227	1040	860
253	619	510	226	1020	840
252	623	516	225	1000	820
251	634	522	224	960	790
250	649	534	223	933	768
249	687	565	222	903	743
248	694	571	221	888	731
247	716	590	220	873	719

TAULA 31.- Valors de rotació òptica específica i de rotació òptica del residu mig corregida de la glicoproteïna. Ambós valors s'expressen en graus·cm²·dmol⁻¹.

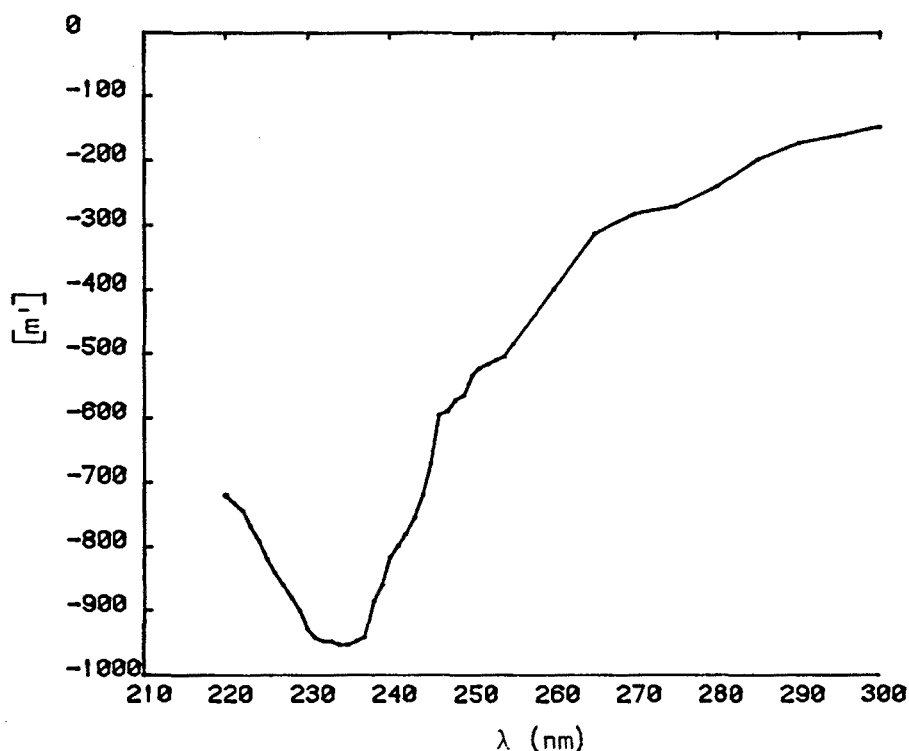


FIGURA 58.- Espectre D.R.O. de la glicoproteïna amb activitat antigènica.

3.4. COMPORTAMENT CROMATOGRÀFIC

Com a comportament cromatogràfic s'entén la variació o no dels paràmetres cromatogràfics en funció de lleugers canvis d'unes determinades variables, principalment pH, força iònica i viscositat. Es a dir, es tracta de delimitar els valors d'aquestes variables dins de les quals la glicoproteïna manté una constància en els seus paràmetres cromatogràfics.

De les tres variables esmentades s'ha prescindit de la influència de la viscositat, atés que és una variable que només afecta el comportament cromatogràfic a valors molt alts envers la viscositat de l'eluent, i això implicaria concentracions molt elevades i, en cromatografia de filtració per gel, les isoterms de partició són lineals (els coeficients de partició entre el gel i el líquid són independents de la concentració de la mostra) fins a molt altes concentracions de solut (PORATH 1967). Així, les variables a emprar han estat el pH i la força iònica.

Pel que fa al pH s'ha emprat el valor del pH fisiològic (7.21) i els dels extrems d'una forquilla de ± 0.50 , en tant que per a la força iònica també s'ha partit del valor propi d'una solució fisiològica, com és ara el de la solució amortidora PBS ($I = 0.16$) i d'aquest valor, fent dilucions amb aigua destil·lada s'han obtingut valors més baixos.

Les condicions experimentals de la determinació són les mateixes que les descrites en l'apartat 2.1.2. DETERMINACIO DE LA MASA MOLECULAR PER CROMATOGRAFIA DE FILTRACIO PER GEL.

El volum del llit cromatogràfic emprat (V_t) ha estat de 124 mL, el volum buit (V_o), determinat amb Blue Dextran de 45 0.5 mL, i amb una solució de tirosina s'ha obtingut un volum d'elució (122 ± 1 mL) que ha servit per a calcular el volum intern (V_i) emprant la relació:

$$V_i = V_e - V_o$$

i que ha resultat ésser de 77 ± 1.5 mL.

El volum del gel en el llit cromatogràfic (V_x) s'obté de:

$$V_x = V_t - V_o = 79 \pm 0.5 \text{ mL}$$

Amb aquests valors i tinguent en compte que el volum d'elució (V_e) de la glicoproteïna ha estat de 90 ± 1 mL, ja es poden calcular els principals paràmetres que caracteritzen el comportament cromatogràfic de la glicoproteïna i que es mostren en la taula 32.

Volum d'elució relatiu	$(V_e/V_o) = 2.02 \pm 0.04$
Constant de retenció	$(V_o/V_e) = 0.50 \pm 0.01$
Coefficient de partició K_{av}	$(V_e - V_o)/V_x = 0.58 \pm 0.03$
Coefficient de partició K_D	$(V_e - V_o)/V_i = 0.60 \pm 0.03$

TAULA 32.- Paràmetres cromatogràfics de la glicoproteïna en un llit cromatogràfic de Sepharose 4B-CL (Pharmacia).

Per a l'estudi del comportament cromatogràfic s'han emprat dues solucions amortidores de fosfats, de pHs 6.71 i 7.21, a concentracions de 71 i 60 mM, respectivament, i una de Tris-HCl 180 mM a pH 7.72. El fet d'emprar la solució Tris-HCl rau en la circumstància que el pH de 7.70 és més proper al pK_a d'aquesta solució amortidora que no pas al pK_a de la de fosfats (pK_a s 8.1 i 7.2, respectivament)(FREIFELDER 1982).

Els valors de pH i de força iònica s'han determinat directament en els efluents. El pH es determina en un pH-metre digital CRISON i la força iònica a partir de l'osmolaritat (determinada en un osmòmetre FISKE) segons unes equacions determinades empíricament i que proporcionen la força iònica a partir del pH i de l'osmolaritat. Les figures 59 i 60 mostren aquestes relacions.

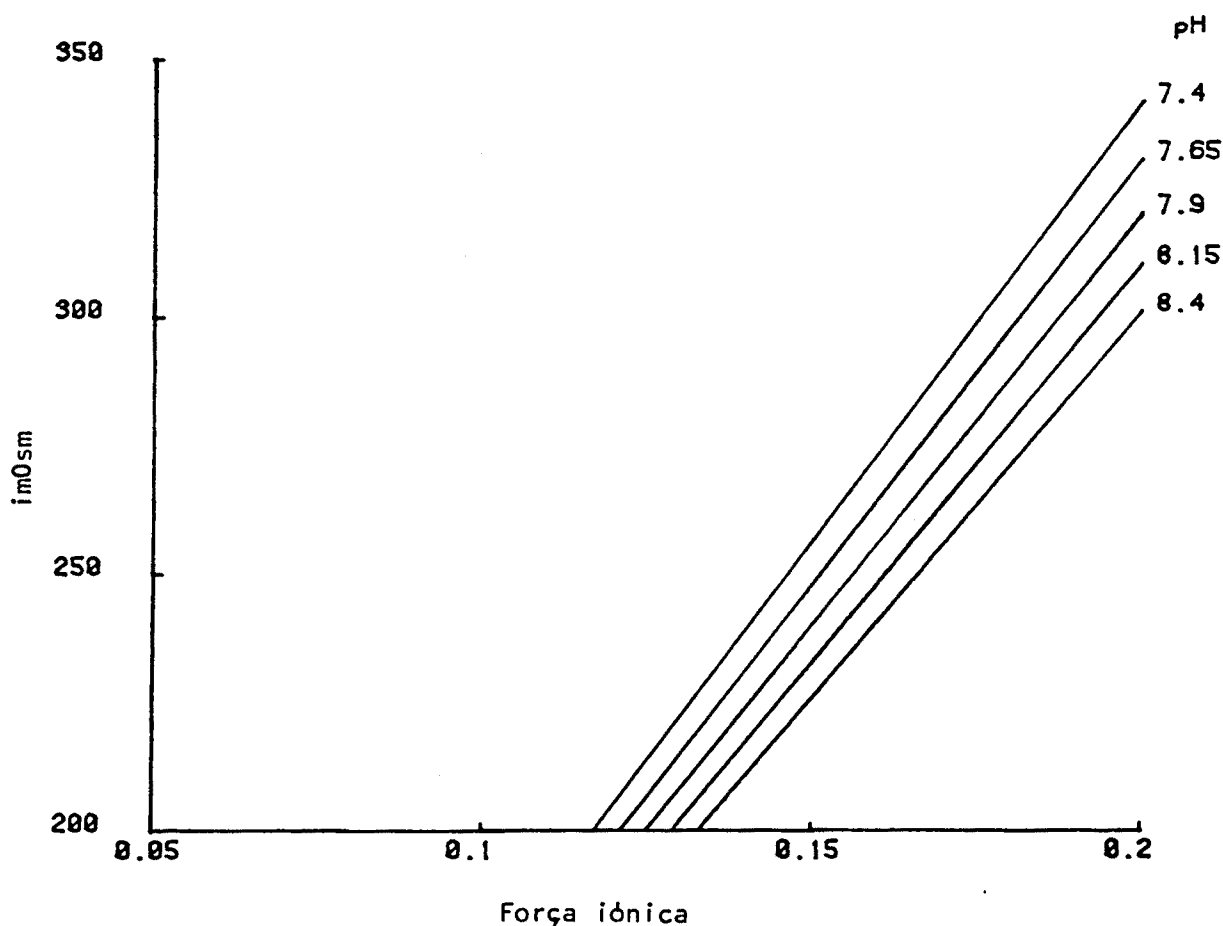


FIGURA 59.- Variació de la relació entre la força iònica i l'osmolaritat segons diferents valors de pH assolits amb solució amortidora Tris-HCl.

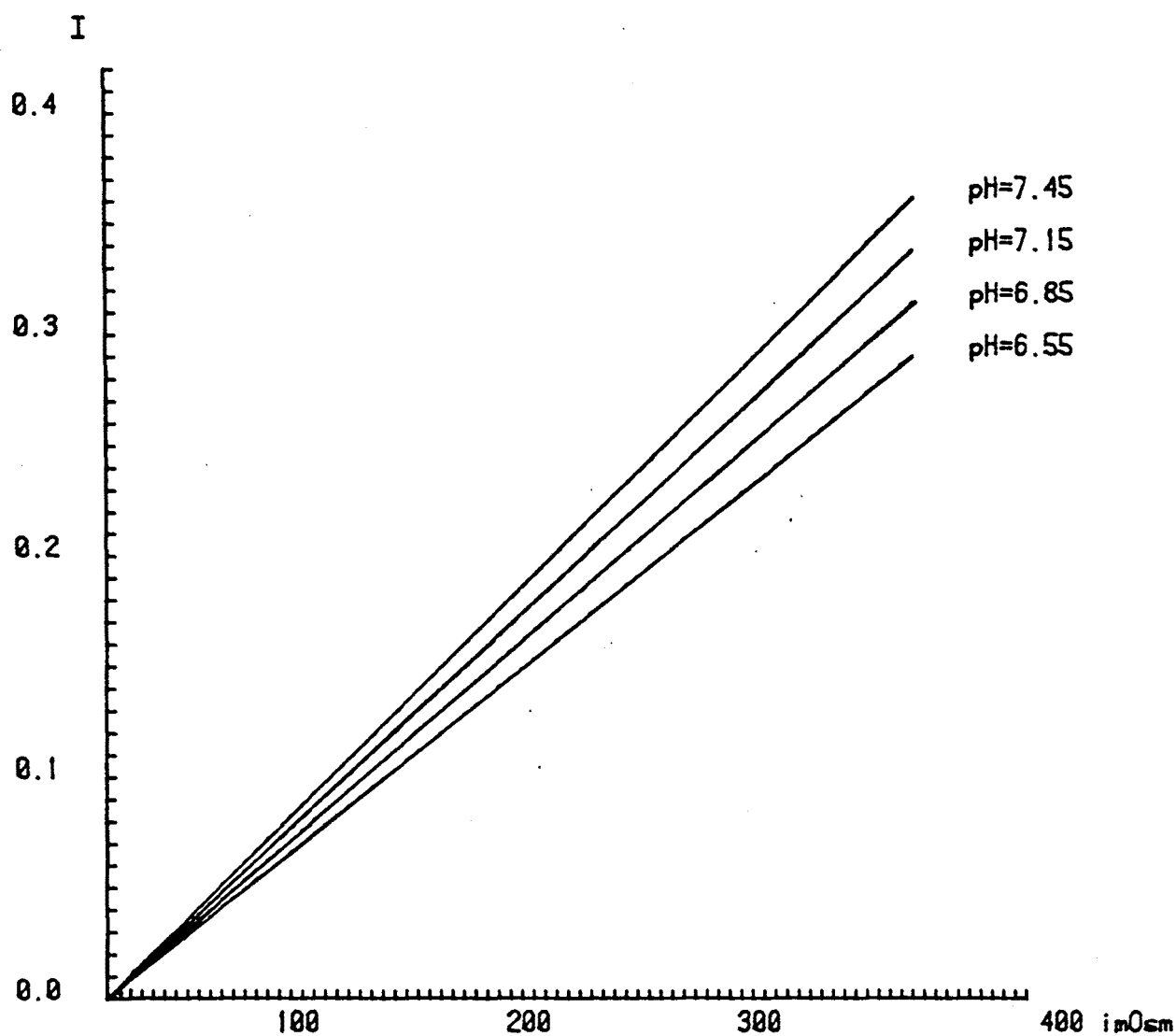


FIGURA 60.- Variació de la relació entre la força iònica (I) i l'osmolaritat (imOsm) segons la variació de pH assolits amb solució amortidora de fosfats.

Amb els valors V_e , V_o i V_i obtinguts es calculen els valors de K_D i es grafiquen enfront de la força iònica, obtenint-se una corba per a cada pH (figura 61).

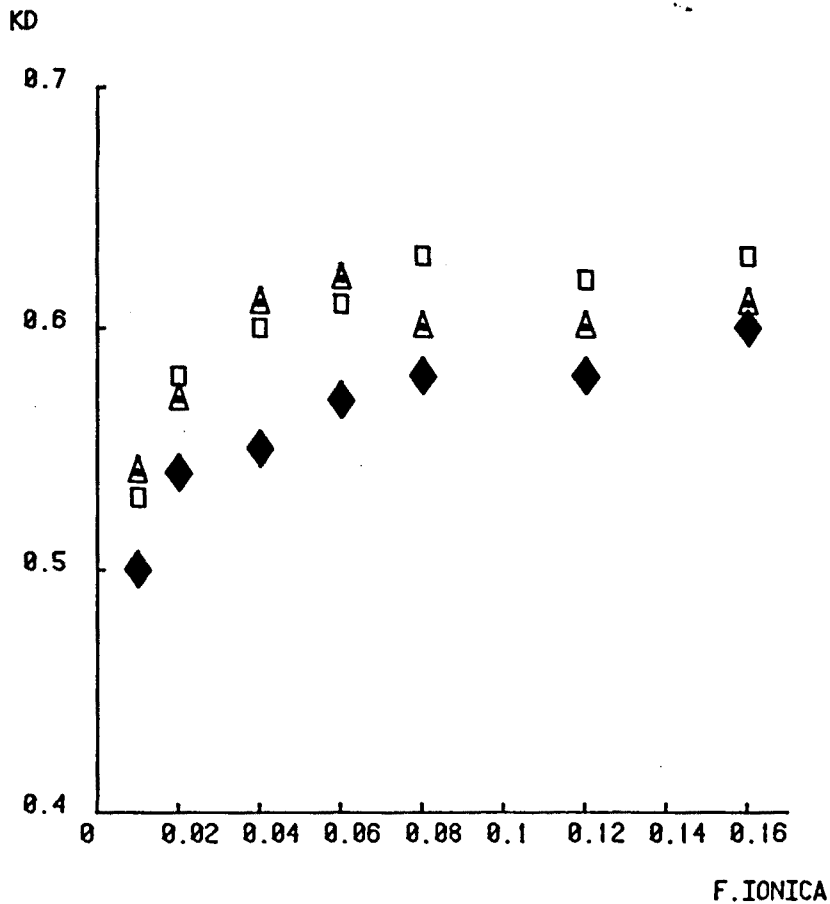


FIGURA 61.- Variació del coeficient de partició K_D en funció de la força iònica i el pH. Els pHs emprats han estat: 7.70 (□); 7.21 (△) i 6.71 (◆).

Hom observa que tan sols es produeix un petit descens del valor de la K_D a valors de força iònica inferiors a 0.02, límit ja indicat en la major part de les obres especialitzades sobre cromatografia de filtració per gel, car llavors predominen els efectes electrostàtics i s'indueixen potencials Donnan entre el gel i el líquid circulant que afecten la separació.

3.5. CARACTERÍSTIQUES HIDRODINÀMIQUES: VISCOSITAT

La viscositat s'ha determinat amb un viscosímetre Cannon-Fenske (modificació del d'Ostwald) per a líquids transparents (Afora 5354/1 sèrie 25) adient per a viscositats compreses entre 0.4 i 1.6 cSt, i amb una constant K de l'aparell igual a 0.002143, a 25°C.

El temps de caiguda de l'aigua a través del capilar a 25°C ha estat de 400 s, amb la qual cosa no ha calgut realitzar cap correcció per energia cinètica. El volum idoni a emprar en les determinacions i calculat segons la metodologia clàssica ha estat de 4.9 mL. El temps de caiguda del solvent i de la solució s'han determinat en un cronòmetre que avalua 0.2 s.

El viscosímetre s'ha immergit en un bany termostatitzat ple amb aigua destil·lada, mantenint-se la temperatura a $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

El temps de caiguda fou calculat segons el valor mig de quatre determinacions independents i que no havien de diferenciar-se entre si en més de 1 s. Després de cada determinació el viscosímetre es rentava amb aigua destil·lada i acetona, assecant-lo amb aire.

Amb una solució de 3.69 mg/mL de glicoproteïna en solució amortidora PBS, filtrada per Durapore (Millipore) de tamany de porus de 0.45 μm , s'ha determinat la viscositat de la solució (η), i la relació d'aquesta amb la del solvent (η_0) forneix la viscositat relativa (η_r). La viscositat específica (η_{sp}) és igual a

$$(\eta - \eta_0)/\eta_0 = \eta_r - 1$$

El volum hidrodinàmic efectiu és definit per la viscositat intrínseca, $[\eta]$, o número límit de viscositat. En condicions ideals d'*infinita dilució*, la viscositat intrínseca expressa la fracció d'increment de viscositat (η_{sp}) per unitat de concentració del solut (c).

Però, les mesures realitzades a concentracions finites estan incrementades per les interaccions degudes al solut:

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + K'[\eta]^2 \cdot c$$

on K' és l'anomenada *constant d'Huggins*.

Generalment, la viscositat intrínseca és determinada per mesures de les relacions η_{sp}/c en un marge de concentracions baixes i extrapolant a concentració zero.

Un mètode alternatiu, que ha estat l'emprat, és l'anomenat del *punt únic* (BRADBURY 1970) que obté la viscositat intrínseca a partir de l'equació:

$$[\eta] = |2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)^{1/2}/c|$$

Aquest mètode te l'avantatge, ultra l'ús d'un sol valor de viscositat reduïda, de permetre el càlcul de la viscositat intrínseca de macromolècules carregades en solucions aquoses, la qual cosa no és possible per l'extrapolació convencional, car els canvis associats en la concentració dels contraions de la proteïna alteren la força iònica efectiva, amb un canvi concomitant en les dimensions moleculars.

En la taula 33 es mostren els resultats obtinguts.

Viscositat de la solució	(η)	=	$1.082 \cdot 10^{-3}$	Pa·s
Viscositat del solvent	(η_0)	=	$1.019 \cdot 10^{-3}$	Pa·s
Viscositat relativa	(η_r)	=	1.062	
Viscositat específica	(η_{sp})	=	0.062	
Viscositat reduïda	(η_{red})	=	16.467	mL/g
Viscositat intrínseca	($[\eta]$)	=	16.467	mL/g
Constant d'Huggins	(K')	=	0.335	

TAULA 33.- Valors dels diferents paràmetres de la viscositat i de la constant d'Huggins d'una solució de glicoproteïna a $c = 3.69$ mg/mL i $T = 25^\circ\text{C}$.

No s'ha determinat el valor del pes molecular viscos (M_v) car els paràmetres α i K de l'equació de Mark-Houwink ($M_v = K \cdot M^\alpha$) no estan definits per a glicoproteïnes amb un contingut glucídic tan elevat com el de la glicoproteïna a estudi.

Els valors de $[\eta]$ i K' obtinguts, indiquen que la molècula es troba, en part, en conformació de cabdell monoestadístic.

Els valors de $[\eta]$ per a proteïnes globulars en forma nativa oscil·len entre 3.3 i 4.0 mL/g, mentre que per a conformacions més expandides, com és ara la de cabdell monoestadístic, són molt més elevats, i així es té un valor de 51.6 mL/g per a l'albumina sèrica bovina desnaturalitzada amb clorhidrat de guanidina 6 M i mercaptoetanol, o de 16.1 mL/g per a la ribonucleasa en el mateix solvent (AHMAD I SALAHUDDIN, 1974). La glicoforina presenta valors de 18 mL/g si el solvent és aigua o de 29 si ho és una solució 0.5 M de NaCl (WELSH i THOM, 1985).

Pel que fa a la constant d'Huggins, que està relacionada amb la interacció de les molècules del solut, no hi ha cap tractament teòric adient encara que està establert que en el cas d'esferes rígides no solvatades, el valor de K' és aproximadament de 2.0, i en el cas de cabdells monoestadístics lineals en els solvents escaients, la constant oscil·la al voltant de 0.35. Per la seva part, les varetes rígides presenten un valor de 0.4 que pot arribar fins a 10 si aquestes es troben associades.

En conseqüència, el valor obtingut (0.335) podria indicar la pertinença de la molècula en solució a una estructura en cabdell monoestadístic.

3.6. PUNT ISOELECTRIC

El punt isoelectric de la molècula s'ha determinat de forma potenciomètrica segons el càlcul de les variacions de pH que experimenta una solució aquosa de la glicoproteïna quan s'hi adiciona ions H^+ o OH^- .

TANFORD (1955), a partir de les relacions entre el grau d'associació i la constant de dissociació, i entre aquesta darrera i l'entalpia lliure de dissociació (ΔG^0) obtingué l'equació següent:

$$pH - \log(\alpha/1 - \alpha) = pK_{int}' - 0.868WZ$$

on α és el grau de dissociació, Z la càrrega total, pK_{int}' el logaritme negatiu de la constant intrínseca de dissociació del grup proteic valorat, i W un valor que depèn de la temperatura, força iònica i forma de la molècula.

Atés que el punt isoelèctric es dóna a un valor de pH en el qual la molècula no te càrrega elèctrica, la qual cosa correspon a un valor nul de Z, la determinació d'aquest paràmetre Z és el que indicarà el valor del pH del punt isoelèctric.

Aquests valors de Z s'han obtingut amb l'ajut d'un programa d'ordenador en llenguatge BASIC que proporciona a partir del volum d'àcid o base adicionat, volum i concentració inicial de la mostra, i valors del pH de la solució i del blanc, el valor de la càrrega Z, a més d'altres paràmetres potenciomètrics no emprats en aquest cas.

La determinació s'ha realitzat a temperatura ambient ($\sim 22^\circ\text{C}$) amb un conjunt Radiometer (Dinamarca) que consta d'una bureta automàtica (Autoburette ABU 12), un pH-metre (pH M62 Standard) provist d'una unitat TTT 60 i un mòdul de registre REA 160.

Com a substàncies titoladores s'han emprat HCl 0.01 N i NaOH 0.01 N de normalitat confrontada.

La glicoproteïna, a concentració de 0.27 mg/mL, s'ha valorat dissolta en aigua bidestil·lada de força iònica $I = 0.15$ assolida amb NaCl.

Les corbes de valoració es dividiren en dues zones, una àcida amb un interval de pHs de 6.88 fins a 2.70, i un altre alcalina, amb un interval de 6.88 fins a 9.60. Per a cadascuna d'aquestes zones es realitzà un assaig paral·lel amb la solució de NaCl de $I = 0.15$, amb la finalitat d'obtenir, per diferència de la concentració de H^+ (o OH^-) entre la solució blanc i la que conté la glicoproteïna, els H^+ fixats o alliberats per la molècula per a cada valor de pH.

En la figura 62 es mostra la corba obtinguda per adició de sosa 0.01 N a una solució de glicoproteïna previament acidificada amb HCl 0.01 N fins a un pH de 2.95. El procés invers, valoració amb HCl 0.01 N d'una solució alcalinitzada fins a un pH de 9.80 dóna una corba superposable, la qual cosa indica que en aquest interval de pHs, la glicoproteïna presenta la condició de *reversibilitat*, o sigui que la reacció és independent del temps i de la direcció en que es porti a terme la valoració.

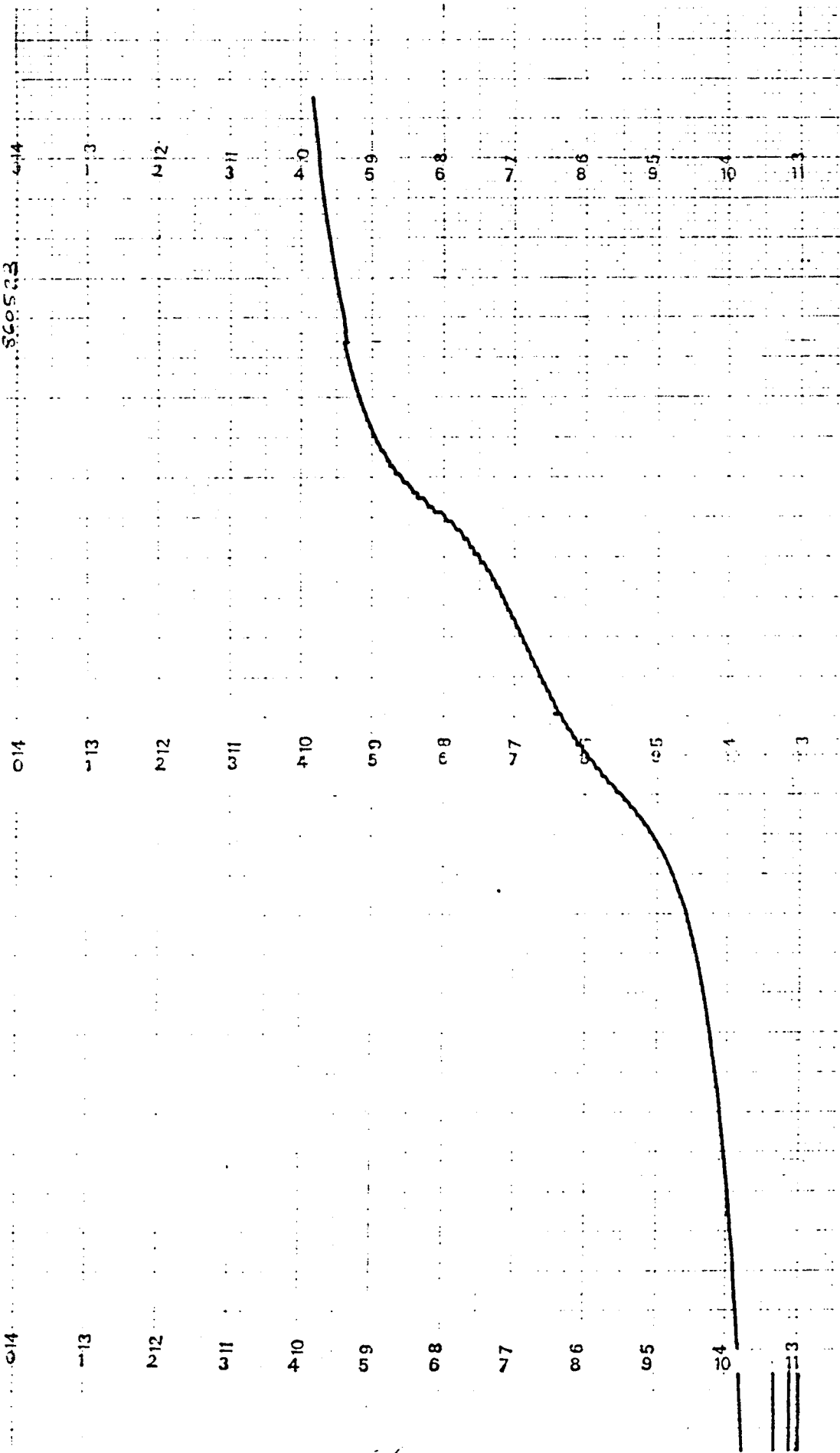


FIGURA 62.- Corba potenciomètrica obtinguda per adició de sosa a una solució de glicoproteïna de pH 2.95. L'interval de pHs de la figura és de 3.76 fins a 9.81.

En la figura 63 es mostra la corba obtinguda a l'enfrontar la càrrega neta (Z) al pH. Al no haver-hi una linealitat en la zona de pH corresponent a càrrega 0, s'ha valorat una nova alíquota de la solució de glicoproteïna, entre els pHs 6.50 i 7.10, emprant en aquest cas reactius més diluïts (0.001 N) -gràfica en la part dreta superior de la figura-. A pH 6.90 s'obté un valor de Z igual a + 0.10 ($Z = + 1.21$ a pH 6.89 i $Z = - 0.16$ a pH 6.91), per la qual cosa el punt isoelèctric ha de correspondre a un valor de pH de 6.90 ± 0.01 .

3.7. PUNT ISOIÒNIC

Per a una proteïna determinada el pH corresponent al punt isoelèctric varia segons la composició iònica del medi, atès que les proteïnes poden unir-se a certs cations o anions. Quan una dissolució de proteïna es dialitza a fons enfront d'aigua destil·lada per tal d'eliminar tots els ions petits diferents dels H^+ i OH^- , el pH de la dissolució resultant és propi del *punt isoiónic*, paràmetre constant per una proteïna determinada, i que implica l'existència de la mateixa concentració en totes les espècies iòniques.

La valoració potenciomètrica també pot donar el valor del pH isoiónic si es fa la determinació a diverses forces iòniques puix el punt d'intersecció de les corbes correspon a un valor de pH que defineix el punt isoiónic. Així, s'han emprat solucions de glicoproteïna a la mateixa concentració però emprant com a solvents solucions de forces iòniques iguals a 0.01, 0.03 i 0.15, assolides amb NaCl.

Amb els valors de Z que s'obtenen s'observa que la intersecció de les corbes s'obté a un valor de $Z = -7.20$, que correspon a un pH de 6.95, valor que ha de correspondre al punt isoiónic.

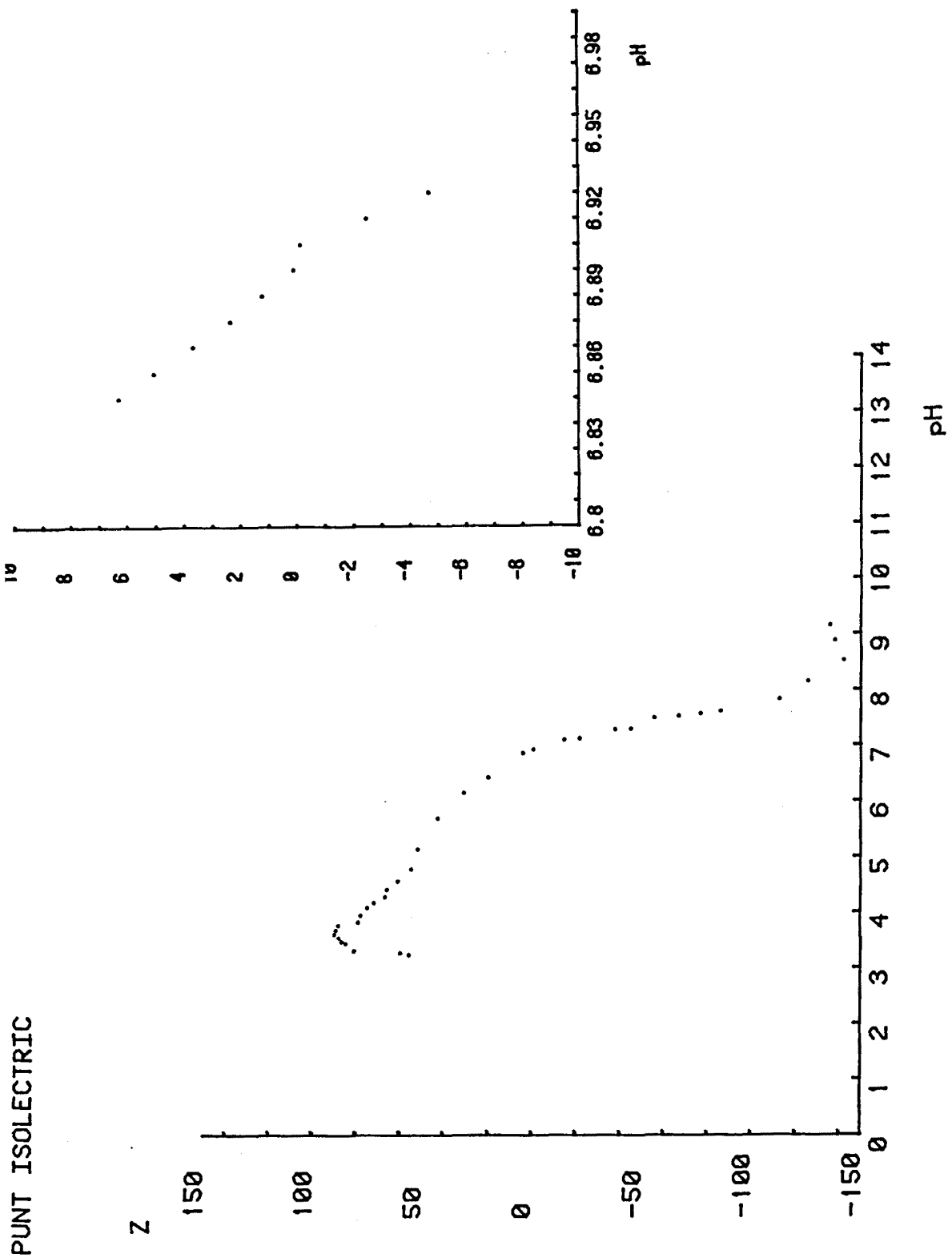


FIGURA 63.- Corba potenciométrica en funció de la càrrega neta, Z, vs el pH.

3.8. VOLUM ESPECÍFIC PARCIAL

El volum que ocupa una solució proteica (V), reduint les components del sistema (proteïna, aigua, sals, ...) a un sistema binari (solvent i solut), pot expressar-se, a pressió i temperatura constants, per:

$$V = N_1 \bar{V}_1 + N_2 \bar{V}_2$$

on \bar{V}_1 i \bar{V}_2 són els volums parcials molars del solvent i del solut, i N_1 i N_2 , els mols respectius.

El volum de la solució serà, doncs, funció dels mols del solut:

$$V = f(N_2)$$

Aquesta funció generalment no és lineal, car els volums molars del solvent i del solut no són igual als valors de les fases pures d'aquestes substàncies.

Per tal de simplificar es considera el volum molar del solvent en solució com a coincident amb el del solvent en fase pura, quedant ara l'equació:

$$V = N_1 V_1^0 + N_2 \phi$$

on V_1^0 és el volum del solvent en la fase pura, i ϕ és el volum aparent molar del solut, essent:

$$\phi = (V - N_1 V_1^0) / N_2$$

La relació entre el volum parcial (\bar{V}_2) i l'aparent (ϕ) del solut és:

$$\bar{V}_2 = N_2 \left(\frac{\partial \phi}{\partial N_2} \right)_{P, T, N_1} + \phi$$

A valors de solucions molt diluïdes, el volum aparent és aproximadament igual al volum parcial.

El volum específic parcial de la glicoproteïna s'ha determinat per dues vies:

- a) experimentalment, calculant la densitat per picnometria
- b) teòricament, segons el contingut en aminoàcids i sucres.

a) picnometria

S'ha fet servir un picnòmetre de 25 mL (Afora 5325) provist d'un termòmetre.

La solució de glicoproteïna de partida ($c = 1.06$ mg/mL) s'havia dialitzat durant 36 hores enfront de la solució amortidora, PBS, emprada com a solvent.

Les solucions determinades estaven a $24 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

Després de determinar la densitat de la solució glicoproteïna i del solvent tot sol, es determina el volum específic aparent (ϕ) per la fórmula:

$$\phi = \frac{1}{\rho_s} \left(1 - \frac{\rho - \rho_s}{c} \right)$$

on ρ i ρ_s són les densitats de la solució i del solvent, i c la concentració de la glicoproteïna. Si aquests valors s'expressen en g/mL, el volum específic aparent s'expressarà en mL/g.

Ultra el valor obtingut amb la solució anterior, es determina la densitat de tres solucions obtingudes per dilució a la meitat de la solució anterior. Amb els valors obtinguts es fa una extrapolació a concentració 0, que proporciona el valor del volum específic parcial, que per a la glicoproteïna ha estat de 0.656 (valor mig de 3 determinacions).

b) determinació teòrica

COHN i EDSALL (1943) determinaren els volums específics aparents dels aminoàcids, a partir dels càlculs dels grups químics que els formen i, aplicant el principi de l'aditivitat, feren la determinació del volum específic aparent de les proteïnes (ϕ_2) emprant l'equació:

$$\phi_2 = \sum \phi_i \omega_i / \sum \omega_i$$

on ϕ_i és el volum específic aparent del residu d'aminoàcid i i ω_i el percentatge, en pes, de cadascun dels aminoàcids.

Malgrat la seva simplicitat, aquest mètode forneix uns resultats força acurats.

En aquest cas el volum específic de la glicoproteïna (Φ_1) serà la suma del de la part proteica (Φ_2) i del de la glucídica (Φ_3).

$$\Phi_1 = \Phi_2 + \Phi_3$$

En la taula 34 s'indiquen els valors dels volums específics aparents i molars dels residus d'aminoàcids calculats a 25 C per ZAMYATNIN (1984), així com les fraccions molars de la part proteica de la glicoproteïna antigènica.

Pel que fa als glúcids s'han emprat els valors indicats per BEZKOROVAINY i DOHERTY (1962): 0.62 per als sucres neutres i hexosamines i 0.59 per a l'àcid siàlic.

Segons els càlculs realitzats, la part peptídica té un volum específic parcial de 0.715 i els dels sucres és de 0.619.

Tingent en compte que la molècula està formada per un 58.95% de glúcids i un 41.05% de proteïna, el volum específic parcial de la molècula és de 0.659.

Residu d'aminoàcid	f	Φ (cm ³ /mol)	ϕ (cm ³ /g)
Cisteïna	0,00000	65,0	0,630
Metionina	0,01157	96,9	0,739
Triptòfan	0,01204	135,5	0,728
Aspàrtic	0,01297	67,5	0,595
Tirosina	0,01606	114,7	0,703
Fenilalanina	0,01763	112,8	0,766
Isoleucina	0,04030	99,1	0,876
Histidina	0,04806	90,4	0,659
Arginina	0,05495	118,9	0,756
Valina	0,05890	82,4	0,831
Prolina	0,05924	72,6	0,748
Leucina	0,05949	99,1	0,876
Alanina	0,06646	52,0	0,732
Lisina	0,07911	100,1	0,775
Treonina	0,09571	68,4	0,676
Glutàmic	0,10283	81,5	0,636
Glicocola	0,10696	34,8	0,610
Serina	0,12817	51,9	0,596

TAULA 34.- Valors de la fracció molar (f), del volum específic aparent molar (Φ) i per gram (ϕ) dels residus aminoacídics a

3.9. INCREMENT DE L'ÍNDEX DE REFRACCIÓ

L'increment de l'índex de refracció produït per la glicoproteïna envers el solvent és un paràmetre necessari per al càlcul de la relació de Rayleigh en la determinació de la massa molecular per espargiment de la llum!

En aquest cas s'ha determinat l'increment de l'índex de refracció de la glicoproteïna dissolta en solució amortidora PBS. La determinació s'ha realitzat en un interferòmetre Carl Zeiss 25288, però, previament ha calgut realitzar una taula interferomètrica que relacioni les unitats que proporcioni l'interferòmetre amb els increments d'índex de refracció. Aquesta taula ha d'ésser vàlida per a qualsevol determinació realitzada amb cubetes de diferent longitud de pas de llum.

La taula s'ha construït a partir d'una sèrie de 12 solucions de clorur sòdic en aigua bidestil·lada que comprenen concentracions des de 6.7416 g/100 mL fins a 0.0944 g/100 mL, determinant-se l'índex de refracció en un refractòmetre Pulfrich -que proporciona uns valors amb 5 xifres decimals- i a continuació observant llur equivalència en les unitats arbitràries que proporcionava l'interferòmetre. Ambdues determinacions s'han realitzat a $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

L'increment de l'índex de refracció (Δn) s'han obtingut segons la fórmula:

$$\Delta n = h \times \lambda / l$$

on h és el paràmetre que relaciona les unitats arbitràries que forneix l'interferòmetre amb els increments dels índexs de refracció, λ és la longitud d'ona emprada (546.1 nm en aquest cas) i l la longitud de pas de llum de la cubeta.

La comprovació de la validesa de la taula s'ha fet amb una sèrie de solucions d'albumina sèrica bovina en solució amortidora PBS.

L'increment de l'índex de refracció obtingut amb l'albumina ha estat de 0.1850 mL/g, valor que coincideix amb l'indicat en la bibliografia (HUGLIN 1972) la qual cosa assegura la fiabilitat dels resultats que s'obtinguin.

L'increment de l'índex de refracció de la glicoproteïna en solució amortidora PBS s'ha determinat amb 6 dilucions que comprenen des d'una concentració de 5.46 mg/mL fins a 0.23 mg/mL.

La figura 64 mostra els valors obtinguts en la gràfica Δn vs concentració (mg/mL). L'extrapolació a concentració 0 forneix un valor de $18.79 \cdot 10^{-5}$ mL/mg (= 0.1879 mL/g).

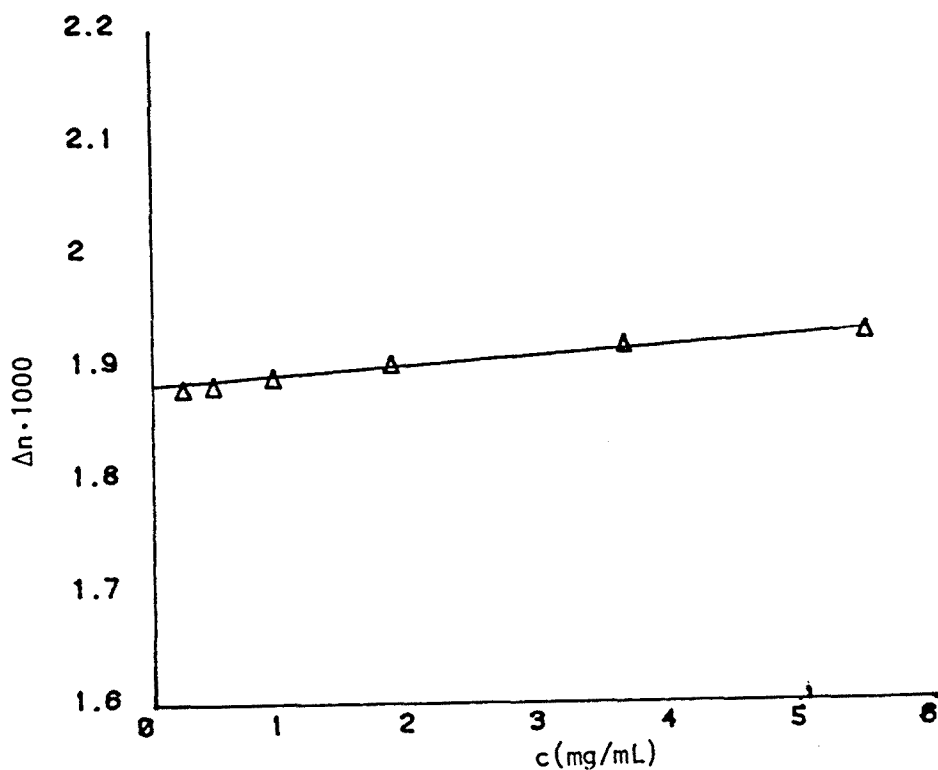


FIGURA 64.- Gràfica de l'increment de l'índex de refracció vs concentració de la glicoproteïna a diferents concentracions.

3.10. SOLUBILITAT

La solubilitat de la glicoproteïna en diverses substàncies solvents es mostra a la taula 35.

L'alt contingut en glúcids de la molècula li proporciona unes propietats que la distingeixen d'algunes de les característiques clàssiques de les proteïnes, com és ara el fet que no precipiti per l'acció de l'àcid tricloracètic o per les solucions saturades de sulfat amònic.

El precipitat més quantiós es produeix amb l'àcid fosfotúngstic. L'etanol, per a produir una turbidesa que comporti una posterior precipitació, ha d'estar a una concentració final superior al 60% (v/v), essent la del 66% la més òptima per a produir el precipitat. Amb tot, cal, per una part, la presència de sals en la solució, clorur sòdic o acetat potàssic, i, per altre, que la mescla romangui un temps, no inferior a 24 h, a temperatura per desota dels -20°C .

Ebullició amb aigua bidestil·lada	N.P.
urea 8 M	N.P.
àcid perclòric al 10%	N.P.
àcid perclòric al 30%	N.P.
àcid tricloracètic al 10%	N.P.
àcid tricloracètic al 40%	N.P.
acetat de zinc, 20 mM, pH 5,8	N.P.
acetat de zinc, 20 mM, pH 5,8 + etanol al 25%	N.P.
acetat bàric, 20 mM, pH 5,8	N.P.
acetat bàric, 20 mM, pH 5,8 + etanol al 25%	N.P.
etanol al 50%	N.P.
etanol al 60%	N.P.
etanol al 75%	T
etanol absolut	T
sulfat amònic al 40%	N.P.
sulfat amònic a saturació	N.P.
àcid fosfotúngstic al 5% en HCl 2 N	P
àcid sulfosalicílic	N.P.
alum, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	N.P.

TAULA 35.- Probes de solubilitat realitzades amb la glicoproteïna antigènica. En tots els casos per cada volum de la substància química a assaig s'adicionaren 2 de la solució glicoproteïnica a $c = 1 \text{ mg/mL}$.

N.P. = Sense precipitació; P = precipitació; T = turbidesa.

4. CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS

4.1. RADI DE GIR

Segons els valors obtinguts en l'apartat 2.1.1. a l'enfrontar $K \cdot c / R_{\theta}$ a $50 \cdot c + \sin(\theta/2)$ el pendent dels valors extrapolats a concentració 0 té un valor de $1.4079 \cdot 10^{-5}$ mol/g, i aquest pendent és igual a:

$$\frac{16\pi^2}{\lambda^2} \cdot \frac{\langle s^2 \rangle}{M_w}$$

i, per tant, emprant com a valor de M_w , l'obtingut per espargiment de la llum, 53500 g/mol, i 546 nm el valor de λ , el radi de gir serà:

$$\langle s^2 \rangle = 1.4070 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{3\lambda^2}{16\pi^2} \cdot M_w = 1422 \text{ nm}^2 = 37.70 \text{ nm}$$

4.2. CONFORMACIÓ DE LA MOLÈCULA

Amb els valors obtinguts a l'apartat 3.3. DISPERSIÓ ROTATÒRIA ÒPTICA s'han calculat una sèrie de paràmetres relacionats amb la conformació de la molècula i que proporcionen uns valors aproximats del contingut en α -hèlix, β -fulla i cabdell monoestadístic (*random coil*).

L'evaluació de l'estructura a partir d'aquestes dades es pot desglossar en dos grups, segons el marge de longituds d'ona emprat en la determinació:

- a) visible i ultravioleta pròxim (de 600 a 240 nm)
- b) ultravioleta (de 250 a 220 nm)

a) Dades obtingudes en l'espectre visible i ultravioleta pròxim

a.1) Equació de Drude

L'equació de Drude d'un sol terme té la següent expressió:

$$[\eta]_{\lambda} = K(\lambda^2 - \lambda_c^2)$$

on K i λ_c són constants que es determinen gràficament mitjançant la linealització de YANG i DOTY (1957):

$$[\text{m}']_{\lambda} \cdot \lambda^2 = [\text{m}']_{\lambda} \cdot \lambda_c^2 + K$$

i enfrontant $[\text{m}']_{\lambda} \cdot \lambda^2$ a $[\text{m}']_{\lambda}$ s'obté λ_c^2 pel pendent de la recta i K és la interceptació en ordenades.

A partir d'una mostra a concentració de 2.05 mg/mL de glicoproteïna, i determinant la dispersió rotatòria òptica de 600 a 350 nm, s'obté la figura 65, els valors de la qual impliquen una constant de dispersió, λ_c , igual a 277.70.

Aquesta constant, si be representa les transicions de les estructures α -hèlix, β -fulla i cabdell monoestadístic, no proporciona gaire informació atés que la seva disminució tan pot atribuir-se a una disminució de la fracció α -hèlix (YANG i DOTY, 1957), com el seu augment a la desnaturalització de l'estructura proteica (JIRGENSONS, 1961). A més, quan el percentatge de conformació en β -fulla és apreciable, la constant no és vàlida.

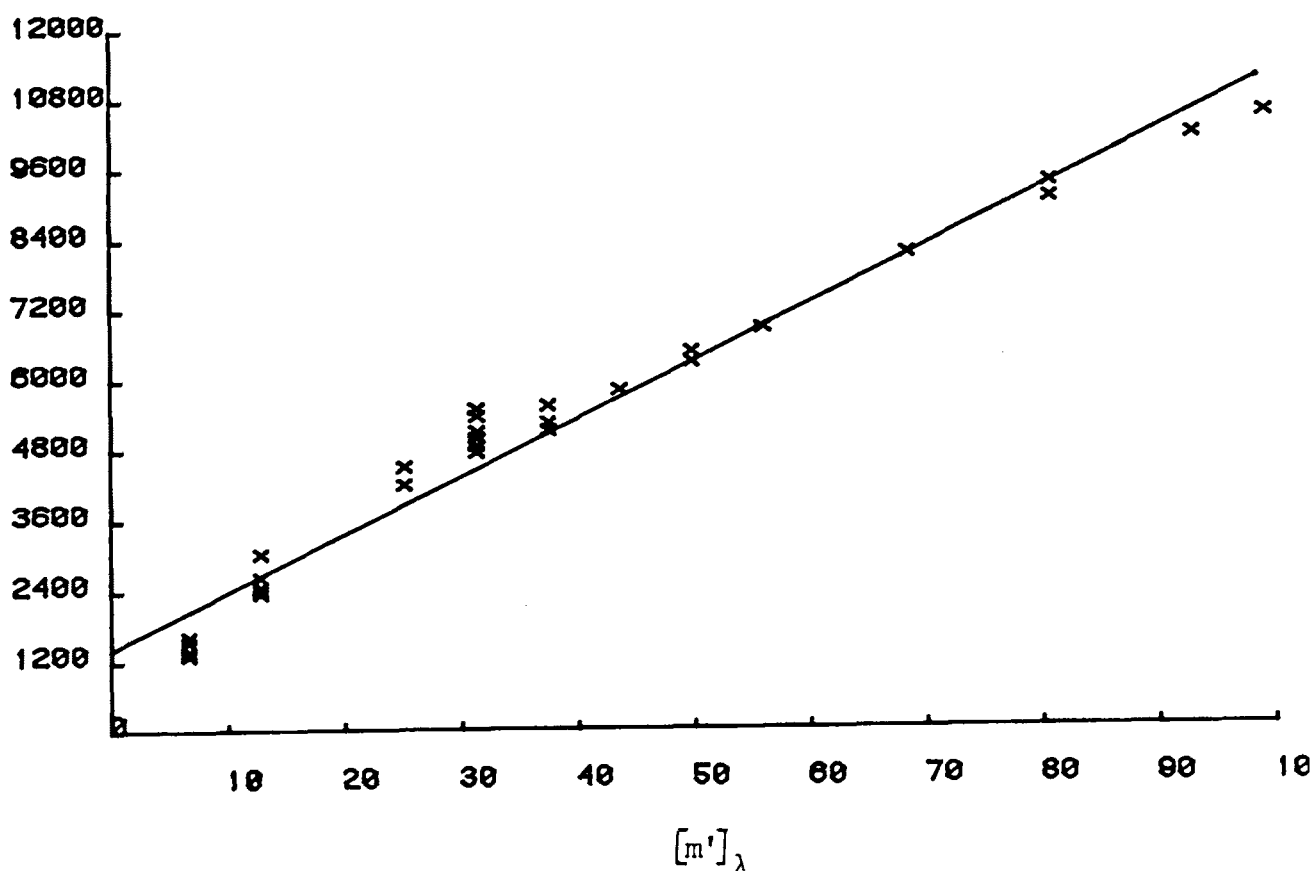


FIGURA 65.- Gràfica obtinguda per a la determinació de la constant de Drude, λ_c .

a.2) *Equació de Moffitt*

L'equació de MOFFITT i YANG (1956) proporciona les constants a_0 i b_0 a partir de la relació

$$[\text{m}']_{\lambda} \cdot \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda_0^2} = a_0 + b_0 \frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$$

Amb els mateixos valors que els emprats per l'equació de Drude s'han obtingut els valors a_0 i b_0 , però previament ha calgut determinar el valor de λ_0 que doni una linealitat més gran. Els valors provats i la correlació obtinguda han estat els següents:

$\lambda_0 = 212$	$r = 0.9040$
$\lambda_0 = 214$	$r = 0.8992$
$\lambda_0 = 216$	$r = 0.8902$

Així, el valor emprat de λ_0 ha estat de 212 nm. Amb aquest valor s'han obtingut les constants

$$\begin{aligned} a_0 &= 7.4737 \\ b_0 &= -186.279 \end{aligned}$$

Aquest valor de b_0 implica un 30% d'estructura en α -hèlix, ja que un 100% d'aquesta estructura correspon a un valor de -630 per a l'esmentada constant.

a.3) *Equació de Moffitt modificada*

L'anterior equació de Moffitt només proporciona informació, per mitjà del paràmetre b_0 , del contingut en α -hèlix.

Per avaluar l'estructura en les altres conformacions es té l'equació de Moffitt modificada que proporciona la fracció en α -hèlix i en β -fulla a partir de les següents equacions (IMAHORI 1960):

$$x^{\beta} = \frac{a_0 - a_0^R + (b_0 - b_0^R) \cdot a_0^H / b_0^H}{a_0^{\beta} - b_0^{\beta} \cdot a_0^{\beta} \cdot a_0^H / b_0^H}$$

$$x^H = \frac{b_0 - b_0^R + (a_0 - a_0^R) \cdot b_0^{\beta} / a_0^{\beta}}{b_0^H - a_0^H \cdot b_0^{\beta} / a_0^{\beta}}$$

on a_0 i b_0 són els valors ja determinats prèviament, a_0^H i b_0^H són les contribucions dels aminoàcids a l'estructura α -hèlix; a_0^{β} i b_0^{β} , les contribucions a l'estructura β -fulla i a_0^R i b_0^R , les contribucions a l'estructura dels residus dels aminoàcids. Els valors d'aquestes contribucions en funció de la λ emprada s'indiquen a la taula 36.

a_0^H	=	680	(de 600 a 400 nm)
a_0^H	=	560	(de 310 a 240 nm)
a_0^{β}	=	840	(de 600 a 240 nm)
a_0^R	=	-620	(de 600 a 400 nm)
a_0^R	=	-710	(de 310 a 240 nm)
b_0^H	=	-630	(de 600 a 400 nm)
b_0^H	=	-430	(de 310 a 240 nm)
b_0^{β}	=	420	(de 600 a 400 nm)
b_0^{β}	=	0	(400 nm)
b_0^R	=	0	(de 600 a 400 nm)
b_0^R	=	70	(de 310 a 240 nm)

TAULA 36.- Valors dels paràmetres i de les contribucions a emprar en les equacions de Moffitt modificades.

Per a calcular aquestes fraccions, s'ha partit d'una alíquota de glicoproteïna a concentració de 1.34 mg/mL fent ús dels valors de D.R.O. des de 310 nm fins a 240 nm, amb un valor de $\lambda_0 = 220$ nm. Els valors de les contribucions han estat els corresponents de la taula 36, emprant un valor de 840 per a la contribució de l'estructura β -fulla (α_0^β).

Aquest valor de 840 no ha estat obtingut de forma experimental a partir d'una estructura 100% β -fulla, sinó per extrapolació, i per això, els resultats d'estructura són purament semiquantitatius, no havent-hi proves de la seva aplicació general (WADA et al., 1961).

Els resultats obtinguts han estat:

$$\begin{aligned} \chi^H &= 0.287 \\ \chi^\beta &= 0.457 \end{aligned}$$

b) Dades obtingudes en l'espectre ultravioleta (de 250 a 220 nm)

Amb les dades obtingudes a aquestes λ s'obté una informació més fidedigna sobre l'estructura de la molècula. La informació pot ésser donada per:

- a) valors puntuals de l'espectre
- b) tot el marge de longituds d'ona emprat

b.1.) Valors puntuals de l'espectre

En aquest cas es pot emprar o bé la relació dels valors de $[m']$ a $-(215/231.4)\text{nm}$, que quan és > 1 és característic d'una estructura majoritàriament en α -hèlix (HVIDT et al., 1985), o bé pot fer-se ús de les magnituds de $[m']$ en les valls i en els cims, i la localització dels mateixos (taula 37).

No s'ha pogut fer ús d'aquesta metodologia car no s'han determinat els valors de la rotació òptica per desota de 220 nm.

b.2.) Valors de tot el marge de λ emprat

El procediment generalment adoptat es fonamenta en ajustar l'espectre obtingut per combinació lineal de les proporcions complementàries de cadascuna de les tres conformacions majoritàries de forma que:

$$[\text{m}'] = f_{\alpha}[\text{m}']_{\alpha} + f_{\beta}[\text{m}']_{\beta} + f_{\text{R}}[\text{m}']_{\text{R}}$$

on f_{α} , f_{β} i f_{R} són les fraccions dels residus en les conformacions α -hèlix, β -fulla i cabdell monoestadístic, respectivament, de manera que $f_{\alpha} + f_{\beta} + f_{\text{R}} = 1$, i $[\text{m}']_{\alpha}$, $[\text{m}']_{\beta}$ i $[\text{m}']_{\text{R}}$ són les rotacions específiques del residu mig per a cada conformació.

λ (nm)	(m')		
	H	β	R
190,0	8040	- 15740	16390
195,0	57125	4882	2997
196,2	65000	10000	- 2500
197,5	70256	14480	- 7675
200,0	69122	22978	- 15801
205,0	49800	29103	- 21929
210,0	26593	21456	- 17295
215,0	18236	11157	- 10361
220,0	8526	862	- 5462
225,0	- 4912	- 5283	- 2915
230,0	- 13661	- 6254	- 2261
235,0	- 13346	- 5739	- 2432
240,0	- 9638	- 4443	- 2346
245,0	- 6365	- 3465	- 2212
250,0	- 4256	- 2688	- 2036

TAULA 37.- Valors de les rotacions específiques del residu mig des de 250 fins a 190 nm calculats per a la poli-L-lisina en condicions que presenta el 100% d'estructura α -hèlix (H), el 100% d'estructura β -fulla (β) o el 100% d'estructura de cabdell monoestadístic (R); GREENFIELD et al.(1967).

Principalment són dues les temptatives que s'han adoptat per a resoldre l'anterior combinació lineal. La primera és l'observació directa de l'espectre de dispersió rotatòria òptica d'homopolipèptids, com és ara la poli-L-lisina, en els tres estats conformacionals majoritaris (GREENFIELD et al., 1967)(taula 37); la segona (CHEN et al., 1974) és l'anàlisi per regressió dels espectres de dicromisme circular de proteïnes de les que es coneix exactament llur estructura per ratjos X (taula 38).

λ (nm)	(m')		
	H	β	R
197	64100	- 2960	- 5130
200	76400	15100	- 21600
203	69900	12200	- 20900
206	56500	7600	- 18500
209	37300	4520	- 13000
212	27800	3710	- 11800
215	22300	- 230	- 9520
218	15800	- 4380	- 6220
221	9620	- 8560	- 3630
224	2080	- 9580	- 2280
227	- 5320	- 8660	- 1320
230	- 11600	- 5020	- 1360
233	- 13800	- 1900	- 1740
236	- 13500	- 1090	- 1010
239	- 11700	- 940	- 670
242	- 9340	- 690	- 950
245	- 7300	- 330	- 1230
248	- 5650	- 350	- 1340
251	- 4390	- 470	- 1390

TAULA 38.- Valors de les rotacions específiques del residu mig $[\alpha]_D$, calculats a partir de les proteïnes de les que es coneix perfectament llur conformació (CHEN et al. 1974).

El tractament de l'espectre de la glicoproteïna antigènica s'ha fet segons les dades de CHEN et al. (1974) amb la següent fórmula:

$$[\eta] = \{[\eta]_{\alpha} \cdot A + [\eta]_{\beta} \cdot B\} \cdot C + [\eta]_{R} \cdot D$$

on A, B, C i D varien de manera que $A + B = 1$, i $C + D = 100$, i, a més, $A \cdot C = \% \text{ d' } \alpha\text{-hèlix}$, $B \cdot C = \% \text{ de } \beta\text{-fulla}$ i $D = \% \text{ de cabdell monoestadístic}$.

Amb l'ajut d'un programa creat per tal motiu i apropiat per a un ordinador Tektronix, es poden generar, per una proporció constant de cabdell monoestadístic, una sèrie de corbes tot fent variar els percentatges d' α -hèlix i β -fulla. Aquestes corbes es comparen amb l'obtinguda, i la que s'aproxima més indica els percentatges de cadascuna de les conformacions.

Les figures 66 a 72 mostren diversos conjunts d'aquestes corbes i la comparació amb la corba de la glicoproteïna. Tal com s'observa, hi ha una gran diferència entre les magnituds dels valors de dispersió rotatòria de la glicoproteïna i els emprats per a la comparació, fet ben explicable per la influència dels glúcids presents i que minven el valor negatiu de la part peptídica. JIRGENSONS (1969) ja palesà la diferència de les propietats de la dispersió rotatòria òptica quan el contingut glucídic de la molècula era superior al 3-4%.

Ampliant l'espectre de la glicoproteïna és més fàcil realitzar la comparació. Així, una corba generada amb un 50% de cabdell monoestadístic, un 30% d' α -hèlix i un 20% de β -fulla (figura 73) segueix, amb molt bona aproximació, l'espectre ampliat de la glicoproteïna.

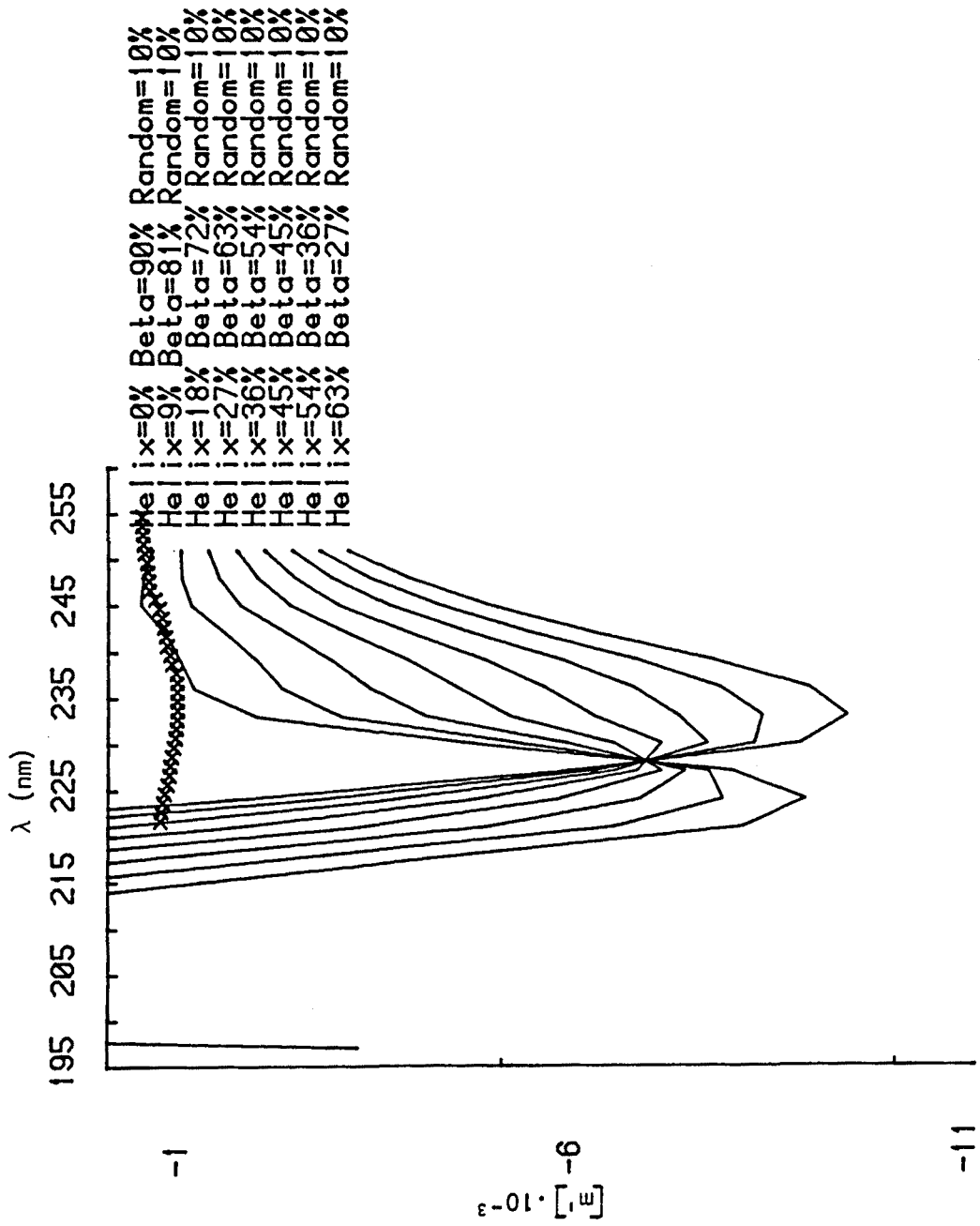


FIGURA 66.- Corbes generades a partir d'un percentatge constant de cabell monoestadístic (10%) i percentatges variables de les altres dues estructures.

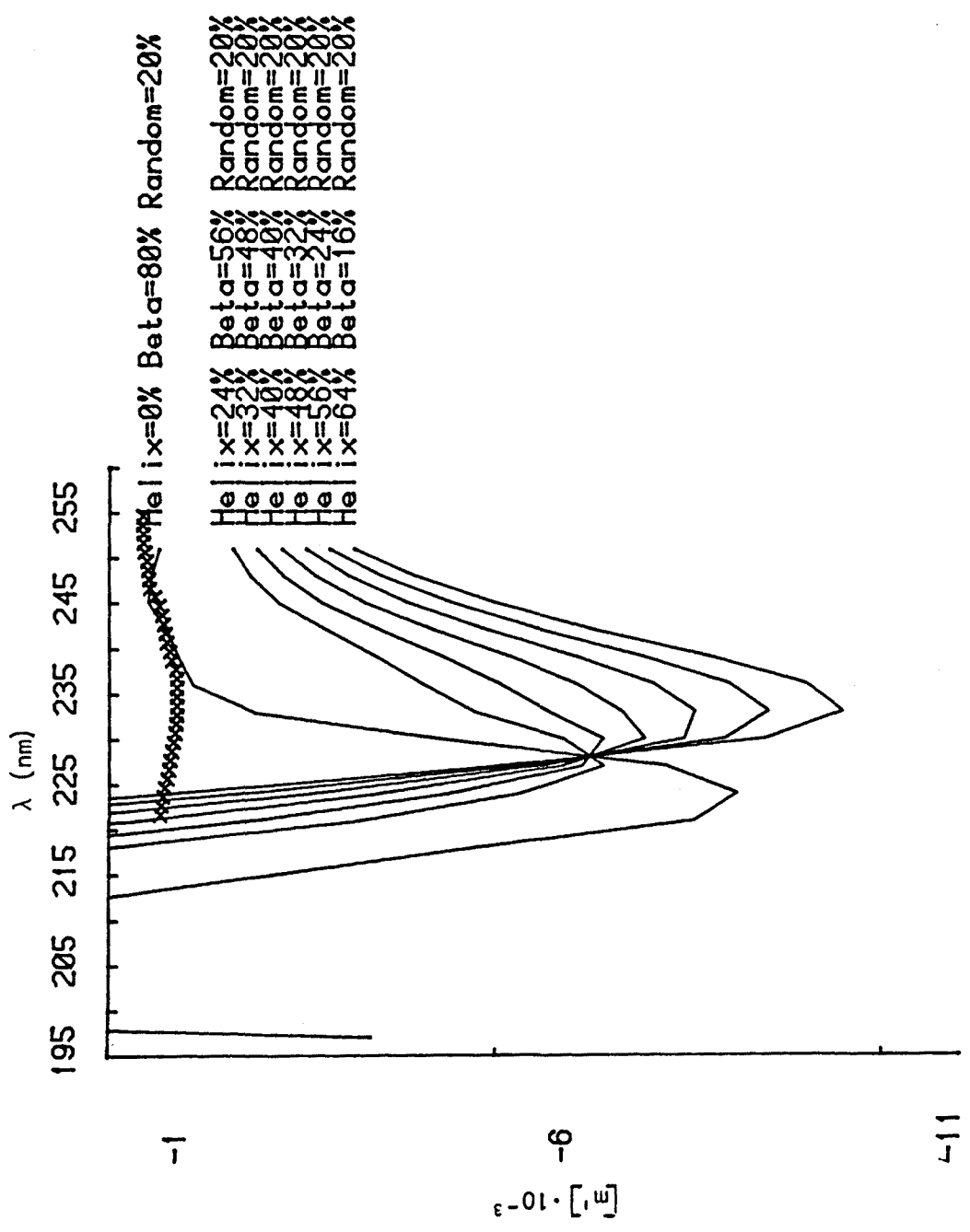


FIGURA 67.- Corbes generades a partir d'un percentatge constant de cabdell monoestadístic (20%) i percentatges variables de les altres dues estructures.

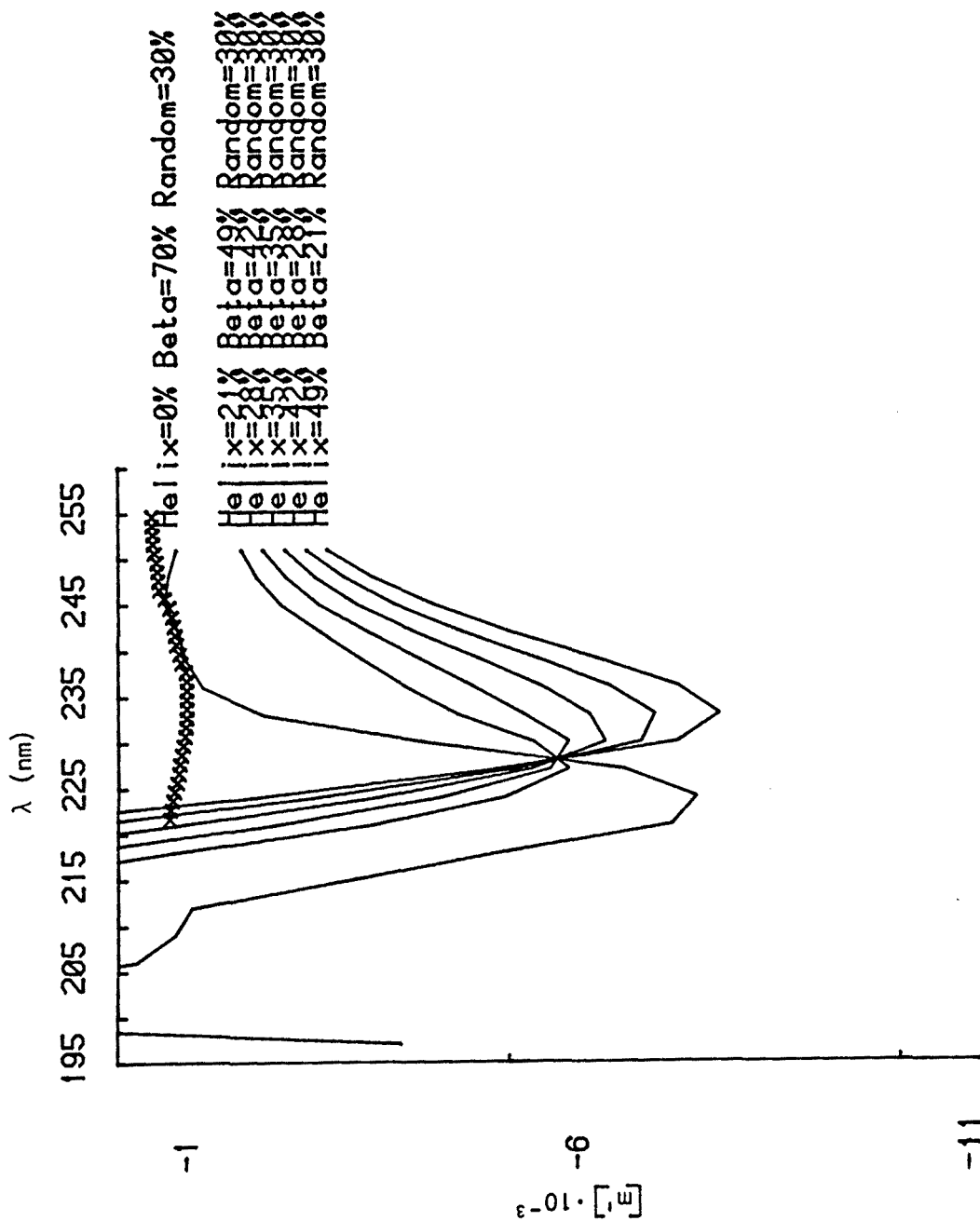


FIGURA 68.- Corbes generades a partir d'un percentatge constant de cabdell monoestadístic (30%) i percentatges variables de les altres dues estructures.

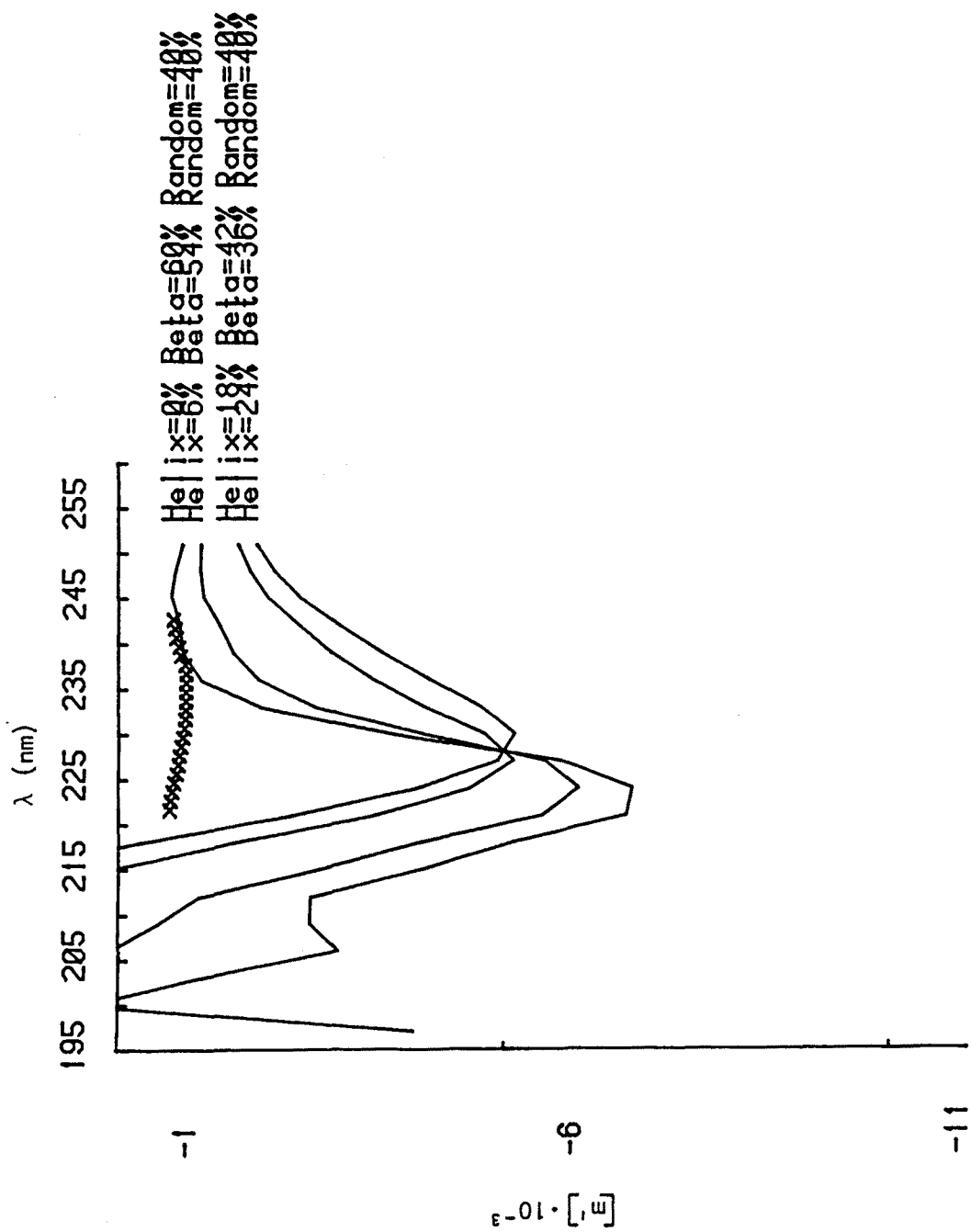


FIGURA 69.- Corbes generades mantenint un percentatge constant de cabdell monoestadístic (40%) i percentatges variables de les altres dues estructures majoritàries.

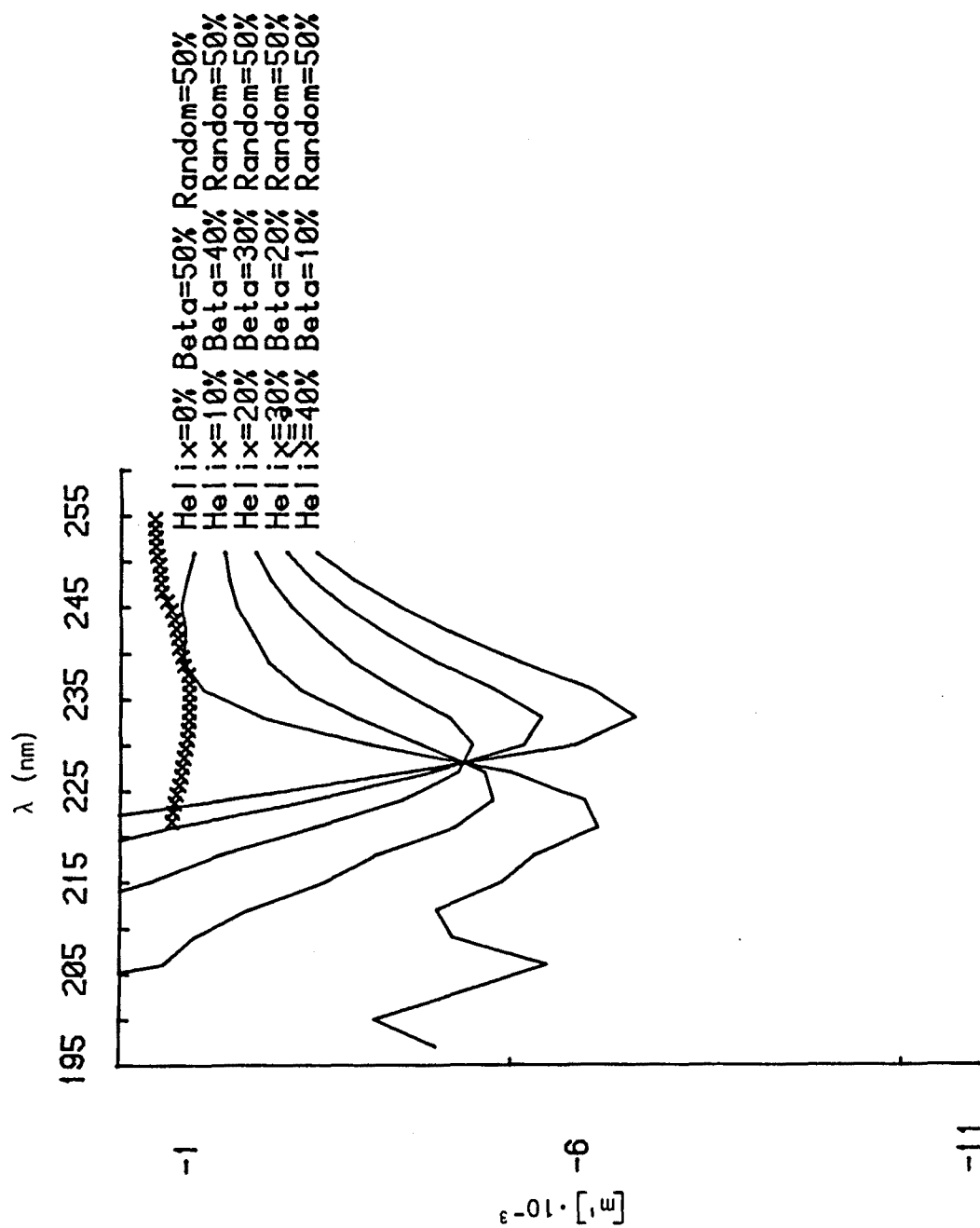


FIGURA 70.- Corbes generades mantenint un percentatge constant de cabdell monoestadístic (50%) i percentatges variables de les altres dues estructures.

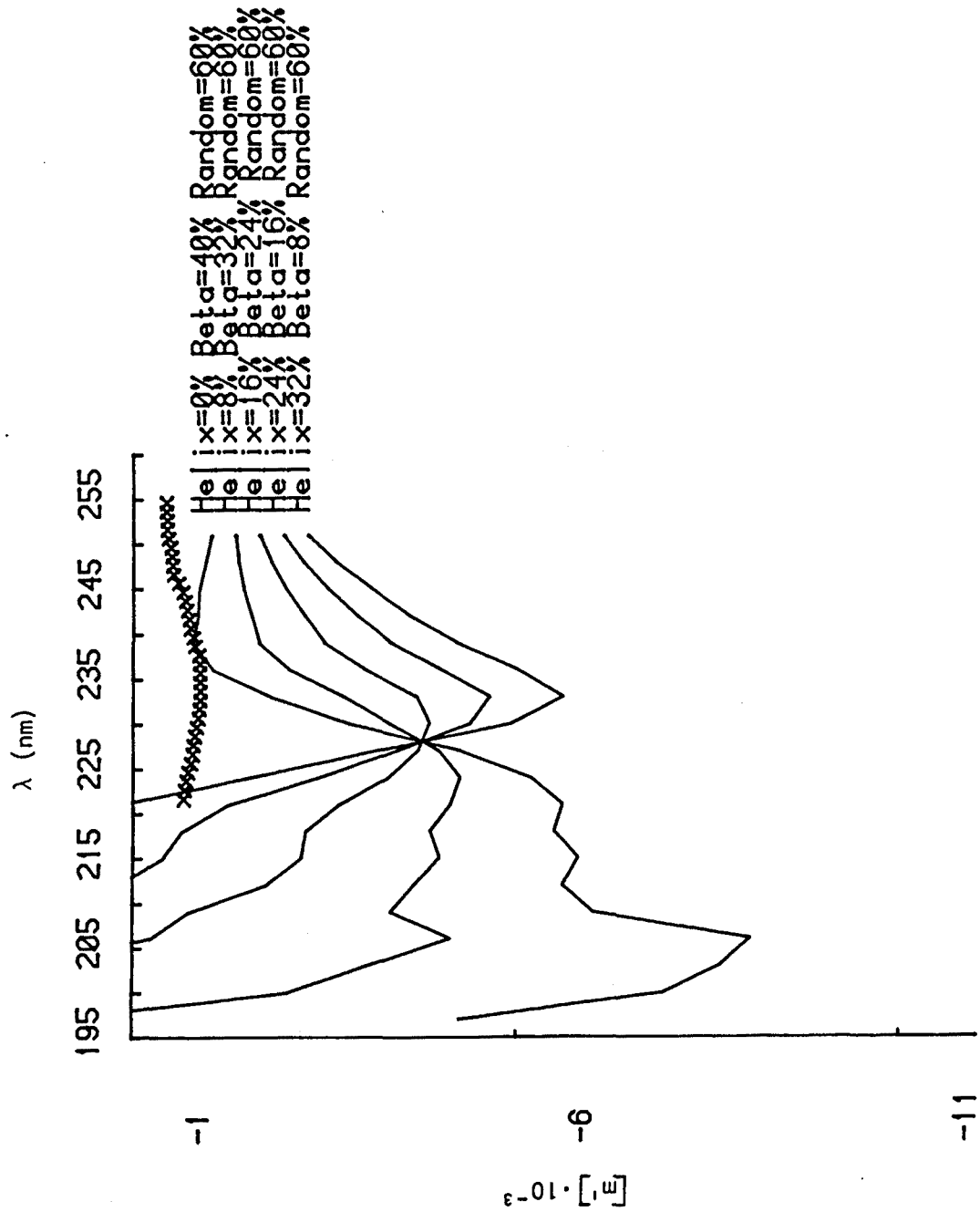


FIGURA 71.- Corbes generades mantenint un percentatge constant de cabdell monoestadístic (60%) i amb percentatges variables de les altres dues estructures.

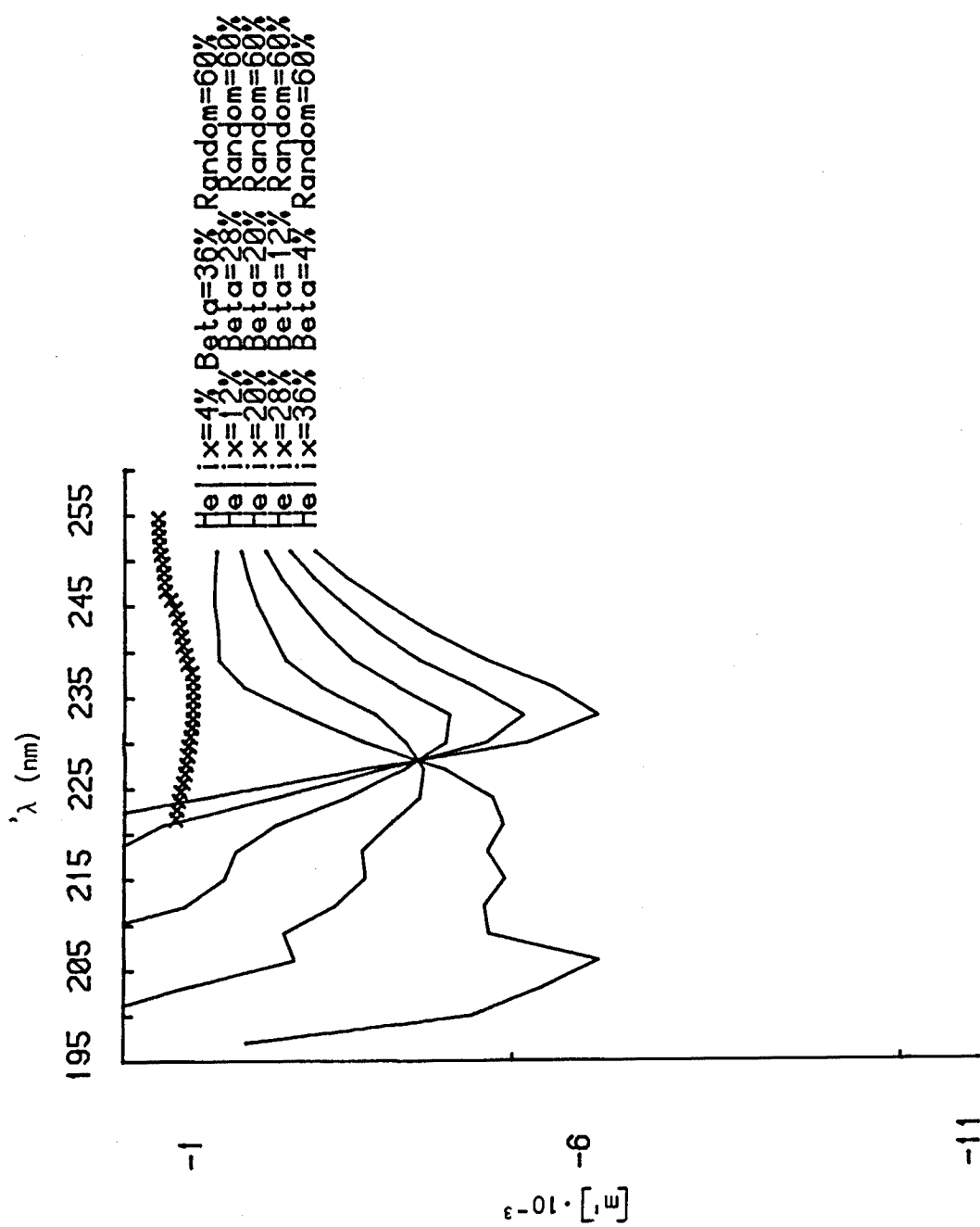


FIGURA 72.- Corbes generades mantenint un percentatge constant de cabell monoestadístic (60%) i amb percentatges variables de les altres dues estructures.

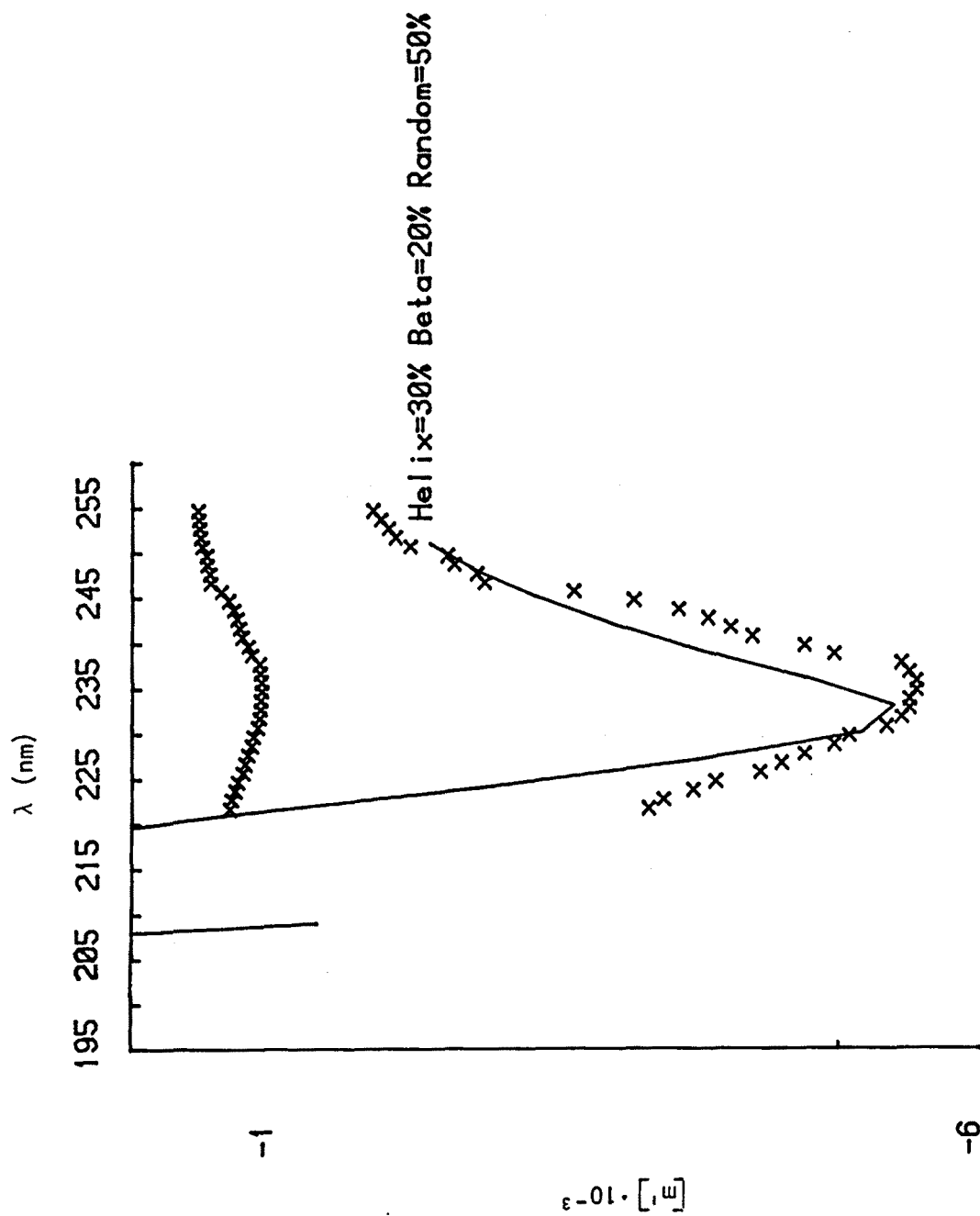


FIGURA 73.- Comparació entre una corba que presenta un 50% de cabdell monoestadístic, un 30% d' α -hèlix i un 20% de β -fulla, i la corba augmentada obtinguda amb la glicoproteïna.

4.3. POLARITAT I HIDROFOBICITAT DE LA MOLÈCULA

La composició en aminoàcids representa una font de dades fàcilment assequible. Conseqüentment, s'han realitzat nombroses temptatives per a computar les composicions mitges en aminoàcids, amb l'esperança que aquestes mitges estiguin correlacionades amb algunes propietats generals de les proteïnes.

- Polaritat

La quantificació de la polaritat de la cadena polipeptídica és una informació que proporciona la composició en aminoàcids de la proteïna. Així, segons les cadenes laterals dels aminoàcids estiguin carregades o no, alguns aminoàcids seran polars o no polars. Altres aminoàcids no tenen una càrrega definida, dependent aquesta de les condicions de pH i força iònica en les que es trobin.

CAPALDI i VANDERKOOI (1972), a partir de les característiques d'una sèrie de proteïnes (proteïnes de membrana i proteïnes solubles) de les que es coneixia llur seqüència, determinaren l'índex de polaritat (I.P.) expressat per:

$$I.P. = (\sum f_i \cdot n_i) \cdot 100$$

on f_i és la fracció molar de cada aminoàcid i n_i el valor corresponent a cada residu segons l'assignació següent:

- aminoàcids polars (Asp, Asn, Glu, Gln, Lys i Arg) $n = 1$
- aminoàcids intermitjos (Ser, Thr, Tyr, His i Gly) $n = 0.5$
- aminoàcids no polars (Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Met, Pro, Phe i Trp) $n = 0$.

Aquest índex, pel que fa a la cadena polipeptídica de la glicoproteïna, té un valor de 44.73, valor que, segons la classificació de Capaldi Vanderkooi, correspon a una proteïna de membrana amb gran part de la cadena soluble en un medi polar.

- *Hidrofobicitat*

Un altre forma de valoració ha estat la comparació de la solubilitat dels aminoàcids en aigua (solvent típicament polar) i en etanol (model de solvent no polar, encara que amb capacitat de dissoldre els aminoàcids en un grau suficient per a permetre les mesures adients).

Com el mateix estat cristallí de referència existeix en ambdues mesures, les entalpies lliures de dissolució poden combinar-se per obtenir la variació d'entalpia lliure (ΔG) en la transferència d'un mol de residu de l'etanol a l'aigua a concentració constant, prenguent com a estàndard (valor 0) el de la glicina, i d'aquesta manera la diferència entre els valors de l'entalpia lliure d'un aminoàcid qualsevol i el de la glicina representaria la contribució de la cadena lateral (ΔG_t).

Els valors de ΔG_t són una manifestació de les forces hidrofòbiques i d'aquí pot definir-se una escala d'hidrofobicitat mitja, H_ϕ , igual a:

$$H_\phi = \Sigma \Delta G_{tifi}$$

Els valors de H_ϕ per a 150 proteïnes i peptids examinats estaven compressos entre 0.44 i 2.02 Kcal/mol. D'aquesta manera, fent ús dels valors de ΔG_t (CANTOR i SCHIMMEL, 1980) s'ha obtingut un valor de $H_\phi = 1.345$ per a la part peptídica de la glicoproteïna antigènica.

Atés que l'elecció de l'etanol com a solvent no polar de referència és molt arbitrària, s'han proposat altres *escales d'hidrofobicitat*. La taula 39 mostra algunes d'aquestes, si be no totes mesuren la mateixa propietat. Amb els valors de l'*escala de consens d'EISENBERG*, expressada en forma normalitzada, s'obté un valor de -0.107 per a la cadena polipeptídica de la glicoproteïna, representant aital xifra un lleuger predomini de la part hidrofílica de la molècula.

Altres escales més senzilles s'han construït simplement per comparació de la relació de les freqüències (f) d'uns determinats aminoàcids.

	Consensus	Consensus	von Heijne	Janin	Chothia	Wollenden	Tanford/Segrest	Kyte	Argos
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ile	1.4	0.73	4.4	0.7	0.24	2.15	5.0	4.5	1.67
Phe	1.2	0.61	5.2	0.5	0.0	-0.76	5.0	2.8	2.03
Val	1.1	0.54	3.9	0.6	0.09	1.99	3.0	4.2	1.14
Leu	1.1	0.53	4.2	0.5	-0.12	2.28	3.5	3.8	2.93
Trp	0.81	0.37	3.9	0.3	-0.59	-5.88	6.5	-0.9	1.08
Met	0.64	0.26	2.1	0.4	-0.24	-1.48	2.5	1.9	2.96
Ala	0.62	0.25	2.9	0.3	-0.29	1.94	1.0	1.8	1.56
Gly	0.48	0.16	1.9	0.3	-0.34	2.39	0.0	-0.4	0.62
Cys	0.29	0.04	-0.08	0.9	0.0	-1.24	0.0	2.5	1.23
Tyr	0.26	0.02	3.6	-0.4	-1.02	-6.11	4.5	-1.3	0.68
Pro	0.12	-0.07	1.1	-0.3	-0.90	-	1.5	-1.6	0.76
Thr	-0.05	-0.18	1.2	-0.2	-0.71	-4.88	0.5	-0.7	0.91
Ser	-0.18	-0.26	0.36	-0.1	-0.75	-5.06	-0.5	-0.8	0.81
His	-0.40	-0.40	-1.5	-0.1	-0.94	-10.27	1.0	-3.2	0.29
Glu	-0.74	-0.62	-4.0	-0.7	-0.90	-10.20	-	-3.5	0.23
Asn	-0.78	-0.64	-1.0	-0.5	-1.18	-9.68	-1.5	-3.5	0.27
Gln	-0.85	-0.69	-0.52	-0.7	-1.53	-9.38	-1.0	-3.5	0.51
Asp	-0.90	-0.72	-5.6	-0.6	-1.02	-10.95	-	-3.5	0.14
Lys	-1.5	-1.1	-2.3	-1.8	-2.05	-9.52	-	-3.9	0.15
Arg	-2.5	-1.8	-9.4	-1.4	-2.71	-19.92	-	-4.5	0.45

TAULA 39.- Escalles d'hidrofobicitat per als residus d'aminoàcids. Els valors estan expressats en Kcal/mol (EISENBERG 1984).

- (1) Escala consensuada d'Eisenberg et al. (1982). Faraday Symp. Chem. Soc. 17, 109-120. Aquesta escala s'indica de forma normalitzada a una mitja de 0.0 i una desviació estàndard de 1.0.
- (2) Escala consensuada d'Eisenberg et al. (1982) sense normalitzar.
- (3) Escala de G. von Heijne i C. Blomberg (1979) Eur. J. Biochem. 97, 175-181.
- (4) Escala de J. Janin (1979) Nature, 277, 491-492.
- (5) Escala de C. Chothia (1976) J. Mol. Biol. 105, 1-14.
- (6) Escala de R. Wolfenden et al. (1981) Biochemistry 20, 849-855.
- (7) Escala de Y. Nozaki i C. Tanford (1971) J. Biol. Chem. 246, 2211-2217.
- (8) Escala de J. Kyte i K. Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132.
- (9) Escala de P. Argos et al. (1982) Eur. J. Biochem. 128, 565-575.

Així, l'escala R_3 es construeix segons la relació:

$$R_3 = \Sigma f(k) / \Sigma f(j)$$

on com aminoàcids hidrofílics (k) es prenen els següents: Arg, Lys, His, Gly, Glu, Asp i Asn, i com a hidrofòbics (j): Ile, Tyr, Phe, Leu, Val i Met.

Fent ús d'aquesta escala s'ha obtingut un valor de 1.985.

La combinació d'aquesta escala amb la d'hidrofobicitat mitja forneix l'escala Z, dita de *funció discriminant* (BARRANTES, 1975):

$$\begin{aligned} Z &= -0.345R_3 + 0.60H_\phi \\ Z &= -0.345(1.985) + 0.60(1.345) \\ Z &= 0.122 \end{aligned}$$

Amb una sèrie de més de 200 proteïnes, s'han calculat els valors de Z, deduint-se que el valor mig de Z per a proteïnes de membrana, internes i externes, és de 0.52 ± 0.11 i 0.12 ± 0.16 , respectivament. Per a proteïnes no membranars el valor mig de Z és de 0.16 ± 0.17 .

L'anàlisi estadístic dels resultats ha demostrat que la classificació d'una proteïna segons l'esmentat valor de Z només falla en un 8% dels casos.

En la taula 40 s'agrupen tots els valors obtinguts comparant-los amb els valors mitjos establerts per a proteïnes de diferent origen.

Tipus de proteïna	I.P.	H_ϕ	R_3	Z
de membrana	<40			
- interna		1,197 \pm 0,097	0,59 \pm 0,18	0,52 \pm 0,11
- externa		0,986 \pm 0,075	1,37 \pm 0,35	0,12 \pm 0,16
no membranar		0,996 \pm 0,098	1,26 \pm 0,42	0,16 \pm 0,17
glicoproteïna antigènica	44,73	1,345	1,985	0,122

TAULA 40.- Valors de polaritat i hidrofobicitat de la part polipeptídica de la glicoproteïna antigènica. L'índex de polaritat (I.P.), l'escala R_3 i la funció discriminant Z, són paràmetres adimensionals, mentre que la hidrofobicitat mitja, H_ϕ , ve expressada en Kcal/mol.

4.4. ACCIÓ DELS AGENTS PERTORBANTS

L'espectre d'absorció d'un cromòfor és determinat principalment per l'estructura química de la molècula, però, a més, l'espectre és sensible al solvent. Aquesta sensibilitat pot manifestar-se per canvis en la intensitat, en la forma de la banda d'absorció, i de la longitud d'ona on es produeix aital absorció. Els canvis en el solvent tenen grans efectes sobre les diferències energètiques entre els estats electrònics.

L'efecte del pH sobre l'espectre d'absorció ja ha estat determinat en els apartats 3.1.5. i 3.1.6., per la qual cosa l'efecte del solvent es limitarà als efectes de la polaritat.

S'ha emprat el mètode de la pertorbació per solvent que es fonamenta en introduir solvents no polars -que no produeixen canvis conformacionals- i per *espectroscòpia diferencial* determinar el desplaçament de la longitud d'ona on es presenta el màxim i la variació en el valor d'aquest.

Els pertorbants emprats han estat solucions aquoses al 20% (v/v o p/p, segons s'escaigui) de dioxà, polietilenglicol 2000 i urea.

En realitat les solucions emprades han estat del 40% i s'ha fet una mescla volum-volum amb la solució de glicoproteïna, amb la qual cosa la concentració final era del 20%.

Les determinacions s'han realitzat als 30 min de realitzada la mescla. Amb les solucions d'urea, ultra la determinació a aquest temps, també s'han realitzat dues altres, una immediatament després de la mescla ($t = 0$) i, altre, a les 18 hores de la mescla.

La solució de la glicoproteïna, diluïda a la meitat, presentava un màxim a 280 nm, amb una absorbància de 0.164.

La figura 74 mostra l'espectroscòpia diferencial obtinguda amb la urea. L'acció d'aquest pertorbant determinada a $t = 0$ i $t = 30$ min no és molt forta. Hi ha un desplaçament del màxim a 278 nm amb un lleuger increment de l'absorbància, que passa de 0.164 a 0.170, per a $t = 0$, i a 0.175 per a $t = 30$ min. La màxima pertorbació es palesa a les longituds d'ona més baixes.

Els valors a les 18 h de la mescla indiquen que la urea ha produït unes variacions conformacionals sobrepasant l'acció propiament pertorbant.

Δ ABSORBANCIA $\times 1000$

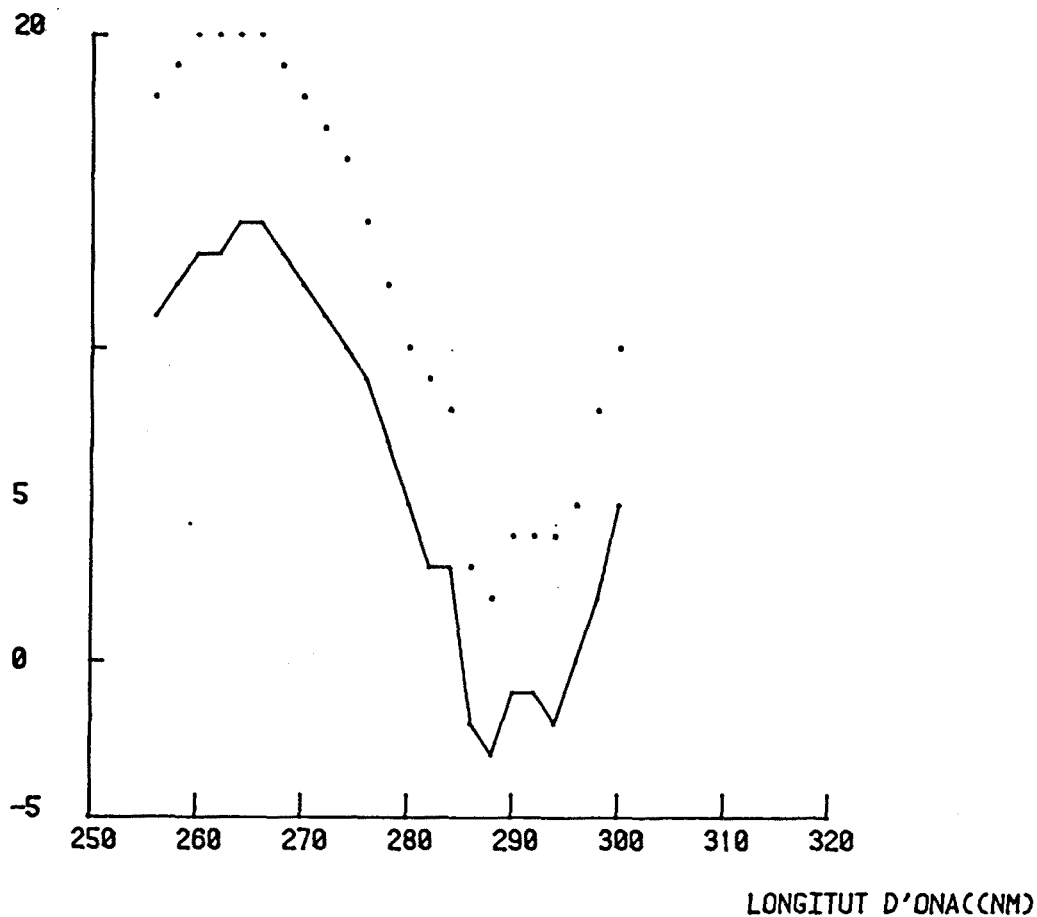


FIGURA 74.- Acció pertorbant de la urea sobre la glicoproteïna, determinada a dos temps: (—), $t = 0$, i (···) $t = 30$ min.

La figura 75 mostra l'espectroscòpia diferencial obtinguda amb el propilenglicol i amb el dioxà. En aquests casos l'efecte pertorbant és més remarcable (absorbància de 0.164 a 0.180, amb el dioxà, i a 0.179, amb el propilenglicol) presentant-se també el màxim a 278 nm, i palesant-se les pertorbacions més grans a les λ compreses entre 250 i 260 nm.

Els resultats obtinguts, tot i que no absolutament concluints, poden indicar que la tirosina i el triptofan, presents en la molècula, es troben tant en la superfície com en l'interior de la molècula, ja que amb el canvi de polaritat del dissolvent, es produeix variació en l'espectre d'absorció, si bé aquesta variació no és dràstica.

Δ ABSORBANCIA $\times 1000$

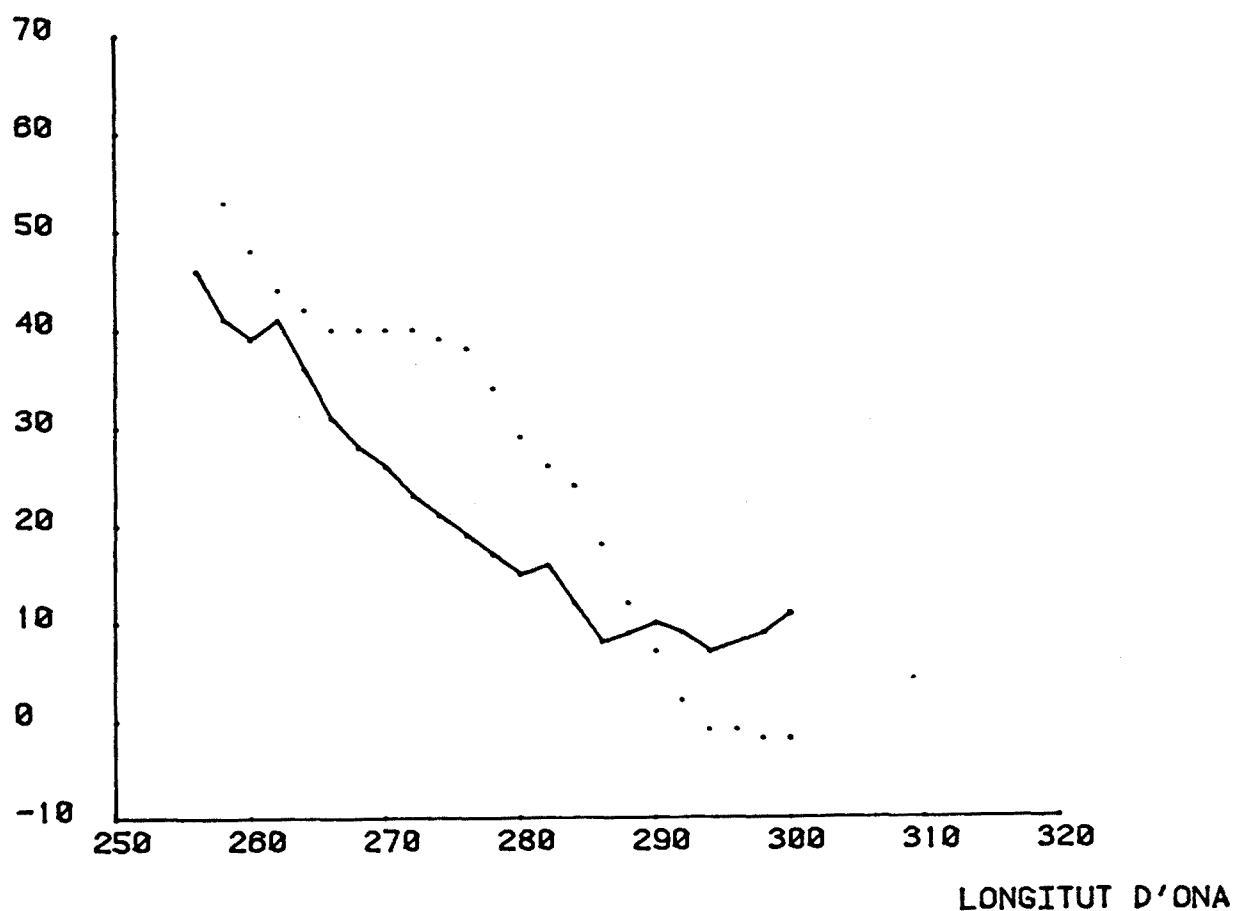


FIGURA 75.- Acció pertorbant del polietilenglicol 2000 (—) i del dioxà (···) sobre la glicoproteïna antigènica.

5. ESTABILITAT ESTRUCTURAL

La determinació de l'estabilitat estructural (o conformacional) de les proteïnes es realitza segons la informació que proporciona l'estudi de llur desnaturalització. El procés de desnaturalització implica un canvi important en una o més propietats de la proteïna a efectes de l'adició de determinats soluts, per efecte de la calor, l'acció mecànica (ultrasons) o algun altre influència que pugui alterar l'estructura nativa. Aquest procés és generalment, però no necessàriament, un desplegament desorganitzatiu.

En aquest cas, com a agents desnaturalitzants s'han emprat el clorhidrat de guanidina (Gdn-HCl), la urea i la calor, i les tècniques que han visualitzat aquest procés de desnaturalització han estat: l'espectroscòpia a l'UV, la dispersió rotatòria òptica (DRO), la viscositat, i la fluorimetria per determinar la capacitat remanent de la proteïna per unir-se a l'àcid 8-anilino-1-naftalen-sulfònic (ANS).

5.1. ACCIÓ DEL CLORHIDRAT DE GUANIDINA

S'ha emprat clorhidrat de guanidina (Scharlau Gu060) en solució aquosa, la concentració exacta de la qual ha estat calculada per l'increment de l'índex de refracció (NOZAKI 1972) amb un refractòmetre Hilger (Hilger & Watts, Londres) a una temperatura constant de $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, aplicant la fórmula:

$$M \text{ (molaritat)} = 57.147(\Delta n) + 38.68(\Delta n)^2 - 91.6(\Delta n)^3$$

La solució emprada de glicoproteïna tenia una concentració de 0.976 mg/mL.

a) determinació espectrofotomètrica

S'ha realitzat en un espectrofotòmetre Hewlett-Packard A-8531, realitzant les lectures a 280 nm, després de transcorreguts 30 min a partir de la mescla dels components. Com a blanc de referència s'ha emprat aigua bidestil·lada o be el conjunt format per aigua, Gdn-HCl i la solució amortidora corresponent (és a dir, que la solució amb la glicoproteïna s'ha substituït per aigua).

El conjunt determinat constava de la solució aquosa de la glicoproteïna (1 mL), solució al 1% de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ i la solució de Gdn-HCl, amb proporcions equivalents a les descrites per HOLLADAY (1984) i que feien, entre ambdues solucions, un volum total de 1 mL.

Aquest tipus de desnaturalització sembla correspondre a un procés reversible car l'alíquota de la solució de glicoproteïna que ha estat sotmesa a una concentració de 6.88 M de Gdn-HCl, després de 72 hores de diàlisi, enfront 50 volums d'aigua a 4°C, renovats 4 cops al dia, mostra un valor d'absorbància a 280 nm igual a 0.141, molt proper a l'obtingut a l'inici de la prova (absorbància igual a 0.150).

b) determinació polarimètrica

S'ha realitzat en un polarímetre Perkin-Elmer 241, amb cel·les de quars que disposen d'una camisa termostatitzada, de 1 cm de pas de llum i 0.5 mL de capacitat.

El valor del poder rotatori s'ha determinat a 356 nm a una temperatura constant de $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Els resultats s'expressen com a rotació específica del residu mig a 356 nm, $[\alpha]'$.

Les mostres analitzades han estat les mateixes que les determinades per espectroscòpia a l'UV.

En la taula 41 es mostren els valors obtinguts amb les proves espectrofotomètrica i polarimètrica. Les dades de l'increment de l'absorbància són la mitja de tres determinacions realitzades, mentre que les polarimètriques ho són de dues determinacions.

Concentració de Gdn-HCl (M)	Increment de l'absor- bància a 280 nm (x100)	[η ']
0	15	53
0.70	16	51
1.76	17	52
2,11	17	48
2.47	16	46
2.82	16	41
3.44	15	40
3.49	16	37
4.2	17	37
4.55	18	36
4.9	15	34
5.25	- 12	33
5.60	- 31	34
6.20	- 29	31
6.88	- 25	27

TAULA 41.- Influència del clorhidrat de guanidina palesada com a increment de l'absorbància i de la rotació específica del residu mig.a 356 nm.

c) *determinació viscosimètrica*

Les determinacions s'han realitzat amb un viscosímetre Cannon-Fenske estan ja descrites les característiques, tant instrumental com operatòries, en l'apartat 3.5. Característiques hidrodinàmiques: Viscositat.

Llevat d'un valor, igual a 30 mL/g, de la viscositat intrínseca obtingut a concentració nul·la de Gdn-HCl, a partir de concentracions d'a d'agent desnaturalitzant superiors a 2.5 M, els valors d'aquest paràmetre viscosimètric romanen inalterats (figura 76). Per tant, sembla probable que l'elevat valor obtingut en absència de Gdn-HCl sigui degut a l'efecte *polielectròlit* (HARDING i CREETH, 1983).

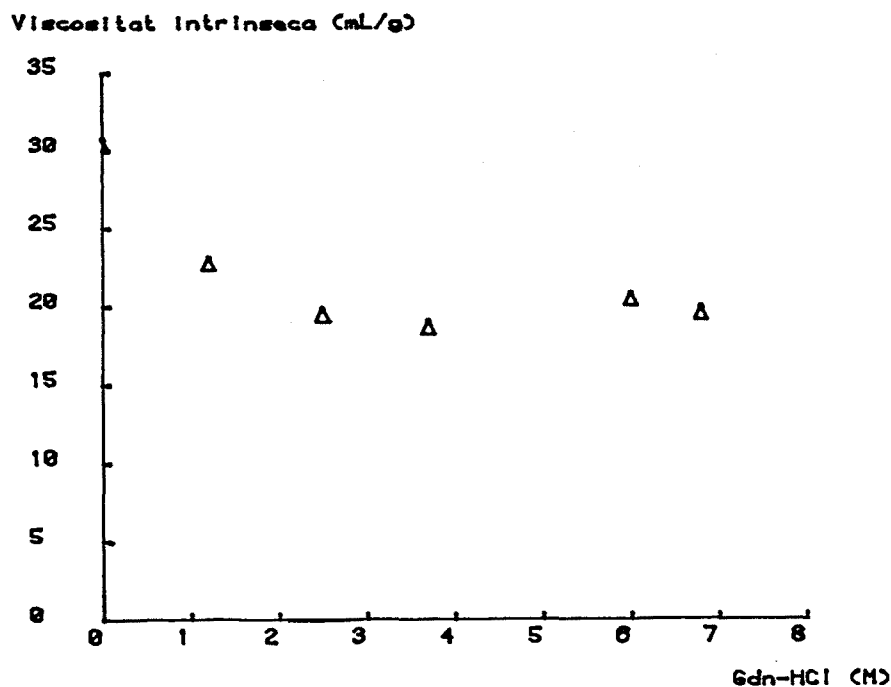


FIGURA 76.- Variació de la viscositat intrínseca en funció de la concentració molar del clorhidrat de guanidina.

d) determinació fluorimètrica

La variació de la fluorescència del complex glicoproteïna-ANS s'ha determinat amb un espectrofluorímetre Perkin-Elmer 204.

La tècnica operatòria ha estat la següent: alíquotes de 2 mL que contenen, ultra les glicoproteïnes, l'agent desnaturalitzant a diferents concentracions, es mesclen amb 0.1 mL d'ANS (Sigma A-3125) dissolt a concentració 2 mM en aigua.

La longitud d'ona d'excitació ha estat de 385 nm i la d'emissió de 495 nm.

La lectura s'ha realitzat abans de transcorreguts 5 min després de la mescla.

Segons la figura 77 s'observa que l'increment de molaritat d'urea produeix una disminució en la variació de la fluorescència relativa. Per contra, quan la determinació de la fluorescència es fa a partir dels 5 min de realitzada la mescla, els resultats obtinguts són els contraris: a major concentració de Gdn-HCl, hom observa un increment de la fluorescència relativa de la solució.

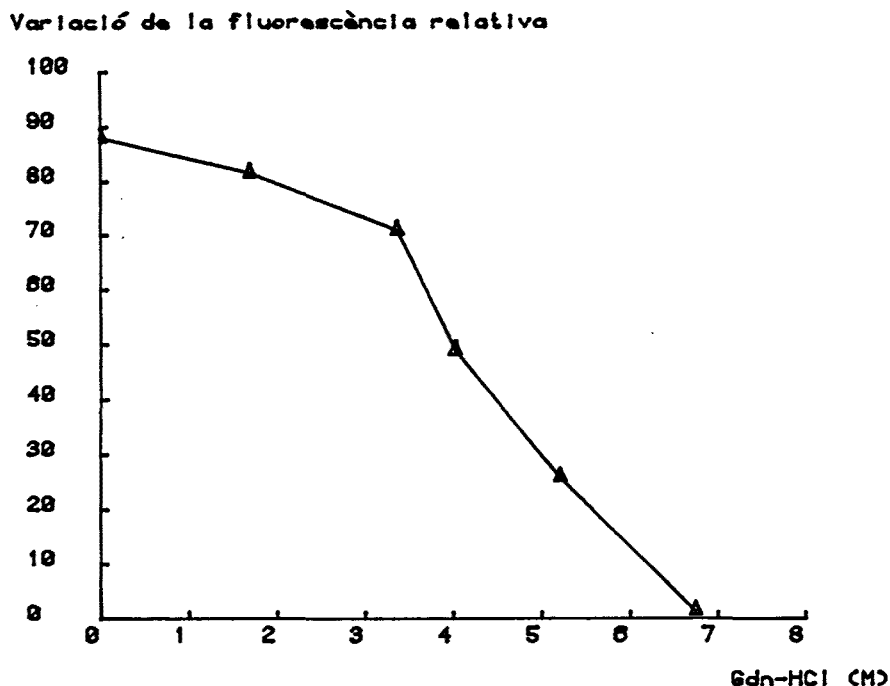


FIGURA 77.- Variació de la fluorescència relativa del complex glicoproteïna-ANS en funció de la molaritat del Gdn-HCl.

La comparació d'aquestes quatre propietats físiques, que varien en funció de la concentració de Gdn-HCl, mostren que l'absorbància i la unió de la molècula a l'ANS són les proves que presenten més variació en llurs valors, i, pel que fa a aquestes dues, és el lloc d'unió a l'ANS el que és afectat ja a baixes concentracions de Gdn-HCl. En un extrem oposat pot afirmar-se que la viscositat no es mostra afectada per l'acció del clorhidrat de guanidina.

5.2. ACCIÓ DE LA UREA

La urea desnatura les proteïnes afectant els ponts d'hidrogen interns, mentre que deixa intactes els ponts disulfur, inclús a concentracions tan altes com 8 M.

La desnaturalització per urea no és instantània: hi ha un procés ràpid que afecta tots els enllaços excepte aquells en els que intervenen la prolina i la hidroxiprolina, i un procés més lent que afecta aquests dos aminoàcids. La lentitud d'aquest darrer procés fa que calguin 24 hores per una desnaturalització total a temperatura ambient (PICKERING i CRABTREE, 1981).

La ruptura dels enllaços disulfur entre cisteïnes pot realitzar-se amb mercaptoetanol, essent una reacció quasi instantània.

Les solucions d'urea (Merck 8487) es preparen per pesada de la quantitat teòricament suficient i llurs concentracions molars són calculades a partir de les densitats pel mètode de KAWAHARA i TANFORD (1966), car l'índex de refracció d'una solució d'urea tan sols és lineal amb la concentració a partir de 2,5 M (WARREN i GORDON, 1966).

Les densitats s'han mesurat amb un picnòmetre provist d'un termòmetre (Afora 5325) amb una capacitat aproximada de 28 mL. El picnòmetre ha estat prèviament calibrat amb aigua. En cas d'existir diferències entre les temperatures de la solució d'urea i de l'aigua en el moment de la determinació, la densitat d'aquesta última s'ha obtingut del CHEMICAL ENGINEER' HANDBOOK (1950).

a) determinació polarimètrica

La determinació realitzada ha estat el càlcul de la rotació òptica enfront de la concentració d'urea a temperatura constant (la rotació òptica s'expressa com a variació de l'angle de rotació, $\Delta\alpha$).

Les solucions d'urea contenen KCl-HCl 0.15 M per tal d'eliminar les interaccions electrostàtiques entre els grups carregats de la superfície de la molècula (GREENE i PACE, 1974).

Les rotacions òptiques foren determinades en un espectropolarímetre Perkin Elmer P23, emprant una cubeta de quars de 1 cm de pas de llum i equipada amb una camisa termostatitzada. S'emprà una escletxa de 3 mm i la longitud d'ona de la lectura fou de 300 nm. La temperatura es mantingué a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Abans de la determinació les solucions foren filtrades per Durapore HVLV (Millipore) de $0.45 \mu\text{m}$ de porus.

La solució aquosa de la glicoproteïna tenia una concentració de 0.856 mg/mL.

La rotació òptica de les diferents solucions a concentracions variables d'urea fou determinada a les 24 hores de realitzada la mescla.

La taula 42 mostra els resultats obtinguts, observant-se que l'acció de la urea es manifesta com a una reducció de la rotació negativa de la molècula

Concentració de urea (M)	α (solució)	α (urea)	$\Delta\alpha$
6.42	- 0.013	- 0.023	+ 0.010
5.13	- 0.010	- 0.019	+ 0.009
4.49	- 0.015	- 0.016	+ 0.001
3.85	- 0.017	- 0.014	- 0.003
3.21	- 0.017	- 0.012	- 0.005
2.57	- 0.015	- 0.009	- 0.006
1.93	- 0.014	- 0.007	- 0.007
1.28	- 0.022	- 0.005	- 0.017
0.00	- 0.068	0.000	- 0.068

TAULA 42 .- Variació de l'angle de rotació ($\Delta\alpha$) en funció de la concentració d'urea. La determinació polarimètrica s'ha realitzat a $25.1 \pm 0.5^\circ\text{C}$ a una λ de 232.5 nm.

b) determinació viscosimètrica

En aquest cas s'ha determinat la viscositat de la solució de la glicoproteïna en urea a diferent concentració molar, amb o sense mercaptoetanol (Merck 805740) (*).

Les solucions emprades han estat les mateixes que les emprades per a les determinacions polarimètriques. En algunes mostres hom ha afegit mercaptoetanol a concentració 0.1 M.

(*) Aquesta prova fou realitzada abans de saber que el contingut en aminoàcids no presentava cisteïna i per tant, la no possibilitat d'enllaços -SH. Aquesta absència fa que el mercaptoetanol no tingui cap efecte sobre la desorganització de la glicoproteïna, com així ha estat corroborat pels resultats d'aquesta prova.

En la figura 78 s'observa el valor de la viscositat intrínseca obtingut en funció de la variació de la concentració d'agent desnaturalitzant.

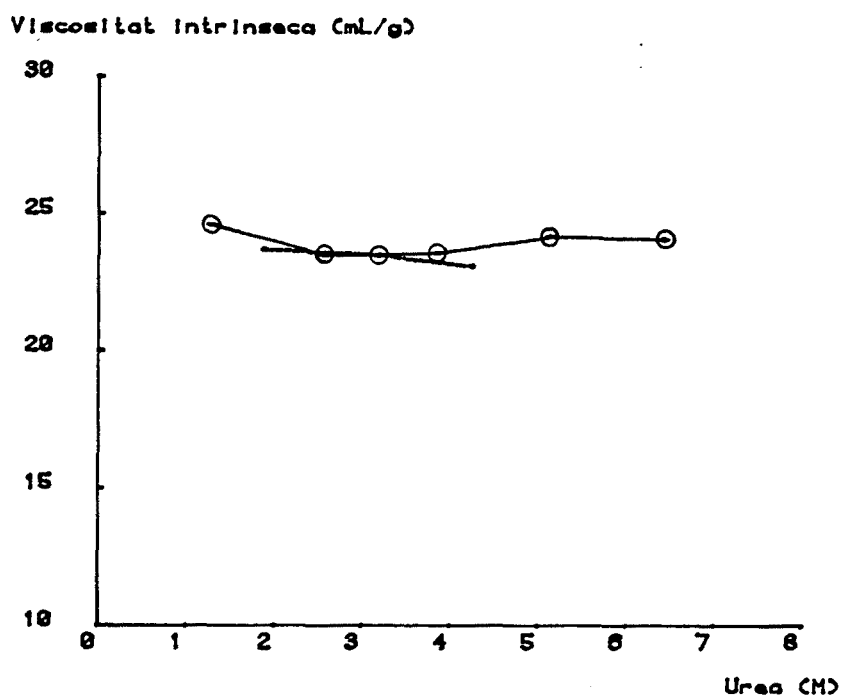


FIGURA 78.- Variació de la viscositat intrínseca expressada en mL/g en funció de la concentració molar d'urea: (—) sense mercaptoetanol; (o—o) amb mercaptoetanol.

5.3. ACCIÓ DE LA CALOR

L'acció de la calor sobre l'estabilitat de la glicoproteïna s'ha determinat per espectrofotometria en dos tipus de proves: en una, la glicoproteïna se sotmet a l'acció continuada de la calor, perllongant-se la prova unes 6 hores; en l'altre, la glicoproteïna només ha estat exposada durant 5 min a una temperatura determinada, refredant-se a continuació, fins a una temperatura de 15°C.

En ambdues proves s'ha fet ús d'un espectrofotòmetre Hewlett Packard A-8531 provist d'una cubeta termostatitzada.

a) acció continuada de la calor

La mostra, que a una temperatura de 20°C presentava un màxim d'absorbància a 284 nm amb un valor de 0.238, estava dissolta en aigua i romangué dins del bany termostatitzat tot el temps que durà la prova.

Cada 20 min la temperatura s'augmentava en 5°C, realitzant les lectures d'absorbància a continuació. Després d'assolida la temperatura màxima, els valors descendents s'han obtingut tot refredant el bany termoatitzat.

En la figura 79 es mostren els resultats obtinguts a l'enfrontar el valor màxim de l'absorbància en la zona de 250 a 300 nm i la temperatura.

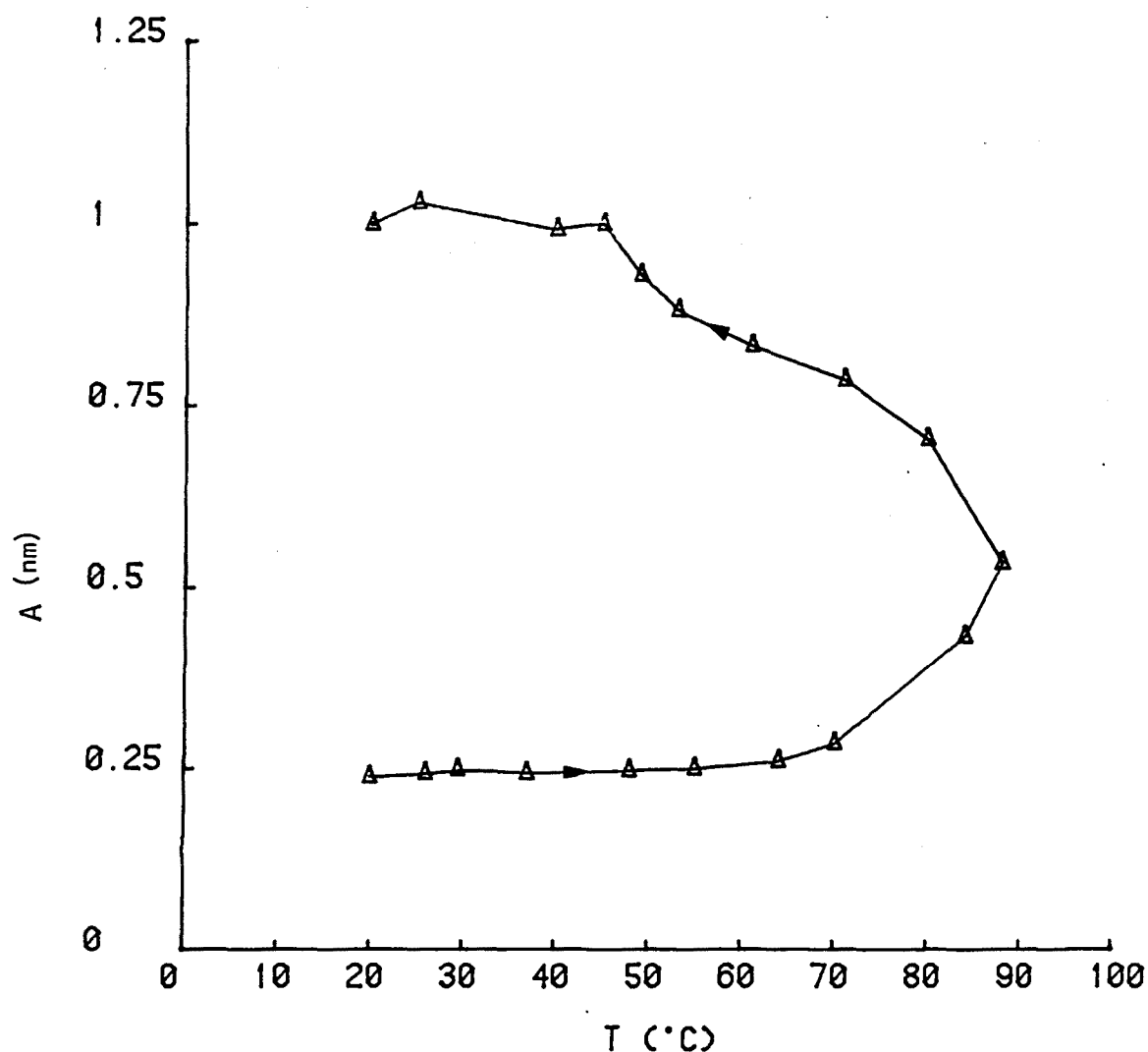


FIGURA 79.- Valor del màxim de l'absorbància en la zona de 250 a 300 nm segons l'escalfament continuat de 20 a 88°C (→) i del refredament de la mateixa mostra (←).

En la figura 80 hom observa les variacions de l'absorbància en la zona compresa entre 200 i 300 nm per als tres casos límits: (A) a 20°C en el moment d'inici de la prova; (B) a 88°C en el punt de màxima temperatura; (C) a 20°C després del refredament de la mostra.

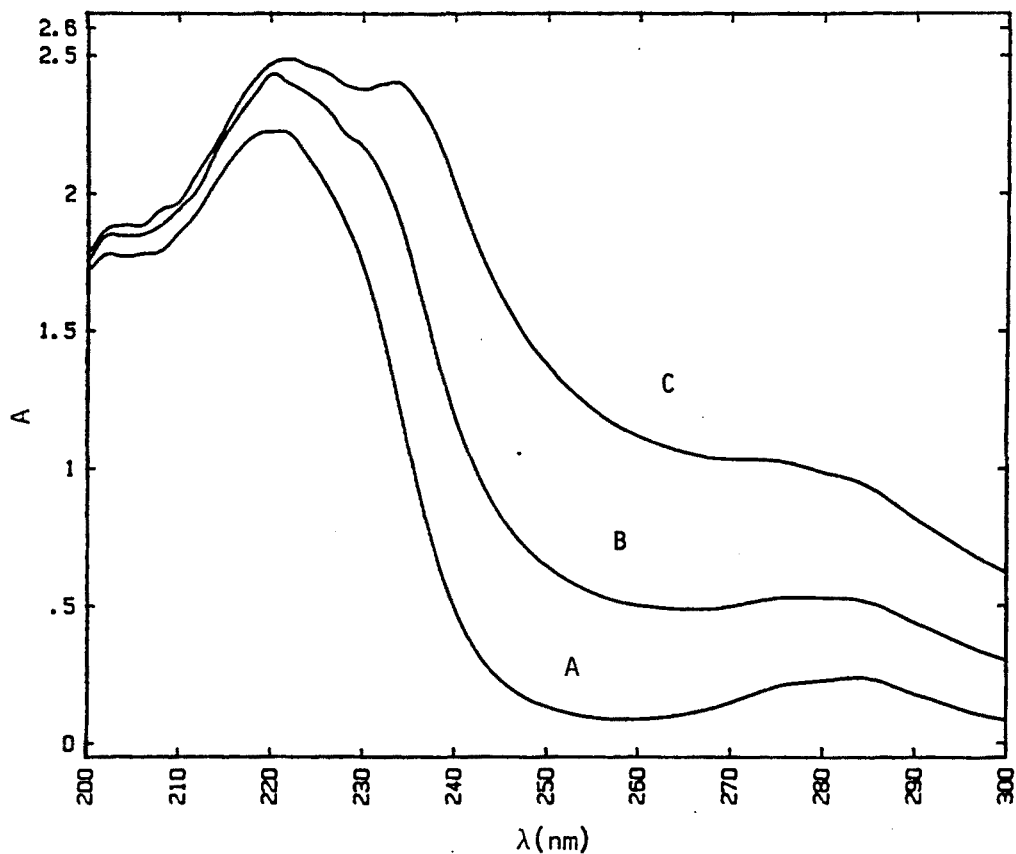


FIGURA 80.- Espectres d'absorció obtinguts en la zona de 200 a 300 nm per a la mostra en les condicions inicials de temperatura (A), quan s'ha assolit el valor màxim de temperatura (B) i quan la temperatura ha retornat als valors inicials després de rebre tot l'aport calòric.

Cal indicar que, en aquesta alíquota, el màxim d'absorbància estigué a 284 nm fins arribar a una temperatura de 80°C, punt en el que es desplaçà a 282 nm. Quan la glicoproteïna s'ha anat refredant, alhora que continuava l'augment de l'absorbància, el màxim s'anava desplaçant cap a valors de λ més baixos, en un principi a 276 nm (de 88 a 71°C) i després a 274 nm, deixant d'haver un màxim definit a partir de 56°C, on la gràfica presentava en la zona de 272-286 una línia horitzontal.

b) exposició a una temperatura

En aquesta prova la glicoproteïna estava dissolta en solució amortidora PBS, presentant un màxim d'absorbància igual a 0.306 a 276 nm, a la temperatura inicial de la prova (14°C).

La temperatura s'ha anat augmentant en intervals de 2°C; un cop assolida la temperatura la mostra s'ha exposat durant 5 min -temps que cal per assolir una temperatura uniforme entre cubeta i contingut- i, a continuació, es determina l'absorbància, refredant-la immediatament fins a 15°C.

S'observa que un augment de temperatura produeix lleugeres disminucions del valor de l'absorbància en el màxim fins arribar a la temperatura de 55°C. A partir d'aquesta temperatura hi ha un augment de l'absorbància fins que s'assoleix la temperatura de 65°C, a partir d'aquí, l'absorbància roman, en línees generals, estabilitzada (figura 81).

Un cop assolida la màxima temperatura de 80°C es deixa refredar la mostra, determinant-se l'absorbància a diverses temperatures. Hom observa un lleuger augment de l'absorbància en el període de refredament envers l'absorbància assolida en el procés d'escalfament (taula 43).

ABSORBANCIA 276 (nm)

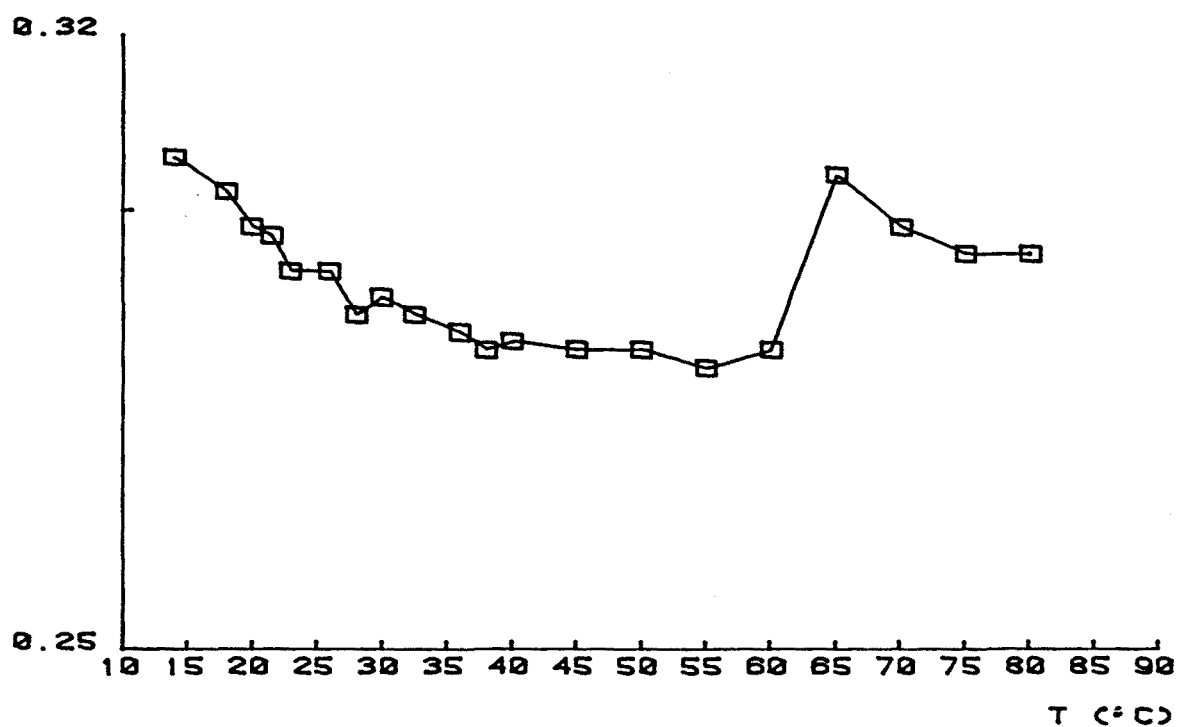


FIGURA 81.- Variació de l'absorbància a 276 nm en funció de l'exposició no continuada a la calor.

	Temperatura (°C)					
	14	22	30	36	50	60
Absorbància a 276 nm						
Escalfament	0.306	0.296	0.290	0.286	0.284	0.285
Refredament	0.308	0.311	0.309	0.307	0.302	0.300

TAULA 43.- Comparació dels valors de l'absorbància a 276 nm obtinguts en el procés d'escalfament i en el de refredament.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Com ja s'ha indicat en l'apartat corresponent, el mètode emprat per a solubilitzar l'estroma eritrocític forneix un material glicoproteínic del que s'ha obtingut una glicoproteïna que presenta l'activitat de grup sanguini A, fet palesat per les proves d'inhibició de l'hemaglutinació i per la unió a la lectina *Helix pomatia*. Prèviament s'havia observat que el material obtingut pel mètode d'Hamaguchi i Cleve, basat en l'extracció amb cloroform-metanol, tenia unes característiques equivalents a les del material obtingut amb un altre tècnica clàssica, la de Marchesi et al., que emprava el diodesalicilat de liti.

Les modificacions introduïdes en el mètode d'Hamaguchi i Cleve (temps d'agitació, reextracció de la interfase, concentració sense escalfament i precipitació etanòlica) han estat molt positives pel que fa a l'obtenció d'un material força homogeni i amb característiques reproduïbles.

Un altre aspecte important ha estat la purificació de la glicoproteïna per un procés de cromatografia d'afinitat emprant com a lligand la lectina obtinguda de la glàndula albuminoïda del cargol *Helix pomatia*. En la major part dels treballs similars, amb estudi de glicoproteïnes eritrocítiques s'ha partit de la premisa -totalment lògica, per altre part- de que *algunes* de les glicoproteïnes de les membranes dels eritròcits de grup sanguini A, han de portar les característiques químiques i estructurals pròpies d'aquest grup sanguini, i, per tant, el principal punt en l'obtenció es basava tan sols en la solubilització de glicoproteïnes.

L'ús de la lectina *Helix pomatia* immobilitzada a esferes de Sepharose 6 MB s'ha emprat principalment en el fraccionament i purificació de limfòcits (HELLSTROM et al., 1976) i en l'aïllament de glicoproteïnes presents en les membranes d'aquests limfòcits, però no hom ha trobat cap ressenya d'haver-la emprat per a l'obtenció de glicoproteïnes d'eritròcit, tot i que si s'havia aplicat aquesta lectina en estudis d'interacció amb eritròcits A o amb glicoproteïnes que en deriven.

La purificació per cromatografia d'afinitat presentà un problema en el moment de la detecció de les glicoproteïnes: la relativament baixa absorptància de la molècula, a 280 nm, i la interferència que presenten les hexosamines amb l'absorptància de l'enllaç peptídic, feren que calgués un sistema diferent de visualització de les glicoproteïnes que l'espectroscòpic en els tubs que contenen l'eluit. Com ja s'ha indicat, aquest sistema es basa fonamentalment en la precipitació amb àcid fosfotúngstic, reacció que per a certes condicions, forneix una turbidesa que és proporcional a la glicoproteïna present. Atés que aquest mètode és destructiu, el control rutinari dels eluits de la cromatografia d'afinitat s'ha realitzat observant, per il·luminació inferior, el precipitat format en els pouets d'una placa Takatsy Microtiter (Cooke Eng., Estats Units). Amb això, la pèrdua de mostra només era d'uns pocs μL del contingut de cada tub.

Les característiques analítiques de la glicoproteïna han proporcionat un 56% del pes de la molècula en glúcids i un 39% de proteïna. Completant aquests valors fins un total del 100%, els valors anteriors esdevenen el 58.95 i 41.05%, respectivament. La meitat dels glúcids correspon a hexosamines, i l'àcid siàlic, si be està present, no presenta un valor elevat (1.7%). Pel que fa a la part proteica, cal fer esment en la minsa presència en la molècula dels aminoàcids cromòfors (Trp, Tyr, Phe), la qual cosa explica que la molècula no presenti una marcada absorció pels voltants dels 280 nm, al contrari de la major part de les substàncies proteïniques, i també explica el valor baix del coeficient d'absorció específica ($0.4324 \text{ L/g}\cdot\text{cm}$). La molècula no conté cisteïna i, per tant, no existeixen enllaços -SH, i com pot observar-se en l'anàlisi d'aminoàcids (figura 41 i taula 25), la serina i treonina, aminoàcids que en les glicoproteïnes s'uneixen a les parts glucídiques, es troben en elevada proporció. També és de destacar la gran quantitat d'amoniac present, molt superior a la quantitat que pot provenir de l'asparagina i de la glutamina, amb un origen en els grups aminats dels aminosucres.

Cal afegir que la quantificació de la molècula pel clàssic mètode de Lowry presenta una pèrdua de sensibilitat envers la que presenta la quantificació d'una proteïna estàndard, com és el cas de l'albumina sèrica (figura 40). Per tant, l'ús d'aquest mètode colorimètric hauria d'anar acompanyat d'un patró obtingut amb la mateixa glicoproteïna a valorar.

Un mètode desenvolupat per a valorar les glicoproteïnes ha estat la quantificació per espargiment de la llum de la turbidesa produïda per l'adició d'etanol absolut a una solució de glicoproteïna. El mètode si be requereix molta cura operatòria, ha resultat força satisfactori pel que fa als resultats i al volum de mostra necessari. A més és factible emprar com a patró una glicoproteïna a l'abast comercial, l'orosomuroid.

Pel que fa a la masa molecular de la glicoproteïna, la cromatografia de filtració per gel fou el primer mètode emprat, i el resultat repetidament obtingut (≈ 750000) era esbalaïdor car, si be en part concordava amb experiències similars anteriors (taula 23), no era lògic el pensar que una molècula d'aitals dimensions hagués passat desapercibuda fins aleshores. En realitat el valor aparent de masa molecular que per filtració per gel s'obté depèn del valor d'aquests quatre paràmetres: radi d'Stokes, coeficient de sedimentació, radi friccional i volum específic parcial (SIEGEL i MONTY, 1966), i la linealitat entre la masa molecular i el volum d'elució només és estricta amb les proteïnes globulars. Les glicoproteïnes tenen estructures més expandides i un grau més elevat d'hidratació de les cadenes glucídiques en comparació amb les cadenes polipeptídiques (ANDREWS 1965). Un altre causa distorsionant és la presència d'àcid siàlic (ALHADEFF 1978), com pot observar-se en la taula 44 en la qual hom aprecia els diferents valors de masa molecular obtinguts amb unes glicoproteïnes i amb llurs derivats desialitzats.

GLICOPROTEIN	CONTINGUT EN ACID SIALIC (%)	MASA MOLECULAR	
		CALCULADA	CONEGUDA
Fetuïna	8.8	368000	48000
Asialofetuïna	0.6	11500	44000
Orosomuroid	12.1	386000	44000
asialo-orosomuroid	0.6	191000	39000
Tiroglobulina	1.4	> 570000	669000
Asialo-tiroglobulina	0.7	34000	660000
Mucina submaxil·lar bovina	2.5	> 570000	1.300000
Asialo-mucina submaxil·lar	0.7	33000	1.267000

TAULA 44.- Comportament cromatogràfic d'algunes glicoproteïnes i llurs derivats desialitzats en gels de Sepharose 6B (ALDAHEFF, 1978).

Així, doncs, la presència d'àcid siàlic en la molècula, l'estructura expandida de la mateixa, o el que igual, un elevat radi d'Stokes, així com el grau d'hidratació de les cadenes glucídiques i també la capacitat de formar agregats, pot explicar l'elevat valor obtingut.

Amb les altres tècniques emprades s'han obtingut valors més concordants. Una masa molecular de la part proteica de 17200, correspondria, segons el percentatge de proteïna en la molècula, a una masa total de 41500, xifra molt propera a l'obtinguda per al monòmer en l'electroforesi (43000). El valor obtingut per espargiment de la llum (53500) hauria de correspondre, segons les condicions emprades de potencial químic constant, al pes del monòmer, si be sempre hi ha la possibilitat de que representi el pes promig de les espècies presents en un equilibri dímer \leftrightarrow monòmer, en aquest cas desplaçat, evidentment, vers el monòmer.

Els paràmetres fisicoquímics que més informació han proporcionat envers la molècula han estat la dispersió rotatòria òptica, i amb menys importància, la viscositat. Les dades obtingudes de la viscositat intrínseca i de la constant d'Huggins apunten vers una estructura de la molècula predominantment en cabdell monoestadístic, a més, segons els elevats valors dels paràmetres β (apartat 3.1.2.) i del radi de gir $\langle s^2 \rangle$ (apartat 4.1.) la molècula ha d'estar molt expandida, fet concordant amb el comportament cromatogràfic palesat.

Les característiques de la dispersió rotatòria òptica de la glicoproteïna (vali negativa a 234 nm i feble magnitud d'aquesta) són totalment equiparables a les obtingudes amb glicoproteïnes antigèniques, tan eritrocítiques com provinents de les secrecions, i mostren algunes diferències quan se les compara amb les obtingudes de cists ovàrics. Així, BEYCHOK i KABAT (1965) observaren que les substàncies obtingudes a partir de cists ovàrics mostraven un efecte Cotton negatiu, amb valls prop de 220 nm i una inflexió a 225. Aquestes substàncies, de masa molecular propera a 300000, tenien un 80% de contingut glucídic, i llurs propietats òptiques foren atribuïdes a la presència de N-acetil-hexosamines. Amb els resultats obtinguts no havia cap evidència de que la conformació α -hèlix estigués present en aquelles glicoproteïnes.

Per altre part, es pogué comprovar que el lleuger efecte Cotton positiu que a 195 nm es presenta en algunes glicoproteïnes era degut a l'alt contingut en àcids siàlics.

BEZKOROVAINY et al.(1965) obtingueren un valor de $[\alpha]_{29}^D(H_2O, 1 \text{ dm})$ igual a -27.0, per a l'antigen NN a concentració de 1 mg/mL, i de -32.4 per a l'antigen obtingut del meconium a concentració de 5 mg/mL.

JIRGENSONS i SPRINGER (1968) estudiant aquests mateixos antigens, pogueren detallar que les glicoproteïnes característiques de l'antigen NN tenien un 40% de caràcter peptídic i un pes molecular de 595000. En la part proteïnica, estaven presents tots els aminoàcids excepte la cisteïna i el triptòfan, abundant, per contra, la serina i la treonina. Aquestes glicoproteïnes presentaven una dispersió òptica molt feble, havent una vall molt aplanada entre 215 i 220 nm, característica, com ja s'ha indicat, de les hexosamines N-acetilades, de les que aquesta substància en contenia un 23.5%. En aquest cas es podia fer correspondre la corba obtinguda amb l'estructura secundària amb conformació β . Pel que fa a l'antigen MM, quedava palessa una certa estructura en α -hèlix, fonamentada per un pic a 200 nm i una vall prop de 230 nm. No obstant, com que la vall s'allargava fins a 227 nm, l'estructura en fulla β també era present. Conseqüentment, en aquest darrer cas les corbes obtingudes eren compatibles amb la presència en les parts polipeptídiques de les molècules, d'una peptita però significativa estructura en α -hèlix, i una conformació en fulla β .

Aquests resultats implicaven un grau molt baix d'ordenació conformational, i la informació proporcionada per les corbes d'efecte Cotton concordava amb la que proporcionaven els resultats obtinguts amb el mètode de Moffitt-Yang.

Posteriorment, URRY et al.(1971), per mig de dicromisme circular realitzat en membranes d'eritròcit solubilitzades en SDS al 0.2% han obtingut uns resultats semblants als fornits amb polipèptids i proteïnes α -helicoidals, però amb un evident desplaçament cap el vermell i una menor amplitut.

DECKER i CARRAWAY (1975) han determinat els espectres de D.C. de glicoproteïnes d'eritròcits de diverses espècies animals; pel que fa als d'origen humà s'obté una vall, de valor feble a 207 nm $-\lambda$ a la que per la nostra part no s'ha pogut fer cap determinació- presentant també una vall aplanada en la zona entre 220 i 230 nm.

Uns valors encara més concordants han estat els obtinguts per SCHULTE i MARCHESI (1979) que, amb una glicoproteïna de membrana d'eritròcit que contenia un 60% de glúcids en pes, presentava una vall a 213 nm i un altre a 235, amb un cim entre ambdues a 215 nm.

Posteriorment, LISOWSKI et al.(1980), amb els antígens M i N, han obtingut uns espectres amb valls a 235 i 205 nm i un cim intermedi a 220 nm. L'estudi de D.C. de glicopèptids d'aquests antígens, amb o sense àcid siàlic, prova que les hexosamines presents tenen més influència sobre l'espectre que no pas l'àcid siàlic.

Tot el que s'ha exposat anteriorment mostra que no hi ha diferències molt importants en els espectres obtinguts amb glicoproteïnes de diferent origen i que poden ésser produïdes per diferències en la metodologia emprada tant en la determinació de les propietats rotatòries com en l'obtenció d'antígens. Es per aixó que, en cas d'haver-se pogut determinar tot el marge de longituds d'ona, l'espectre obtingut amb la glicoproteïna estudiada podria ésser superposable als obtinguts amb altres experiències.

La conformació de la glicoproteïna, obtinguda segons el mètode de GREENFIELD et al.(1967), ha proporcionat una estructura majoritària en cabdell monoestadístic (50%), havent, a més, un elevat percentatge en fulla β . Aquest fet no és estrany atés que la presència de cadenes glucídiques unides a seqüències peptídiques afavoreix la formació d'estructures β (BEELEY 1977).

Aquests percentatges concorden amb els descrits per altres estudis que han determinat la conformació, partit de dades de D.C. o D.R.O., de diverses glicoproteïnes antigèniques, com és el cas de DECKER i CARRAWAY (1975) que propugnen per aquestes substàncies, el cabdell monoestadístic com a estructura dominant, oscil·lant el contingut en α -hèlix del 13 al 23%.

SCHULTE i MARCHESI (1979) han obtingut per a la glicoforina A uns percentatges del 27% d' α -hèlix, 10% de fulla β i 63% de cabdell monoestadístic.

Per la seva part, els ja esmentats LISOWSKI et al.(1980) assignen als antígens uns percentatges més baixos d' α -hèlix (9% per a l'antígen M i 7% per a l'antígen N).

Per a WELSH et al.(1985) la glicoforina en solució aquosa té, respectivament, uns percentatges de 26.9 (α -hèlix), 19.8 (fulla β) i 53.3 (cabdell monoestadístic).

Cal precisar que l'estructura determinada per a la glicoproteïna no reflexa l'estructura d'aquesta en la membrana sinó que és la mesura que la conformació té en solució. Amb tota seguretat, en un medi no polar com és la membrana, la part que hi ha ancorada, adoptarà de forma predominant l'estructura α -hèlix.

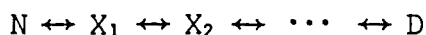
En la desnaturalització d'una proteïna és important el considerar els següents aspectes:

- a) si la desnaturalització és un procés senzill d'un sol pas o bé és un procés complexe
- b) si la desnaturalització és reversible
- c) si els desnaturalitzants produeixen molècules que són diferents en forma i propietats

Pel que fa a la naturalesa del procés de desnaturalització, el mecanisme més senzill, i força abundant, és el que pot descriure's per un senzill model en dos estats, l'estat natiu (N) i l'estat desnaturalitzat (D), poguent-se definir una constant d'equilibri (K) igual a:

$$K = (D)/(N)$$

Quan el procés de desnaturalització comprén l'existència d'estats intermedis estables (X), el model és, llavors, complexe:



La presència d'aquests intermediaris pot ésser deduïda al mesurar diferents propietats físiques que varien en el procés de desnaturalització. Si davant la influència d'una mateixa quantitat d'agent desnaturalitzant aquestes diferents propietats físiques indiquen que està present una mateixa fracció de molècules en estat natural, això és un criteri *necessari*, si be no *suficient* de que el procés de desnaturalització es produeix segons el model de dos estats. En cas contrari, ja es pot afirmar que el model ha d'ésser més complexe.

En el cas de la glicoproteïna s'han comparat les variacions de dues propietats físiques (absorbància a l'U.V. i dispersió rotatòria òptica) en funció de l'acció del Gdn-HCl (taula 41). Les variacions ara es mostren com a valors percentuals referits a un valor del 100% que és el que presentava la propietat física en absència de desnaturalitzant. Aquesta comparació percentual forneix dues corbes diferents (figura 82) per la qual cosa es pot assegurar que el procés de desnaturalització està regit per un mecanisme complexe.

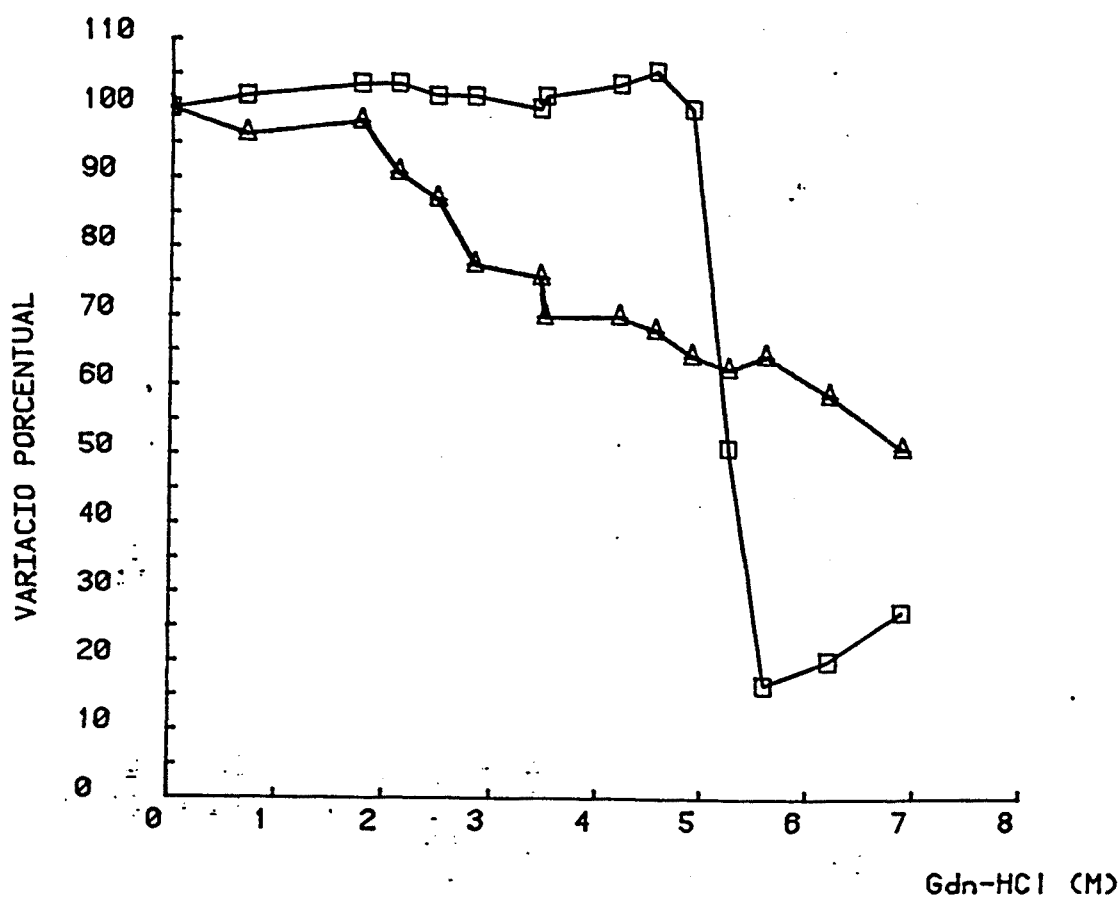


FIGURA 82.- Variació percentual de l'absorbància a 280 nm (□) i de la dispersió rotatòria òptica (Δ) en funció de la concentració de Gdn-HCl.

En altre ordre de coses, l'acció dels agents desnaturalitzants, urea i Gdn-HCl, te totes les característiques d'ésser reversible, car la diàlisi repetida de les alíquotes exposades a concentracions elevades d'aquests agents retorna la molècula als valors originals, o sigui als que presentava abans de l'acció dels agents desnaturalitzants i, l'activitat antigènica roman en les glicoproteïnes.

L'acció dels desnaturalitzants no sembla produir molècules amb diferent forma que l'original. No obstant, aixó pot deure's al fet que la molècula ja es troba en un principi en una configuració força desorganitzada.

A la vista dels resultats obtinguts es pot concloure que la glicoproteïna és molt estable i que les mesures de viscositat i DRO indiquen que el Gdn-HCl no indueix més estructura en cabdell monoestadístic que la que presenta la molècula abans de la prova. A més, l'acció desnaturalitzant és reversible essent el procés complexe.

Tot aixó concorda, en els trets principals, amb l'estudi realitzat per BYERS i VERPOORTE (1978) amb la glicoforina A, amb la diferència que els autors indiquen una irreversibilitat de l'efecte produït pel Gdn-HCl, aseveració fonamentada en el fet d'haver recuperat només el 85% del valor original del poder rotatory, si be després de la diàlisi fou recuperada tota la capacitat d'unió a l'ANS.

Un cop s'ha arribat a aquest punt cal plantejar-se una pregunta: quina és la relació de la glicoproteïna estudiada amb les clàssiques glicoproteïnes de la membrana eritrocítica, i més concretament amb la principal glicoproteïna, la glicoforina A, o amb el seu antecedent cronològic, l'anomenada *major sialoglycoprotein* o glicoforina en general.

L'existència o no d'aquesta relació s'ha intentat esbrinar per mig de la comparació d'una sèrie de característiques entre ambdues glicoproteïnes, però malgrat que la glicoforina A ha estat l'objecte de molts d'estudis, és, en canvi, freturosa de dades sobre els seus paràmetres fisicoquímics i biofísics, la qual cosa dificulta la proposada comparació, i fa que aquesta hagi de fonamentar-se, principalment, en característiques analítiques.

En primer lloc, la composició global en sucres i proteïna de la glicoproteïna estudiada (59 i 41%, respectivament) és la mateixa que la indicada per a la glicoforina, si bé dins del contingut glucídic, l'àcid siàlic només representa un 1.7% del pes total, mentre que la glicoforina en conté un 20.7%. Les altres glicoforines també tenen elevades proporcions: un 23.2% la glicoforina B, i un 19.4% la glicoforina C (FURTHMAYR et al. 1975).

L'anàlisi dels aminoàcids mostra també algunes diferències (taula 45) i un important punt de coincidència; l'absència de cisteïna.

AMINOACID	GLICOPROTEINA	GLICOFORINA
<u>Hidrofòbics</u>		
Metionina	1.2	2.0
Valina	5.9	8.4
Isoleucina	4.0	6.9
Leucina	1.2	6.4
Triptófan	1.2	-
Tirosina	1.6	3.0
Fenilalanina	1.8	1.5
<u>Neutres</u>		
Treonina	9.6	10.8
Serina	12.8	13.8
Prolina	5.9	7.4
Glicina	10.7	6.4
$\frac{1}{2}$ Cisteïna	0.0	0.0
Alanina	6.7	5.4
<u>Acídics</u>		
Aspàrtic	1.3	5.9
Glutàmic	10.2	9.9
<u>Bàsics</u>		
Lisina	7.9	4.4
Histidina	4.8	3.9
Arginina	5.5	4.4

TAULA 45.- Comparació dels continguts en aminoàcids de la glicoproteïna amb activitat A (segons els valors de la taula 25) i de la glicoforina (segons Marchesi et al. 1972). Els valors expressen % en mols. En la glicoforina no s'ha determinat el triptófan.

Pel que fa a la masa molecular, TOMITA I MARCHESI (1975) han establert que la unitat monomèrica de la glicoforina A estava formada per 131 aminoàcids i 16 cadenes glucídiques, però en la bibliografia es troben diferents valors de masa molecular assignats al suposadament mateix monòmer. Determinats per equilibri de sedimentació es troben els següents valors: 15000 (JANADO, 1973, xifra obtinguda conjuntament amb els resultats fornits per la pressió osmòtica), 24000 (JAVOID i WINZLER, 1974), 27900 i 31100 (dos possibles formes monomèriques determinades per DOHNAL et al.(1980)), 29000 (GREFRATH i REYNOLDS (1974), 55000 (FUKUDA i OSAWA, 1973), ...

Per l'anàlisi dels pèptids obtinguts per ruptura amb cianogen de brom, MARCHESI et al.(1972) obtingueren un valor de 55000.

Com es veu, tant el valor de la glicoproteïna amb activitat A obtingut per espargiment de la llum (53500 daltons), com el proporcionat per l'anàlisi d'aminoàcids (41500) estan dins dels possibles valors de la glicoforina.

De la mateixa manera, els valors obtinguts per PAGE/SDS (43000 i 76000) també se situen dins de la forquilla de mases moleculars establertes per a les glicoforines segons aquesta tècnica. Anotem que FAIRBANKS et al.(1971) assignaren uns valors de 83000 daltons per al PAS 1, de 45000 per al PAS 2 i de 25000 per al PAS 3, mentre que, per exemple, FURTHMAYR i MARCHESI (1976) calcularen, referits al dímer glicoforina A, uns valors de 53000 a 90000. La comparació encara es complica més si es té en compte que la glicoforina A està formada per un 60% de PAS 1, un 30% de PAS 2 i un 10% de PAS 3, i que aquestes zones glicoproteïniques, definides per raó de la seva tinció, com PAS, poden ésser heterogènies (FURTHMAYR et al., 1975).

En altres aspectes comparatius la glicoproteïna amb activitat A té grans similituts en allò que pertoca a la conformació deduïda per D.R.O. Els percentatges de les tres conformacions principals obtinguts amb la glicoforina A (SCHULTE i MARCHESI, 1979) són quasi iguals als obtinguts amb la glicoproteïna.

El mateix succeeix amb el valor de la viscositat intríntrica (WELSH i THOM, 1985), però aquesta és una característica concatenada amb l'anterior atés que la viscositat d'una molècula en solució és funció de la conformació que la molècula te en aquestes condicions.

Un altre analogia trobada ha estat la gran estabilitat molecular enfront els agents desnaturalitzants, semblant a la que presenta la glicoforina A (BYERS i VERPOORTE, 1978). L'alta proporció de glúcids, l'absència de ponts disulfur en la molècula, així com la conformació en cabdell monoestadístic, característiques comunes a ambdues glicoproteïnes, són la causa d'aquesta inusual estabilitat.

Per tant, no hi ha proves concluent per a poder afirmar que la glicoproteïna aïllada sigui una glicoforina. En tot cas, podria definir-se com una *quasi glicoforina* (la terminologia anglesa seria aquí molt més clara = *glycophorin-like*), o una glicoforina que ha perdut part del seu contingut en àcid siàlic (en aquest cas la glicoforina te capacitat d'inhibir l'hemaglutinació dels eritròcits tant del grup A com del B, i la glicoproteïna aïllada només inhibeix l'hemaglutinació dels eritròcits A). Així, doncs, tot apunta a presumir que la glicoproteïna aïllada és una de les moltes glicoproteïnes presents en la membrana i que degut a la seva inferior proporció -o a dificultats d'extracció- queden emmascarades per les àmplies bandes de tinció al Blue Coomassie o al PAS de les glicoproteïnes majoritàries. Anteriorment, ja s'ha indicat que, amb una metodologia diferent, GAHMBERG (1976) visualitzà més de 20 glicoproteïnes presents en la membrana de l'eritròcit humà. Com a recolzament d'aquesta hipòtesi es troba l'estudi de KARHI i GAHMBERG (1980) en el que l'activitat sanguínea A ha estat assignada a la banda 3 i a altres glicoproteïnes menors no especificades, indicant, en el mateix estudi, que no ha estat trobada l'activitat A en cap de les dues glicoforines A o B.

CONCLUSIONS

1. S'han comparat tres mètodes d'obtenció de glicoproteïnes eritrocítiques, introduint modificacions en un d'ells, les quals han proporcionat un material homogeni i reproducible.
2. En el procés de purificació de la glicoproteïna s'ha fet ús de la lectina *Helix pomatia* unida a Sepharose 6 MB.
3. S'ha aïllat una glicoproteïna a partir d'eritròcits A₁⁺ que presenta activitat de grup sanguini A, palesada per una reacció d'inhibició de l'hemaglutinació i per unió amb *Helix pomatia*.
4. S'ha definit la composició química de la glicoproteïna estant aquesta formada per un 59% de glúcids i un 41% de proteïna.
5. En la composició glucídica destaca l'alt contingut en hexosamines (28% del pes total) i la presència d'àcid siàlic.
6. En la composició en aminoàcids cal esmentar l'absència en cisteïna, el baix contingut en aminoàcids cromòfors i l'alt contingut en serina i treonina, aminoàcids que intervenen en la unió amb els sucres.
7. La glicoproteïna obtinguda presenta diferències importants amb la glicoforina A.
8. Atesa la relativament baixa absorptància pels voltants dels 280 nm i la interferència dels aminosucres amb l'enllaç peptídic, ha calgut idear un sistema de visualització de les glicoproteïnes en els eluits cromatogràfics. Aquest ha consistit en la precipitació amb àcid fosfotúngstic, precipitació que, segons les condicions en que es realitzi, no és instantània, havent-hi un temps en el que la turbidesa produïda és proporcional quantitativament a la glicoproteïna present.
9. Degut a la baixa incidència dels aminoàcids cromòfors i a que els glúcids redueixen l'absorptància desenvolupada en la tècnica de Lowry, aquesta tècnica, fent ús d'un estàndard proteïníc, no és molt adient per a la quantificació de la glicoproteïna. Com a alternativa s'han establert les condicions operatòries per a valorar la glicoproteïna en funció de la turbidesa produïda per l'adició d'etanol absolut a una solució de la glicoproteïna. En aquesta tècnica, que presenta molt bona correlació i no és destructiva, tan sols calen uns pocs µL per a l'assaig.

10. La glicoproteïna pot presentar-se en forma de dímer, essent la massa molecular aparent del monòmer de 41500 a 53500, segons la tècnica emprada.
11. La glicoproteïna presenta un comportament anòmal quan s'elueix per cromatografia de filtració per gel, fet produït per la hidratació de les cadenes glucídiques, per la presència d'àcid siàlic i per la formació d'agregats.
12. Segons l'estudi de la conformació per D.R.O., la molècula en solució presenta predominantment una conformació en cabdell monoestadístic (50%) i una alta proporció de fulla β (20%). El predomini de la conformació en cabdell monoestadístic també s'ha palesat per viscositat.
13. La glicoproteïna és inusualment estable a l'acció dels agents desnaturalitzants, urea i Gdn-HCl, acció que, per altre part, és reversible.
14. El lloc d'unió a l'ANS és molt més sensible que l'absorbància, la viscositat i la dispersió rotatòria òptica, a l'acció del Gdn-HCl.
15. Les mesures de viscositat i D.R.O. indiquen que el Gdn-HCl no provoca un desplegament cooperatiu ni induïx una estructura en cabdell monoestadístic, possiblement a causa de que la molècula ja es troba predominantment en conformació de cabdell monoestadístic.
16. El procés de desnaturalització de la glicoproteïna és complexe.

BIBLIOGRAFIA

- AHMAD, F. i SALAHUDDIN, A. (1974): *Influence of temperature on the intrinsic viscosities of proteins in random coil conformation*. *Biochemistry*, 13, 245.
- AHMAD, F. i McPHIE, P. (1978): *Intrinsic viscosities of randomly coiled glycoproteins*. *Int.J.Biochem.*, 9, 647.
- AKYYAMA, Y. i OSAWA, T. (1972): *Isolation and characterization of glycoproteins possessing inhibitory activity against various phytohemagglutinins from human group A erythrocytes*. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 353, 323.
- ALHADEFF, J.A. (1978): *Gel filtration of sialoglycoproteins*. *Biochem.J.*, 173, 315.
- AMINOFF, D., MORGAN, W.T.J. i WATKINS, W.M. (1950): *Studies in immunochemistry. 8: The isolation and properties of the human blood-group A-substances*. *Biochem.J.*, 46, 426.
- ANDERSON, R.A. i LOVRIEN, R.E. (1984): *Glycophorin is linked by band 4.1 protein to the human erythrocyte membrane skeleton*. *Nature*, 307, 655.
- ANNISON, E.F. i MORGAN, W.T.J. (1952a): *Studies in immunochemistry. 10: The isolation and properties of Lewis (Le^a) human blood-group substance*. *Biochem.J.*, 50, 460.
- ANNISON, E.F. i MORGAN, W.T.J. (1952b): *Studies in immunochemistry. 11: The isolation and properties of the human blood-group H substance*. *Biochem. J.*, 52, 247.
- AUBERT, J.P., BISERTE, G. i LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1976): *Carbohydrate-peptide linkage in glycoproteins*. *Arch.Biochem.Biophys.*, 175, 410.
- BALESTRIERI, C., COLONNA, G., GIOVANE, A., IRACE, G. i SERVILLO, L. (1978): *Second-derivative spectroscopy of proteins. A method for the quantitative determination of aromatic amino acids in proteins*. *Eur.J.Biochem.*, 90, 315.
- BARRANTES, F.J. (1975): *Nicotinic cholinergic receptor. Different compositions evidenced by statistical analysis*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 62, 407.

- BEELEY, J.G. (1977): *Peptide chain conformation and the glycosylation of glycoproteins*. Biochem.Biophys.Res.Comm., 76, 1051.
- BENCZE, W.L. i SCHMID, K. (1957): *Determination of tyrosine and triptophan in proteins*. Anal.Chem., 29, 1193.
- BERNOCO, M., DANILOVS, J., TERASAKI, P.I., CARTRON, J.P., MILLICONE, R., LE PENDU, J. i ORIOL, R. (1985): *Detection of combined ABH and Lewis glycosphingolipids in sera of H-deficient donors*. Vox Sang., 49, 58.
- BERNSTEIN, S.S., JONES, R.L., ERICKSON, B.N., WILLIAM, I.A. i MACY, I.G. (1938): *A method for the preparation of post hemolytic residue or stroma of erythrocytes*. J.biol.Chem., 122, 507.
- BEYCHOK, S. i KABAT, E.A. (1965): *Optical activity and conformation of carbohydrates. I: Optical rotatory dispersion studies on immunochemically reactive amino sugars and their glycosides milk-oligosaccharides, oligosaccharides of glucose and blood group substances*. Biochemistry, 4, 2565.
- BEZKOROVAINY, A. i DOHERTY, D.G. (1962): *Isolation and characterization of an acidic glycoprotein from normal bovine plasma*. Arch.Biochem.Biophys., 96, 491.
- BEZKOROVAINY, A., SPRINGER, G.F. i HOTTA, K. (1966): *Some physical properties of the human NN and Me-Vg blood-group antigens*. Biochem.Biophys.Acta, 115, 501.
- BJERRUM, O.J. i LUNDAHL, P. (1974): *Crossed immunoelectrophoresis of human erythrocyte membrane proteins. Immunoprecipitation patterns for fresh and stored samples of membranes extensively solubilized with non-ionic detergents*. Biochem.Biophys.Acta, 342, 69.
- BJERRUM, O.J., BHAKDI, S., KNUFFERMANN, H. i BØG-HANSEN, T.C. (1974): *Immunoelectrophoretic heterogeneity and cross-reactions of individuals spectrin components isolated by preparative sodium dodecylsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*. Biochem.Biophys.Acta, 373, 44.
- BLACK, L.W. i HOGNESS, D.G. (1969): *The lysozyme of bacteriophage λ* . J.biol.Chem., 244, 1976.
- BLACKBURN, S. (1968) en "Amino acid determination". Marcel Dekker. Nova York.

- BLADIER, D., GATTEGNO, L., FABIA, F., PERRET, G. i CORNILLOT, P. (1980): *Individual variations of the seven carbohydrate components of human erythrocyte membrane during aging in vivo*. Carbohydrate Res., 83, 371.
- BLUMENFELD, O.O. i ZVILICHOVSKY, B. (1972): *Isolation of glycoproteins from red cell membranes using pyridine*. Methods Enzymol., 28, 245.
- BOXER, D.H., JENKINS, R.E. i TANNER, M.J.A. (1974): *The organization of the major protein of the human erythrocyte membrane*. Biochem.J., 137, 531.
- BRADBURY, J.H. (1970) en "Physical principles and techniques of protein chemistry" (dirigida per S.J.Leach), cap. 11: Viscosity. Academic Press. Londres.
- BRADFORD, M.M. (1976): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein*. Anal.Biochem., 72, 248.
- BRAMLEY, T.A., COLEMAN, R. i FINEAN, J.B. (1971): *Chemical, enzymological and permeability properties of human erythrocyte ghosts prepared by hypotonic lysis in media of different osmolarities*. Biochim.Biophys.Acta, 241, 752.
- BYERS, D.M. i VERPOORTE, J.A. (1978): *Structural stability of glycophorin effects of heat and guanidine-HCl*. Biochim.Biophys.Acta, 533, 478.
- CABANTCHIK, Z.I., BALSHIN, M., BREVER, W. i ROTHSTEIN, A. (1975): *Pyridoxal phosphate. An anionic probe for protein amino groups exposed on the outer and inner surfaces of intact human red blood cells*. J.biol.Chem., 250, 5130.
- CAMPBELL, H.D. (1983): *The Lowry protein assay: Linearization of standard curve by double reciprocal plot*. Anal.Lett., 16, 1495.
- CANDY, D.J. (1980) en "Biological functions of carbohydrates", pp. 152-170. Blackie & Sons. Glasgow.
- CANTOR, C.R. i SCHIMMEL, P.R. (1980) en "Biophysical Chemistry" Part I. Cap. 2: Properties of amino acids. Freeman. San Francisco.
- CAPALDI, R.A. i VANDERKOOI, G. (1972): *The low polarity of many membrane proteins*. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A., 69, 930.

CARAWAY, K.L. i SHIN, B.C. (1972): *Specific modification, isolation and partial characterization of an erythrocyte membrane protein*. J.biol.Chem., 247, 2102.

CARTER, J.R. (1973): *Role of sulfhydryl groups in erythrocyte membrane structure*. Biochemistry, 12, 171.

CHABANEL, A., FLAMM, M., SUNG, K.L.P., LEE, M.M., SCHACHTER, D. i CHIEN, S. (1983): *Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity*. Biophys.J., 44, 171.

CHAPMAN, D. (1968): *Biological membranes*. Sci.Journal, 4, 55.

CHAPMAN, D., KAMAT, V.B. i LEVENE, R.J. (1968): *Infrared spectra and the chain organization of erythrocyte membranes*. Science, 160, 314.

CHEMICAL ENGINEERS' HANDBOOK (1950). Taula 45: Densities of pure substances, pp. 175. McGraw-Hill. Nova York.

CHEN, Y.H., YANG, J.T. i CHAU, K.H. (1974): *Determination of the helix and β -form of proteins in aqueous solution by circular dichroism*. Biochemistry, 13, 3350.

CHOU, P.Y. i FASMAN, G.D. (1974): *Conformational parameters for amino acids in helical, sheet, and random coil regions calculated from proteins*. Biochemistry, 13, 211.

CLAUSEN, H., LEVERY, S.B., NUDELMAN, E., TSUCHIYA, S. i HAKOMORI, S. (1985): *Repetitive A epitope (type 3 chain A) defined by blood group A₁-specific monoclonal antibody TH-1: Chemical basis of qualitative A₁ and A₂ distinction*. Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 82, 1199.

COGAN, U. i SCHACHTER, D. (1981): *Asymmetry of lipid dynamics in human erythrocyte membranes studied with impermeant fluophores*. Biochemistry, 20, 6396.

COHEN, C.M. (1983): *The molecular organization of the red cell membrane skeleton*. Sem.Hematol., 20, 141.

COHN, E.J. i EDSALL, J.T. (1943) en "Proteins, amino acids and peptides" pp. 155. Reinhold. Nova York.

COOK, G.M.W. i EYLAR, E.H. (1965): *Separation of the M and N blood group antigens of the human erythrocyte*. Biochim.Biophys.Acta, 101, 57.

CÔTE, R.H. i VALET, J.P. (1976): *Isolation, composition and reactivity of the neutral glycoproteins from human meconiums with specificities of the ABO and Lewis systems*. Biochem.J., 153, 63.

DANIELLI, J.F. i DAVSON, H. (1935): *A contribution to the theory of permeability of thin films*. J.cell.comp.Physiol., 5, 495.

DAVIES, M. (1979) en "Funciones de las membranas biológicas", pp. 4, Omega. Barcelona.

DECKER, R.V. i CARRAWAY, K.L. (1975): *Circular dichroism of erythrocyte membrane glycoproteins*. Biochim.Biophys.Acta, 386, 52.

DEJTER-JUSZYNSKI, M., HARPAZ, N., FLOWERS, H.M. i SHARON, N. (1978): *Blood-group ABH-specific macroglycolipids of human erythrocytes: Isolation in high yield from a crude membrane glycoprotein fraction*. Eur.J.Biochem., 83, 363.

DELANUAY, J. (1978): *Les constituants de la membrane erythrocytaire*. Path. Biol., 26, 117.

DODGE, J.T., MITCHELL, C. i HANAHAN, D.J. (1963): *Preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes*. Arch. Biochem. Biophys., 100, 119.

DOHNAL, J.C., POTEPA, L.A. i GARVIN, J.E. (1980): *The molecular weights of three forms of glycophorin A in sodium dodecyl sulfate solution*. Biochem. Biophys.Acta, 621, 255.

DOMENECH, J.M. i RIBA, M.D. (1983) en "Introducción al modelo lineal: regresión múltiple". Documentos del Laboratorio de Psicología Matemática. Universitat Autònoma de Barcelona.

DONOVAN, J.W. (1969) en "Physical principles and techniques of protein chemistry" (dirigida per S.J.Leach), Part A, Cap. 3: "Ultraviolet absorption". Academic Press. Nova York.

DUNBAR, J.C. i RALSTON, G.B.(1980): *Hidrodinamic characterization of the heterodimer of spectrin*. Biochem.Biophys.Acta, 667, 177.

DUNSTAN, R.A., SIMPSON, M.B., KNOWLES, R.W. i ROSSE, W.F. (1985): *The origin of ABH antigens on human platelets*. Blood, 65, 615.

ECONOMIDOU, J., HUGUES-JONES, N.C. i GARDNER, B. (1967): *Quantitative measurements concerning A and B antigen sites*. Vox Sang., 12, 321.

EICHBERG, J. i MOKRASCH, L.C. (1969): *Interference by oxidized lipids in the determination of the protein by the Lowry procedure*. Anal.Biochem., 30, 649.

EISENBERG, D. (1984) en "Protein and nucleic acid structure and dynamics" (dirigida per J.King), Cap.7: "Three-dimensional structure of membrane and surface proteins", pp. 220-221. Benjamin/Cummings Pub.Co. Menlo Park (California).

ELGSAETER, A., SHOTTON, D.M. i BRANTON, D. (1976): *Intramembrane particle aggregation in erythrocyte ghost. II: The influence of spectrin aggregation*. Biochim.Biophys.Acta, 426, 101.

ESTELRICH, J. i POUPLANA, R. (1985): *Estudio comparativo sobre diversas técnicas hemolíticas*. Análisis Clínicos, 10, 277.

FAIRBANKS, G., STECK, T.L. i WALLACH, D.F.H. (1971): *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*. Biochemistry, 10, 2606.

FASMAN, G.D. (1963): *Optical rotatory dispersion*. Methods Enzymol., 6, 928.

FEIZI, T. (1985): *Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens*. Nature, 314, 53.

FINNE, J., KRUSIUS, T., RAUVALA, H., KEKOMÄRI, R. i MYLLYLÄ, G. (1978): *Alkali-stable blood group A- and B-active poly(glycosyl)-peptides from human erythrocyte membrane*. FEBS Lett., 89, 111.

FINNE, J. (1980): *Identification of the blood-group ABH active glycoprotein components of human erythrocyte membrane*. Eur.J.Biochem., 104, 181.

FIORI, A., GIUSTI, G.V. i PANARI, G. (1971): *Gel filtration of ABH blood group substances. III: ABH gel filtration pattern of solubilised red cell stroma*. J.Chromatogr., 55, 365.

FISCHER, L. (1980) en "Gel filtration chromatography", Cap.5: "Experimental technique in column gel filtration chromatography" 2^a Edici6. Elsevier. Amsterdam.

FLAMM, M., BASU, M.K., SCHACHTER, D., BERTLES, J.F. i MANIATIS, A. (1982): *Role of membrane lipids in cold agglutination of human erythrocytes*. Blood, 60, 340.

FOLCH, J., ASCOLI, J., LEES, M., MEATH, J.A. i de BARON, F.M. (1951): *Preparation of lipide extracts from brain tissue*. J.biol.Chem., 191, 833.

FOLCH, J., LEES, M. i SLOANE STANLEY, G.H. (1957): *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J.biol. Chem., 226, 497.

FREIFELDER, D. en "Physical Biochemistry", Cap.4: "Measurement of pH", pp. 118-128, 2^a edici6. W.H.Freeman & Co. San Francisco.

FUKUDA, M. i OSAWA, T. (1973): *Isolation and characterization of a glycoprotein from human group O erythrocyte membrane*. J.biol.Chem., 248, 5100.

FUJITA, S. i CLEVE, H. (1975): *Isolation and partial characterization of two minor glycoproteins from the human erythrocyte membranes*. Biochem. Biophys.Acta, 382, 172.

FURTHMAYR, H., TOMITA, M. i MARCHESI, V.T. (1975): *Fractionation of the major sialoglycopeptides of the human red blood cell membrane*. Biochem. Biophys.Res.Comm., 65, 113.

FURTHMAYR, H. i MARCHESI, V.T. (1976): *Subunit structure of human erythrocyte glycophorin A*. Biochemistry, 15, 1137.

- GAHMBERG, C.G. i HAKOMORI, S.(1973): *External labeling of cell surfaces galactose and galactosamine in glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes.* J.biol.Chem., 248, 4311.
- GAHMBERG, C.G.(1976): *External labeling of human erythrocyte glycoproteins. Studies with galactose oxidase and fluorography.* J.biol.Chem., 251, 510.
- GARDAS, A. i KOSCIELAK, J.(1971): *A, B and H blood group specificities in glycoprotein and glycolipid fractions of human erythrocyte membrane. Absence of blood group active glycoproteins in the membrane of non-secretors.* Vox Sang., 20, 137.
- GARDAS, A. i KOSCIELAK, J.(1973): *New form of A-, B- and H-blood group active substances extracted from erythrocyte membranes.* Eur.J.Biochem., 32, 178.
- GARDNER, M.L.G.(1984): *Cysteine: A potential source of error in amino acid analysis of mercaptoethane sulfonic or hydrochloric acid hydrolysates of proteins and peptides.* Anal.Biochem., 141, 429.
- GENETER, B. i MANNONI, P.(1980) en "Inmunología transfusional", Cap. 10: "Sistema ABO y sus asociados". Toray. Barcelona.
- GERBAL, A. i ROPARS, C.(1976): *L'antigène B acquis.* Rev.franç.Transfus.Immunohémat., 19, 127.
- GIBBONS, R.A., MORGAN, W.T.J. i GIBBONS, M.(1954): *Studies in immunochemistry. 16: Isolation of blood-group active mucoids from ovarian cysts fluids.* Biochem.J., 60, 428.
- GLAZER, A.N. i SMITH, E.L.(1961): *Phenolic hydroxyl ionization in papain.* J.biol.Chem., 236, 2948.
- GODIN, D.V. i SCHRIER, S.L.(1972): *Modification of the erythrocyte membrane by sulfhydryl groups reagents.* J.Membr.Biol., 7, 285.
- GOODMAN, S.R. i SCHIFFER, K.(1983): *The spectrin membrane skeleton of normal and abnormal erythrocyte: a review.* Am.J.Physiol., 244, 121.
- GOODWIN, T.W. i MORTON, R.A.(1946): *The spectrophotometric determination of tyrosine and triptophan in proteins.* Biochem.J., 40, 628.

- GORDON, A.H.(1975) en "Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels", Supplement pp. 145-204. Elsevier. Amsterdam.
- GORTER, E. i GREDEL, F.(1925): *Biomolecular layers of lipoids on chromatocytes of blood*. J.exp.Med., 41, 439.
- GREEN, F.A.(1967): *Disaggregated human erythrocyte membrane and blood group activity*. J.Immunol., 99, 56.
- GREENE, R.F. i PACE, C.N.(1974): *Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, α -chymotrypsin and β -lactoglobulin*. J.biol. Chem., 249, 5388.
- GREENFIELD, N., DAVIDSON, B. i FASMAN, G.D.(1967): *The use of computed optical rotatory dispersion curves for the evaluation of protein conformation*. Biochemistry, 6, 1630.
- GREFRATH, S.P. i REYNOLDS, J.A.(1974): *The molecular weight of the major glycoprotein from the human erythrocyte membrane*. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A., 71, 3913.
- GUIDOTTI, G.(1972a): *Membrane proteins*. Annu.Rev.Biochem., 41, 731.
- GUIDOTTI, G.(1972b): *The composition of biological membranes*. Arch.Intern. Med., 129, 194.
- GWYNNE, J.T. i TANFORD, C.(1970): *A polypeptide of very high molecular weight from red blood cell membranes*. J.biol.Chem., 245, 3269.
- HAKOMORI, S. i KOBATA, A.(1974) en "The antigens", vol.II (dirigida per M.Sela) Cap.2: "Blood group antigens". Academic Press. Nova York.
- HAKOMORI, S.(1978): *Isolation of blood group ABH-active glycolipids from human erythrocyte membranes*. Methods Enzymol., 50, 207.
- HAMAGUCHI, H. i CLEVE, H.(1971): *Properties of the water dissolved membrane proteins of human proteins*. Biochim.Biophys.Acta, 233, 320.
- HAMAGUCHI, H. i CLEVE, H.(1972): *Solubilization of human erythrocyte membrane glycoproteins and separation of the MN glycoprotein from a glycoprotein with I, S and A activity*. Biochim.Biophys.Acta, 278, 271.

- HAMMARSTRÖM, S., MURPHY, L.A., GOLDSTEIN, I.J. i ETZLER, M.E.(1977): *Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine specific lectins: Helix pomatia A hemagglutinin, Soy Bean agglutinin, Lima bean lectin, and Dolichus biflorus lectin.* Biochemistry, 16, 2750.
- HARA, M., INOUE, T, AKIYAMA, K., TSUDA, R., SHICHIJO, S. i YOKOYAMA, M.M. (1982): *Species-specific glycoproteins of the human red cell membrane.* Vox Sang., 42, 151.
- HARDING, S.E. i CREETH, M.(1983): *Polyelectrolyte behaviour in mucus glycoproteins.* Biochim.Biophys.Acta, 746, 114.
- HARRIS, J.R.(1971): *Further studies on the proteins released from haemoglobin-free erythrocytes ghosts at low ionic strength.* Biochem.Biophys.Acta, 229, 761.
- HARRIS, J.R. i NEEM, I.(1978): *The subunit composition of two high molecular weight extrinsic proteins from human erythrocyte membranes.* Biochem. Biophys.Acta, 537, 495.
- HARRISON, R. i LUNT, G.G.(1977) en "Biologische Membranen". Gustav Fischer. Stuttgart.
- HEATH, B.P., MOHANDAS, N., WYATT, J.L. i SHOHET, S.B.(1982): *Deformability of isolated red cell membranes.* Biochem.Biophys.Acta, 691, 211.
- HELENIUS, A. i SIMONS, K.(1975): *Solubilization of membranes by detergents.* Biochem.Biophys.Acta, 415, 29.
- HELENIUS, A., McCASLIN, D.R., FRIES, E. i TANFORD, C.(1979): *Properties of detergents.* Methods Enzymol., 56, 734.
- HELLER, W., KLEVENST, H.B. i OPPENHEIMER, H.(1946): *The determination of particle sizes from Tyndall spectra.* J.Chem.Phys., 14, 565.
- HELLER, M. i HANAHAN, D.J.(1972): *Human erythrocyte membrane bound enzyme acetylcholinesterase.* Biochem.Biophys.Acta, 255, 251.
- HELLSTRÖM, U., DILLNER, M.L. i HAMMARSTRÖM, S.(1976): *The interaction of nonmitogenic and mitogenic lectins with T lymphocytes.* Scand.J.Immunol., 5, Suppl., 5, 45,

- HESS, H.H. i LEWIN, E.(1965): *Microassay of biochemical structural components in nervous tissues. II: Methods for cerebrosides, proteolipid proteins, and residue proteins.* J.Neurochem., 12, 205.
- HOLLADAY, L.A.(1984): *Estimation of the denaturation equilibrium constant for ribonuclease.* J.Chem.Ed., 61, 1026.
- HOWE, G., LLOYD, K.O. i LEE, L.T.(1972): *Isolation of glycoproteins from red cell membranes using phenol.* Methods.Enzymol., 28, 236.
- HUGLIN, E.B.(1972) en "Light scattering from polymer solutions", pp.207. Academic Press. Nova York.
- HVIDT, S., RODGERS, M.E. i HARRINGTON, W.F.(1985): *Temperature-dependent optical rotatory dispersion properties of helical muscle proteins and homopolymers.* Biopolymers, 24, 1647.
- IMAHORI, K.(1960): *Rotatory behaviour of protein denaturation.* Biochem. Biophys.Acta, 37, 336.
- JACOBS, R.E. i OLDFIELD, E.(1891): *NMR of membranes.* Progress in NMR Spectroscopy, 14, 113.
- JANADO, M., AZUMA, J. i ONODERA, K.(1973): *Reversible aggregation of a human erythrocyte membrane glycoprotein.* J.Biochem., 74, 881.
- JAVAID, J.I. i WINZLER, R.J. (1974): *Association of glycoproteins with the membranes. I: Isolation and molecular weight of the major glycoprotein from human erythrocytes.* Biochemistry, 13, 3635.
- JENKINS, R.E. i TANNER, M.J.A.(1977a): *The structure of the major protein of the human erythrocyte membrane.* Biochem.J., 161, 139.
- JENKINS, R.E. i TANNER, M.J.A.(1977b): *Ionic strength-dependent changes in the structure of the major protein of the human erythrocyte membrane. Characterization of the intact protein and major fragments.* Biochem.J., 161, 131.
- JENNINGS, M.L.(1984): *Oligomeric structure and the anion transport function of human erythrocyte band 3 protein.* J.Membr.Biol., 80, 105.
- JI, T.H., KIEHM, D.J. i RUSSELL MIDDAGH, C.(1980): *Presence of spectrin tetramer on the erythrocyte membrane.* J.biol.Chem., 255, 2990.

JIRGENSONS, B.(1961): *Further studies on rotatory dispersion and structure of globular proteins*. Makromol.Chem., 44/46, 123.

JIRGENSONS, B. i SPRINGER, G.F.(1968): *Conformation of blood-group and virus receptor glycoproteins from red cells and secretions*. Science, 162, 365.

JIRGENSONS, B.(1969) en "Optical rotatory dispersion of proteins and other macromolecules", Cap.XI: "Optical rotatory dispersion of glycoproteins and lipoproteins". Springer. Berlin-Heidelberg.

JOHNSON, R.M., TAYLOR, G. i MEYER, D.B.(1980): *Shape and volume changes in erythrocyte ghosts and spectrin-actin networks*. J.Cell Biol., 86, 371.

JORPES, E.(1932): *The protein component of the erythrocyte membrane or stroma*. Biochem.J., 26, 1488.

JULIANO, R.L.(1972): *The solubilization and fractionation of humane erythrocyte membrane proteins*. Biochem.Biophys.Acta, 266, 301.

KABAT, E.A.(1973) en "Carbohydrates in solution", Cap.18: "Immunochemical studies on the carbohydrate moiety of water soluble blood group A, B, H, Le^a substances and their precursor I antigens". American Chemical Society. Washington.

KAHANE, I. i RAZIN, S.(1969): *Immunological analysis of Micoplasma membranes*. J.Bact., 100, 187.

KANT, J.A. i STECK, T.L.(1973): *Specificity in the association of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with isolated human erythrocyte membranes*. J.biol.Chem., 248, 8457.

KARHI, K.K. i GAHMBERG, C.G.(1980): *Identification of blood group A-active glycoproteins in the human erythrocyte membrane*. Biochem.Biophys.Acta, 622, 344.

KATZ, E.P. (1968): *Molecular weight determination from amino acid analysis data: A numerical method*. Anal.Biochem., 25, 417.

KAWAHARA, K. i TANFORD, C. (1966): *Viscosity and density of urea and guanidine hydrochloride*. J.biol.Chem., 241, 3228.

KOCH, A.L.(1961): *Light scattering by objects of biological interest*.
Biochem.Biophys.Acta, 51, 429.

KORNBERG, R.D. i McCONNELL, H.M.(1971): *Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes*. Biochemistry, 10, 1111.

KOSCIELAK, J., PIASEK, A., GORNIAK, A. i GREGOR, A.(1973): *Structures of fucosa-containing glycolipids with H and B blood group activity and of sialic and glucosamine containing glycolipid of human erythrocyte membrane*. Eur.J.Biochem., 37, 214.

KOSCIELAK, J., MILLER-PODRAZA, H. i ZDEBSKA, E.(1978): *Isolation of poly-(glycosyl)ceramides with A, B, H and I blood-group activities*. Methods Enzymol., 50, 211.

LANGMUIR, I. (1942) en "Molecular films, the cycloton and the new biology" (dirigida per H.S.Taylor), Cap.: "Molecular films in chemistry and biology". Rutgers University Press. New Brunswick.

LAUF, P.K. i POULIK, M.D.(1968): *Solubilization and structural integrity of the human red cell membrane*. Br.J.Haematol., 15, 191.

LE PENDU, J., ORIOL, R., JUSZCZAK, G., LIBERGE, G., ROUGER, P. i SALMON, C. (1983a): *α -2-L-fucosyltransferase activity in sera of individuals with H-deficient red cells and normal H antigen in secretions*. Vox Sang., 44, 360.

LE PENDU, J., LEMIEUX, R.U., DALIX, A.M., LAMBERT, F. i ORIOL, R.(1983b): *Competition between ABO and Le gene specified enzymes. I: A Lewis related difference in the amount of A antigen in saliva of A₁ and A₂ secretors*. Vox Sang., 45, 349.

LE PENDU, J., ORIOL, R., LAMBERT, F., DALIX, A.M. i LEMIEUX, R.U.(1983c): *Competition between ABO and Le gene specified enzymes. II: Quantitative analysis of A and B antigens in saliva of ABH nonsecretors*. Vox Sang., 45, 421.

LEACH, S.J.(1966) en "A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry" (dirigida per P.Alexander i H.P.Lundgren). Vol. 4, pp. 1. Pergamon Press. Oxford.

- LEE, L.T., JANNEY, F.A., DEAS, J.E. i HOWE, C.(1978): *Comparative immunochemical study of human erythrocyte glycoproteins*. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 158, 530.
- LILJAS, L., LUNDAHL, P. i HJERTEN, S.(1974): *Selective solubilization with Tween 20 of proteins from water extracted human erythrocyte membranes analysis by gel electrophoresis in dodecylsulfate and in Tween 20*. Biochem. Biophys.Acta, 352, 327.
- LILJAS, L., LUNDAHL, P. i HJERTEN, S.(1976): *The major sialoglycoprotein of the human erythrocyte membrane. Release with a non-ionic detergent and purification*. Biochim.Biophys.Acta, 426, 526.
- LILJAS, L.(1978): *Aggregates of human erythrocytes membranes sialoglycoproteins in the presence of desoxycholate and dodecylsulfate*. Biochem. Biophys.Acta, 532, 347.
- LINDERKAMP, O. i MEISELMAN, H.J.(1982): *Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density-separated human red cells*. Blood, 59, 1121.
- LIS, H. i SHARON, N.(1972): *Soy Bean agglutinin*. Methods Enzymol., 28, 360.
- LISOWSKI, J., WASNIEWSKA, K. i LISOWSKA, E.(1980): *Circular dichroism studies of M and N blood group-specific glycoproteins and glycopeptides*. Biochem.Biophys.Acta, 622, 365.
- LOTAN, R. i NICOLSON, G.L.(1978) en "Glycoproteins and glycolipids in disease processes" (dirigida per E.F.Walborg, Jr.). Cap.14: "Membrane glycoproteins-Dynamics and affinity isolation" ACS Symposium Series, 80. Washington.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., LEWIS, FARR, A. i RANDALL, R.J.(1951): *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J.biol.Chem., 193, 265.
- LUTZ, H.U. i FEHR, J.(1979): *Total sialic acid content of glycophorins during senescence of human red blood cells*. J.biol.Chem., 254, 11177.
- MADDY, A.H. i MALCOLM, B.R.(1965): *Protein conformation in the plasma membranes*. Science, 150, 1616.

- MADDY, A.H.(1966): *The properties of the protein of the plasmic membrane of erythrocytes*. Biochem.Biophys.Acta, 117, 93.
- MADDY, A.H. i KELLY, P.G.(1971): *Acetic acid as a solvent for erythrocyte membrane proteins*. Biochem.Biophys.Acta, 241, 290.
- MADDY, A.H., DUNN, M.J. i KELLY, P.G.(1972): *The characterization of membrane proteins by centrifugation and gel electrophoresis. A comparison of proteins prepared by different methods*. Biochem.Biophys.Acta, 288, 263.
- MADDY, A.H. i DUNN, M.J.(1976) en "Biochemical Analysis of membranes"(dirigida per A.H.Maddy). Cap.6: "The solubilization of membranes". Chapman & Hall. Londres.
- MAKKAR, H.P.S., SHARMA, O.P., DAWRA, R.K. i NEGI, S.S.(1982): *Modification of Lowry's protein assay for the determination of protein in high concentrations of sodium hydroxide*. The Analyst, 107, 960.
- MANTLE, T.J.(1978) en "Techniques in protein and enzyme biochemistry" Cap.I: "Molecular weight determination by gel filtration, density gradient, centrifugation, electrophoresis and irradiation inactivation". Elsevier. Amsterdam.
- MARCHESI, V.T., i ANDREWS, E.P.(1971): *Glycoproteins: isolation from cell membranes with lithium diiodosalicylate*. Science, 159, 203.
- MARCHESI, V.T., TILLACK, T.W., JACKSON, R.L., SEGREST, J.P. i SCOTT, R.E. (1972): *Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane*. Proc.Nat.Acad.Sci, 69, 1445.
- MARCHESI, V.T., FURTHMAYR, H. i TOMITA, M.(1976): *The red cell membrane*. Annu,Rev.Biochem., 45, 667.
- MARCHESI, V.T.(1983): *The red cell membrane skeleton: Recent progress*. Blood, 61, 1.
- MARKWELL, M.A., HAAS, S.M., TOLBERT, N.E. i BIEBER, L.L.(1981): *Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures*. Methods Enzymol., 72, 296.
- MARRINK, J. i GRUBER, M.(1969): *Molecular weight determination by chromatography on Sepharose 4B*. FEBS Lett., 2, 242.

MASSA, R.G. i ARAYA, L.(1980) en "Inmunohematología básica", pp. 21. UNITEC. Còrdova (Argentina).

McGUICKIN, W.F. i MCKENZIE, B.F.(1958): *An improved periodic acid fuchsin sulfite staining method for evaluation of glycoproteins.* Clin.Chem., 4, 476.

MEAGHER, R.B. i FURST, A.(1976): *Reversed - phase high-pressure liquid chromatography of normal rat urinary carbohydrates.* J.Chromatogr., 117, 211.

MIKKELSEN, A., STOKKE, B.T. i ELGSAETER, A.(1984): *An electro-optic study of human erythrocyte spectrin dimers the presence of calcium ions does not alter spectrin flexibility.* Biochem.Biophys,Acta, 786, 95.

MIYAMOTO, S. (1979): *Blood group activity of the major sialoglycoprotein of human erythrocyte membrane by affinity chromatography.* Hirosaki Igaku, 31, 195.

MOFFITT, W. i YANG, J.T.(1956): *The optical rotatory dispersion of simple polypeptides. I.* Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A., 42, 596.

MOHANDAS, N., CHASIS, J.A. i SHOHET, S.B.(1983): *The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape.* Sem.Hematol., 20, 225.

MOLDOW, C.F., ZUCKER-FRANKLIN, D., GORDON, A., HOSPELHORN, V. i SILBER, R. (1972): *Studies on the succinylation of erythrocyte membranes.* Biochem. Biophys.Acta, 255, 133.

MOLLICONE, R., DAVIES, D.R., EVANS, B., DALIX, A.M. i ORIOL, R.(1986): *Cellular expression and genetic control of ABH antigens in primary sensory neurons of marmoset, baboon and man.* J.Neuroimmunol., 10, 255.

MOORE, S. i STEIN, W.H. (1963): *Chromatographic determination of amino acids by the use of automating recording equipment.* Methods Enzymol., 6, 819.

MORENO, C., LUNDBLAD, A. i KABAT, B.A.(1971): *Immunochemical studies on blood groups. LI: A comparative study of the reaction of the reaction of A₁ and A₂ blood group glycoproteins with human anti-A.* J.Exp.Med., 134, 439.

MORRISON, W.L. i NEURATH, H.(1953): *Proteolytic enzymes of the formed elements of human blood.* J.biol.Chem., 200, 39.

MÜHLETHALER, K.(1971): *Studies on freeze-etching of cell membranes.* Int. Rev.Cytol., 31, 1.

MÜLLER, T. i MORRISON, M.(1977): *Detection of a variant of protein 3, the major transmembrane protein of the human erythrocyte.*J.biol.Chem.,252, 6573.

NANNI, G., PALA, V., CINOLLO, G., MARINARI, U.M. i CASU, A.(1977): *Some characteristics of the residue obtained after pronase tractament of sheep erythrocyte membranes. I: Protein and phospholipid patterns.* Ital.J.Biochem., 26, 215.

NAVARRO, S., BORCHMAN, D. i BICKNELL-BROWN, E.(1984): *Lipid-protein ratios by infrared spectroscopy.* Anal.Biochem.; 136, 382.

NEWMAN, R. i UHLENBRUCK, G.(1977): *Investigation into occurrence and structure of lectin receptors on human and bovine erythrocyte, milk fat globule and lymphocyte plasma-membrane glycoproteins.* Eur.J.Biochem., 76, 149.

NICOLSON, G.L.(1976): *Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I: Cytoplasmic influence over cell surface components.* Biochem. Biophys.Acta, 457, 57.

NIKAIDO, H. (1967) en "Specificity of cell surfaces" (dirigida per B.Davis i L.Warren) pp. 95, Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.

NOZAKI, Y.(1972): *The preparation of guanidine hydrochloride.* Methods Enzymol., 27, 43.

NYMAN, P.O. i LINDSKOG, S.(1964): *Amino acid composition of various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase.* Biochem.Biophys.Acta, 85, 141.

ORIOLO, R., COOPER, J.E., DAVIES, D.R. i KEELING, P.W.N.(1984): *ABH antigens in vascular endothelium and some epithelial tissues of baboons.* Lab.Invest., 50, 514.

- ORTNER, H.M. i PACHER, O.(1972): *Der Karboxylgruppenhalt eng vernetzter gele und sein Einfluß auf die Kationselectivität.* J.Chromatogr., 71, 55.
- PADRÓS, E., DUÑACH, M., MORROS, A., SABÉS, M. i MAÑOSA, J.(1984): *Fourth-derivative spectrophotometry of proteins.* Trends Biochem.Sci., 9, 508.
- PANN, C. i KUHNS, W.J.(1972): *Differentiation of HeLa cells with respect to blood group H antigen.* Nature, N.B., 240, 22.
- PETERS, R., PETERS, J., TEWS, K.H. i BAHR, W.(1974): *A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes.* Biochem.Biophys. Acta, 367, 282.
- PETERSON, G.L.(1979): *Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.* Anal.Biochem., 100, 201.
- PHILIPPE, J.(1967): en "Les méthodes statistiques en pharmacie et en chimie" Taula XV: "Transformation d'une proportion P en probit". Masson. París.
- PICARD, J.(1977): *Glycoprotéines membranaires: Les glycoprotéines des érythrocytes.* Rev.Franç.Transfus.Immunohémat., 20, 351.
- PICKERING, M. i CRABTREE, R.H.(1981): *Protein denaturation.* J.Chem.Ed., 58, 513.
- PINTO DA SILVA, P., DOUGLAS, S.D. i BRANTON, D. (1971): *Localization of A antigen sites on human erythrocytes-ghosts.* Nature, 232, 194.
- PONDER, E.(1942): *On properties of the red cell ghosts. I: Volume and shape changes during haemolysis and reversible haemolysis.* J.exp.Biol., 18, 257.
- PONDER, E. (1955) en "Protoplasmodologia: Handbuch der Protoplasmaforschung" Num.10, pp.43. Springer. Viena.
- PORATH, J.(1967): *The development of chromatography on molecular sieves.* Lab.Pract., 16, 838.
- POULIK, M.D. i LAUF, P.K.(1969): *Some physico-chemical and serological properties of isolated protein components of red cell membranes.* Clin.exp.Immunol., 4, 165.

PROKOP, O., UHLENBRUCK, G. i KÖHLER, W.(1968): *A new source of antibody-like substances having anti-blood group specificity. A discussion on the specificity of Helix agglutinins.* Vox Sang., 14, 321.

QUINN, P.J.(1976) en "The molecular biology of cell membranes", pp.84. McMillan Press. Londres.

RANDERATH, K.(1965) en "Dünnschicht-Cromatographie". Verlag Chemie. Winheim.

READ, S.M.i NORTHCOTE, D.H.(1981): *Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein.* Anal.Biochem., 116, 53.

REED, C.F., SWISHER, S.N., MARINETTI, G.V. i EDEN, E.G.(1960): *Studies of the lipids of the erythrocyte. I: Quantitative analysis of the lipids of normal human red blood cells.* J.Lab.Clin.Med., 56, 281.

ROBERTSON, J.D.(1959): *The ultrastructure of cell membranes and their derivatives.* Biochem.Soc.Symp., 16, 3.

ROBERTSON, J.D.(1981): *Membrane structure.* J.Cell.Biol., 91, 189.

ROSENBERG, S.A. i GUIDOTTI, G.(1968): *The protein of human erythrocyte membranes. I: Preparation, solubilization, and partial characterization.* J. biol.Chem., 243, 1985.

ROSENTHAL, A.S., KREGENOW, F.M. i MOSES, H.L.(1970): *Some characteristics of a Ca^{2+} -dependent ATPase activity associated with a group of erythrocyte membrane proteins which form fibrils.* Biochim.Biophys.Acta, 196, 254.

ROUGER, P. i SALMON, C.(1982): *Tissue distribution and development of blood group antigens.* Blood Transf.Immunohemat., 25, 643.

RUBIN, C.S., ROSENFELD, R.D. i ROSEN, O.M.(1973): *Studies on the orientation of cyclic AMP-dependent protein kinase of human erythrocyte membranes.* J.biol.Chem., 247, 6135.

- SATTSANGI, P.D., SATTSANGI, S. i GROSSMAN, H.(1982): *Isolation of Soybean agglutinin (SBA) from Soy meal*. J.Chem.Ed., 59, 977.
- SCHACHTER, H., MICHAELS, M.A., TILLEY, C.A., CROOKSTON, M.C. i CROOKSTON, J.H.(1973): *Quantitative differences in the N-acetyl-D-galactosaminyltransferases produced by human A¹ and A² genes*. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 70, 220.
- SCHECHTER, B., CONWAY-JACOBS, A. i SELA, M.(1971): *Conformational changes in a synthetic antigen induced by specific antibodies*. Eur.J.Biochem., 20, 321.
- SCHELLMAN, J.A. i SCHELLMAN, C.(1962) en "The proteins" (dirigida per H.Neurath). 2^a edició. Vol.II, pp.1. Academic Press. Nova York.
- SCHENKEL-BRUNNER, H. i TUPPY, H.(1973): *Enzymatic conversion of human blood group -O-erythrocytes into A₂ and A₁ cells by α -N-acetyl-D-galactosaminyltransferases of blood group A individuals*. Eur.J.Biochem., 34, 125.
- SCHMID, K.(1953): *Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXIX: Separation from human plasma of polysaccharides, peptides and proteins of low molecular weight. Crystallization of an acid glycoprotein*. J.Am.Chem. Soc., 75, 60.
- SCHUBERT, D., POENSGEN, J. i GERHARD, W.(1972): *Association of protein fractions and lipids from human erythrocyte membranes. I: Strongly bound protein fraction*. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 353, 1034.
- SCHULTE, T.H. i MARCHESI, V.T.(1979): *Conformation of human erythrocyte glycophorin A and its constituent peptides*. Biochemistry, 18, 275.
- SEGHIER, F., DJAFRI, M., PAGÈS, A. i ABABEI, L.(1977): *Essais de solubilization des antigènes B de la membrane érythrocytaire*. Acta biol.med.germi, 36, 875.
- SEGREST, J.P., JACKSON, R.L., ANDREWS, E.P. i MARCHESI, V.T.(1971): *Human erythrocyte membrane glycoprotein: A re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis*. Biochem.Biophys. Res. Commun., 44, 391.

- SELA, M.(1969): *Antigenicity: some molecular aspects*. Science, 166, 1365.
- SERVILLO, L., COLONNA, G., BALESTRIERI, C., RAGONE, R. i IRACE, G.(1982): *Simultaneous determination of tyrosine and tryptophan residues in proteins by second-derivative spectroscopy*. Anal.Biochem., 126, 251.
- SHARON, N.(1975): *Les sucres dans la vie sociale des cellules*. La Recherche, 52, 16.
- SHEETZ, M.P.(1983): *Membrane skeletal dynamics: Role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape*. Sem.Hematol., 20, 175.
- SHELTON, R.L. i LANGDON, R.G.(1984): *Quantitation of the major proteins of the human erythrocyte membrane by amino acid analysis*. Anal.Biochem., 140, 366.
- SIEGEL, L.M. i MONTY, K.J.(1966): *Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulphite and hydroxylamine reductases*. Biochem.Biophys.Acta, 112, 346.
- SIEGEL, D. i BRANTON, D.(1982): *Human erythrocyte band 4.9*. J.Cell.Biol., 95, 265a.
- SIMMONDS, R.J. i YON, R.J.(1977): *Protein chromatography on adsorbents with hydrophobic and ionic groups. Purification of human erythrocyte glycophorin*. Biochem.J., 163, 397.
- SINGER, S.J. i NICOLSON, G.L.(1972): *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 175, 720.
- SINGER, S.J.(1974): *The molecular organization of membranes*. Annu.Rev.Biochem., 43, 805.
- SPANDE, T.F. i WITKOP, B.(1967): *Determination of the tryptophan content of proteins with N-bromosuccinimide*. Methods Enzymol., 11, 498.

- SPEE-BRAND, R., STROUS, J.A.M. i KRAMER, M.F.(1980): *Isolation and partial characterization of rat gastric mucous glycoprotein*. Biochim.Biophys.Acta, 621, 104.
- SPIRO, R.G.(1966): *Analysis of sugars found in glycoproteins*. Methods Enzymol., 8, 3.
- SPIRO, R.G.(1972): *Study of the carbohydrates of glycoproteins*. Methods Enzymol., 28, 3.
- STECK, T.L. i YU, J.(1963): *Selective solubilization of proteins from red blood cells membranes by proteins perturbants*. J.Supramol.Struct., 1, 220.
- STECK, T.L.(1974): *The organization of proteins in the human red blood cell membrane*. J.Cell Biol., 62, 1.
- STEIM, J.M., TOURTELLOTTE, M.E., REINERT, J.C.(1969): *Calorimetric evidence for the liquid crystalline state of lipids in a biomembrane*. Proc.Nat.Acad. Sci., U.S.A., 63, 104.
- STEWART, M.W.(1979) en "Inmunoquímica", pp.4. Omega, Barcelona.
- STIBENZ, D. i GEYER, G.(1980): *Conformational calculations of the N-terminal hydrophilic segment of human erythrocyte glycophorin*. Folia Hematol., Leipzig, 107, 787.
- SVENNERHOLM, L. i FREDMAN, P.(1980): *A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides*. Biochem.Biophys.Acta, 617, 97.
- TANFORD, C.(1955) en "Electrochemistry in Biology and Medicine" (dirigida per T.Shedlovsky). Cap.13: "Hydrogen ion titration curves of proteins". Wiley and Sons. Nova York.
- TANFORD, C., HAVENSTEIN, J.D. i RANDE, D.G.(1956): *Phenolic hydroxyl ionization in proteins. II: Ribonuclease*. J.Am.Chem.Soc., 77, 6409.
- TANNER, M.J.A. i GRAY, W.R.(1971): *The isolation and functional identification of a protein from the human erythrocyte ghost*. Biochem.J., 125, 1109.

- TILLACK, T.W., MARCHESI, S.L., MARCHESI, V.T. i STEERS, E.(1970): *A comparative study of spectrin: a protein isolated from red blood cell membranes*. Biochem.Biophys.Acta, 200, 125.
- TOMITA, M. i MARCHESI, V.T.(1975): *Amino acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocytes glycophorin*. Proc.Nat.Acad.Sci., U.S.A., 72, 2964.
- TOMODA, A., KODAIRA, K., TANIMOTO, K. i YONEKAMA, Y.(1984): *Isolation of human erythrocyte membranes in glucose solution*. Anal.Biochem., 140, 386.
- TUCKOVA, L.(1979): *Purification and chemical characterization of antigens from sheep erythrocytes*. Folia Microbiol., 24, 495.
- TURNER, J.D. i ROUSER, G.(1970): *Precise quantitative determination of human blood lipids by thin-layer triethylamino ethylcellulose column chromatography*. Anal.Biochem., 38, 423.
- UNWIN, N. i HENDERSON, R.(1984): *Proteinas de membrana*. Investigación y Ciencia, 91, 46.
- URRY, D.W., MASOTTI, L. i KRIVACIC, J.R.(1971): *Circular dichroism of biological membranes. I: Mitochondria and red blood cell ghosts*. Biochem.Biophys.Acta, 241, 600.
- VIITALA, J., FINNE, J. i KRUSIUS, T.(1982): *Blood group A and H determinants in polyglycosyl peptides of A₁ and A₂ erythrocytes*. Eur.J.Biochem., 126, 401.
- WADA, A., TSUBOI, M. i KONISHI, E.(1961): *Optical rotatory dispersion of the β -form of the polypeptide chain*. J.Phys.Chem., 65, 1119.
- WALBORG, E.F., Jr.(1978) en "Glycoproteins and glycolipids in disease processes" (dirigida per E.F.Walborg, Jr.). Cap.1:"Current concepts of glycoprotein structure". ACS Symposium, 80, Washington.
- WANG, K. i RICHARDS, F.M.(1974): *An approach to nearest neighbor analysis of membrane proteins. Application to the human erythrocyte membrane of a method employing cleavable cross-linkages*. J.biol.Chem., 249, 8005.

- WARREN, L.(1959): *The thiobarbituric acid assay of sialic acid*. J.biol. Chem., 234, 1971.
- WARREN, J.R. i GORDON, J.A.(1966): *On the refractive indices of aqueous solutions of urea*. J.Phys.Chem., 70, 297.
- WATKINS, W.M.(1966a): *Blood group substances*. Science, 152, 172.
- WATKINS, W.M.(1966b) en "Glycoproteins. Their composition, structure and function" (dirigida per A.Gottschalk). Cap.11. Sect.7: "Blood group specific substances". Elsevier. Amsterdam.
- WEED, R.I., REED, C.F. i BERG, G.(1963): *Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membrane?* J.Clin.Inv., 42, 581.
- WELSH, E.J., THOM, D., MORRIS, E.R., REES, D.A.(1985): *Molecular organization of glycophorin A: Implications for membrane interactions*. Biopolymers, 24, 2301.
- WHITTEMORE, N.B., TRABOLD, N.C., REED, C.F. i WEED, R.J.(1969): *Solubilized glycoprotein from human erythrocyte membrane possessing blood group A-, B-, and H-activity*. Vox Sang., 17, 289.
- WILLIAMS, C.A. i CHASE, M.W.(1977) en "Methods in immunology and immunochemistry". Vol.4. Cap.16:"Agglutination and flocculation". Academic Press. Londres.
- WINDER, A.F. i GENT, W.L.G.(1971): *Correction of light-scattering errors in spectrophotometric protein determinations*. Biopolymers, 10, 1243.
- WINZLER, R.J.(1955): *Determination of serum glycoproteins*. Meth.Biochem. Anal., 2, 279.
- YAMAKAWA, T., IRIE, R. i IWANAGA, M.(1960): *The chemistry of lipid of post-hemolytic residue or stroma of erythrocytes*. J.Biochem., 48, 490.
- YANG, J.T. i DOTY, P.(1957): *The optical rotatory dispersion of polypeptides and proteins in relation to configuration*. J.Am.Chem.Soc., 79, 761.

YOKOI, T., IWASA, M. i SAGISAKA, K.(1983): *Immunochemical investigations of Rh(D) activity detected in band 3 of red cell membrane.* Tohoku J.Exp., Med., 141, 217.

ZAHLER, P.(1968): *Blood group antigens in relation to chemical and structural properties of the red cell membrane.* Vox Sang., 15, 81.

ZAHLER, P. i WEIBEL, E.R.(1970): *Reconstitution of membranes by recombining proteins and lipids derived from erythrocyte stroma.* Biochem.Biophys.Acta, 219, 320.

ZAMYATNIN, A.A.(1984): *Amino acid, peptide, and protein volume in solution.* Ann.Rev.Biophys.Bioeng., 13, 145.

ZWAAL, R.A. i ROELOFSEN, B.(1976) en "Biochemical analysis of membranes" (dirigida per A.H.Maddy). pp.352-377. Wiley and Sons. Nova York.

