

APÈNDIXS TREBALL II

Apèndix I. MISCROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE MOSTRES DE CK2 AGREGADES

Els resultats mostrats al treball II ens van donar peu a intentar una aproximació experimental més estructural que completés les dades prèviament obtingudes en que s'observava que, el domini C-terminal de grp94 protegia a la CK2 α enfront d'agregació induïda per xoc tèrmic.

A la bibliografia estava descrit que, tant els agregats com les partícules proteiques individuals, eren estructures grans que es podien visualitzar per microscòpia electrònica de transmissió (Lee et al., 1997; Saito et al., 1999).

Com a control de la formació d'agregats i per posar a punt la tècnica es va escollir l'enzim malat deshidrogenasa (MDH) utilitzat habitualment en assajos d'activitat xaperona i del que hi havia imatges de microscòpia publicades.

Materials i Mètodes

Materials. Reixetes de microscòpia electrònica 300 mesh (Sigma), mica (Balzers Union), pinces de rellotger Dumont n^o 5 o 7, acetona (Merck), PBS filtrat, espectrofotòmetre Cary 400, acetat d'uranil (Sigma), malat deshidrogenasa de cor de porc (LaRoche), α i β CK2 humanes recombinants, grp94-CT humana recombinant (purificades segons Roher et al, 2001).

Preparació de reixetes per microscòpia electrònica. En primer lloc cal dipositar una capa de carboni de 2 nm sobre mica exfoliada que posteriorment serà dipositada sobre la reixeta. Aquest procés es realitza al Servei de Microscòpia (UAB) utilitzant un evaporador Bal-Tec. S'exfolia la mica, prèviament tallada a la mida de la plataforma giratòria, amb unes pinces. Es col·loca la mica a la plataforma i es deixa fer el buit un mínim de 30 min, fins que arribi a $2 \cdot 10^{-3}$ mbar. L'evaporador es programa amb els següents paràmetres: layer 2, 2 nm gruix, 90 mA, 1.95 kV. Disparar (*shutter*) fins que el display de gruix de carboni arribi a 2 nm.

En segon lloc cal rentar les reixetes amb acetona (per eliminar possibles restes orgàniques) i després amb aigua i finalment cal assecar-les.

L'última etapa consisteix en transferir la capa de carboni de la mica a les reixetes. Aquest pas es realitza amb l'ajut d'un bastidor de PVC i niló submergit en aigua on hi tenim dipositades les reixetes. La mica en entrar en contacte amb l'aigua allibera la capa de carboni que restarà surant damunt l'aigua. Quan, amb molta cura, eliminem l'aigua el carboni quedarà dipositat sobre les reixetes.

Preparació de les mostres. Les mostres que s'havien d'observar al MET eren prèviament tractades seguint els següents passos:

- 1.- Es realitzava un assaig d'agregació a 45°C durant 60 min utilitzant l'espectrofotòmetre metabolitzat (Cary 400). Les mostres valorades van ser CK2 α (1 μ M), CK2 $\alpha\beta$ (1:1, 1 μ M), CK2 α +grp94-CT (1:1, 1 μ M) i MDH (1 i 2 μ M) com a control d'agregació a 45 °C (veure les corbes d'agregació a la Figura 1).
- 2.- Es separava una alíquota de 100 μ l de cada una de les mostres i es guardava en gel fins que eren utilitzades (mostres per observar al MET). Els 900 μ l que quedaven es centrifugaven 60 min, a 4°C i 15000xg. Es separava el pellet del sobrenedant i es liofilitzaven els sobrenedants. Els liofilitzats obtinguts es resuspenien en 50 μ l de tampó de mostres reductor i es valoraven mitjançant SDS/PAGE i/o western blott junt amb els pèl·lets, tractats de la mateixa forma.
- 3.- Deposició de mostres sobre la reixeta: es dipositaven 10 μ l de cada mostra sobre les reixetes durant 5 min. S'assecava l'excés de mostra amb un tros de paper de filtre, anant molt amb compte per evitar arrossegar la capa de carboni.
- 4.- Tinció de les mostres: La tinció negativa consisteix en l'addició de sals de metalls pesants en solució, de forma que aquests s'acumulin als contorns de la mostra (Bozzola et al., 1992). Es va realitzar una tinció negativa de les mostres amb 2% d'acetat d'uranil (preparat fresc en aigua i protegit de la llum), dipositant 10 μ l del colorant sobre la reixeta i tenyint durant 1 min. S'assecava l'excés amb un tros de paper de filtre.
- 5.- Observació de les mostres: les mostres es visualitzaven al Servei de microscòpia de la UAB amb un microscopi Hitachi H7000 operant a 75 kV a 8.000 o 80.000 augments depenent de si s'observaven agregats o no agregats respectivament. L'adquisició d'imatges es realitzava prenent fotografies amb el mateix microscopi amb un temps d'exposició entre 1 i 2 s. Els negatius eren escanejats al LAFEAL (UAB) i es procedia al tractament de la imatge i a la presa de mesures.

Resultats i Discussió

La MDH és una proteïna homodimèrica de 35 kDa localitzada principalment a citosol i mitocondria que s'utilitza habitualment per valorar l'activitat xaperona de diferents xaperones moleculars. Si sotmetem l'enzim a temperatures de 45°C forma agregats insolubles que observats al MET amb tinció negativa, són com una gran xarxa proteica (magnificació 8.000x). L'agregació de l'enzim és massiva i no s'observen camps sense agregats (Figura 1). A una temperatura de 25 °C la MDH no pateix agregació i a 80.000 augments es poden observar partícules esfèriques individualitzades de mida entre 12 i 35 nm (Figura 1). Les mides i la forma esfèrica de les partícules observades, està d'acord amb els treballs ja publicats i les imatges adquirides coincideixen amb les que apareixen a la literatura sobre l'agregació de la malat deshidrogenasa (Saito et al., 1999).

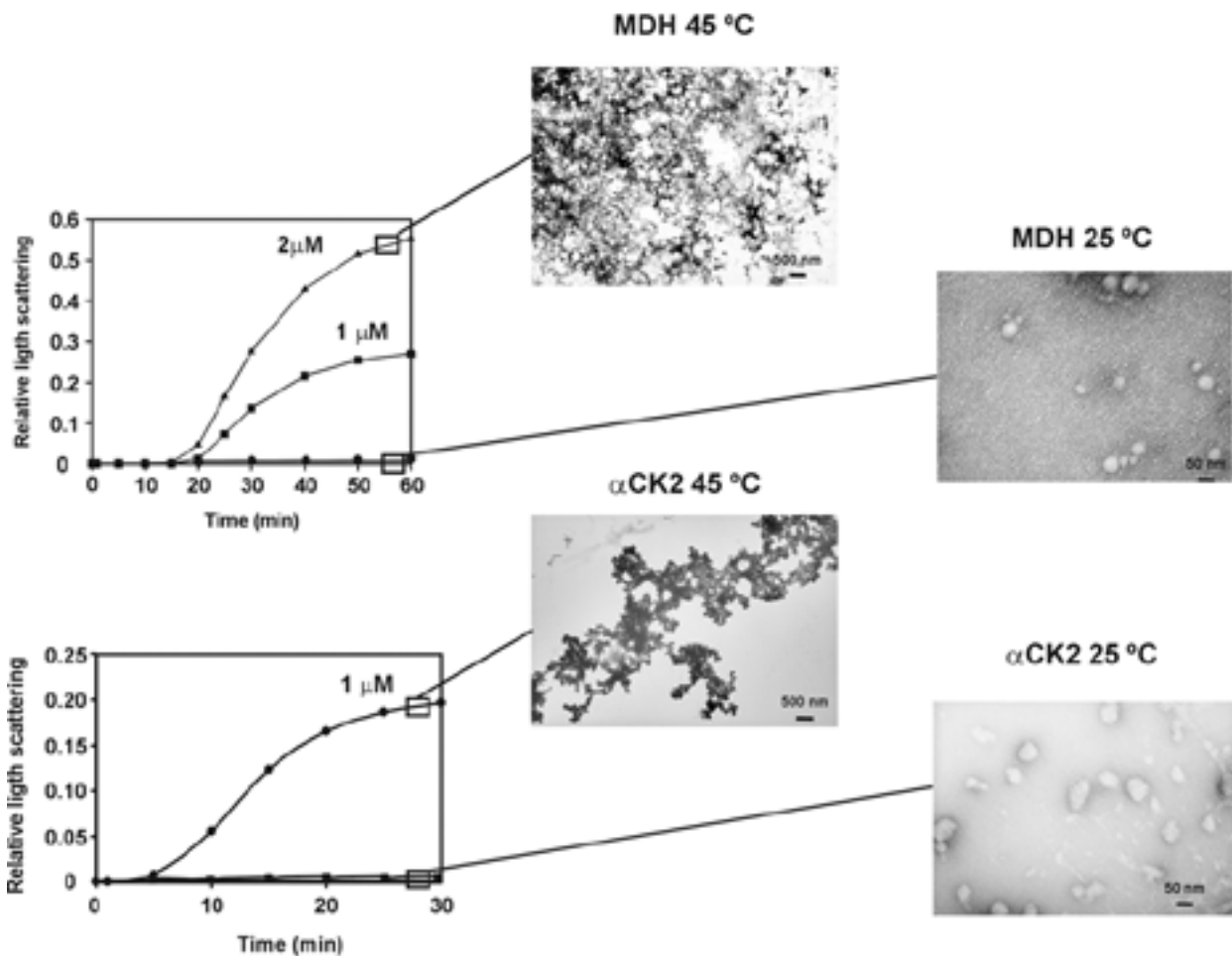


Figura 1. Agregació induïda per xoc tèrmic de CK2α i MDH. Les gràfiques mostren les corbes d'agregació de la MDH (gràfic superior) i de la CK2α (gràfic inferior) a 45°C i 25°C tal i com s'indica en els diferents pannells. Les fotografies de microscòpia van ser adquirides a partir de la tinció de mostres d'agregats o no agregats d'ambdues proteïnes.

Amb la tinció negativa esperaríem veure el contorn de les mostres, que és on s'hauria de dipositar l'acetat d'uranil. En el cas de les mostres no agregades el patró de tinció negativa és l'esperat, no així en les mostres agregades en que sembla que els agregats proteics estiguin recoberts d'acetat d'uranil. Creiem que la grandària dels agregats provoca que les sals de metall recobreixin les estructures i que tinguem un contrast similar al que observaríem amb una tinció positiva.

La subunitat catalítica de la proteïna quinasa CK2 sotmesa a xoc tèrmic forma grans agregats insolubles, que al MET donen la imatge d'una xarxa proteica bastant diferent de la xarxa d'agregats de la MDH (Figura 1). Sembla que els agregats formats són més compactes i tenen una estructura més definida. La mida de les partícules de la mostra de CK2 α a 25 °C, observades a 80.000 augments i la mida individual de les partícules esfèriques que formen els agregats són aproximadament iguals (40 nm). Cal dir que en la mostra de CK2 α incubada a 25°C s'observen diferents formes i mides de partícules. A la literatura (Valero et al. 1995) està descrit que l'holoenzim adquireix estructura quaternària diferent segons la força iònica del medi. A una força iònica d'entre 0.1-0.2 M NaCl pot formar quatre tipus d'estructures: *ring-like* (36.6 nm) estructura majoritària a 0.2 M NaCl, filaments prims i gruixuts majoritaris a 0.1 M NaCl i una estructura anomenada protòmer que correspon a l'holoenzim que la trobaríem minoritàriament a 0.1 i a 0.2 M NaCl però que passa a ser la forma predominant a 0.5 M NaCl. Així doncs, teòricament, a força iònica de 0.15 M NaCl es poden observar les 4 formes estructurals de la CK2 (*protomer*, *ring like* i filaments prims i gruixuts). En les nostres preparacions de CK2 α la força iònica és de 0.15 M NaCl i el que hem observat són partícules esfèriques d'aproximadament 40 nm que coincideix amb la mida de 36.6 nm de les estructures *ring-like* i partícules més petites que es podrien correspondre amb una estructura similar al *protòmer* (mides de 19 nm). Cal dir que aquestes estructures les observem amb la CK2 α i que per tant sembla que la CK2 β en el nostre cas, no és imprescindible per l'oligomerització.

A partir dels assajos d'agregació basats en tècniques espectroscòpiques hem descrit que la CK2 α agrega a 45 °C però que en presència de CK2 β o de grp94-CT no es produeix agregació (veure treball 2). En el cas de la subunitat CK2 β la protecció en front de xoc tèrmic és completa si prèviament reconstituïm l'enzim, però no és capaç de protegir totalment a la subunitat catalítica si es reconstitueix l'enzim a l'iniciar-se l'assaig d'agregació. En les mostres de CK2 valorades per MET

el que observem és que efectivament no es formen grans xarxes d'agregats però si veiem petits nuclis d'agregació (magnificació 80.000 vegades) que es podrien correspondre amb aquella $CK2\alpha$ que no s'ha unit a $CK2\beta$. No hem pogut adquirir imatges prou clares que ens donin informació estructural de l'holoenzim (Figura 2 A i B).

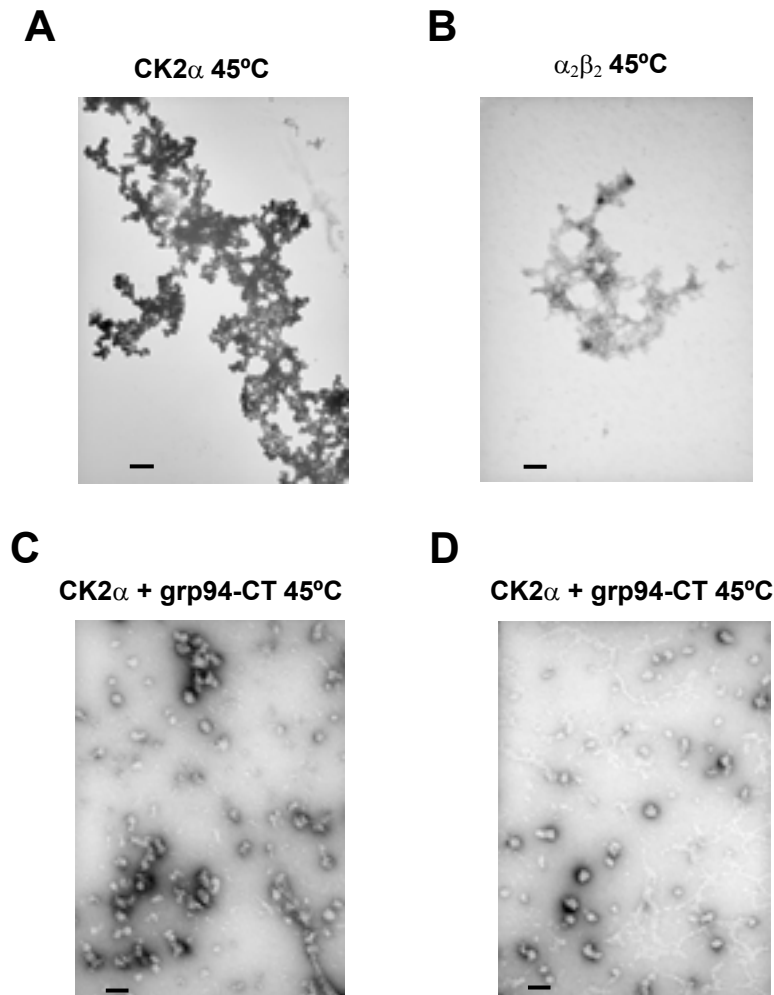


Figura 2. Efecte protector de grp94-CT sobre l'agregació de $CK2\alpha$ induïda per incubació de les mostres a 45°C. (A) Fotografia representativa d'agregats de $CK2\alpha$. (B) Fotografia representativa de mostres d'holoenzim reconstituït. (C) i (D) Fotografies representatives de $CK2\alpha$ incubada en presència de grp94-CT.

Pel que fa a les mostres de $CK2\alpha$ sotmeses a xoc tèrmic en presència de grp94-CT, les imatges de microscòpia confirmen totalment els experiments de *scattering* de llum en que veiem que la protecció enfront d'agregació és completa a relacions molars superiors a 1. No observem cap agregat de $CK2\alpha$ i el que veiem són partícules esfèriques de diferents mides. L'aspecte i mida de les partícules és diferent de les partícules observades amb preparacions de $CK2\alpha$ sola, i es podrien

correspondre a complexos de CK2 α /grp94 (Figura 2 C i D). Així i de forma indirecte la microscòpia aporta indicis sobre l'existència d'una associació física entre CK2 α i grp94. A les mostres de grp94 incubades a 45 i 25°C en que no observem agregació mitjançant *scattering* de llum, tampoc s'observa cap agregat utilitzant microscòpia (imatge no mostrada). Tal i com passava amb les preparacions d'holoenzim, no podem extreure cap informació estructural sobre grp94 de les imatges obtingudes.

Bibliografia específica

Bermúdez, T. (1998) Treball de Tesi doctoral. UAB.

Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. i Vierling, E. (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. *EMBO J.* **16**, 659-671.

Saito, Y., Ihara, Y., Leach, M. R., Cohen-Doyle, F. M. i Williams, D. B. (1999) Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J.* **23**, 6718-6729.

Valero, E., De Bonis, S., Filhol, O., Wade, R. H., Langowski, J., Chambaz, E. M. i Cochet, C. (1995) Quaternary structure of casein kinase 2. Characterization of multiple oligomeric states and relation with its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 8345-8352.

Apèndix II. ASSAJOS D'AGREGACIÓ AMB CITRAT SINTASA

La demostració directa de que grp94 tenia activitat xaperona utilitzant la CK2 α com a substrat, ens va portar a intentar esbrinar si la grp94 podria ser funcionalment una xaperona amb un ventall més ampli de substrats. Per tal de determinar si grp94 tenia una funció xaperona sobre altres substrats es va assajar un enzim, la Citrat Sintasa (CS), utilitzat rutinàriament en assajos d'agregació *in vitro* per monitoritzar l'activitat xaperona d'hsp90 (Buchner et al., 1998). D'altra banda i ja que ens interessava fer assajos d'agregació amb grp94 fosforilada per CK2, es feia necessari trobar un substrat diferent de CK2 α per tal d'evitar interferències amb la monitorització de l'agregació en mostres de grp94 fosforilades amb CK2.

Materials i Mètodes

Assaig d'agregació. La metodologia utilitzada segueix bàsicament, el protocol descrit per Buchner et al. (1998) amb algunes modificacions per adaptar-lo i fer-lo comparable a l'assaig d'agregació posat a punt per la CK2 α .

La CS de cor de porc utilitzada, era comprada en una solució de persulfat amònic (La Roche) i havia de ser dialitzada O/N a 4°C enfront de tampó 50 mM Tris HCl pH 7.5. Al matí següent es centrifugava durant 30 min, a 13000xg i 4°C i es recuperava el sobrenedant. La concentració de proteïna és determinava per absorbància a 280 nm ($\epsilon = 1.78 \text{ UDO M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'enzim s'aliquotava en fraccions de 300 μl i es descongelava en el moment del seu ús; és recomanable no tornar a congelar l'enzim.

L'agregació de la CS es va induir en les mateixes condicions utilitzades per la CK2 α , és a dir incubant les mostres a 40 o 45 °C i monitoritzant l'agregació al llarg de 90 minuts. L'agregació es va seguir mesurant l'*scattering* de llum a 360 nm utilitzant un espectrofluorímetre Perkin-Elmer per les mostres incubades a 40 °C o un espectrofotòmetre Cary-400 per les mostres incubades a 45 °C. En el cas que es volgués realitzar un assaig d'activitat CS es retiraven alíquotes de les mostres de l'assaig d'agregació als temps indicats.

Assaig d'activitat CS. L'activitat CS s'assajava seguint el protocol de Srere et al., (1963) que consisteix en seguir l'increment d'absorbància a 412 nm del DTNB reduït. L'àcid oxalacètic (OAA) reacciona amb l'acetil CoEnzimaA per formar citrat i CoEnzimaA, en una reacció catalitzada per la CS, finalment el CoenzimaA reacciona amb el DTNB reduint-lo.

El DTNB i l'OAA van ser adquirits a Sigma i l'acetilCoenzimaA a La Roche. Els estocs (10 mM OAA, 5 mM acetilCoA i 10 mM DTNB) s'emmagatzemaven a -20 °C en alíquotes, fins al moment del seu ús. El DTNB calia guardar-lo protegit de la llum.

Assaig: 930 µl de tampó TE (50 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8)
 10 µl de OAA 10 mM
 10 µl de DTNB 10 mM
 30 µl de acetil CoA 5 mM
 20 µl de mostra a assajar

S'utilitzaven cubetes de plàstic d'1 cm de pas de llum i l'assaig es realitzava a 25°C i 412 nm a l'espectrofotòmetre Cary 400.

La barreja d'assaig es feia directament a la cubeta de lectura, que s'agitava just en el moment d'afegir l'enzim i ràpidament s'introduïa a l'espectrofotòmetre i es seguia l'increment d'absorbància a 412 nm del DTNB reduït.

Assaig d'agregació amb mostra fosforilada. El domini C-terminal de grp94 es fosforilava amb proteïna quinasa CK2 humana recombinant. Abans de realitzar l'assaig de fosforilació es reconstituïa l'enzim a partir de les subunitats CK2 α i CK2 β pures que es barrejaven en quantitats equimolars en tampó de reconstitució (150 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% BSA) i s'incubaven 30 min a 30 °C. La fosforilació es realitzava amb el mètode habitual (Trujillo et al, 1998) utilitzant 125 µM GTP com a donador de fofat. Per tal de minimitzar les interferències en l'assaig d'agregació posterior s'utilitzaven 20 pmol de CK2 i es deixava fosforilar durant 3 hores. La concentració final de grp94 fosforilada era de 0.75 µM.

L'assaig d'agregació es va fer com s'ha descrit en l'apartat anterior amb 0.5 µM de CS i 0.125 µM de grp94 fosforilada. Els controls d'agregació es feien en presència de la solució de fosforilació (250 mM EDTA, β -glicerolfosfat sòdic pH 7) i de 20 pmols de CK2 autofosforilada.

Els temps de fosforilació màxima i les concentracions de CK2 utilitzades a l'assaig es van optimitzar tal i com s'ha detallat a l'apèndix III.

Resultats i Discussió

Dels assajos d'agregació amb citrat sintasa (CS) se'n poden extreure resultats que confirmen les dades prèvies sobre activitat xaperona obtingudes utilitzant la CK2 α com a substrat (Trellall II). Tal i com es pot veure a la Figura 1 (pannell A) la CS agrega en les mateixes condicions que la CK2 α tot i que les cinètiques d'agregació són diferents. La CS inicia l'agregació a partir dels 25 minuts d'incubació a temperatura de xoc tèrmic, mentre que la CK2 α mostra major sensibilitat a temperatura i inicia l'agregació als 5 minuts després de començar la incubació. L'agregació arriba a ser completa als 90 minuts mentre que per la CK2 el plató d'agregació màxima s'assolia als 30 minuts. El domini C-terminal de grp94 inhibeix l'agregació de la CS a relacions molars petites i assoleix una activitat protectora màxima a una relació molar d'1:1. Així doncs, podem dir que la grp94 es mostra molt més eficient en la seva activitat xaperona sobre CS que sobre CK2 α amb la qual no observem una protecció completa fins a relacions molars 4:1.

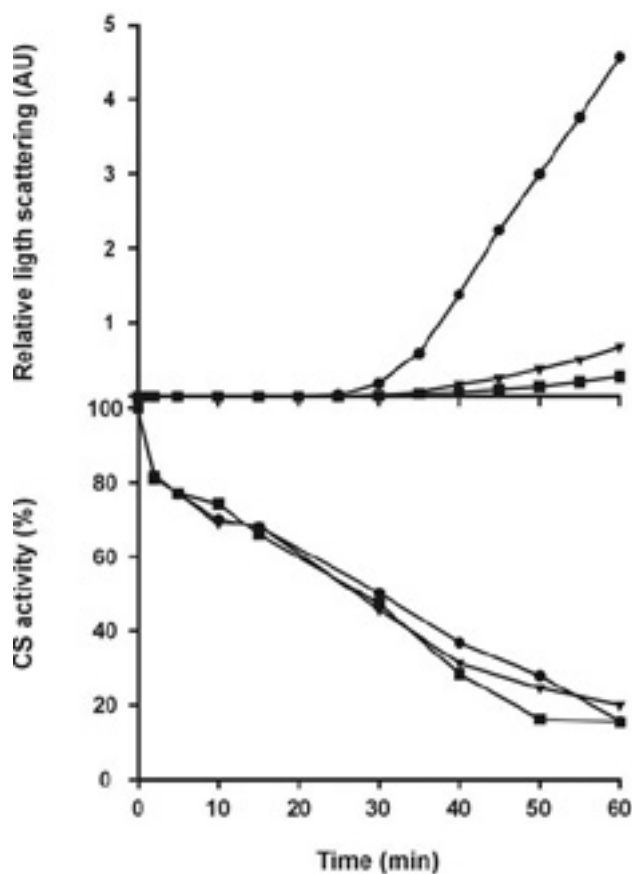


Figura 1. Al pannel superior es mostra l'agregació de la CS sola (●), o en presència de grp94-CT relació 1:0.25 (▼) o relació 1:0.5 (■). Al pannel inferior es mostra una gràfica amb els valors d'activitat de la CS sola (●) o en presència de grp94-CT relació 1:0.25 (▼) o relació 1:0.5 (■).

Pel que fa a la protecció de l'activitat enzimàtica la grp94 tampoc és capaç de protegir l'activitat CS. Tal i com observem a la Figura 1 pannel B la CS perd un 20% d'activitat durant els minuts inicials de l'assaig tant en absència com presència de grp94.

Del resultat mostrat a la Figura 1 també podem extreure informació pel que fa a l'ordre en que s'observen els processos d'inactivació i agregació. La inactivació és un succés previ a l'agregació ja que quan encara no detectem *scattering* de llum ja tenim el 50% de l'enzim inactivat. Aquest fet no el podiem observar en els experiments d'agregació amb CK2 α , on l'agregació es solapava amb la inactivació i on no podiem demostrar que fossin processos seqüencials.

Un altre aspecte que era difícil de clarificar utilitzant la CK2 α com a substrat era la importància de la fosforilació sobre l'activitat xaperona de grp94. Amb la CS com a substrat de plegament es podia fàcilment realitzar una fosforilació prèvia amb CK2 recombinant i observar quina era la resposta xaperona de grp94 fosforilada.. Com es mostra a la Figura 2 la grp94 fosforilada té una menor capacitat d'inhibir l'agregació de la CS. Així doncs, tal i com succeïa amb la pèrdua d'estructura quaternària en presència d'agents reductors podria ser que la fosforilació afavorís la pèrdua d'estructura i derivés en una menor capacitat de protegir la CK2 α de l'agregació induïda per xoc tèrmic. Caldria però demostrar que la fosforilació de grp94 indueix canvis en l'estructura oligomèrica tal i com succeeix amb els agents reductors. En el cas de l' α B cristal·lina s'han descrit canvis en l'estat d'oligomerització en mostres fosforilades (Ito et al., 2001).

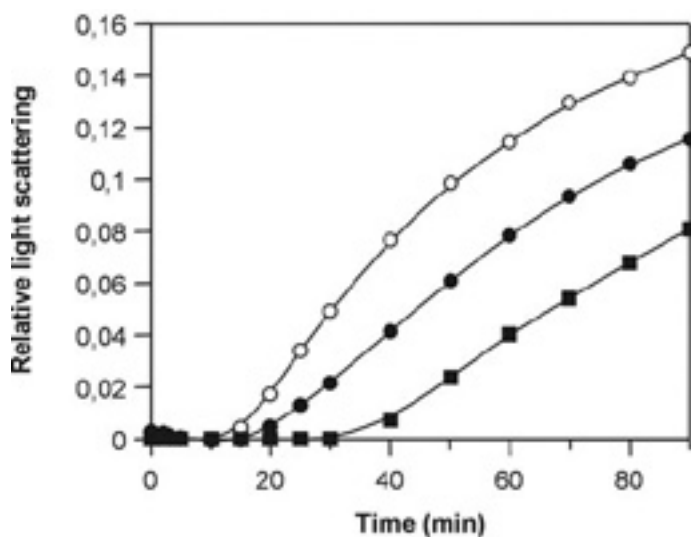


Figura 2. Agregació de la CS sola (○), en presència de grp94-CT relació 1:0.25 (●) i en presència de grp94-CT fosforilada per CK2 relació 1:0.25 (■).

Cal destacar que la grp94 té un ventall estret de substrats i que altres substrats assajats, com p.ex. la Malat deshidrogenasa (MDH) no poden ser protegits contra agregació. A altes relacions molars de MDH/grp94 (1:10 i 1:20) l'enzim mostrava la mateixa corba d'agregació. En la Figura 3 es mostren les corbes d'agregació de la MDH (concentracions de 1 i 2 μM de MDH) que són idèntiques i es solapen tant en presència com en absència de grp94.

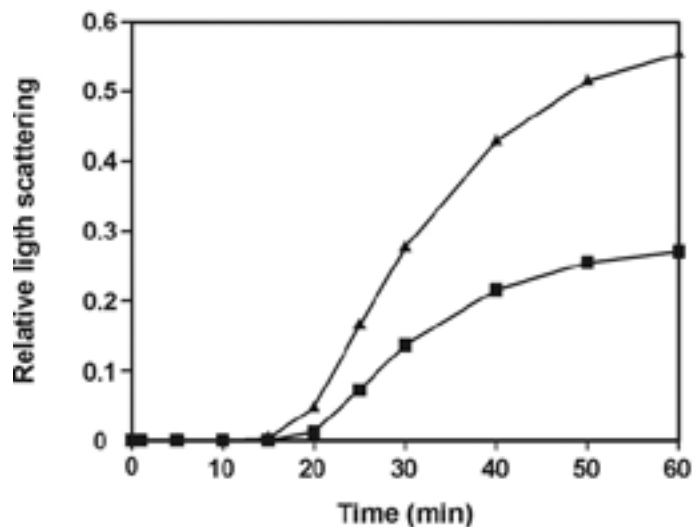


Figura 3. Agregació de la Malat deshidrogenasa 2 μM (▲) en presència de grp94-CT relació 1:10 i malat deshidrogenasa 1 μM en presència de grp94 1:10 (■). La MDH de porc era adquirida a La Roche liofilitzada. La solució estoc dissolta en PBS era congelada en alíquotes fins al moment del seu ús.

Bibliografia específica

Buchner, J., Grallert, H. i Jakob, U. (1998) Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Meth. Enzymol.* **290**, 323-338.

Apèndix III. ESTUDI DE L'ESTAT DE FOSFORILACIÓ PER MALDI/TOFMS*

Un dels aspectes en el que ens interessava aprofundir, era la caracterització de la fosforilació del domini C-terminal de grp94 per proteïna quinasa CK2 humana recombinant (hrCK2). El domini C-terminal de grp94 presenta 5 seqüències consens de fosforilació per CK2. En estudis previs amb CK2 purificada de fetge de rata s'havien obtingut estequiometries de fosforilació de 6 mols de ^{32}P /mol grp94 i volíem veure si la fosforilació per CK2 humana era similar. A banda de caracteritzar els centres de fosforilació *in vitro* també volíem una tècnica ràpida i fiable que ens permetés determinar si tot el substrat present en una mostra estava fosforilat. El sistema MALDI permet detectar variacions de massa molecular molt petites, així doncs, era possible detectar increments de massa molecular deguda a la incorporació enzimàtica d'un o més fosfats.

Materials i mètodes

Preparació de mostres de grp94-CT. La tècnica de MALDI/TOFMS* és molt sensible per la detecció de pèptids i proteïnes de baix pes molecular però presenta inconvenients en el cas de proteïnes de més alt pes molecular (per damunt de 30 kDa). D'altra banda calen mostres molt pures de proteïna i tampons específics perquè els senyals obtinguts de proteïnes de pes molecular alt no siguin enmascarats per senyals que provenen de molècules petites o del tampó en que estan les mostres. Així doncs, es va posar a punt el mètode de cristallització lenta basat en el mètode de Botting (2000) que permet obtenir espectres de proteïnes de pes molecular alt.

El mètode consisteix en utilitzar una matriu de CHCA (àcid α -cyano-4-hidroxicinamídic) que es prepara saturada en àcid fòrmic/aigua/propanol (1:3:2 v/v/v).

**NOTA: les sigles MALDI/TOFMS són les sigles de "matrix-assisted laser desorption-ionisation/time of flight mass spectrometry".*

La matriu es barreja amb la solució de proteïna i es deixa cristal·litzar de forma lenta. La matriu té la propietat d'absorbir la radiació del làser i transferir-la a la mostra, de forma que s'evita la degradació de la proteïna. A banda d'això afavoreix el procés d'ionització. Les molècules ionitzades s'analitzen en un espectròmetre de masses segons el temps de vol.

La grp94 a una concentració de 17 pmols/ μ l es mescla amb 28 μ l de la solució saturada de matriu en un tub eppendorf. La mostra es mescla amb la reïna, escrapejant les parets del tub per facilitar la formació de cristalls. El tub es deixa amb el tap obert durant 16-18 hores, temps suficient perquè es formin cristalls de proteïna. S'elimina el sobrenedant amb molta cura mirant de no endur-se els cristalls tot i que normalment es mantenen adherits a les parets del tub. Es renta la mostra dues vegades amb aigua milliQ i finalment es ressuspenen els cristalls en 2 μ l d'aigua.

En el cas que es valorin mostres fosforilades aquestes eren prèviament sotmeses a un assaig de fosforilació amb 0.1 o 1 pmol de CK2 recombinant durant 5 hores en presència de 1 mM de GTP no radiactiu. La preparació de les mostres fosforilades per l'anàlisi per espectrometria de masses implicava utilitzar el mateix procediment que per les mostres no fosforilades.

Preparació de mostres de grp94-CT digerides amb LysC. Per la obtenció de pèptids de grp94-CT es va utilitzar la proteasa LysC que digereix les proteïnes en residus de lisines. La predicció de pèptids obtinguts per digestió amb LysC es va realitzar amb el software de predicció de pèptids de l'Expasy (www.expasy.ch/peptide-mass). Les mostres no fosforilades i fosforilades es mesclaven amb tampó 2 M urea i 25 mM DTT i es digerien amb LysC a una relació enzim:substrat de 1:10 (p/p) durant tota la nit a T^a ambient (l'endopeptidasa LysC té activitat d'autodigestió a 37°C). Finalment s'afegia la matriu de CCA o de sinaptomínic. En el cas de la matriu de CCA es seguia el mateix protocol utilitzat per proteïna sencera i en el cas del sinaptomínic s'afegia la matriu en el moment de dipositar la mostra a la placa de MALDI.

Els espectres de MALDI/TOFMS es van obtenir al servei d'espectrometria de masses de l'IBB utilitzant un sistema Bruker Biflex.

Cinètica i Estequiometria de fosforilació. La fosforilació es realitzava amb el mètode habitual (Trujillo et al, 1998), utilitzant $125 \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ com a donador de fosfat. La reacció s'aturava afegint tampó de mostres reductor i es separaven les mostres en un gel d'electroforesis SDS/PAGE. El gel es tenyia amb Coomassie, es posava a contactar al Phosphorimager (BioRad) (Servei LAFEAL) durant 16 hores i les bandes es densitometraven amb el programa Molecular Analyst (BioRad). El càlcul de les constants cinètiques es feia a partir dels resultats de les densitometries, utilitzant el programa GraFit 1.0.

Resultats i discussió

En una primera aproximació, es van obtenir espectres de grp94-CT, CK2 α i CK2 β purificades per tal de veure si el sistema de preparació de mostres era l'adequat i per tal de determinar la massa molecular de les diferents proteïnes recombinants utilitzades al llarg de tots els estudis. A la Figura 1 es mostren els espectres obtinguts, utilitzant el mètode de cristal·lització lenta, per grp94-CT, CK2 α i CK2 β (panells A, B i C respectivament). En tots ells s'ha utilitzat BSA com a patró per calibrar la massa molecular de les proteïnes problema.

A més calia estandaritzar el patró de pics obtingut ja que els assajos amb grp94-CT fosforilada contenien una mescla de les tres proteïnes. Donada la sensibilitat de la tècnica podiem detectar els pics corresponents a les subunitats que formen la quinasa reconstituïda i per tant reconèixer-los. Posteriorment i per tal de minimitzar la presència de α i β CK2 es va optar per fosforilar a temps llargs amb poca quantitat d'enzim.

El pes molecular teòric per grp94-CT és de 34331 Da incloses les 6 histidines que formen part de la proteïna de fusió. El pes molecular teòric de CK2 α és de 46023,58 Da i el pes molecular teòric per CK2 β és de 25932 Da, ambdues amb les 6 histidines incloses. El PM de cada una de les proteïnes obtingut pel sistema MALDI és de 34450 Da per grp94-CT, 46341 Da per CK2 α i 26319 Da per CK2 β (Figura 1).

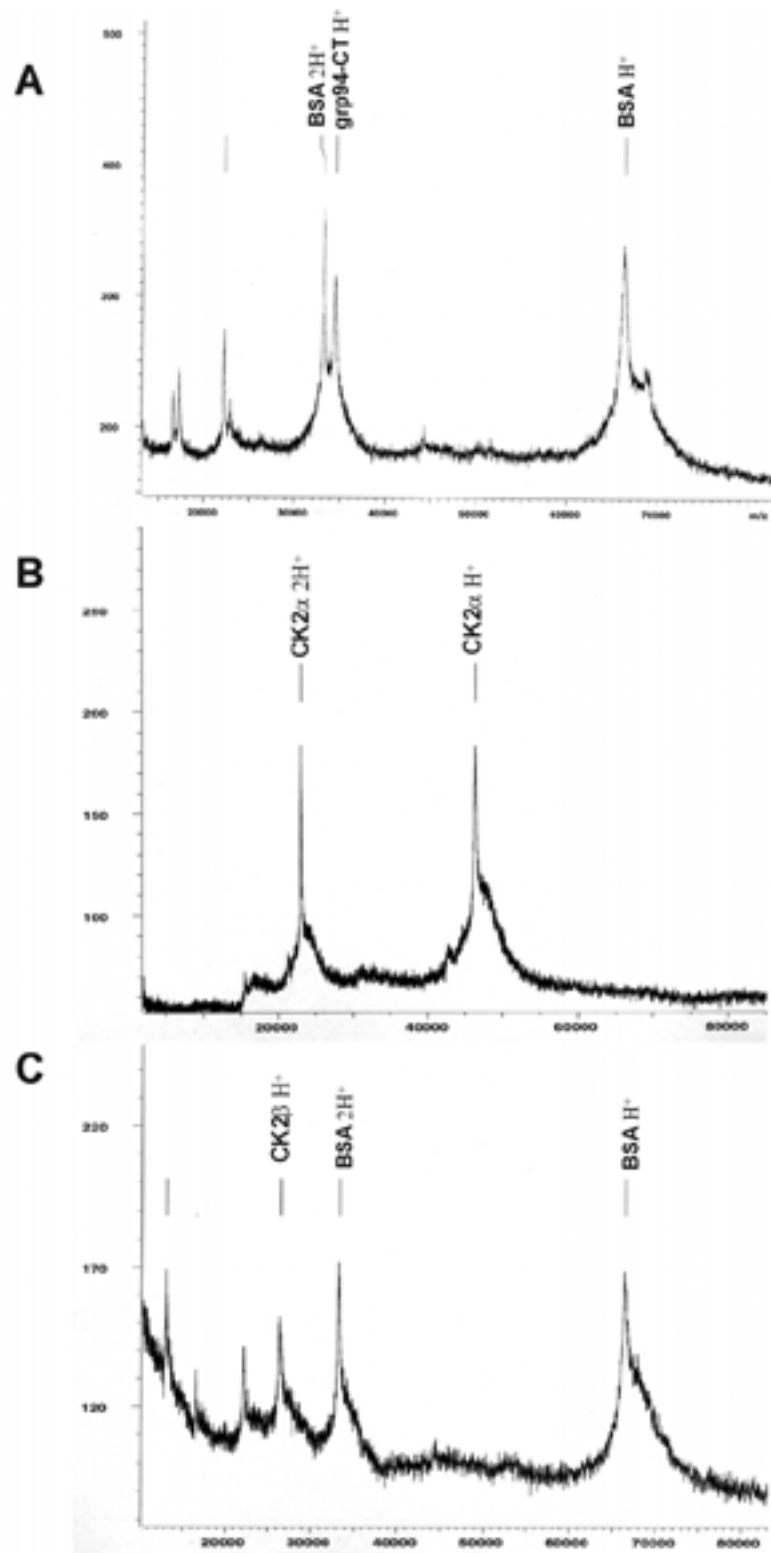


Figura 1. Espectres de MALDI de grp94-CT (A), CK2 α (B) i CK2 β (C) utilitzant BSA com a patró. Massa molecular obtinguda per grp94-CT és de 34450 Da, per CK2 α és de 46341 Da i per CK2 β és de 26319 Da.

Les diferències obtingudes entre la massa molecular teòrica i la massa observada semblen degudes a l'error intrínsec de la tècnica. Per mostres de menys de 5 kDa, el % de l'error està al voltant del 0.0005% mentre que per proteïnes majors de 10 kDa és al voltant de 0.01%. Tot i així el sistema és força més precís que p.ex. tècniques electroforètiques i les mesures entre diferents experiments van ser repetitives.

Un cop establertes les condicions de treball pel MALDI es va procedir a fosforilar grp94-CT amb 0,25 pmols de CK2hr utilitzant GTP com a donador de fosfat. Els espectres de les mostres fosforilades i de les mostres control de la Figura 2 i Figura 3 indiquen que, la fosforilació s'ha produït en un únic centre, ja que l'increment de massa en les mostres fosforilades és d'uns 80 Da.

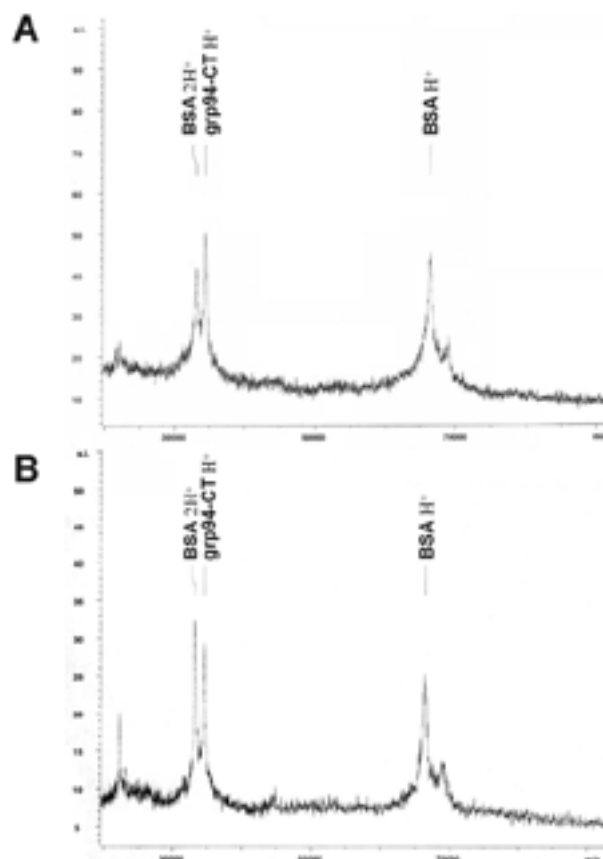


Figura 2. Espectres de MALDI de grp94-CT no fosforilat (A) i fosforilat (B).

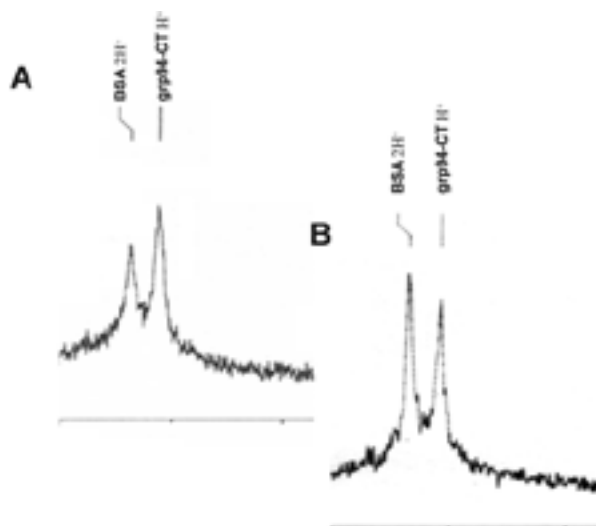


Figura 3. Espectres de MALDI ampliat de grp94-CT no fosforilat (A) i fosforilat (B).

El fet que només s'incorporés un únic fosfat va ser una sorpresa ja que en treballs previs amb CK2 purificada de fetge de rata s'havien obtingut estequiometries de fosforilació de 6 mols de ^{32}P /mol grp94-CT. Així doncs, es van determinar els paràmetres cinètics de la fosforilació amb CK2 humana recombinant. En la Figura 4 es mostra una cinètica de fosforilació representativa, junt amb els valors de les constants cinètiques i de l'estequiometria.

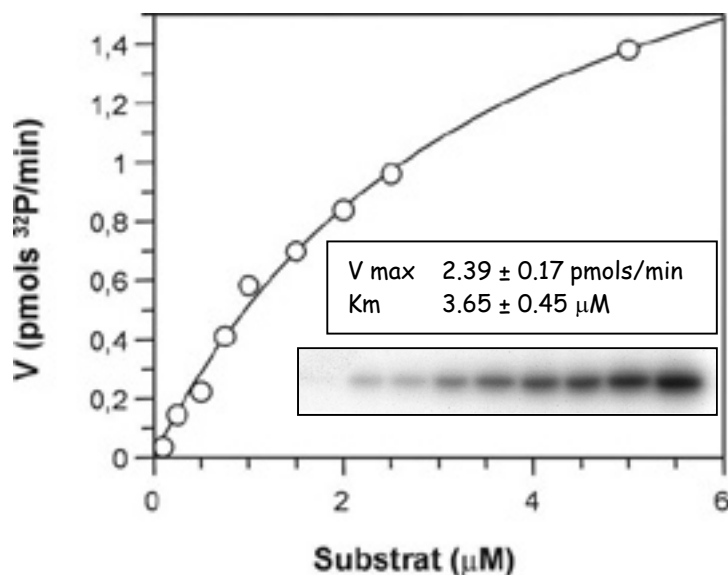


Figura 4. Cinètica de fosforilació de grp94-CT. Es mostra un experiment representatiu. Diferents concentracions de grp94-CT es van fosforilar durant 5 min amb 1 pmol de CK2 recombinant.

Estequiometria de fosforilació: 0.95 ± 0.1 mols de ^{32}P /mol grp94-CT

