



**ESTUDIOS SOBRE  
EL MECANISMO DE PLEGAMIENTO  
DEL INHIBIDOR PROTEICO DE  
CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA (PCI)**



**Silvana Pavía Vilà**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNDAMENTAL**  
**Marzo 2000**



Instituto de Biología Fundamental

# **ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE PLEGAMIENTO DEL INHIBIDOR PROTEICO DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA (PCI)**

Tesis presentada para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas  
por SILVANA PAVÍA VILÀ, licenciada en Ciencias Químicas.

Trabajo realizado en el Instituto de Biología Fundamental  
de la Universidad Autónoma de Barcelona,  
bajo la dirección de los Dres.:  
F. X. Avilés y F. Canals.

Bellaterra, Marzo 2000.

S. Pavía Vilà

Dr. F. X. Avilés

Dr. F. Canals

*Al Ricard*

*Després de cinc anys de recerca i un any d'escriure, correccions i altres, ja quasi ho he aconseguit. Ja està tot llest: la memòria, els tràmits, les signatures, tot a punt per entregar...però em falta quelcom que encara no he fet i és molt important.*

*Ara que en tinc l'oportunitat, em resulta molt difícil d'expressar amb unes quantes paraules el meu agraïment a les persones que durant tot aquest temps han estat al meu costat.*

*Agraeixo al **Dr. F. Xavier Avilés** haver-me iniciat a descobrir l'apassionant món de la investigació i donar-me l'oportunitat de fer aquest doctorat amb el seu grup de recerca. Agraeixo tot el que m'ha ensenyat sobre química de proteïnes, i la direcció i l'orientació que en tot moment l'hi ha donat al meu treball. Però sobretot li agraeixo el tracte humà i la paciència que ha tingut amb mi en alguns moments difícils.*

*Agraeixo al **Dr. Quico Canals** el temps que ha dedicat en ensenyar-me tot el que sabia sobre plegament de proteïnes i com és traduïa això al treball de cada dia al laboratori. Agraeixo la seva co-direcció i haver estat en tot moment pendent dels passos a seguir i dels resultats aconseguits.*

*I també al **Dr. Angel Díez- Cascón** la seva dedicació al meu aprenentatge en tècniques que llavors eren per mi com la dimensió desconeguda i la seva visió pràctica de la recerca.*

*Agraeixo als meus amics i companys de laboratori, la **Gabi**, la **Julia**, la **Cristina**, les **Silvies** i en **Pep**, l'haver compartit tots aquests anys i col·laborat junts amb coneixements científics...i d'altres no tant científics.*

*I també a totes les altres persones de l'**IBF** i del **Departament de Bioquímica**, les estones que hem passat junts, entre experiment i experiment, al passadís i sobretot durant les llegendàries "fondues"....*

*Agraeixo al **Prof. Francesc Teixidor** i la **Dra. Clara Viñas** que m'hagin acollit al seu grup de recerca i que m'hagin permès seguir fent investigació. Agraeixo els seus consells i les facilitats que m'han donat per poder posar un punt final a aquest treball.*

*I també als meus nous companys de feina: la **Houda**, la **Rosario**, la **Rajae**, la **Isabel**, la **Gemma**, l'**Oscar**, el **Carles**, el **Yoyo** i el **Jordi**; i de l'**ICMAB** la seva amistat que comença.*

*Agraeixo a les meves amigues, la **Núria** i la **Teresa**, la **Mireia**, l'**Alexandra**, la **Cristina** i la **Rosmi**, finalment a la **Vera** i la **Inge**, les converses mantingudes i els consells donats sobre el que, simplement, és la vida.*

*Agraeixo a la meva **mare** haver-me ensenyat a estudiar i a donar les primeres passes d'aquest camí. Agraeixo en **Josep** aquelles converses que em varen fer qüestionar el meu futur.*

*Agraeixo al meu **pare** que estigui al meu costat i el suport que em dona per anar endavant.*

*Agraeixo en **Max** i en **Jan** el canvi que han fet a la meua vida i aquestes hores de jocs i "caos" que aconsegueixen fer-me desconnectar de la realitat.*

*Finalment, li agraeixo a la persona que tinc més a prop i a quí dedico aquest treball, l'amor i la felicitat que em dona. Sense ell no ho hagués aconseguit.*

*Lo más bello que podemos experimentar es el lado misterioso de la vida.  
Es el sentimiento profundo que se encuentra en la cuna del arte y de la ciencia verdadera.*

***Albert Einstein.***

*No seré célebre ni grande.  
Continuaré siendo aventurera, cambiando, siguiendo a mi espíritu y mis ojos,  
rechazando ser etiquetada y estereotipada.  
La cuestión es liberarse de una misma; encontrar tus verdaderas dimensiones, no dejarte aturdir.*

***Virginia Woolf.***

---

## **ÍNDICE GENERAL.**

<b>ABREVIATURAS.</b>	iii
<b>RESUMEN.</b>	19
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	23
I. A. EL PLEGAMIENTO PROTEICO.	23
I. A. 1. El problema del plegamiento proteico.	23
I.A. 2. Estudios del mecanismo de plegamiento en proteínas que contienen puentes disulfuro.	23
I. B. EL INHIBIDOR PROTEICO DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA (PCI).	27
I. B. 1. Estructura del Inhibidor proteico de Carboxipeptidasa de Patata (PCI).	27
I. B. 2. Estudios realizados sobre el mecanismo de plegamiento del PCI.	28
<b>II. OBJETIVOS.</b>	33
<b>III. MATERIAL Y METODOS.</b>	41
III. ÍNDICE.	v
III. A. EQUIPAMIENTO Y PRODUCTOS QUÍMICOS.	41
III. B. MÉTODOS DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PCI RECOMBINANTE.	42
III. C. MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.	57
III. D. CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI PURIFICADOS.	65

---

III. E. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DE PCI RECOMBINANTE.	81
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	97
IV. ÍNDICE.	ix
IV. A. OBTENCIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.	97
IV. B. CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI PURIFICADOS.	107
IV. C. ESTUDIO DEL PROCESO DE REORDENAMIENTO (“RESHUFFLING”) DE LOS PUENTES DISULFURO DEL PCI.	205
IV. D. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DE PCI RECOMBINANTE.	225
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	241
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.</b>	247

## ABREVIATURAS

A	Angiotensina
a.i.	Intensidad absoluta
a.u.	Unidades de absorbancia
AcTH	Adrenocorticotropic Hormone (Fragm. 18- 39)
Amp	Ampicilina
ATZ	Anilina tiazolina
- ME	- Mercaptoetanol
BPTI	Inhibidor Pancreático de Tripsina Bovino
BSA	Seroalbúmina bovina
CAS AA	Casaminoácidos
CCA	Ácido - ciano- 4- hidroxicinámico
CD	Dicroísmo Circular
CADA	tetrafluoroborat de 1- ciando- 4- dimetilamino- piridinio
CPA	Carboxipeptidasa A
CTX	Cardiotoxina
Cys- Cys	Cistina
Cys	Cisteína
CZE	Electroforesis Capilar de Zona
DAB	1,4- Diaminobutano
DEAE	Dietilaminoetil
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
0.1%	Coeficiente de extinción de una disolución al 0.1 %
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EC	Electroforesis Capilar
EDTA	Etilen- diamino- N, N, N', N'- tetracetato
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ER	Retículo Endoplasmático
FPLC	Cromatografía Líquida de alta Resolución
GdmCl	Cloruro de Guanidinio
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HPLC	Cromatografía Líquida de alta Presión
IBF	Instituto de Biología Fundamental
IGF	Factor de Crecimiento tipo Insulina
IPTG	Isopropil- - D- tio- galactopiranósido
Itz-	residuo amino terminal iminotiazolidina- 4- carboxil

---

L.B.	Lineweaver- Burk
LCI	Inhibidor proteico de Carboxipeptidasa de Sanguijuela
Lys- C	Lisil Endopeptidasa de <i>Achromobacter Lyticus</i>
M/z	Relación masa/ carga
MALDI- TOF	Matrix Assisted Laser Desorption- Time of Flight
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption
Medio LB	Medio "Luria- Bertani"
Medio M9 CAS	Medio mínimo M9 suplementado con Casaminoácidos
Mr	Masa molecular relativa
MS	Espectrometría de Masas
N	Estructura nativa
"o/ d"	"over/ day"
"o/ n"	"over/ nighth"
p	plásmido
PCI	Inhibidor proteico de Carboxipeptidasa de Patata
PDI	Protein Disulfide Isomerasa
PITC	Fenilisotiocianato
PTH	Feniltiohidantoina
R	Forma reducida
RBI	<i>Ragi</i> $\alpha$ - amylase/ trypsin Inhibitor
rePCI	PCI recombinante
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNasa A	Ribonucleasa A
rpm	revoluciones por minuto
TAP	Tick Anticoagulant Peptide
TCEP	Tris- (2- Carboxietil) fosfina
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Tris hidroximetil amino metano
UV	Ultravioleta

---

## RESUMEN.

El PCI es una proteína de 39 aminoácidos con una estructura globular central de 27 residuos y dos colas, N- terminal y C- terminal. La parte globular de la proteína presenta una hélice  $3_{10}$ , como única estructura secundaria regular, así como 4 bucles ("loops") y está estabilizada por tres puentes disulfuro formados por las cisteínas C8- C27, C12- C24 y C18- C34. La presencia de estos puentes disulfuro nos permite estudiar el replegamiento del PCI a través de la captura de los intermediarios que se forman en el proceso de plegamiento a partir de la proteína reducida. Esto permite conocer el número de intermediarios dependientes de disulfuro, su diversidad, su estructura y sus propiedades, proporcionándonos información sobre el mecanismo de plegamiento.

En una primera fase del presente trabajo, hemos estudiado el aislamiento y la purificación de los intermediarios con tres puentes disulfuro (denominados "scrambled species") a partir de la mezcla de intermediarios que se obtiene tras efectuar el replegamiento del PCI a partir de PCI purificado o a partir de cultivos de *E. Coli* que expresan PCI. Así mismo, hemos realizado una caracterización estructural de los intermediarios "scrambled" aislados en forma pura, se han determinado sus constantes de inhibición, éstas son del orden  $\mu\text{M}$  (unas 1000 veces superiores a la estimada para el PCI nativo). También se ha determinado cuáles son las cisteínas implicadas en cada uno de los puentes disulfuro de la estructura de tales especies mediante digestión proteolítica y mediante reducción química parcial de un puente disulfuro. Finalmente se ha realizado un análisis conformacional por estudios de Dicroísmo Circular y Resonancia Magnética Nuclear, técnicas que nos han permitido observar que tales intermediarios no presentan una estructura mayoritaria definida.

En una segunda fase, hemos estudiado la última etapa del camino de plegamiento del PCI, etapa donde las especies "scrambled" rompen y vuelven a formar sus puentes disulfuro para dar lugar a la estructura nativa. Con este fin se ha estudiado la estabilidad relativa de estos intermediarios frente a agentes desnaturizantes y se han llevado a cabo experimentos cinéticos de su evolución a estructura nativa. Estos experimentos han probado que el plegamiento del PCI no tiene lugar a través de una vía única sino que se dan múltiples vías paralelas. Se han observado que los intermediarios que son más estables frente a agentes desnaturizantes son los que presentan una evolución más lenta hacia la forma nativa.

Finalmente en una tercera fase, se ha estudiado la influencia de agentes redox en la producción de PCI recombinante y en otras proteínas relacionadas. Se observó que la expresión de éstos en *E. Coli*, en forma secretada al medio, se acumulaba gran parte de la proteína en forma de intermediarios tipo "scrambled". Se ha determinado que la forma más eficiente para convertir estas especies en proteína nativa, consiste en la adición al medio tras el cultivo de agentes redox para catalizar el proceso de "reshuffling". De esta forma se consiguen importantes mejoras en el rendimiento de la producción.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

### **I. A. EL PLEGAMIENTO PROTEICO.**

#### **I. A. 1. EL PROBLEMA DEL PLEGAMIENTO PROTEICO.**

El problema del plegamiento proteico ha sido generalmente entendido de dos formas diferentes: bien como un problema de información o como un problema de mecanismo.

Clásicamente el problema se enfoca como una descodificación de información; el objetivo es descifrar un “código” que permita deducir la conformación nativa de las proteínas a partir de su estructura primaria, de la misma forma que el “código genético” permite deducir la secuencia de aminoácidos de una proteína a partir de su secuencia de nucleótidos.

La dificultad de dicho problema y el lento progreso desde su formulación sugirieron que podría ser atacado por estudios experimentales del proceso de plegamiento proteico. De ahí la formulación mecanística del problema: describir en términos cinéticos, termodinámicos y estructurales el proceso por el cual una cadena polipeptídica desestructurada puede plegarse para dar una configuración definida y además biológicamente activa (Freedman, 1992).

Desde finales de los 60, se inician estudios sobre el mecanismo por el cual las proteínas desplegadas pueden adquirir su conformación nativa *in vitro*. La base de estos estudios es el hecho de que el número de configuraciones posibles de una cadena polipeptídica es tan elevado que la búsqueda de la conformación nativa completamente al azar es imposible porque sería exageradamente lenta (Levinthal, 1968). Ello sugirió la existencia de rutas específicas de plegamiento, consecuentemente la existencia de unos estados intermedios donde la proteína se encuentra parcialmente estructurada. La caracterización de estos estados intermedios podría dar información sobre la relación entre la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de la proteína (Goldenberg, 1992).

#### **I. A. 2. ESTUDIOS DEL MECANISMO DE PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS QUE CONTIENEN PUENTES DISULFURO.**

Por dos importantes razones el mecanismo de formación de los puentes disulfuro puede dar información valiosa para el trazado de las rutas de plegamiento de proteínas que contienen cistinas (Freedman, 1984; Creighton, 1990). En primer lugar, es conocido que la formación de puentes disulfuro está asociada al plegamiento de tales proteínas (Haber and Anfinsen, 1962). Durante el plegamiento proteico, los puentes disulfuro se rompen y se vuelven a formar (proceso de “reshuffling”) para adaptarse a las conformaciones más favorables para la proteína.

En segundo lugar, los intermediarios de plegamiento de las proteínas que contienen puentes disulfuro pueden ser capturados, separados y aislados por sistemas cromatográficos. Esto permite estudiar el número de intermediarios, su diversidad, su estructura y sus propiedades (Creighton, 1986).

La técnica utilizada para obtener estos intermediarios de plegamiento es la denominada "disulfide quenching" (Creighton 1978, 1986, 1990). La formación y la rotura de puentes disulfuro puede ser dirigida experimentalmente mediante el control redox de la interacción. Así pueden utilizarse reactivos como la iodoacetamida y el ácido iodoacético para "atrapar" ("quenching") de forma irreversible la formación de enlaces disulfuro. O simplemente una acidificación con ácido trifluoroacético permitiría "atrapar" no solo la formación, sino también la rotura y la reorganización de puentes disulfuro en una reacción rápida, no dependiente de la accesibilidad estérica, y reversible.

La monitorización de la formación de los puentes disulfuro durante el plegamiento presenta algunas ventajas. En primer lugar, como todos los enlaces disulfuro establecidos entre cisteínas son equivalentes, cualquier diferencia existente entre ellos en una proteína es debido a la conformación adoptada por ésta (Givol, 1965). En segundo lugar, si existe un intercambio intramolecular entre disulfuros, la conformación más estable será la más abundante (Creighton, 1992b). Finalmente, esta técnica ayuda a definir el papel cinético de los intermediarios del plegamiento (Creighton, 1996; Goldenberg, 1992; Weissman & Kim, 1995).

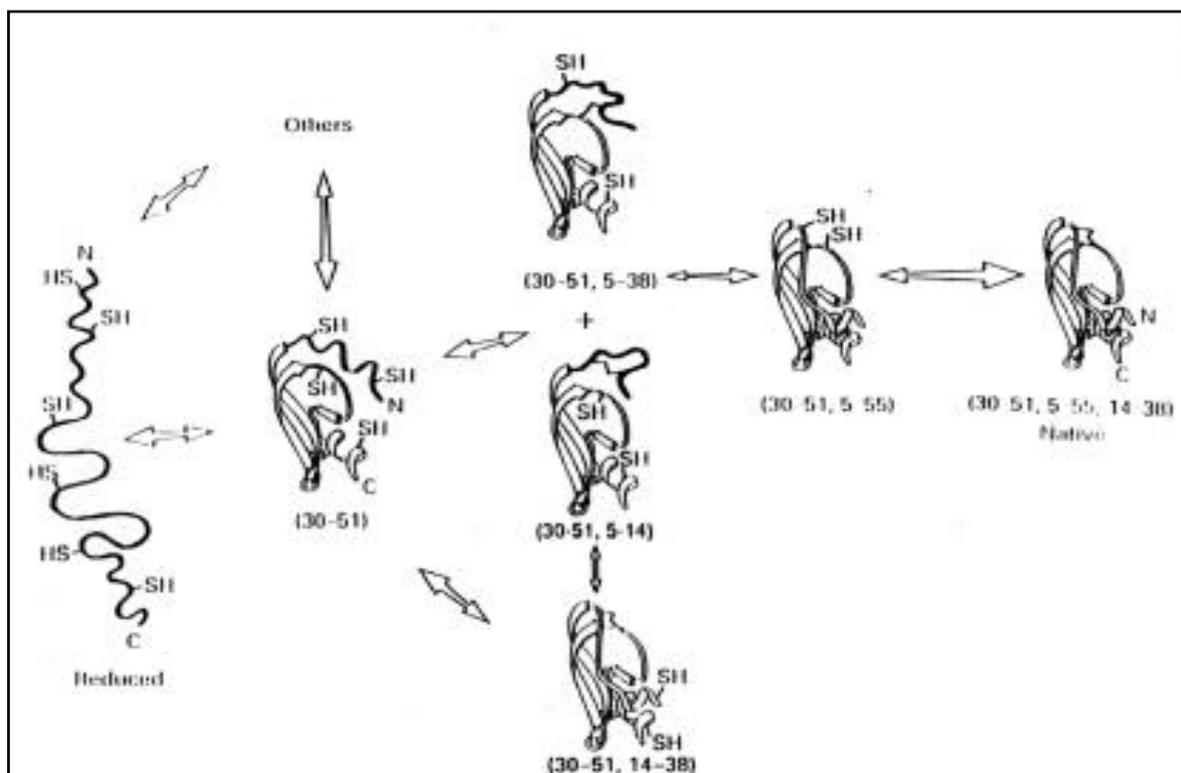
Los primeros trabajos en que se identifican intermediarios en el plegamiento de proteínas con puentes disulfuro fueron los realizados sobre el Inhibidor de Tripsina Pancreático Bovino (BPTI) (Creighton, 1978; Creighton and Goldenberg, 1984); y sobre la Ribonucleasa A (RNasa A) (Creighton, 1979; Konishi *et al.*, 1981; Scheraga *et al.*, 1987; Creighton, 1988).

En el BPTI, proteína de 58 residuos aminoacídicos y tres puentes disulfuro en la estructura nativa, se describió la existencia de ocho intermediarios de plegamiento unidos por puentes disulfuro (incluyendo en ellos la configuración nativa) de los 75 posibles, definidos por las combinaciones de las seis cisteínas en 0 a 3 puentes disulfuro. Algunos de estos intermediarios con uno o dos puentes disulfuro que aparecían en proporciones elevadas, contenían uniones entre cisteínas diferentes a la configuración nativa y, a su vez, parecían estar involucrados en el proceso de plegamiento de la proteína.

El modelo de mecanismo de plegamiento propuesto para el BPTI (Creighton, 1978; Creighton and Goldenberg, 1984.) a partir del estudio de los intermediarios se muestra en la figura I. A. 1.

Este modelo fue revisado después por Weissman and Kim (1991, 1992a) utilizando para sus estudios técnicas más modernas de separación y análisis. Según los resultados obtenidos, estos investigadores afirman que los intermediarios de plegamiento encontrados en elevada proporción y contienen uniones entre cisteínas como las de la estructura nativa.

El plegamiento del BPTI, según estos investigadores, tiene lugar por rutas preferentes que transcurren a través de un número limitado de intermediarios que se forman en proporción elevada. La estructura de la proteína nativa se forma a partir de un intermediario definido que contiene dos puentes disulfuro a través de la formación del tercer puente disulfuro nativo. No se detecta ningún intermediario con tres puentes disulfuro diferentes a los de la estructura nativa.



**Figura I. A. 1. Esquema del mecanismo de plegamiento definido para el BPTI.**

Posteriormente, se han realizado estudios del mismo tipo en la Hirudina (Chatrenet and Chang, 1992, 1993; Chang, 1993a, 1994a, 1995a, 1996, 1997), proteína de 49 residuos y tres puentes disulfuro en la estructura nativa. Estos estudios han revelado un número de características importantes del mecanismo de plegamiento de la Hirudina:

a) Del número de especies identificadas por cromatografía (HPLC) de fase reversa y electroforesis capilar se deduce que los intermediarios de plegamiento son extremadamente heterogéneos.

b) La ruta de plegamiento de la Hirudina pasa por dos etapas diferenciadas: En la primera etapa de plegamiento, denominada por los autores de "empaquetamiento", existe una formación no específica de los puentes disulfuro de la proteína. La proteína reducida y desnaturalizada evoluciona de forma secuencial a través de una mezcla en equilibrio de isómeros que contienen un puente disulfuro y una mezcla de isómeros con dos puentes disulfuro, para alcanzar una mezcla de isómeros con tres puentes disulfuro ("scrambled species"). En la segunda etapa de plegamiento, denominada de "reorganización o consolidación", las especies scrambled se reestructuran y se consolidan para formar la especie nativa.

c) Las especies scrambled de la Hirudina son intermediarios importantes en la ruta a la estructura nativa. Además, la concentración que presentan a lo largo de la ruta de plegamiento puede ser manipulada en función de los potenciales redox (Chang, 1994a).

d) La presencia de un desnaturalizante durante la ruta de plegamiento afecta únicamente la segunda etapa de ésta. No afecta visiblemente la formación no específica de puentes disulfuro, ya que las

---

composiciones de las especies con uno y dos puentes disulfuro, identificadas por HPLC, son indistinguibles tanto si el plegamiento tiene lugar en presencia como en ausencia de desnaturizante.

e) La construcción de una ruta única de plegamiento, por ejemplo la identificación de especies productivas que sean indispensables para la continuación del plegamiento, no es posible debido al gran número de los intermediarios.

Las diferencias observadas entre el mecanismo descrito para el BPTI y para la Hirudina tienen implicaciones de importancia fundamental porque representan dos modelos muy diferentes sobre el plegamiento de proteínas. El modelo descrito para el BPTI está en la línea del modelo "armazón o marco" (framework model) (Ptitsyn, 1987; Kim & Baldwin, 1982; Baldwin, 1989; Karplus & Weaver, 1994) que acentúa la importancia de las interacciones locales para obtener un plegamiento eficiente a través de estructuras como la nativa. Por otra parte el modelo descrito para la Hirudina es más consistente con el modelo de "colapso" (collapse model) (Dill, 1990; Dill *et al.*, 1995). Este modelo describe que el plegamiento proteico se inicia con un rápido colapso hidrofóbico seguido de un alineamiento lento, donde las interacciones específicas no dominan el plegamiento sino que refinan la estructura.

Estas discrepancias expuestas podrían ser atribuidas a la diferencia estructural, en particular al patrón de puentes disulfuros existente entre las dos proteínas. Por ello, son muy interesantes los resultados obtenidos del estudio sobre el plegamiento del Inhibidor específico del Factor Xa (Tick Anticoagulant Peptide, TAP) (Chang 1996, 1999b). Esta proteína (Waxman *et al.*, 1990; Sardana *et al.*, 1993) tiene 60 aminoácidos (uno más que el BPTI) y tres puentes disulfuro, además pertenece al grupo de inhibidores tipo Kunitz como el BPTI. Ambas proteínas presentan una homología estructural en el patrón de puentes disulfuro y en la conformación tridimensional.

El mecanismo de plegamiento del TAP en muchos aspectos es indistinguible al descrito para la Hirudina. La complejidad de los intermediarios de plegamiento, la forma en que fluyen en la ruta de plegamiento, la aceleración de las dos etapas del plegamiento cuando actúan agentes redox y el mecanismo de acumulación de los intermediarios del plegamiento con tres puentes disulfuro son algunos de los aspectos que hacen el mecanismo de plegamiento del TAP similar al descrito para la Hirudina. Existe una diferencia referente a las propiedades de las especies scrambled, la sensibilidad a agentes desnaturizantes es diferente para las dos proteínas. Para la Hirudina sólo los intermediarios con tres puentes disulfuro presentan sensibilidad a desnaturizante, mientras que para el TAP son los intermediarios de uno, dos y tres puentes disulfuro los que son sensibles. Recordamos que las especies sensibles a desnaturizante son las que deben adoptar estructuras estabilizadas por interacciones no covalentes y no necesariamente deben tener puentes disulfuro como los de la proteína nativa. Finalmente una caracterización de los intermediarios más estables y abundantes del TAP indica que no son éstos los que necesariamente facilitan el proceso de plegamiento, por el contrario parece que sean el paso limitante en la etapa final del plegamiento de la proteína.

Curiosamente el mecanismo de plegamiento del TAP también presenta similitudes y diferencias con el descrito para el BPTI:

a) Los intermediarios del plegamiento con uno y dos puentes disulfuro existen en un equilibrio dinámico. Este hecho también ocurre con el BPTI, la Hirudina y otras proteínas, lo que ha llevado a pensar que las propiedades estos intermediarios no son tan diferentes (Weissman & Kim, 1992b; Dadlez & Kim, 1995).

b) Los intermediarios de plegamiento del TAP son más heterogéneos que los descritos para el BPTI y además no presentan entre ellos especies predominantes.

c) Finalmente, es importante observar que el TAP presenta especies intermediarias con tres puentes disulfuro, mientras que el BPTI presenta especies con dos puentes disulfuro como los del nativo y dos cisteínas que forman el tercer disulfuro de forma eficiente.

En los estudios realizados sobre el mecanismo de plegamiento de otras proteínas como el Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (EGF), proteína de 53 residuos y tres puentes disulfuro (Chang, 1995b); los realizados sobre la Cardiotoxina (CTX), proteína de 6.8 kDa y cuatro puentes disulfuro (Chang, 1998); los realizados sobre el Factor de Crecimiento de la Insulina (IGF), proteína de 80 aminoácidos y tres puentes disulfuro (Chang, 1999c) y los realizados sobre el pro- BPTI (Weissman and Kim, 1992c) se ha observado existencia de numerosos intermediarios de plegamiento que corresponderían a la descripción de especies scrambled.

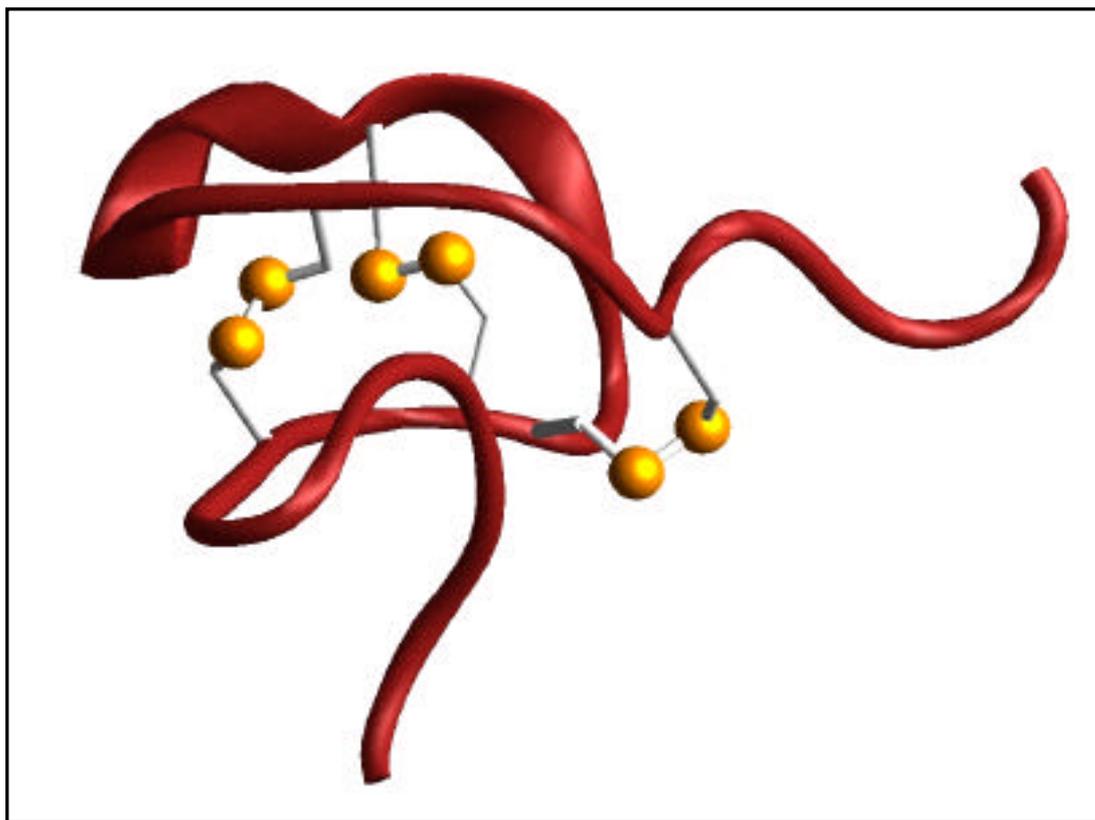
Los estudios de las rutas de plegamiento de éstas y otras proteínas evidencian de forma clara la existencia de intermediarios parcialmente estructurados. Sin embargo, no hay aun un acuerdo general sobre un modelo de mecanismo de plegamiento. Se cuestiona si el plegamiento proteico es un proceso controlado cinética o termodinámicamente (Creighton, 1990; Baker *et al.*, 1992; Dobson, 1992); si existe una única vía de plegamiento preferente o son muchas las rutas que llevan a la configuración proteica nativa final (Harrison and Durbin, 1985; Scheraga *et al.*, 1987; Weissman and Kim, 1991, 1992a; Radford *et al.*, 1992); la importancia relativa de intermediarios con estructura similar a la nativa o no (Weissman and Kim, 1991, 1992a; Creighton, 1992b); y sobre el papel respectivo del “colapso hidrofóbico” y las “interacciones específicas” en impulsar y guiar el plegamiento (Baldwin, 1989; Dill, 1990).

## **I. B. EL INHIBIDOR PROTEICO DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA (PCI).**

### **I. B. 1. ESTRUCTURA DEL INHIBIDOR PROTEICO DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA.**

En 1982, Rees y Libscomb resolvieron por cristalografía de rayos X la estructura tridimensional del complejo PCI- Carboxipeptidasa A y en 1987 Clore *et al.* determinaron la conformación del PCI libre en disolución mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Pese a su pequeño tamaño, 39 residuos aminoácidos, el PCI posee una configuración globular y constituye un buen ejemplo de “proteína mínima” capaz de adoptar una estructura tridimensional estable (figura IV. B. 1. 1).



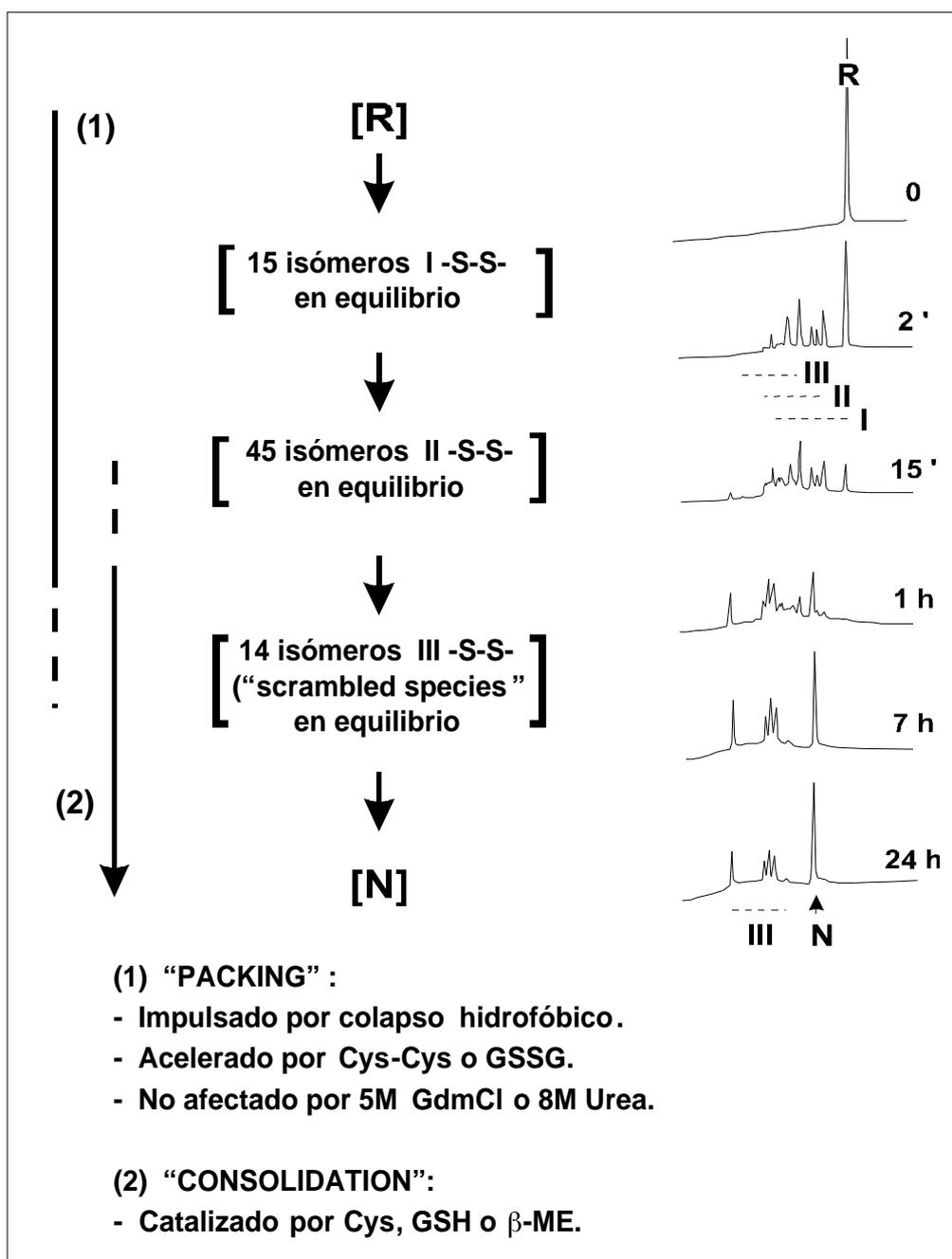
**Figura I. B. 1. 1. Estructura tridimensional del PCI.**

El PCI posee una estructura compacta, en forma de núcleo globular (27 residuos) del que sobresalen los extremos N- y C- terminal de la molécula (7 y 5 residuos respectivamente). El extremo C- terminal constituye el centro de unión primario del PCI a la carboxipeptidasa. La proteína carece de elementos regulares de estructura secundaria exceptuando una hélice  $3_{10}$  entre los residuos 14 y 18. El núcleo globular de su estructura esta estabilizado por tres puentes disulfuro que delimitan cuatro bucles ("loops"). Los puentes formados por las cisteínas 8 - 24 y 12 - 27 forman un anillo a través del cual se establece el puente disulfuro 18- 34, formando una estructura en forma de nudo.

El PCI puede ser purificado de la patata (Hass and Ryan, 1981), pero para asegurar la homogeneidad y facilitar futuros análisis de mutantes, se ha utilizado PCI recombinante (Molina *et al.* 1992) para los estudios del presente trabajo.

## **I. B. 2. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE EL MECANISMO DE PLEGAMIENTO DEL PCI.**

Los estudios sobre el mecanismo de plegamiento del PCI llevados a cabo previamente en nuestro grupo (Chang, *et al.* 1994b), revelaron que el plegamiento del PCI sigue un mecanismo en dos etapas similares al explicado para la Hirudina. Dicho mecanismo se esquematiza en la figura I. B. 2. 1.



**Figura I. B. 2. 1. Esquema del proceso de plegamiento del PCI.** En la parte derecha de la figura se muestran los cromatogramas de HPLC de fase inversa resultado de analizar los intermediarios de plegamiento atrapados en medio ácido a lo largo del proceso de replegamiento y reoxidación del PCI. (I, II, III: Especies con 1, 2 o 3 puentes disulfuro; R: Forma totalmente reducida y N: Estructura nativa).

Estudios de la influencia que ejercen agentes reductores y desnaturalizantes en la composición de los intermediarios de plegamiento sugieren que no existen interacciones específicas no covalentes que guíen el plegamiento en la primera etapa de replegamiento del PCI.

Por técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y espectrometría de masas se ha encontrado que los 75 posibles isómeros de las estructuras proteicas de uno, dos y tres puentes disulfuro, se agrupan en 23 fracciones (puras o no) de posibles intermediarios. Cabe comentar que en dichas fracciones, aunque sean puras, la cadena polipeptídica podrá adoptar más de una conformación posible. Tal heterogeneidad sugiere que no existe un único camino de plegamiento para el PCI.

Estudios cinéticos realizados sobre la segunda etapa del proceso de "refolding", la de reorganización, sugieren que es la etapa limitante del proceso de plegamiento del PCI. En ella tienen lugar roturas y nuevas formaciones ("reshuffling") de los puentes disulfuro formados por unión entre cisteínas diferentes a las uniones existentes en la estructura nativa, y además es necesaria la presencia de un catalizador con grupos tiol libres. Este último hecho nos da la explicación de por qué las especies scrambled se acumulan y pueden ser obtenidas experimentalmente. Durante la primera etapa del plegamiento las especies de cero, uno o dos puentes disulfuro con cisteínas libres actúan como catalizadores tiol de la reacción; a medida que el plegamiento proteico tiene lugar existen menos especies con cisteínas libres, ya que estas cisteínas libres van formando los puentes disulfuro de la proteína. Como consecuencia en ausencia de grupos tiol libres la reacción se para, acumulándose las especies con tres puentes disulfuro, scrambled (Chang, *et al.* 1994b).

## II. OBJETIVOS.

1. Caracterización estructural de los intermediarios de plegamiento con tres puentes disulfuro del PCI, las denominadas especies "scrambled". Se plantea en primer lugar la puesta a punto de la obtención y purificación de las especies "scrambled" en cantidades suficientemente grandes, y seguidamente su caracterización estructural a través de la determinación de sus respectivos puentes disulfuro, actividad inhibidora y técnicas espectroscópicas como el Dicroísmo Circular y Resonancia Magnética Nuclear.

2. Estudio de la última etapa del camino de plegamiento del PCI, etapa de reorganización o consolidación, donde las especies "scrambled" rompen y vuelven a formar sus puentes disulfuro para dar lugar finalmente a la estructura nativa. Para ello se plantea el estudio de la influencia de desnaturalizantes sobre el proceso de reorganización y experimentos de tipo cinético a partir de los intermediarios.

3. Aplicar el conocimiento de los factores que permiten controlar el proceso de plegamiento *in vitro* del PCI, al estudio de su expresión recombinante en E. Coli, con el fin de mejorar el rendimiento de la producción de PCI nativo, o de otras proteínas relacionadas, mediante la manipulación de la reorganización de los puentes disulfuro de las especies intermediarias del plegamiento para obtener la especie nativa.

## ÍNDICE

### III. MATERIAL Y MÉTODOS.

III. A. EQUIPAMIENTO Y PRODUCTOS QUÍMICOS.	41
III. A. 1. Equipamiento.	41
III. A. 2. Productos químicos.	42
III. B. MÉTODOS DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PCI RECOMBINANTE.	42
III. B. 1. Procedimientos de esterilización del material biológico y disoluciones.	42
III. B. 1. 1. Procedimientos de esterilización.	42
III. B. 1. 1. 1. Esterilización por calor.	42
III. B. 1. 1. 2. Esterilización por filtración.	42
III. B. 1. 2. Condiciones de esterilización en el laboratorio.	42
III. B. 2. Material biológico y medios de cultivo.	43
III. B. 2. 1. Microorganismos y cepas.	43
III. B. 2. 2. Vectores.	43
III. B. 2. 3. Medios de cultivo.	43
III. B. 2. 4. Crecimiento y manipulación de cepas bacterianas.	45
III. B. 2. 4. 1. Crecimiento de cultivos en medio líquido.	45
III. B. 2. 4. 2. Crecimiento de cultivos en placa.	45
III. B. 2. 4. 3. Mantenimiento de las cepas.	45
III. B. 3. Expresión de PCI recombinante.	45
III. B. 3. 1. Condiciones de cultivo a pequeña escala.	45
III. B. 3. 2. Condiciones de cultivo en fermentador.	46
III. B. 3. 2. 1. Características del fermentador.	46
III. B. 3. 2. 2. Funcionamiento y condiciones de la fermentación.	48
III. B. 4. Purificación de PCI recombinante.	51
III. B. 4. 1. Obtención del medio extracelular.	51
III. B. 4. 2. Obtención de la fracción periplasmática.	51
III. B. 4. 3. Concentración del medio extracelular.	52
III. B. 4. 4. Fraccionamiento cromatográfico.	53
III. B. 4. 4. 1. Cromatografía a presión atmosférica en fase reversa.	53
III. B. 4. 4. 2. Cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) de intercambio iónico.	54
III. B. 4. 4. 3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa.	55
III. B. 4. 5. Determinación de la concentración de rePCI purificado.	56

III. C. METODOS DE OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.	57
III. C. 1. Métodos de obtención de los intermediarios de plegamiento del PCI.	57
III. C. 1. 1. Métodos de obtención a partir de PCI purificado.	57
III. C. 1. 1. 1. Obtención a niveles analíticos.	57
III. C. 1. 1. 1. 1. Obtención en ausencia de desnaturizante.	57
III. C. 1. 1. 1. 1. 1. Utilización de columnas de Gel- filtración (columnas PD- 10).	57
III. C. 1. 1. 1. 1. 2. Utilización de minicolumnas de fase reversa (Sep- pak C18).	58
III. C. 1. 1. 1. 2. Obtención en presencia de desnaturizante.	59
III. C. 1. 1. 2. Obtención a niveles semipreparativos.	59
III. C. 1. 1. 2. 1. Utilización de minicolumnas de fase reversa (Sep-pak C18).	59
III. C. 1. 1. 2. 2. Utilización de columnas de Gel- filtración.	60
III. C. 1. 2. Métodos de obtención a partir de cultivos de <i>E. Coli</i> que expresan PCI.	60
III. C. 1. 2. 1. Obtención a partir del crudo de fermentación.	60
III. C. 2. Purificación y separación de los intermediarios de plegamiento del PCI por cromatografía (HPLC) de fase reversa.	62
III. C. 2. 1. Utilización de una columna C4 (Vydac) semipreparativa.	62
III. C. 2. 2. Utilización de una columna C18 (Nova- pak) analítica.	63
III. C. 2. 3. Utilización de una columna C18 (Vydac) analítica.	64
III. C. 2. 4. Utilización de una columna C3 (Zorbax) analítica.	64
III. C. 2. 5. Análisis cualitativo y cuantitativo de los intermediarios aislados.	65
III. D. CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI PURIFICADOS.	65
III. D. 1. Análisis de la pureza de cada una de las fracciones scrambled.	65
III. D. 1. 1. Análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa.	65
III. D. 1. 2. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) de intercambio iónico.	66
III. D. 1. 3. Análisis por Electroforesis Capilar (EC).	67
III. D. 2. Determinación de las constantes de inhibición de la Carboxipeptidasa de los intermediarios del PCI.	68
III. D. 2. 1. Ecuación de la constante de inhibición (Ki).	68
III. D. 2. 2. Inhibición a diferentes tiempos de preincubación.	68
III. D. 2. 3. Determinación de la constante de inhibición del intermediario Xb por el método de Lineweaver- Burk.	69
III. D. 2. 4. Determinación de las constantes de inhibición a partir de las IC <sub>50</sub> .	69

III. D. 3. Determinación de las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento del PCI.	71
III. D. 3. 1. Determinación de los puentes disulfuro por digestión con proteasas.	71
III. D. 3. 1. 1. Digestión con Tripsina y/o Quimiotripsina.	71
III. D. 3. 1. 2. Digestión con Elastasa.	71
III. D. 3. 1. 3. Digestión con Subtilisina.	72
III. D. 3. 1. 3. 1. Digestión con Subtilisina en Tris/CaCl <sub>2</sub> .	72
III. D. 3. 1. 3. 2. Digestión con Subtilisina en N-etilmorfolina.	72
III. D. 3. 1. 4. Digestión con Termolisina.	73
III. D. 3. 1. 4. 1. Digestión con Termolisina en NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> / CaCl <sub>2</sub> .	73
III. D. 3. 1. 4. 2. Digestión con Subtilisina y Termolisina en Tris/CaCl <sub>2</sub> .	73
III. D. 3. 1. 4. 3. Digestión con Termolisina en N-etilmorfolina.	73
III. D. 3. 1. 5. Digestión con Lys- C.	74
III. D. 3. 1. 6. Separación y recolección de las fracciones digeridas por cromatografía (HPLC) de fase reversa.	74
III. D. 3. 1. 7. Análisis de los péptidos de digestión por Espectrometría de Masas MALDI.	75
III. D. 3. 1. 8. Secuenciación automática N- terminal de péptidos.	75
III. D. 3. 2. Determinación de los puentes disulfuro por reducción química parcial.	75
III. D. 3. 2. 1. Análisis por Espectrometría de Masas MALDI- TOF.	77
III. D. 4. Caracterización estructural.	78
III. D. 4. 1. Estudios de Dicroísmo Circular (CD).	78
III. D. 4. 1. 1. Comparación de los espectros de DC de PCI nativo, de PCI reducido y de los intermediarios de plegamiento.	78
III. D. 4. 1. 2. Comparación de los espectros de DC de PCI nativo a diferentes concentraciones de urea y a diferente pH.	79
III. D. 4. 2. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	80
II. D. 5. Estudio del proceso de reordenamiento ("reshuffling") de los puentes disulfuro del PCI.	80
III. D. 5. 1. Estudio del equilibrio entre los intermediarios de plegamiento del PCI en presencia de agentes desnaturalizantes.	80
III. D. 5. 2. Experimentos de "Stop/ Go" de la mezcla de intermediarios de plegamiento del PCI y de cada uno de ellos aislado.	80

---

III. E. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DE PCI RECOMBINANTE.	81
III. E. 1. Estudios en cultivos de <i>E. Coli</i> a pequeña escala.	81
III. E. 1. 1. Influencia de los agentes redox en la producción de rePCI.	81
III. E. 1. 1. 1. Cultivo de 50 mL.	81
III. E. 1. 1. 1. 1. Ensayos de adición de agentes redox durante el cultivo.	81
III. E. 1. 1. 1. 2. Evolución de los sobrenadantes de cultivos en presencia de agentes redox tras ajustar el pH a 8.5.	83
III. E. 1. 1. 1. 3. Ensayos de adición de agentes redox después del cultivo.	84
III. E. 1. 1. 2. Cultivo de 500 mL y purificación del PCI obtenido.	84
III. E. 1. 1. 3. Determinación de la concentración y del tiempo de reacción óptimos de los agentes redox.	86
III. E. 1. 2. Influencia de agentes redox en la producción de otras proteínas recombinantes.	87
III. E. 1. 2. 1. Influencia de agentes redox en la producción del mutante delección Val- 38 y Gly-39 del PCI.	87
III. E. 1. 2. 2. Influencia de un agente redox en la producción del mutante delección Tyr- 37, Val- 38 y Gly- 39 del PCI.	89
III. E. 1. 2. 3. Influencia de agentes redox en la producción de Inhibidor de Carboxipeptidasa de Sanguijuela (LCI).	90
III. E. 2. Aplicación a la mejora de producción de rePCI por fermentación.	91
III. E. 3. Condiciones de cultivo en fermentador.	91

---

### III. MATERIAL Y MÉTODOS.

#### III. A. EQUIPAMIENTO Y PRODUCTOS QUÍMICOS.

##### III. A. 1. EQUIPAMIENTO.

- Agitador vórtex Heidolph, modelo top- mix 94323 (Alemania).
- Aparato de Dicroísmo Circular Jasco, modelo J- 715.
- Aparato de ultrafiltración de agua Millipore, modelo Milli- Q (USA).
- Autoclave Matachana, modelo 92617 (España).
- Balanzas Sartorius.
- Baño de ultrasonidos P- Selecta.
- Campana de esterilización Telstar UV- 100.
- Centrífugas Heraeus, modelo sephatech Megafuge 2.0R; y Sorvall Instruments du Pont, modelo RC5C (USA) con rotores GS- A y GS- 3.
- Conductímetro Crison Instruments S. A., modelo 522 (España) con un electrodo Ingold (Suiza).
- Cubetas de cuarzo Hellma de 10 mm de paso de luz.
- Electroforesis Capilar Beckman, modelo P/ ACE System 2210.
- Espectrofotómetro de UV- Visible Cary (EI).
- Espectrómetro de Masas MALDI- TOF Bruker, modelo BIFLEX.
- Espectrómetro de Masas MALDI- 1700 (Novartis, Basilea).
- Estufa de cultivos Memmert.
- Fermentador Braun modelo Biostat B (Alemania), y electrodos de pH i pO<sub>2</sub> Ingold (Suiza).
- FPLC System de Pharmacia (Suecia).
- HPLC Beckman modelo *System Gold* 126 acoplado a un detector modelo *System Gold* 166 y un inyector automático modelo *System Gold* 507.
- HPLC Waters acoplado a un detector modelo Photodiode Array detector 994 (USA).
- Incubador de aire con agitación orbital Braun, modelo Certomat (Alemania).
- Liofilizador Telstar, modelo Cryobloc (España).
- Microcentrífuga de Eppendorf, modelo 5415C (USA).
- pHmetro Radiometer Copenhaguen, modelo pHm83 con electrodo Ingold (USA).
- Speed- Vac concentrador Uniscience Univap.
- Secuenciador Automático Applied Biosystems 470 A, conectado a un Analizador de PTH, Herwlett- Pakard 1090.
- Secuenciador Automático Beckman, modelo LF3000 Protein Sequencer.
- Ultrafiltrador tangencial Millipore con membranas de medida de discriminación de 1000 Da (USA).

##### III. A. 2. PRODUCTOS QUÍMICOS.

Los productos químicos de uso general utilizados han sido reactivos de grado analítico procedentes de las casas comerciales Merck (Alemania), Sigma Chemical Co. (USA), Pharmacia (Suecia) y Fluka (Suiza).

La procedencia de los productos de utilización más específica se indicará a medida que aparezcan en el texto.

### **III. B. MÉTODOS DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PCI RECOMBINANTE.**

#### **III. B. 1. PROCEDIMIENTOS DE ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y DISOLUCIONES.**

##### **III. B. 1. 1. PROCEDIMIENTOS DE ESTERILIZACIÓN.**

Los procedimientos utilizados han sido:

- Esterilización por calor.
- Esterilización por filtración.

##### **III. B. 1. 1. 1. ESTERILIZACIÓN POR CALOR.**

El procedimiento de esterilización utilizado en el presente trabajo ha sido el de esterilización por calor húmedo.

La esterilización por calor húmedo se realiza en autoclaves. Las autoclaves de laboratorio (Matachana) trabajan a una presión de vapor de una atmósfera por encima de la presión atmosférica, a una temperatura entre 120 y 140°C durante 20- 30 min. y están equipadas con un manómetro y un medidor de temperatura. Para controlar la temperatura del interior de la cámara de esterilización se introducen entre los objetos a esterilizar papeles indicadores especiales que cambian de color cuando el tratamiento térmico es el adecuado.

##### **III. B. 1. 1. 2. ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN.**

Para esterilizar disoluciones líquidas de sustancias termolábiles se utilizan filtros capaces de retener los microorganismos.

Los filtros utilizados son Millipore (USA) y tienen un diámetro de poro de 0.22 µm.

##### **III. B. 1. 2. CONDICIONES DE ESTERILIZACIÓN EN EL LABORATORIO.**

Todas las disoluciones y todo el material de vidrio y plástico autoclavable que han sido utilizados para realizar técnicas de microbiología han sido autoclavados antes de su utilización, con excepción de aquellas disoluciones termolábiles no autoclavables que se han esterilizado por filtración.

Cuando se ha trabajado con medios de cultivo se ha trabajado al lado de una llama o dentro de una campana de flujo laminar (Telstar UV- 100) que previamente ha sido esterilizada por radiaciones de luz ultravioleta (UV).

#### **III. B. 2. MATERIAL BIOLÓGICO Y MEDIOS DE CULTIVO.**

### III. B. 2. 1. MICROORGANISMOS Y CEPAS.

- ***Escherichia Coli (E. Coli)* cepa MC1061**

Descrita por Casadaban & Cohen, (1980).

Su genotipo es: *hsdR2*, *hsdM*<sup>+</sup>, *hsdS*<sup>+</sup>, *araD139*, (*ara-leu*)<sup>7-697</sup>, (*lac*)<sup>47</sup>, *gal*<sup>15</sup>, *galK16*, *rpsL(Str<sup>r</sup>) McrA*, *McrB1*.

Esta cepa se ha utilizado como huésped general de vectores plasmídicos para la expresión de PCI recombinante, de los mutantes: delección Val38- Gly39 y delección Tyr37- Val38- Gly39 del PCI; y del Inhibidor de Carboxipeptidasa de Sanguijuela (LCI)

### III. B. 2. 2. VECTORES.

- **Plásmido pIN- III- *ompA3*.**

Pertenece a la familia de vectores p N- - *ompA* descritos por Ghayeb & col. (1984).

Este vector plasmídico de 7.25 Kb contiene el gen de resistencia a la Amp, el gen represor *lac*, el origen de replicación *Col E1* i un promotor *lpp-lac Zpo* inducible por isopropil- β- D- galactopiranósido (IPTG) que controla la expresión de la secuencia señal de secreción OmpA. Se ha utilizado como vector control porque no contiene el gen de PCI.

- **Plásmido pIMAM3**

Descrito por Molina, *et al.* (1992).

Vector derivado de p N- - *ompA3* con un gen sintético para el PCI fusionado a la señal de secreción OmpA. Se ha utilizado como vector de expresión del PCI.

- **Plásmido pIN- III del2.**

Descrito por Molina, *et al.* (1994).

Vector derivado de p N- - *ompA3* con un gen sintético para el PCI mutado fusionado a la señal de secreción *ompA*. Se ha utilizado como vector de expresión del mutante delección Val 38- Gly 39 del PCI.

- **Plásmido pIN- III del3.**

Descrito por Marino & Venhudova (2000).

Vector derivado de p N- - *ompA3* con un gen sintético para el PCI mutado fusionado a la señal de secreción *ompA*. Se ha utilizado como vector de expresión del mutante delección Tyr 37- Val 38- Gly 39 del PCI.

- **Plásmido que pIN- III LCI.**

Descrito por Reverter, *et al.* (1998).

Vector derivado de p N- - *ompA3* con un gen sintético para el LCI fusionado a la señal de secreción *ompA*.

### III. B. 2. 3. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo utilizados se describen en el manual de Sambrook (1989).

- **Medio LB “Luria- Bertani”** (para 1 litro de agua de calidad milli- Q):

Bacto- triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Se ajusta el pH a 7.2 con NaOH y se esteriliza dentro de la autoclave (120 °C) durante 20 minutos.

La bacto- triptona y el extracto de levadura son suministrados por la casa Difco.

- **Medio mínimo M9** (para 1 litro de agua):

Sales M9 x 10	100 mL
MgSO <sub>4</sub> 1M	2 mL
CaCl <sub>2</sub> 1M	1 mL
Tiamina 1M	1 mL
Glicerol 80%	4 mL

Estas disoluciones se esterilizan por separado. Las sales M9 x 10, el MgSO<sub>4</sub> (1M), el agua y el glicerol 80% se esterilizan dentro de la autoclave (120 °C) durante 20 minutos; mientras que la tiamina y el CaCl<sub>2</sub> (1M) se esterilizan por filtración con filtros estériles de 0.2 µm de poro y 25 mm de diámetro de la casa Millipore (USA).

La composición de las sales M9 x 10 es la siguiente:

- **Sales M9 x 10** (para 1 litro de agua):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	64.6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g
NaCl	5 g

Una vez mezcladas las sales, la disolución se ajusta el pH a 7.4 con NaOH.

- **Medio M9 CAS** (para 1 litro de agua):

Se suple el medio mínimo M9 con casaminoácidos (Difco) a una concentración final del 0.2% peso/ volumen:

Medio M9	990 mL
Casaminoácidos 20%	10 mL

La disolución de casaminoácidos se prepara al 20% y se esteriliza en el autoclave (120°C) durante 20 minutos.

- **Adición de antibióticos a los medios de cultivo:**

Al cultivar cepas portadoras de vectores, los medios de cultivo deben suplir con los antibióticos a los que confieren resistencia con el fin de que la cepa no pierda el vector. Para ello, se prepara por separado y se esteriliza una disolución de antibiótico stock. Una vez esterilizado el medio de cultivo se añade el antibiótico a partir de esta

disolución stock. El antibiótico utilizado en este trabajo es la Ampicilina (Amp) (Boehringer) y se prepara de la siguiente manera:

Se prepara una disolución stock de 25 mg/ mL en agua destilada de calidad milli- Q. Se esteriliza por filtración y se guarda en forma de alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La concentración final de Amp que se emplea en los medios de cultivo es de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **III. B. 2. 4. CRECIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.**

Los protocolos se han obtenido de los manuales de Sambrook (1989) i Davis & col. (1986).

##### **III. B. 2. 4. 1. CRECIMIENTO DE CULTIVOS EN MEDIO LÍQUIDO.**

Para el crecimiento de un cultivo bacteriano pequeño se adicionan en un erlenmeyer estéril de 250 mL unos 50 mL de medio LB o medio mínimo M9 estéril, las cantidades necesarias de suplementos adicionales (fuente de carbono suplementaria, antibióticos, etc...) dependiendo de cada caso y 0.5 mL del preinóculo bacteriano. Dicho preinóculo se prepara adicionando 2- 3  $\mu\text{L}$  de un cultivo stock glicerinado o una colonia, si la cepa bacteriana la tenemos guardada en placa, a 2- 3 mL de medio LB que contienen ampicilina en un tubo estéril de 10 mL.

El erlenmeyer se pone a incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante de 250 a 300 rpm entre 12 y 15 horas.

##### **III. B. 2. 4. 2. CRECIMIENTO DE CULTIVOS EN PLACA.**

Para el crecimiento de cultivos bacterianos en placas de Petri se utilizan placas con medio mínimo M9, 15 g/ L de agar y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. La cepa bacteriana se extiende sobre las placas en estrías con ayuda de una asa, y las placas se incuban en posición invertida entre 12 y 15 horas en un horno a  $37^{\circ}\text{C}$  sin agitación.

##### **III. B. 2. 4. 3. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.**

Para el mantenimiento de las cepas a corto plazo (un mes como máximo) estas se pueden plaquear en placas de Petri, que contengan el medio adecuado, y guardarlas invertidas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Para el mantenimiento de las cepas a largo plazo se guardan alícuotas de un cultivo a las que se añade glicerol que permite conservar el cultivo durante como mínimo dos años. Para ello se inocula la cepa deseada en 10 mL de medio de cultivo y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación durante 12 horas. Una vez el cultivo ha crecido se hacen alícuotas de 850  $\mu\text{L}$  en tubos estériles y a cada una se adicionan 150  $\mu\text{L}$  de glicerol 80%, esterilizado previamente en la autoclave. Se mezcla la disolución con ayuda de un vórtex y se congela inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **III. B. 3. EXPRESIÓN DE PCI RECOMBINANTE.**

##### **III. B. 3. 1. CONDICIONES DE CULTIVO A PEQUEÑA ESCALA.**

Las condiciones de crecimiento de los cultivos de la cepa bacteriana *E. Coli* MC1061 con el plásmido recombinante p MAM 3 se resumen a continuación:

1. Se prepara un inóculo adicionando 2- 3  $\mu\text{L}$  de un cultivo stock glicerinado a 2- 3 mL de medio LB que contiene Amp (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en un tubo estéril de 10 mL.
2. Se deja crecer durante la noche (over/night, "o/n") a 37°C y 300- 350 rpm hasta una densidad óptica (DO) aproximada de 1.
3. Se prepara el cultivo adicionando 0.5 mL del inóculo a 50 mL de medio M9 CAS que contiene Amp (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y IPTG (2 mM) en un erlenmeyer estéril de 250 mL. El IPTG actúa como inductor de la expresión de la proteína recombinante.
4. Se deja crecer el cultivo "o/ n" a 37°C y 300- 350 rpm.
5. Después de 18 horas de crecimiento celular aproximadamente se sacan los cultivos del incubador y se mira la DO de éstos a una absorbancia de 550 nm, y se analizan según corresponda.

Normalmente se realizan tres cultivos control: dos cultivos con el plásmido p N- *OmpA3* nativo (sin inserto) uno inducido con IPTG y el otro sin inducir; y un tercer cultivo con el plásmido recombinante pI MAM 3 pero sin inducir.

### III. B. 3. 2. CONDICIONES DE CULTIVO EN FERMENTADOR.

Para la obtención de grandes cantidades de proteína recombinante PCI partimos de cultivos en fermentador. En el fermentador el proceso está muy automatizado y tiene como principales ventajas que permite trabajar con volúmenes superiores y con condiciones de incubación controladas.

El tipo de fermentación utilizado en este trabajo ha sido discontinuo alimentado o "fed batch". Esta técnica es esencialmente un cultivo en batch el cual es alimentado con nutrientes frescos.

#### III. B. 3. 2. 1. CARACTERÍSTICAS DEL FERMENTADOR.

El fermentador permite controlar la temperatura, la agitación, el pH, la oxigenación y la adición de substratos, incrementando de manera importante los niveles de crecimiento celular (hasta  $\text{DO}_{550}$  de 30) y los niveles de expresión.

El fermentador utilizado en este trabajo es el modelo Biostat B de la casa Braun (figura III. B. 3. 2. 1. 1.) que presenta las siguientes características:

- Vaso de fermentación de dos litros de volumen.
- Camisa termostaticadora por baño de agua.
- Sonda de temperatura conectada a un controlador.
- Sistema de agitación con espas giratorias.
- Entrada de aire regulada por un manómetro y distribuida por una asa de aireación.
- Sonda de pH. Electrodo de la casa Ingold, conectado a un controlador acoplado a bombas peristálticas para la adición de ácido o de base.
- Sonda de oxígeno. Electrodo de la casa Ingold, conectado a un controlador acoplado a una bombona de oxígeno.
- Salida de gases refrigerada por un condensador.
- Bombas peristálticas para la adición de substratos.
- Tapa superior con salidas de conexión para el séptum de inoculación, tubo de recogida de muestra, entradas de substratos, etc...

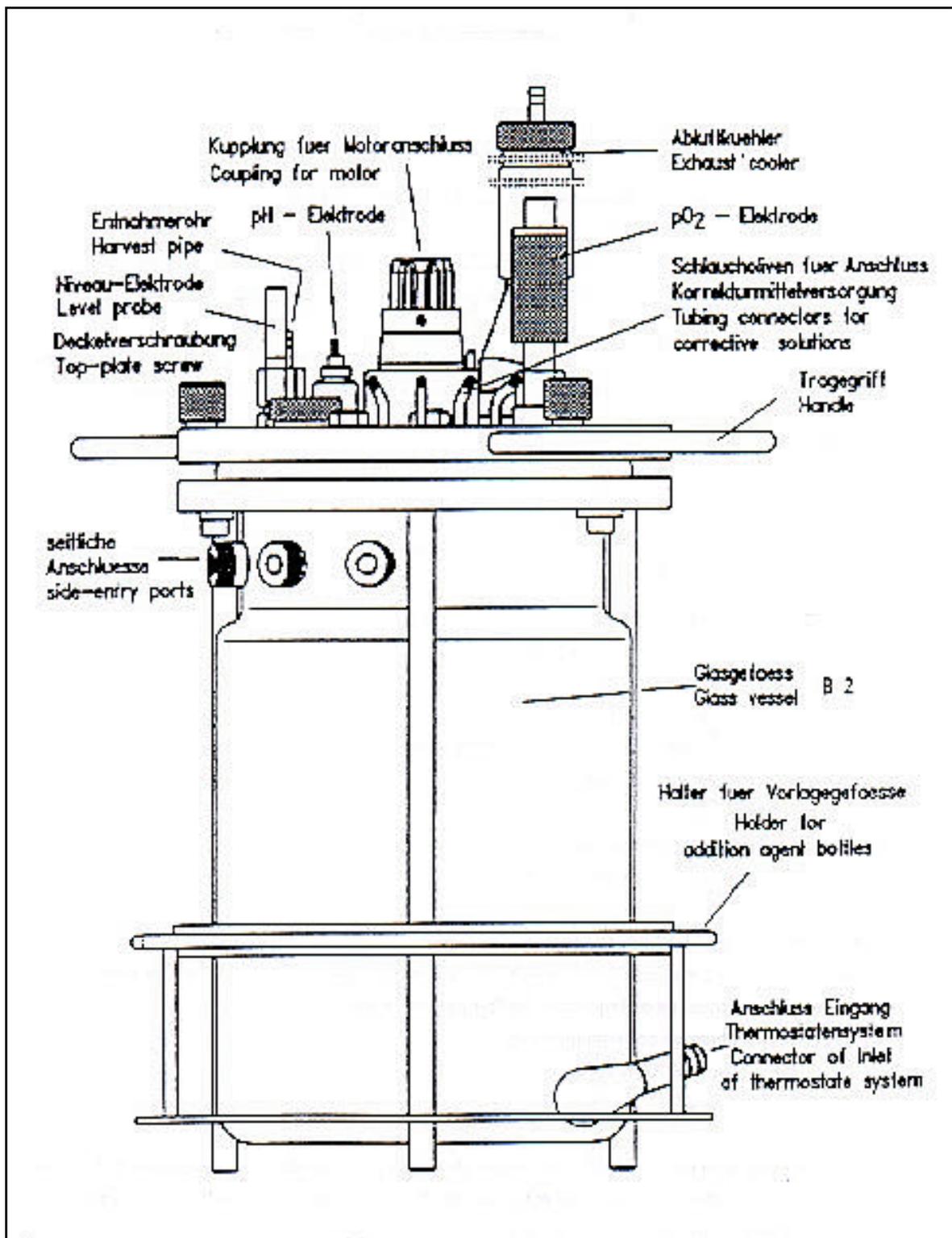


Figura III. B. 3. 2. 1. 1. Esquema de las características del fermentador Biostat B.

### III. B. 3. 2. 2. FUNCIONAMIENTO Y CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN.

Seguidamente se exponen las normas de funcionamiento (Operating Manual, BIOSTAT B) y las condiciones de fermentación más óptimas para la producción de PCI.

#### a) Desarrollo del inóculo.

1. Dos días antes de la fermentación, se prepara un preinóculo de la soga bacteriana *E. Coli* MC1061 portadora del plásmido recombinante p MAM3.
2. Se inoculan 2- 3  $\mu$ L de un cultivo stock glicerinado en 2- 3 mL de medio M9 CAS utilizando como fuente de carbono glicerol al 0.3% (III. B. 2. 3) y suplido con 50  $\mu$ g/ mL de Amp en un tubo de 10 mL estéril.
3. Se deja crecer el preinóculo "o/ n" a 37°C con agitación a 250- 300 rpm.
4. Un día antes de la fermentación se prepara un inóculo adicionando 1.5 mL de preinóculo a un erlenmeyer estéril que contiene 150 mL del mismo medio y se deja crecer el cultivo en idénticas condiciones.
5. El tercer día se siembra el fermentador con los 150 mL del inóculo.

#### b) Preparación de la fermentación.

1. Un día antes de la fermentación se prepara el fermentador:
  - Se limpia el vaso del fermentador, con especial cuidado con las entradas de la asa de aireación.
  - Se calibra la sonda de pH del fermentador.
  - Se comprueba la sonda de oxígeno y si hace falta adicionar electrolito.
  - Se cambia el séptum de incubación.
  - Se colocan los filtros de 0.22  $\mu$ m en los diferentes lugares de entrada de aire.
  - Se deja la camisa de refrigeración abierta.
  - Se llena el vaso del fermentador con:
    - 1185 mL de H<sub>2</sub>O destilada.
    - 135 mL de sales M9 x 10 (III. B. 2. 3).
  - Se monta la tapa y los electrodos.
  - Se protegen todos los conectores y salidas con papel de aluminio. En el caso de los filtros de aire y de las conexiones eléctricas se protegen con algodón y papel de aluminio.
  - Se prepara dos botellas del fermentador con:
    - 200 mL de CAS AA al 20 %.
    - 200 mL de Glicerol al 80%.
2. Se autoclava el fermentador, el condensador de gases y las botellas de fermentador a 120°C durante 20 minutos. Una vez acabado el proceso de esterilización de la autoclave se monta el condensador de gases en caliente para evitar al máximo una contaminación.
3. Se deja enfriar el fermentador y se instalan las conexiones:
  - Se conectan las sondas al controlador.
  - Se conectan los tubos a la camisa termostaticadora.

- Se conectan los tubos del condensador de gases al sistema de agua circulante.
  - Se acopla el sistema de agitación.
  - Se conecta la entrada de aire al controlador y se ajusta el flujo de entrada de aire.
  - Se conectan y se ceban los tubos de los substratos, del ácido y de la base a las bombas peristálticas del módulo.
  - Se enciende el control de la temperatura a 37°C.
  - Se deja el fermentador en estas condiciones un mínimo de 6 horas ("o/ n") para polarizar la sonda de oxígeno.
4. El día de la fermentación se calibra la sonda de oxígeno. Se ajusta el 0% saturado con nitrógeno y el 100% con aire.
5. Se agregan de forma estéril, por el séptum de inoculación, los restantes componentes del medio:
- 2.7 mL de MgSO<sub>4</sub> (1 M)
  - 1.35 mL de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M)
  - 1.35 mL de Tiamina (0.1 %)
  - 8.5 mL de Glicerol (80%)
  - 13.5 mL de CAS AA (20 %)
  - 1.35 mL de Oligoelementos\*
  - 2.7 mL de Amp (25 mg/ mL)
  - 15 mL de IPTG (200 mM)
  - Unas gotas de antiespumante (Braun- Biotech S.A.)

\*Los Oligoelementos son los componentes de una mezcla formada por diversas sales que se esterilizan por filtración.

Composición de sales de los oligoelementos:

MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10 mg/ L
CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	4 mg/ L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 mg/ L
CuCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	1 mg/ L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.5 mg/ L
AlCl <sub>3</sub>	1 mg/ L
*FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	40 mg/ L

\*El FeSO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O se ha de preparar y filtrar al momento para su esterilización.

6. Se inocula el medio del fermentador con el inóculo de 150 mL con la ayuda de una de las bombas peristálticas del módulo.
7. Se fijan las condiciones y los controles iniciales de la fermentación:
- **Control de la temperatura:**  
*Set point: 37°C*  
*Mode: Auto*

- **Control del pH:**  
*Set point:* 7  
*Mode:* Auto
- **Control de pO<sub>2</sub>:**  
*Set point:* 50%  
*Mode:* Auto Stir  
 Entrada de aire a 6 L/ min  
 La bombona de oxígeno no esta conectada
- **Control de la agitación:**  
*Set point:* va variando  
*Mode:* Auto Casc

Con estos parámetros los rpm de la agitación están subordinados al mantenimiento de un *set point* de la pO<sub>2</sub> al 50%. A medida que el cultivo va creciendo (fase exponencial) disminuye la pO<sub>2</sub>, que inicialmente se encontraba sobre el 100%, hasta que cuando llega al 50% la agitación subordinada al *set point* de la pO<sub>2</sub> hace incrementar la agitación para incrementar la aireación y mantener esta condición.

8. Se controla el crecimiento celular, recogiendo alícuotas y midiendo su DO a 550 nm, y la velocidad de agitación. Si en algún momento se para el crecimiento se hacen adiciones de los substratos casaminoácidos 20% y glicerol 80% en una proporción de 2 a 1.

9. Cuando la agitación llega cerca de 900 rpm se cambian las condiciones, se fija la velocidad de agitación a 900 rpm, se conecta la bombona de oxígeno al sistema.

- **Control de pO<sub>2</sub>:**  
*Set point:* 50%  
*Mode:* Auto Gasm  
 Entrada de aire a 6 L/ min  
 Se conecta la bombona de oxígeno
- **Control de la agitación:**  
*Set point:* 900 rpm  
*Mode:* Auto

En el momento que la agitación se fija manualmente a 900 rpm, el control básico se realiza monitorizando el consumo de oxígeno. Si las bacterias continúan creciendo consumen cada vez más oxígeno y por lo tanto se suministra oxígeno directamente de la bombona para mantener la pO<sub>2</sub> al 50%. Cuando el cultivo llega a fase estacionaria, el consumo de oxígeno disminuye debido a la parada del crecimiento y disminución del ritmo metabólico.

10. Cuando el cultivo lleva aproximadamente 10- 12 horas de crecimiento se hace una segunda inducción con 15 mL de IPTG (200 mM).

11. Se deja crecer el cultivo durante 25- 30, horas hasta que llega a fase estacionaria.

A modo de ejemplo orientativo, los tiempos de adición de nutrientes y el control de la agitación realizadas en una de las fermentaciones es la siguiente:

**Tabla III. B. 3. 2. 2. 1. Tiempos de adición de nutrientes y control de la agitación durante la fermentación.**

Tiempo después de inocular (horas)	Agitación (rpm)	CAS AA (mL) + Glicerol 80% (mL)	Sales M9 + MgSO <sub>4</sub> + CaCl <sub>2</sub> + Tiamina + Oligoelementos (mL <sub>T</sub> )
3	500		
4.45	600		
5		15 / 30	
6	800		
6.15		15 / 30	
6.30	900		25
6.45		15 / 30	
10.30		30 / 60	50 + IPTG
24		15 / 30	

### III. B. 4. PURIFICACIÓN DE PCI RECOMBINANTE.

Para purificar grandes cantidades de PCI recombinante se parte siempre de cultivos en fermentador con volúmenes de aproximadamente 2 litros. La proteína se localiza en el medio extracelular aunque se ha hecho una obtención del periplasma como comprobación.

#### III. B. 4. 1. OBTENCIÓN DEL MEDIO EXTRACELULAR.

Con el medio obtenido de la fermentación seguimos el siguiente procedimiento:

1. Se distribuye el cultivo en tubos de centrifuga de 0.5 L y se centrifugan a 9000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.

La centrifuga utilizada es una Sorvall y el rotor empleado es un GS- A.

2. Se filtra el sobrenadante a través de filtros de baja retención de proteínas de 0.8, 0.4 y 0.2 µm sucesivamente. Los filtros utilizados son de la casa Millipore y la filtración se realiza pasando la muestra a través de un kitasatos acoplado a un sistema de vacío.

#### III. B. 4. 2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN PERIPLASMÁTICA.

Con una sexta parte (400 mL aproximadamente) del crudo de fermentación obtenido seguimos el siguiente procedimiento:

1. Se centrifugan las células a 4200 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se separa el precipitado celular del sobrenadante por decantación y se guarda.

La centrifuga utilizada es una Sorvall y el rotor empleado es un GS- 3.

2. Se resuspende el precipitado celular por agitación en 60 mL de Tampón P durante 10 minutos sobre una base de hielo.

La composición del **Tampón PI** es la siguiente:

Sacarosa 20 %	200 gr
Tris 0.2 M (Trizma Base SIGMA)	24.2 gr
EDTA 0.1 M (Titriplex III, MERCK)	37.2 gr
H <sub>2</sub> O destilada	1 litro

Finalmente se ajusta el pH a 9.0 con NaOH (10N) y se deja enfriar durante 2 horas a 4°C.

3. Se centrifuga la suspensión a 9000 rpm durante 15 minutos a 4°C en la misma centrífuga. Nuevamente se separa el precipitado celular por decantación y se guarda.

4. Se resuspenden las células por agitación en 60 mL de Tampón P durante 10 minutos sobre una base de hielo.

La composición del **Tampón PII** es la siguiente:

Tris 0.2 M (Trizma Base SIGMA)	24.2 gr
H <sub>2</sub> O destilada	1 litro

Finalmente se ajusta el pH a 9.0 con NaOH (10 N) y se deja enfriar durante 2 horas a 4°C.

5. Se centrifuga la suspensión II a 9000 rpm durante 15 minutos a 4°C en la misma centrífuga. Se separa el precipitado celular por decantación y esta vez se recupera el sobrenadante. Se guarda, se determina la concentración de PCI del sobrenadante (III. B. 4. 5.) y se analiza por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. C. 2. 3.).

### III. B. 4. 3. CONCENTRACIÓN DEL MEDIO EXTRACELULAR.

Se concentra el medio extracelular con un aparato de Ultrafiltración tangencial (Pellicon Millipore). Esta técnica permite la concentración de disoluciones de moléculas que no pasan a través del diámetro de poro de la membrana del ultrafiltrador. La membrana utilizada en el presente trabajo discrimina entre moléculas de  $M_r$  inferior o superior a 1000 Da.

Para la concentración se siguen los siguientes pasos:

1. Se monta el ultrafiltrador tangencial con la membrana.
2. Se realiza un primer lavado del ultrafiltrador. Se pasan 5 L de agua destilada a una presión de 20 psi de entrada y 10 psi de salida (20/ 10). En estas condiciones se realiza un control de la membrana, se mide el parámetro NWP de la membrana.

$$NWP = \frac{R}{\frac{Pe + Ps}{2} \times S} \times F$$

S = Superficie (1 dm<sup>2</sup>)

R = Volumen filtrado por minuto

Pe = Presión de entrada en psi (20 psi)

Ps = Presión de salida en psi (10 psi)

F = Factor de temperatura (para 22°C el factor es 1.072)

En estas condiciones el parámetro NWP debe tener un valor aproximado a 1.

3. Saturación. Se recircularizan 500 mL de Seroalbúmina bovina (BSA) 0.1% durante 30 min trabajando a una presión de 20/ 10.

4. Segundo lavado. Se pasan 5 L de agua destilada a una presión de 20/ 10.

5. Concentración de la muestra. Se recircularizan los 2 L de medio extracelular, descartando el filtrado, hasta un volumen de 100 mL. Para la concentración de la muestra se trabaja a una presión de 40/ 20.

6. Limpieza. Se recircularizan 500 mL de NaOH (0.5 N) durante 30 min trabajando a una presión de 20/ 10 nuevamente.

7. Lavado. Se pasan 5 L de agua destilada a una presión de 20/ 10. En estas condiciones se vuelve a realizar el control de la membrana y se recalcula el parámetro NWP que debe de tener un valor aproximado al calculado anteriormente.

8. Conservación. Se recircula formaldehído 2% durante 10 min a presión 20/ 10.

9. Se desmonta el aparato y se guarda la membrana a 4°C en disolución de formaldehído al 2%.

### III. B. 4. 4. FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO.

Para la purificación de PCI se realizan tres fraccionamientos cromatográficos:

- Cromatografía a presión atmosférica en fase reversa.
- Cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) de intercambio aniónico.
- Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa.

#### III. B. 4. 4. 1. CROMATOGRAFÍA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA EN FASE REVERSA.

El principio de separación de moléculas de la fase reversa se basa en el diferente carácter hidrofóbico de éstas.

La fase estacionaria esta formada por un soporte de partículas esféricas de sílica o un polímero inerte que contienen cadenas hidrocarbonadas unidas covalentemente que le dan a la superficie un carácter no polar. La interacción entre las moléculas y la fase estacionaria se realiza por interacciones hidrofóbicas y de reparto entre fases de forma que las diferentes moléculas de una disolución se separan por su carácter hidrofóbico. En consecuencia son eluidas primero las moléculas más polares y seguidamente las apolares.

En el presente trabajo se han utilizado las minicolumnas preempaquetadas Sep pak C18 de 35 cc. Son Waters-Millipore y vienen preempaquetadas con 10 gr de soporte de sílica que lleva unidas covalentemente cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono.

Un primer fraccionamiento cromatográfico en una columna de fase reversa nos permitirá eliminar las sales, gran parte del color de la muestra y las proteínas más grandes que quedan retenidas en la columna.

El protocolo de fraccionamiento seguido en estas columnas es el siguiente:

- a) Se pretrata la columna con 50 mL de acetonitrilo de calidad HPLC.
- b) Se lava la columna con 100 mL de agua destilada Milli- Q.
- c) Se carga la muestra concentrada a 100 mL. En tales condiciones iniciales nuestra proteína queda retenida.
- d) Se lava la columna con 100 mL de agua destilada Milli- Q.
- e) Se hace una primera elución con 50 mL de acetonitrilo 15 %. En este paso no se eluye nuestra proteína y en cambio se elimina gran parte del color.

- f) Finalmente se eluye nuestra proteína con 50 mL de isopropanol al 30 %.
- g) Se acaba de eluir todo el retenido en un último paso con 50 mL de isopropanol al 60%.

Se comprueba por cromatografía (HPLC) de fase reversa que nuestra proteína se encuentra en la fracción eluida con isopropanol 30% (apartado III. C. 2. 3.).

Finalmente se evapora el isopropanol en el Speed- Vac.

### III. B. 4. 4. 2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (FPLC) DE INTERCAMBIO IÓNICO.

La cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) ha sido un método escogido para la separación, purificación semipreparativa y repurificación de proteínas. El fraccionamiento cromatográfico utilizando tiene como ventajas que permite la purificación en menos tiempo, da un alto rendimiento y permite una recuperación óptima de especies puras y nativas en menos etapas.

El equipo utilizado es un LKB- Pharmacia FPLC System y se compone de:

- Una bomba peristáltica P-1.
- Dos bombas de alta precisión P- 500.
- Controlador de flujo y gradiente LCC- 500 *plus Liquid Chromatography controller*.
- *Loops* de volumen variable y un *superloop* de 50 mL.
- Detector variable LKB 2140 *Rapid Spectral Detector*.
- Registrador *Plotter* Hewlett Pakard modelo 7475 A.
- Válvulas MV- 7 *Motor Valve*.
- Ordenador Tandon PAC 3865

Todos los disolventes utilizados en el FPLC han sido preparados con agua destilada y desionizada a través de un equipo Milli- Q. Posteriormente han sido filtrados a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  y desgasificados en un baño de ultrasonidos (P- Selecta) durante 10 min.

El fraccionamiento cromatográfico en la purificación de la proteína se realiza en una columna de intercambio aniónico y su elución se sigue por absorción a 280 nm.

La columna utilizada ha sido una TSK- DEAE 5PW Ultrapac de LKB con un diámetro de partícula de 10  $\mu\text{m}$ , diámetro de poro de 0.1  $\mu\text{m}$  y de medidas de 21.5  $\times$  150 mm, protegida con una precolumna empaquetada del mismo material.

La muestra evaporada y concentrada hasta unos 3- 5 mL en el Speed- Vac se diluye en 25 mL de fase móvil A (Tris- Acético 20 mM, pH= 8.5) y se comprueba que la conductividad sea igual o no muy superior a las condiciones de equilibrio de la columna cromatográfica y que su pH sea similar al de los disolventes de la cromatografía (pH= 8.5).

El protocolo seguido y las condiciones cromatográficas utilizadas para la purificación de PCI son las siguientes:

Fases móviles A y B:

- Fase móvil A: TrisAcOH      20 mM      pH= 8.5  
(Se ajusta el pH con Acético Glacial)
- Fase móvil B: TrisAcOH      20 mM

NH<sub>4</sub>AcO      0.8 M      pH= 8.5  
(Se ajusta el pH con Amoniaco)

Se equilibra la columna con fase móvil A a un flujo de 4 mL/ min durante 30 minutos como mínimo.

Al final del equilibrado, el pH y la conductividad a la salida de la columna deben ser similares a los de la fase móvil A.

1. Se disuelve la muestra en 25 mL de fase móvil A, se mide su conductividad y su pH. Su conductividad no debe ser mayor de 1500 µS. Si esto sucede, se debe diluir con más fase móvil A. En cuanto al pH, si es menor de 8.25, se debe aumentar con NaOH (1 M).

2. Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	100	0
15	100	0
85	80	20
90	0	100
100	0	100
105	100	0

El flujo es constante a 4 mL/ min.

3. Se sigue el curso de la cromatografía detectando la absorbancia a 280 nm a la salida de la columna. Se recogen los picos que salen de la columna entre los minutos 65 y 85, tiempo de elución del PCI recombinante.

4. Se identifica el PCI por cromatografía (HPLC) de fase reversa de las fracciones obtenidas (III. C. 2. 3.).

5. Finalmente se liofiliza la fracción que contiene el rePCI para una posterior purificación (III. B. 4. 4. 3.).

Al final de la cromatografía la columna se guarda en metanol 20% a 4°C.

### III. B. 4. 4. 3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC) DE FASE REVERSA.

En el presente trabajo la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se ha utilizado como tercer y último paso de purificación; como método analítico para identificar en que fracción de las obtenidas en las diferentes purificaciones se encuentra nuestra proteína y para valorar el grado de pureza de las proteínas. Variando para cada caso el tipo de columna utilizada y las condiciones de análisis.

El equipo de cromatografía líquida de alta presión utilizado es un Beckman y consta de las siguientes partes:

- Dos bombas de alta presión modelo *System Gold 126*
- Ordenador EMC
- Controlador de flujo y gradiente programa *System Gold*
- Inyector manual de 2 mL
- Inyector automático modelo *System Gold 507*
- Detector modelo *System Gold 166*

Todos los disolventes utilizados en el HPLC han sido preparados con agua destilada y desionizada a través de un equipo Milli- Q. Posteriormente han sido desgasificados en un baño de ultrasonidos durante 10 min.

En el presente trabajo el tipo de cromatografía utilizado en el HPLC es la cromatografía en columnas de fase reversa.

Como se ha descrito anteriormente (III. B. 4. 4. 1) el material de empaquetamiento de la fase reversa suele estar formado por un soporte de sílica de medida de poro de 100 Å aproximadamente, que tiene unidas covalentemente cadenas hidrocarbonadas de 4 a 18 átomos de carbono; la medida de las partículas suele ser de 5 o 10 µm. Las variaciones en la medida de poro, de la partícula y en la densidad y longitud de las cadenas hidrocarbonadas determinaran diferentes especificidades y aplicaciones. En nuestro caso la columna utilizada es una Vydac C4 semipreparativa (modelo 214TP1010) con un diámetro de partícula de 10 µm, diámetro de poro de 30 nm y medidas de 1.0 x 25 cm, protegida con una precolumna empaquetada con el mismo material.

El protocolo seguido como último paso de purificación del PCI es el siguiente:

Fases móviles A y B:

- Fase móvil A: H<sub>2</sub>O con 0.1% de Ácido trifluoroacético (TFA)
- Fase móvil B: Acetonitrilo con 0.1% TFA

1. Se equilibra la columna con una mezcla de 80% A a un flujo de 1.4 mL/ min al menos durante 15 minutos.
2. Se disuelve la muestra liofilizada en 2 mL de fase móvil A y se inyecta manualmente al HPLC.

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	80	20
5	80	20
45	60	40
50	20	80
55	20	80
57	80	20

El flujo de elución es constante a 1.4 mL/ min.

Se sigue la elución de la proteína por absorción a 280 nm.

3. Se recoge la fracción que aparece entre los 35 y 40 min, tiempo de elución de nuestra proteína.
4. Finalmente se liofiliza la fracción recogida

Al final de la cromatografía la columna se guarda en acetonitrilo sin TFA a temperatura ambiente.

### III. B. 4. 5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE rePCI PURIFICADO.

En el presente trabajo, se ha determinado la concentración de proteína a partir del espectro de absorción de proteínas en el ultravioleta (UV). La particular estructura primaria de las proteínas, y en concreto, su contenido total en aminoácidos aromáticos, determina que éstas presenten un espectro de absorción típico entre 240 nm y 340 nm, con un máximo alrededor de los 280 nm.

La determinación de la concentración de proteína se ha realizado por métodos espectroscópicos gracias al

$$\epsilon_{280 \text{ 0.1\%}} = 3 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \cdot \text{cm}}$$

conocimiento previo del coeficiente de extinción molar ( ) del PCI a 280 nm (Hass y Ryan, 1981):

A partir de la ley de Lambert & Beer, conociendo el coeficiente de absorción del PCI y utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de ancho, podemos conocer la concentración de una disolución de PCI midiendo la absorbancia a dicha longitud de onda:

$$[PCI] = \frac{A_{280} \text{ mg}}{3 \text{ mL}}$$

### **III. C. MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DE PCI.**

#### **III. C. 1. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.**

Los intermediarios de plegamiento del PCI se pueden obtener a partir de PCI puro, mediante la reorganización de puentes disulfuro de la proteína nativa; o bien a partir de cultivos de *E. Coli* que expresan PCI, purificando los intermediarios producidos en cualquier fermentación de PCI recombinante.

##### **III. C. 1. 1. MÉTODOS DE OBTENCIÓN A PARTIR DE PCI PURIFICADO.**

Según los ensayos que se quieran realizar con los intermediarios de plegamiento se requerirá su obtención a niveles analíticos o a niveles semipreparativos.

##### **III. C. 1. 1. 1. OBTENCIÓN A NIVELES ANALÍTICOS.**

Como se describe posteriormente en resultados y discusión (IV. A. 1) existe una diferencia notable en la proporción de intermediarios cuando estos se obtienen en presencia o ausencia de desnaturalizante. Los protocolos seguidos se describen a continuación:

##### **III. C. 1. 1. 1. 1. OBTENCIÓN EN AUSENCIA DE DESNATURALIZANTE.**

Para la obtención de los intermediarios en ausencia de desnaturalizante se ensayan dos tipos de columnas: columnas de Gel- filtración (columnas PD- 10), o bien minicolumnas de fase reversa (minicolumnas Sep- pak C18).

##### **III. C. 1. 1. 1. 1. 1. Utilización de columnas de Gel- filtración (columnas PD- 10).**

Para la eliminación rápida del desnaturalizante y del reductor al que es sometido el PCI se utilizan columnas de Gel- filtración (columnas PD- 10) que separan las moléculas en función del peso molecular. Las columnas PD- 10 (Pharmacia Biotech) vienen preempaquetadas con Sephadex G- 25 M sumergido en agua destilada que contiene 0.15% Kathon CG/ICP Biocide.

El protocolo seguido para la obtención de los intermediarios en estas condiciones es el siguiente:

1. Se reduce y desnaturaliza el PCI disolviendo 2.5 mg de muestra en 0.5 mL de tampón Tris. HCl (0.5 M, pH=8.5) que contiene GdmCl (5 M) i DTT (60 mM) durante 90 min a 24°C.

2. Se pasa la muestra por una columna PD- 10, procesando la muestra de la siguiente manera:
    - a) Se equilibra la columna con 25 mL de tampón Tris/ HCl (0.1 M, pH= 8.5), previamente saturado de oxígeno por burbujeo durante 20 min.
    - b) Se pasa la muestra por gravedad por la columna.
    - c) Se lava con 2.3 mL del mismo tampón.
    - d) Se eluye la muestra con 1.2 mL del mismo tampón.
  3. Se diluye la muestra con 1.3 mL de tampón Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5) para llegar a una concentración final de proteína de 1 mg/ mL.
  4. Se deja el PCI reducido y desnaturalizado obtenido, un mínimo de 4h a 24 °C para la formación de los intermediarios de plegamiento con tres puentes disulfuro del PCI.
  5. Se adiciona a la muestra el mismo volumen de la siguiente disolución: 4 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN + 4% de TFA.
- En estas condiciones, los intermediarios de plegamiento del PCI son completamente estables durante 24h a 25°C.

### III. C. 1. 1. 1. 1. 2. Utilización de minicolumnas de fase reversa (minicolumnas Sep- pak C18).

El principio de separación de moléculas de la fase reversa se basa en el diferente carácter hidrofóbico de éstas como se ha explicado anteriormente (III. B. 4. 4. 1.).

En el presente protocolo se han utilizado las minicolumnas preempaquetadas Sep- pak C18 de 1cc de volumen. Son suministradas por Waters- Millipore y vienen preempaquetadas con un soporte de sílica que lleva unidas covalentemente cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono.

El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Se disuelven 1.5 mg de PCI en 1.5 mL de tampón Tris/ HCl (0.5 M, pH= 8.5) que contenga 5 mg/ mL de Ditiotreitól (DTT).
2. Se deja que la reacción tenga lugar durante toda la noche, para asegurar que todo el PCI se ha reducido.
3. Se pasa la muestra por una minicolumna Sep- pak C18, procesándola de la siguiente manera:
  - a) Se pretata la minicolumna con 10 mL de acetonitrilo y luego 25 mL de agua Milli- Q.
  - b) Se pasan 1.5 mL de muestra.
  - c) Se lava la minicolumna con 25 mL de agua Milli- Q.
  - d) Se eluye el retenido con 4 mL de 30% CH<sub>3</sub>CN + 0.1% TFA.

Las disoluciones y la muestra se pasan por la columna mediante una jeringa.

4. Se diluye la muestra con 3.5 mL de tampón Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5) previamente saturado de oxígeno. Obteniendo una concentración final de proteína de 0.2 mg/ mL.
5. Se deja que la reacción tenga lugar durante toda la noche a 25 °C.
6. Se procede a la concentración y evaporación del CH<sub>3</sub>CN presente en la muestra en el Speed- Vac hasta una concentración final de proteína entre 0.5- 1 mg/ mL.
7. Se adiciona un volumen igual de 4 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN + 4% TFA.

### III. C. 1. 1. 1. 2. OBTENCIÓN EN PRESENCIA DE DESNATURALIZANTE.

La obtención de los intermediarios de plegamiento de PCI en presencia de agentes desnaturizantes se realiza de forma similar a la descrita en el apartado III. C. 1. 1. 1. 1., utilizando columnas de gel- filtración PD- 10.

1. Se disuelven 2 mg de PCI en 400  $\mu$ L de tampón Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5) que contiene GdmCl (6 M) i  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ - ME) (0.25 mM). La concentración de PCI es de 5 mg/ mL.
2. Se deja que tenga lugar la reorganización de puentes disulfuro (reshuffling") durante 6h como mínimo, a 25°C.
3. Se pasa la muestra por una columna de Gel- filtración PD- 10, procesándola de la siguiente manera:
  - a) Se pretrata la columna con 10 mL de tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (50 mM).
  - b) Se pasa la muestra por gravedad por la columna, adicionándole previamente 100  $\mu$ L de tampón Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5).
  - c) Se lava con 2.3 mL del mismo tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .
  - d) Finalmente, se eluye la muestra con 1.1 mL del mismo tampón.
4. Se liofilizan las muestras obtenidas de cada columna PD- 10 utilizada.

### III. C. 1. 1. 2. OBTENCIÓN A NIVELES SEMIPREPARATIVOS.

Para obtener los intermediarios de plegamiento del PCI a niveles semipreparativos ensayamos dos procesos que se diferencian en la forma de obtener en PCI reducido y desnaturizado libre para iniciar el proceso de plegamiento *in vitro*.

#### III. C. 1. 1. 2. 1. Utilización de minicolumnas de fase reversa (Sep- pak C18).

En el presente ensayo se han utilizado las minicolumnas preempaquetadas Sep- pak C18 de 35 cc. Son suministradas por Waters- Millipore y vienen preempaquetadas con 10 gr de soporte de sílica que lleva unidas covalentemente cadenas hidrocarbonadas de 18 átomos de carbono.

El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Se reduce y desnaturiza el PCI disolviendo 10 mg en 2 mL de tampón Tris/ HCl (0.5 M, pH= 8.5) que contiene DTT (60 mM) durante 90 min a 24 °C.
2. Se pasa la muestra así preparada por una minicolumna Sep- pak C18 de 35 cc. La muestra se procesa de la siguiente manera:
  - a) Se pretata la minicolumna con 50 mL de acetonitrilo y luego 100 mL de agua Milli- Q.
  - b) Se cargan los 2 mL de muestra.
  - c) Se lava la minicolumna con 100 mL de agua Milli- Q.
  - d) Se eluye el retenido con 50 mL de 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0.1% TFA.

Las disoluciones y la muestra se pasan por la columna al vacío.

3. Se mira la absorbancia a 280 nm de la muestra recogida de la minicolumna y se calcula la cantidad de proteína recuperada por métodos espectroscópicos (III. B. 4. 5.).

4. Se diluye la muestra con un volumen conocido de tampón Tris/ HCl (0.1 M, pH= 8.5) previamente saturado de oxígeno para obtener una concentración final de proteína de 0.1 mg/ mL.
5. Se deja que la reacción tenga lugar durante toda la noche a 24 °C.
6. Se concentra y se evapora el CH<sub>3</sub>CN presente en la muestra mediante el Speed- Vac hasta una concentración final de muestra entre 0.5- 1 mg/ mL.
7. Finalmente, se adiciona el mismo volumen de 4 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN + 4% TFA.

### **III. C. 1. 1. 2. Utilización de columnas de Gel- filtración.**

Para la eliminación rápida del desnaturalizante al que es sometido el PCI se utiliza una columna de Gel- filtración que será previamente preempaquetada con 15 gr de Sephadex G25 (Pharmacia Biotech).

El protocolo seguido es el siguiente:

1. Inicialmente se procede a empaquetar la columna:
  - a) Se disuelven 15 gr de Sephadex G25 (Pharmacia) en 100 mL de agua Milli- Q.
  - b) Se deja el gel con agitación lenta durante 3 h.
  - c) Se desgasifica el gel durante 20 min en el baño de ultrasonidos.
  - d) Se carga despacio el gel por gravedad en una columna de 3 cm de diámetro y 10 cm de altura.
  - e) Se deja que el gel se compacte durante 1 o 2 h.

En estas condiciones la columna ya esta preparada para ser utilizada.

2. Se reduce y desnaturaliza el PCI disolviendo 15 mg en 3 mL de tampón Tris/ HCl (0.5 M, pH= 8.5) que contiene DTT (60 mM) durante 90 min a 24 °C.
3. Se equilibra la columna pasando por gravedad, tres veces el volumen de la columna, el tampón Tris/ HCl (0.1 M, pH= 8.5) previamente saturado de oxígeno.
4. Se pasa la muestra y se recogen 15 fracciones de 1 mL cada una.
5. Se lee la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones recogidas se juntan las fracciones que contengan PCI reducido.
6. Se procede a la concentración de la muestra mediante el Speed- Vac hasta una concentración final de muestra entre 0.5- 1 mg/ mL.
7. Finalmente se adiciona el mismo volumen de 4 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN + 4% TFA.

### **III. C. 1. 2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN A PARTIR DE CULTIVOS DE *E. COLI* QUE EXPRESAN PCI.**

El método de obtención de los intermediarios a partir de cultivos de *E. Coli* que expresan PCI se basa en la purificación de los intermediarios producidos durante la producción de PCI recombinante por fermentación.

#### **III. C. 1. 2. 1. OBTENCIÓN A PARTIR DEL CRUDO DE FERMENTACIÓN.**

Se realiza una fermentación para la obtención de PCI recombinante. El protocolo seguido es el mismo que se describe en el apartado III. B. 3. 2.

Una vez obtenido el crudo de fermentación se procede a la purificación de los intermediarios de plegamiento y del PCI recombinante producidos. Para ello se obtiene el medio extracelular y se concentra la muestra.

El protocolo seguido es el siguiente:

1. Se distribuye el cultivo en tubos de centrifuga de 0.5 L y se centrifugan a 9000 rpm durante 30 minutos a 4°C, recogiendo después el sobrenadante.

La centrifuga utilizada es una Sorvall y el rotor empleado es un GS- A.

2. Se adiciona al cultivo TFA hasta obtener un pH= 3.0, aproximadamente 0.1% del cultivo total.

3. Se analiza una alícuota de 100 µL por cromatografía (HPLC)\* de fase reversa.

Se filtra el sobrenadante a través de filtros de baja retención de proteínas (Millipore) de 0.8, 0.4 y 0.2 µm sucesivamente pasando la muestra a través de un kitasatos al vacío.

Se analiza una alícuota de 100 µL del filtrado por cromatografía (HPLC)\* de fase reversa.

4. Se realiza la primera purificación por cromatografía a presión atmosférica en fase reversa. Para ello se utilizan las minicolumnas preempaquetadas Sep-pak C18 de 35 cc.

El protocolo seguido es el mismo descrito en el apartado III. B. 4. 4. 1.

Se analiza una alícuota de 100 µL de cada una de las muestras que se van obteniendo de la Sep- pak a partir de que se carga la muestra en ella por cromatografía (HPLC)\* de fase reversa.

Se localizan e identifican los intermediarios comparando el cromatograma obtenido con un cromatograma patrón de los mismos.

5. Se purifica la fracción de Sep- pak que contiene los intermediarios de plegamiento por cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) de intercambio iónico.

La columna utilizada es una TSK-DEAE 5PW Ultrapac de LKB con un diámetro de partícula de 10 µm, diámetro de poro de 0.1 µm y de medidas de 21.5 × 150 mm, protegida con una precolumna empaquetada del mismo material.

El protocolo seguido es el mismo descrito en el apartado III. B. 4. 4. 2.

Se recogen los picos que salen de la columna entre los minutos 50 y 85, tiempo de elución de los intermediarios y del PCI.

Se analizan alícuotas de 100 µL de cada una de las fracciones recogidas del FPLC por cromatografía (HPLC)\* de fase reversa, identificándose de nuevo los intermediarios comparando el cromatograma obtenido con un cromatograma patrón de los intermediarios.

6. Posteriormente se purifica cada fracción de FPLC que contiene los intermediarios por cromatografía (HPLC)\* de fase reversa.

La columna utilizada es una Vydac C4 semipreparativa (modelo 214TP1010) con un diámetro de partícula de 10 µm, diámetro de poro de 30 nm y medidas de 1.0 x 25 cm, protegida con una precolumna empaquetada con el mismo material.

El protocolo seguido es el mismo descrito en el apartado III. B. 4. 4. 3.

7. Se analiza la pureza de cada una de las muestras purificadas inyectando alícuotas de 100 µL al HPLC de fase reversa.

8. Finalmente se determina la concentración de las muestras de los intermediarios por métodos espectroscópicos (III. B. 4. 5.).

\*Para el análisis de todas las alícuotas de los diferentes pasos de separación y purificación descritos se utiliza la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa.

La columna analítica utilizada de fase reversa es una Nova- Pak C18 (Waters) tiene un diámetro de partícula de 4 µm, un diámetro de poro de 60 Å; un diámetro de 3.9 mm y una longitud de 150 mm.

El protocolo seguido para el análisis cromatográfico es el mismo que describe en el apartado III. C. 2. 2.

### **III. C. 2. PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI POR CROMATOGRAFÍA (HPLC) DE FASE REVERSA.**

En esta parte del trabajo la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se ha utilizado como método de purificación y separación de los intermediarios de plegamiento; como método analítico para comprobar que en la fracción eluida de las columnas de gel- filtración y fase reversa se encuentran los intermediarios; y para valorar el grado de pureza de los intermediarios una vez ya purificados.

Las cantidades de muestra ( $\mu\text{g}$ - mg) inyectadas a la columna dependerán del tipo de análisis que se realice. Si se realiza una purificación y separación inyectaremos como máximo unos 5 mg en las columnas semipreparativas y unos 500  $\mu\text{g}$  en las columnas analíticas. Si se realiza un análisis de identificación de las especies scrambled en fracciones eluidas de otras columnas o determinaciones de pureza inyectaremos una cantidad mínima observable, unos 10- 15  $\mu\text{g}$  de muestra.

El equipo de cromatografía líquida de alta presión utilizado es un Beckman y se describe detalladamente en el apartado III. B. 4. 4. 3.

El tipo de cromatografía utilizada en el HPLC es de fase reversa y las diferentes columnas utilizadas se describen en cada apartado.

El protocolo general para una purificación por cromatografía (HPLC) de fase reversa es la siguiente:

1. Se preparan los disolventes con agua destilada y desionizada a través de un equipo Milli- Q. Posteriormente han sido desgasificados en un baño de ultrasonidos durante 10 min.

Fases móviles A y B.

- Fase móvil A:  $\text{H}_2\text{O}$  con 0.1% TFA
- Fase móvil B:  $\text{CH}_3\text{CN}$  con 0.1% TFA

2. Se equilibra la columna con la composición de fases móviles que se va a iniciar la cromatografía y a un flujo de constante ( $\text{mL}/\text{min}$ ) al menos durante 15 minutos.

3. Se disuelve la muestra liofilizada en un volumen de fase móvil A y se inyecta manualmente o automáticamente al HPLC.

4. Se inicia el gradiente cromatográfico predeterminado para el ensayo.

5. Al final de la cromatografía la columna se guarda en acetonitrilo sin TFA a temperatura ambiente.

#### **III. C. 2. 1. UTILIZACIÓN DE UNA COLUMNA C4 (VYDAC) SEMIPREPARATIVA.**

Para purificar los intermediarios de plegamiento obtenidos a niveles semipreparativos (III. C. 1. 1. 2.) se ha utilizado una columna Vydac C4 semipreparativa (modelo 214TP1010). Tiene un diámetro de partícula de 10  $\mu\text{m}$ , diámetro de poro de 300 Å y medidas de 1.0 x 25 cm. Esta columna se utilizó también para la purificación de PCI y de especies scrambled a partir del sobrenadante del crudo de fermentación (III. B. 4. 4. 3.). El tipo de muestra a inyectar y el gradiente utilizado en este ensayo son diferentes a los utilizados en los anteriores casos.

El protocolo cromatográfico general se describe el apartado III. C. 2. y a continuación detallamos el gradiente utilizado para la purificación y separación de los intermediarios:

1. Se equilibra la columna con una mezcla de 78% A y 22% B a un flujo de 1.4 mL/ min al menos durante 15 minutos.

2. Se disuelve la muestra liofilizada en 2 mL de fase móvil A y se inyecta manualmente al HPLC.

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	78	22
5	78	22
50	67.5	32.5
50	10	90
60	10	90
65	80	20

El flujo de elución es constante a 1.4 mL/ min.

Se sigue la elución de los intermediarios por absorción a 280 nm.

### III. C. 2. 2. UTILIZACIÓN DE UNA COLUMNA C18 (NOVA- PAK) ANALÍTICA.

Para analizar los intermediarios de plegamiento obtenidos a niveles semipreparativos, a partir del sobrenadante del crudo de fermentación (III. C. 2. 1.), o a niveles analíticos (III. C. 1. 1. 1) se han utilizado una columna C18 (Nova- pak) analítica. Esta columna (Waters) tiene un diámetro de partícula de 4  $\mu\text{m}$ , un diámetro de poro de 60  $\text{\AA}$ ; un diámetro de 3.9 mm y una longitud de 150 mm.

El protocolo cromatográfico general se describe el apartado III. C. 2. y a continuación detallamos el gradiente utilizado para el análisis de la pureza de los intermediarios:

1. Se equilibra la columna con una mezcla de 78% A y 22% B a un flujo de 1 mL/ min al menos durante 15 minutos.

2. Se disuelve la muestra liofilizada en 2 mL de fase móvil A y se inyecta manualmente al HPLC.

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	78	22
15	78	22
60	67.5	32.5
65	20	80
75	20	80
78	78	22

El flujo de elución es constante a 1 mL/ min.

Se sigue la elución de los intermediarios por absorción a 214 nm.

### III. C. 2. 3. UTILIZACIÓN DE UNA COLUMNA C18 (VYDAC) ANALÍTICA.

Para analizar los intermediarios de plegamiento obtenidos a niveles semipreparativos (III. C. 1. 1. 2.) o a niveles analíticos (III. C. 1. 1. 1) también se ha utilizado una columna C18 (Vydac) analítica. Esta columna (Waters) tiene un diámetro de poro de 300 Å; un diámetro de partícula de 5 µm y un diámetro de 4.6 mm y una longitud de 150 mm.

El protocolo cromatográfico general se describe el apartado III. C. 2. y a continuación detallamos el gradiente utilizado para el análisis de la pureza de los intermediarios:

1. Se equilibra la columna con una mezcla de 76% A y 24% B a un flujo de 1 mL/ min al menos durante 15 minutos.

2. Se disuelve la muestra liofilizada en 2 mL de fase móvil A y se inyecta manualmente al HPLC.

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	76	24
15	76	24
60	55	45
65	20	80
75	20	80
78	76	24

El flujo de elución es constante a 1 mL/ min.

Se sigue la elución de los intermediarios por absorción a 214 nm.

#### III. C. 2. 4. UTILIZACIÓN DE UNA COLUMNA C3 (ZORBAX) ANALÍTICA.

Para analizar la pureza de los intermediarios de plegamiento obtenidos a niveles semipreparativos (III. C. 1. 1. 2.) o a niveles analíticos (III. C. 1. 1. 1) también se ha utilizado una columna Zorbax, modelo 300SB- C3. Esta columna es de fase reversa (Rockland Technologies, Inc.) tiene una dimensiones de 4.6 mm × 150 mm, un diámetro de partícula de 5 µm y un diámetro de poro de 300 Å. Esta columna esta recubierta por una monocapa de triisopropil silano enlazada químicamente a la superficie de sílica, por esta razón esta columna presenta una mayor estabilidad a bajos pHs y a elevadas temperaturas; además cromatográficamente presenta mayor reproducibilidad, resolución y puede trabajar con menor tiempo de equilibrado inicial.

El protocolo cromatográfico general se describe el apartado III. C. 2. y a continuación detallamos el gradiente utilizado para el análisis de la pureza de los intermediarios:

1. Se equilibra la columna con una mezcla de 80% A y 20% B a un flujo de 1 mL/ min al menos durante 5 minutos.

2. Se disuelve la muestra liofilizada en 2 mL de fase móvil A y se inyecta manualmente al HPLC.

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	80	20
10	80	20
55	60	40
55	5	95
65	5	95
85	80	20

El flujo de elución es constante a 1 mL/ min.

Se sigue la elución de los intermediarios por absorción a 214 nm.

### III. C. 2. 5. ANÁLISIS CUANTITATIVO Y CUALITATIVO DE LOS INTERMEDIARIOS AISLADOS.

Una vez se ha colectado y separado cada intermediario de plegamiento, para analizar la cantidad final obtenida y su pureza, se reinyecta en el HPLC una pequeña parte (del orden de  $\mu\text{g}$ ) de cada una de las muestras colectadas.

Para un análisis cuantitativo, se toma como patrón una cantidad conocida de PCI, que de la misma manera, se inyecta en el HPLC. Mediante la comparación del área cromatográfica de la pequeña fracción reinyectada y el área cromatográfica de la cantidad conocida de PCI se calcula la cantidad total de cada una de las fracciones colectadas.

La cantidad del patrón adecuada para el análisis es de 5  $\mu\text{g}$ .

## III. D. CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DE PCI PURIFICADOS.

Debido a la complejidad de las muestras de origen biológico muchas veces se utilizan dos o más técnicas diferentes pero complementarias para confirmar los resultados de ensayos cualitativos y cuantitativos. En el presente experimento se han utilizado tres técnicas: Cromatografía (FPLC) de intercambio iónico, Cromatografía (HPLC) de fase reversa y Electroforesis Capilar (EC).

### III. D. 1. ANALISIS DE LA PUREZA DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES SCRAMBLED.

#### III. D. 1. 1. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC) DE FASE REVERSA.

Se analizó la pureza de cada una de las fracciones scrambled purificadas previamente, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa. En este ensayo se variaron las siguientes condiciones de análisis: las columnas de separación cromatográfica (III. C. 2.) y los gradientes de separación.

Tras efectuar diversos ensayos que se describen detalladamente en resultados y discusión (IV. B. 1.) la mejor separación se obtuvo con una columna C18 (Vydac) analítica de fase reversa. El protocolo detallado de la separación cromatográfica se describe el apartado III. C. 2. 3.

### III. D. 1. 2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (FPLC) DE INTERCAMBIO IÓNICO.

Se han realizado diferentes análisis por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico con los intermediarios de plegamiento del PCI obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa y posteriormente liofilizados.

Los experimentos realizados son los siguientes:

- a) Cromatografía analítica de la mezcla de intermediarios.  
Se inyecta una muestra (50 µg) de la mezcla de intermediarios obtenidos en ausencia y en presencia de desnaturalizante (III. C. 1. 1. 1.).
- b) Obtención de los cromatogramas de cada uno de los intermediarios aislado y separado previamente por HPLC de fase reversa.  
Se inyecta una muestra (50 µg) de cada intermediario anteriormente aislado por HPLC (III. C. 2. 1.).
- c) Cromatografía preparativa de las fracciones de intermediarios inyectando un la mezcla de ellos.  
Se inyecta la mezcla de intermediarios (500 µg) obtenida a niveles semipreparativos (III. C. 1. 1. 2.). Se recoge cada una de las fracciones separadas.  
Posteriormente se analizan por cromatografía (HPLC) de fase reversa, en condiciones idénticas a las descritas en el apartado III. C. 2. 3.

Todos los disolventes utilizados en el FPLC han sido preparados con agua destilada y desionizada a través de un equipo Milli- Q. Posteriormente han sido filtrados a través de membranas de 0.22 µm y desgasificados en un baño de ultrasonidos durante 10 min.

El fraccionamiento cromatográfico en la purificación de la proteína se realiza en una columna de intercambio aniónico y su elución se sigue por absorción a 280 nm.

La columna utilizada ha sido una TSK- 5PW analítica con un diámetro de partícula de 10 µm y de medidas de 7.5 mm × 7.5 cm.

El protocolo seguido y las condiciones cromatográficas utilizadas son las siguientes:

Fases móviles A y B:

- Fase móvil A: TrisAcOH 20 mM pH= 8.5  
(Se ajusta el pH con Acético Glacial)
- Fase móvil B: TrisAcOH 20 mM  
NH<sub>4</sub>Ac 0.8M pH= 8.5  
(Se ajusta el pH con Amoniaco)

1. Se equilibra la columna con fase móvil A a un flujo de 0.4 mL/ min durante 30 minutos como mínimo.

Al final del equilibrado, el pH y la conductividad a la salida de la columna deben ser similares a los de la fase móvil A.

2. Se disuelve la muestra en 500 µL de fase móvil A, se mide su conductividad y su pH. Su conductividad no debe ser mayor de 1500 µS. Si esto sucede, se debe diluir con más fase móvil A. En cuanto al pH, si es menor de 8.25, se debe aumentar con NaOH (1 M).

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	100	0
15	100	0
85	70	30
90	0	100
100	0	100
105	100	0

El flujo es de 0.4 mL/ min.

3. Se sigue el curso de la cromatografía detectando la absorbancia a 214nm o 280 nm según la cantidad de muestra inyectada. Se recogen los picos que salen de la columna entre los 15 y 60 minutos.

4. Finalmente se identifican los intermediarios por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa de las fracciones obtenidas (III. C. 2. 3.).

Al final de la cromatografía la columna se guarda en metanol 20% a 4°C.

### III. D. 1. 3. ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS CAPILAR (EC).

A diferencia de las cromatografías, la electroforesis capilar permite la separación de las muestras según la relación carga- masa de éstas.

En el presente trabajo se han realizado experimentos de pureza similares al anterior utilizando técnicas electroforéticas de separación, en concreto se ha ensayado la electroforesis capilar de zona (CZE).

Se ha utilizado un capilar de sílica fundida sin recubrir (Beckman) de 50 cm y 75 µm de diámetro interno. El aparato de electroforesis capilar utilizado es una CE Beckman P/ ACE System 2210.

Los experimentos realizados son los siguientes:

a) Separación de los intermediarios de plegamiento mediante electroforesis capilar.

Inyectamos una muestra (5 µg) de la mezcla de intermediarios obtenida en ausencia y en presencia de desnaturalizante (III. C. 1. 1. 1.).

b) Obtención de los electroferogramas de cada uno de los intermediarios aislado y separado previamente.

Inyectamos una muestra (5 µg) de cada intermediario anteriormente aislado por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. C. 2. 2.).

Las condiciones de separación son las siguientes:

1. Inicialmente se limpia y se regenera el capilar pasando una disolución de NaOH (0.1M ) durante 20 min y posteriormente H<sub>2</sub>O durante 10 min.

2. Se equilibra el capilar con el tampón de separación durante 20 min.

- Tampón de separación: 20 mM Tricina/ 10 mM Borato  
0.5 mM 1, 4- Diaminobutano (DAB) pH= 8.3

3. Se disuelve la muestra en 50 µL de tampón de separación.

4. Se inyecta la muestra por voltaje durante 5 seg.

5. Se inicia la separación a una diferencia de potencial de separación de 15 KV y a una intensidad de 90 µA.

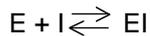
6. Se obtiene el electroferograma de las muestras inyectadas después de 20 min de separación en las condiciones dadas.

7. Se regenera y limpia el capilar con una disolución de NaOH (0.1 M) durante 20 min.

### III. D. 2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE INHIBICIÓN DE LA CARBOXIPEPTIDASA DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.

#### III. D. 2. 1. ECUACIÓN DE LA CONSTANTE DE INHIBICIÓN (K<sub>i</sub>).

Para la inhibición competitiva de un inhibidor (I) por un enzima (E) tenemos el equilibrio:



$$K_i = \frac{[E] \times [I]}{[EI]}$$

Siendo K<sub>i</sub> la constante de disociación del complejo enzima- inhibidor [EI].

En nuestro caso el PCI es un inhibidor competitivo [I] y la Carboxipeptidasa A (CPA) es el enzima de análisis [E].

Para tener una primera idea del orden de magnitud de la K<sub>i</sub> de los diferentes intermediarios se realizaron determinaciones de la actividad inhibidora de Carboxipeptidasa A de diferentes volúmenes de las disoluciones purificadas de las mismas, hasta encontrar alguna que diera un porcentaje de inhibición entre un 30 y 60 %.

Los resultados obtenidos de esta estimación inicial indican que las K<sub>i</sub> de los intermediarios esta bastante por encima de 10 nM. Consecuentemente se puede utilizar el método de Lineweaver y Burk para el cálculo de las K<sub>i</sub>.

#### III. D. 2. 2. INHIBICIÓN A DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACIÓN.

1. Se preparan las disoluciones de enzima, sustrato e inhibidor:

- **Disolución de CPA (Enzima):** Se prepara 1 mL de una disolución de CPA bovina 4.25 μM disolviendo 6 μL de CPA bovina 25 mg/ mL (Boehringer Mannheim, RFA) en 1 mL de tampón de actividad de la CPA (TrisCl 20 mM y ClNa 0.5 M a pH= 5.0).
- **Disolución de hipuril- L- fenilalanina (Sustrato):** Se preparan 50 mL de una disolución 1mM disolviendo 16.32 mg de hipuril- L- fenilalanina (Serva, RFA) en 50 mL de tampón de actividad de la CPA.
- **Disolución de la especie scrambled a ensayar (Xd):** Se preparan 100 μL de una disolución 0.11 mM de Xd disolviendo 50 μg en 100 μL de H<sub>2</sub>O milli- Q.

2. Se preincuban 10 μL de disolución de enzima con 10 μL de disolución de inhibidor y se deja evolucionar la reacción durante 1, 5, 15 y 30 minutos a 25°C.

3. Se hace el cero del espectrómetro a la absorbancia de medición (254 nm), para ello se utiliza 1 mL de sustrato en cada cubeta.

4. Se hace el blanco del espectrómetro mezclando en la cubeta de cuarzo 1 mL de disolución de sustrato y 10 μL de disolución de enzima. Se sigue el incremento lineal de la absorbancia a 254 nm de la mezcla.

5. Se mezcla en la cubeta de cuarzo 1 mL de disolución de sustrato con 10 μL de disolución de enzima y con la disolución de inhibidor. Inmediatamente se sigue el incremento lineal de la absorbancia a 254 nm de la mezcla.

6. Se mezcla en la cubeta de cuarzo 1 mL de disolución de sustrato con los 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las disoluciones de enzima- inhibidor previamente preincubadas a diferentes tiempos. Inmediatamente se sigue el incremento lineal de la absorbancia a 254 nm de la mezcla.

7. De esta forma se obtiene la pendiente del incremento lineal en absorbancia de Xd sin preincubación y preincubado a diferentes tiempos.

### III. D. 2. 3. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE INHIBICIÓN DEL INTERMEDIARIO Xb POR EL MÉTODO DE LINEWEAVER- BURK.

1. Se preparan las disoluciones de enzima, sustrato e inhibidor:

- **Disolución de CPA (Enzima):** Se prepara 1 mL de una disolución de CPA bovina 4.25  $\mu\text{M}$  disolviendo 6  $\mu\text{L}$  de CPA bovina 25 mg/ mL (Boehringer Mannheim, RFA) en 1 mL de tampón de actividad de la CPA (TrisCl 20 mM y ClNa 0.5 M a pH= 5.0).
- **Disolución de hipuril- L- fenilalanina (Sustrato):** Se preparan 50 mL de una disolución 1mM disolviendo 16.32 mg de hipuril- L- fenilalanina (Serva, RFA) en 100 mL de tampón de actividad de la CPA. A partir de esta disolución se preparan 10 mL de las siguientes disoluciones: 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mM. Para ello se mezclan las cantidades adecuadas de disolución 1 mM y tampón de actividad.
- **Disolución de la especie scrambled (Inhibidor):** Se preparan las siguientes disoluciones de Xb: 1.86, 1.39, 0.93 y 0.46 mM a partir de un stock 14.55 mM.

2. Inicialmente se hace el cero del espectrómetro a la absorbancia de medición (254 nm), para ello se utiliza 1 mL de sustrato en cada cubeta.

3. Seguidamente es preciso hacer el blanco, para ello se mezcla en la cubeta de cuarzo de 1 mL de disolución de sustrato y 10  $\mu\text{L}$  de disolución de enzima. Inmediatamente se sigue el incremento lineal de la absorbancia a 254 nm de la mezcla.

4. Para los ensayos cinéticos se mezcla en una cubeta de cuarzo 1 mL de disolución de sustrato con 10  $\mu\text{L}$  de disolución de enzima y con disolución de inhibidor, Inmediatamente se sigue el incremento lineal de a absorbancia a 254 nm de la mezcla. De esta forma se obtienen las velocidades iniciales, expresadas como la pendiente del incremento lineal en absorbancia de las muestras.

Para cada concentración de sustrato se ensayan las diferentes concentraciones de inhibidor preparadas.

Las concentraciones finales de la especie scrambled ensayada fueron: 18.3, 13.9, 9.6, 4.6 y 0  $\mu\text{M}$ .

Se representan las inversas de las velocidades iniciales ( $1/v_i$ ) frente a las inversas de la concentración de sustrato ( $1/[S]$ ), obteniéndose una familia de rectas, una para cada concentración de inhibidor.

A continuación se representan las pendientes de dichas rectas frente a la concentración de inhibidor, el punto de corte de dicha recta con el eje X nos da la  $K_i$ .

### III. D. 2. 4. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE INHIBICIÓN A PARTIR DE LAS $IC_{50}$ .

1. Inicialmente se preparan las disoluciones de enzima, sustrato e inhibidor:

- **Disolución de CPA (Enzima):** Se prepara 1 mL de una disolución de CPA bovina 4.25  $\mu\text{M}$  disolviendo 6  $\mu\text{L}$  de CPA bovina 25 mg/ mL (Boehringer Mannheim, RFA) en 1 mL de tampón de actividad de la CPA.
- **El tampón para determinar la actividad de la CPA utilizado es:** TrisCl (20 mM) y ClNa (0.5 M) a pH= 5.0.

- **Disolución de hipuril- L- fenilalanina (Sustrato):** Se preparan 50 mL de una disolución 1mM disolviendo 16.32 mg de hipuril- L- fenilalanina (Serva, RFA) en 50 mL de tampón de actividad de la CPA.
- **Disolución de los intermediarios (Inhibidor):** Para el primer ensayo se prepara una disolución 1.16 mM disolviendo 100 µg de muestra en 20 µL en H<sub>2</sub>O milli- Q.

2. Se hace el cero del espectrómetro a la absorbancia de medición (254 nm), para ello se utiliza 1 mL de sustrato en cada cubeta de cuarzo.

El espectrómetro utilizado es un espectrómetro de UV- Visible Cary (EI).

3. Seguidamente es preciso hacer el blanco, para ello se mezcla en la cubeta de medición 1 mL de disolución de sustrato y 10 µL de disolución de enzima. Inmediatamente se sigue el incremento lineal de la absorbancia a 254 nm de la mezcla. Se determina la pendiente del incremento lineal en absorbancia causado por la hidrólisis del sustrato.

4. Para los ensayos cinéticos se mezcla en una cubeta de cuarzo 1 mL de disolución de sustrato con 10 µL de disolución de enzima y con 10 µL de disolución de inhibidor, Inmediatamente se sigue el aumento lineal de la absorbancia a 254 nm de la mezcla.

En el caso particular de Xb se adicionaron 15 µL de disolución de enzima.

Los µg adicionados de los intermediarios en el primer ensayo y las concentraciones finales de las mismas fueron:

Muestra	µg adicionados	Concentración final (µM)
Xa	50	11.6
Xb	25	5.4
Xc	50	11.6
Xd	5	1.1

5. Una vez conocidas las concentraciones que nos dan entre un 30 y un 60 % de inhibición, se prepara una disolución stock 2.32 mM de cada especie scrambled. Para ello se disuelven 400 µg de muestra en 40 µL en H<sub>2</sub>O milli- Q.

6. A partir de esta disolución stock se preparan diferentes diluciones dependiendo de la inhibición que presenta cada especie scrambled. Mezclándose las cantidades adecuadas de disolución 2.32 mM y tampón de actividad.

Las concentraciones finales de los intermediarios preparados y empleados en los ensayos son:

[Xa] µM	[Xb] µM	[Xc] µM	[Xd] µM
17.4	-	23.2	11.6
11.6	11.6	17.4	4.6
8.7	5.8	11.6	3.4
3.4	3.0	5.8	2.3
0.00	0.00	0.00	0.00

7. Se realizan ensayos de inhibición de la actividad de CPA en la forma descrita, utilizando 10 µL de cada dilución del inhibidor.

### **III. D. 3. DETERMINACIÓN DE LAS CISTEÍNAS IMPLICADAS EN LOS PUENTES DISULFURO DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.**

Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de determinar cuales son las cisteínas implicadas en cada uno de los puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento del PCI. Para ello se han utilizado dos metodologías diferentes: la digestión enzimática de los intermediarios y una nueva técnica (Wu & Watson, 1997) basada en la reducción química parcial de un puente disulfuro de los intermediarios.

#### **III. D. 3. 1. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO POR DIGESTIÓN CON PROTEASAS.**

Para caracterizar estructuralmente los intermediarios de plegamiento del PCI se han realizado digestiones con diferentes proteasas: Tripsina, Quimotripsina, Elastasa, Subtilisina, Termolisina y Lys- C.

Los primeros ensayos de digestión a nivel analítico se han realizado sobre la primera fracción de la mezcla de intermediarios (Xa), aislada y separada por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. C. 2.).

Se ha experimentado la digestión sobre esta fracción con diferentes proteasas y con diferentes medios con la finalidad de encontrar la mejor digestión y sus condiciones óptimas.

Los enzimas utilizados en cada uno de los ensayos provienen de la casa comercial SIGMA.

##### **III. D. 3. 1. 1. DIGESTIÓN CON TRIPSINA Y/ O QUIMOTRIPSINA.**

1. Se prepara una disolución stock de 1 mg/ mL de enzima en HCl (0.001 M). Esta disolución así preparada es estable durante varias semanas a 5 °C.

2. Antes de utilizar el enzima para el ensayo de digestión, se diluye una alícuota de la solución stock con HCl (0.001 M) a una concentración final de 1 µg de enzima por 100 µL de disolución.

En cada uno de estos ensayos hemos tratado la muestra con un 1% w/ w de proteasa.

Se han realizado tres experimentos de digestión simultáneos:

a) Se tratan 2 µg de muestra con 2 µL de una disolución de Tripsina 0.01 µg/ µL en 100 µL de tampón Tris/ CaCl<sub>2</sub> (0.08 M/ 50 mM, pH= 8.0).

b) Se tratan 2 µg de muestra con 2 µL de una disolución de Quimotripsina 0.01 µg/ µL en 100 µL de tampón Tris/ CaCl<sub>2</sub> (0.08 M/ 50 mM, pH= 8.0).

c) Se tratan 4 µg de muestra con 2 µL de cada una de las disoluciones de Tripsina y Quimotripsina (0.01 µg/ µL) preparadas anteriormente, en 100 µL de tampón Tris/ CaCl<sub>2</sub> (0.08 M/ 50 mM, pH= 8.0).

3. Se deja que las reacciones de digestión tengan lugar durante 4h a 37 °C.

4. Se paran las reacciones de digestión añadiendo 100 µL de H<sub>2</sub>O Milli- Q conteniendo un 0.1% de TFA.

5. Se inyecta la muestra (200 µL) así digerida y se observan los péptidos de digestión obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 3. 1. 6.).

##### **III. D. 3. 1. 2. DIGESTIÓN CON ELASTASA.**

1. Se prepara una disolución stock 1 mg/ mL de Elastasa en Tris (0.2 M, pH= 8.8).

2. Antes de utilizar el enzima para el ensayo de digestión, se diluye una alícuota de la solución antes preparada con el mismo tampón de digestión a una concentración de 1 µg de enzima por 10 µL de disolución.
3. En el ensayo hemos tratado la muestra con un 2% w/ w de enzima.
4. Se tratan 10 µg de muestra con 2 µL de la disolución de Elastasa 0.1 µg/ µL en 20 µL de tampón Tris. HCl (0.2 M, pH= 8.8).
5. Se deja que la reacción de digestión tenga lugar durante 2h a 37 °C.
6. Se para la digestión añadiendo 80 µL de H<sub>2</sub>O Milli- Q con 0.1% de TFA.
7. Se separa una alícuota de 50 µL de muestra digerida (5 µg) y se observan los péptidos de digestión obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 3. 1. 6.).

### **III. D. 3. 1. 3. DIGESTIÓN CON SUBTILISINA.**

Para la digestión enzimática con Subtilisina se utilizaron dos tampones diferentes: Tris/ CaCl<sub>2</sub> (pH= 8.1) y N-Etilmorfolina (pH= 6.5).

#### **III. D. 3. 1. 3. 1. Digestión con Subtilisina en Tris/ CaCl<sub>2</sub>.**

1. Se prepara una disolución stock de 1 mg/ mL de Subtilisina en Tris/ CaCl<sub>2</sub> (0.046 M/ 0.0115 M, pH= 8.1). Esta disolución así preparada es estable durante varias semanas a 5 °C.
2. Antes de utilizar el enzima para el ensayo de digestión, se diluye una alícuota de la solución stock con el mismo tampón de digestión a una concentración final de 1 µg de enzima por 10 µL de disolución.  
En el ensayo hemos tratado la muestra con un 2% w/ w de enzima.
3. Se tratan 10 µg de muestra con 2 µL de la disolución de Subtilisina 0.1 µg/ µL en 20 µL de tampón Tris/ CaCl<sub>2</sub> (0.046 M/ 0.0115 M, pH= 8.1).
4. Se deja que la reacción de digestión tenga lugar durante 2h a 37 °C.
5. Se para la digestión con 80 µL de H<sub>2</sub>O Milli- Q con 0.1% de TFA.
6. Se separan 50 µL de muestra digerida (5 µg) y se observan los péptidos de digestión obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 3. 1. 6.).

#### **III. D. 3. 1. 3. 2. Digestión con Subtilisina en N- Etilmorfolina.**

1. Se prepara una disolución stock de 1 mg/ mL de Subtilisina en H<sub>2</sub>O Milli- Q.
2. Antes de utilizar el enzima para el ensayo de digestión, se diluye una alícuota de la solución stock con el tampón de digestión que se va a utilizar ( N- Etilmorfolina/ acetato). Obteniendo una nueva disolución que contiene 1 µg de enzima por 10 µL de disolución.  
En el ensayo hemos tratado la muestra con un 5% w/ w de enzima.
3. Se tratan 40 µg de muestra con 20 µL de la disolución preparada de Subtilisina (0.1 µg/ µL) en 80 µL de tampón N- Etilmorfolina/ acetato (50 mM, pH= 6.5).
4. Se deja que la reacción de digestión tenga lugar 16h a 25 °C.
5. Se para la digestión con 20 µL de la disolución: 9 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN con un 0.4% de TFA.
6. Se separan 20 µL de muestra digerida (6.6 µg) y se observan los péptidos de digestión obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 3. 1. 6.).

### **III. D. 3. 1. 4. DIGESTIÓN CON TERMOLISINA.**

Para la digestión enzimática con Termolisina se utilizaron tres tampones diferentes:  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /  $\text{CaCl}_2$ , Tris/  $\text{CaCl}_2$  y N- Etilmorfolina.

#### **III. D. 3. 1. 4. 1. Digestión con Termolisina en $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ / $\text{CaCl}_2$ .**

1. Se prepara una disolución stock de 1 mg/ mL de Termolisina en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /  $\text{CaCl}_2$  (0.1 M/ 1 mM, pH= 7.0- 9.0). Esta disolución es estable durante varias semanas a 5 °C.
2. Antes de utilizar el enzima para el ensayo de digestión, se diluye una alícuota de la solución stock con el mismo tampón de digestión a una concentración de 1 µg de enzima por 10 µL de disolución.  
En el ensayo hemos tratado la muestra con un 2% w/ w de enzima.
3. Se tratan 10 µg de muestra con 2 µL de la disolución de Termolisina 0.1 µg/ µL en 20 µL de tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /  $\text{CaCl}_2$  (0.1 M/ 1 mM, pH= 7.0- 9.0).
4. Se deja que la reacción de digestión tenga lugar durante 2h a 37 °C.
5. Se para la digestión con 80 µL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli- Q con 0.1% de TFA.
6. Se separan 50 µL de muestra digerida (5 µg) y se observan los péptidos de digestión obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 3. 1. 6.).

#### **III. D. 3. 1. 4. 2. Digestión con Subtilisina y Termolisina en Tris/ $\text{CaCl}_2$ .**

1. Se prepara una disolución stock de 1 mg/ mL de Termolisina y otra de Subtilisina en Tris/  $\text{CaCl}_2$  (0.05 M/ 0.01 M, pH= 8.0)  
Esta disolución es estable durante varias semanas a 5 °C.
2. Antes de utilizar los enzimas para el ensayo de digestión, se diluye una alícuota de la solución stock con el mismo tampón de digestión a una concentración de 1 µg de enzima por 10 µL de disolución.
3. Se tratan 20 µg de muestra con 4 µL de cada una de las disoluciones (0.1 µg/ µL) en 20 µL de tampón Tris/  $\text{CaCl}_2$  (0.05 M/ 0.01 M, pH= 8.0).
4. Se deja que la digestión tenga lugar durante 2h a 37 °C.
5. Se para la reacción de digestión con 180 µL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli- Q con 0.1% de TFA.
6. Se separan 50 µL de muestra digerida (5 µg) y se observan los péptidos de digestión obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 3. 1. 6.).
7. Como la digestión obtenida contenía péptidos interesantes de analizar, se inyectó el resto de la muestra (15 µg) en el HPLC de fase reversa y se colectó cada uno de los péptidos de digestión obtenidos.
8. Posteriormente se liofilizan para análisis por espectrometría de masas MALDI- TOF (III. D. 3. 1. 7) y secuenciación automática (III. D. 3. 1. 8).

#### **III. D. 3. 1. 4. 3. Digestión con Termolisina en N- Etilmorfolina.**

1. Se prepara una disolución stock de 1 mg/ mL de Termolisina en  $\text{H}_2\text{O}$  Milli- Q.
2. Antes de utilizar el enzima para el ensayo de digestión, se diluye una alícuota de la solución stock con el tampón de digestión que se va a utilizar ( N- Etilmorfolina/ acetato). Obteniendo una nueva disolución que contiene 1 µg de enzima por 10 µL de disolución.

En el ensayo hemos tratado la muestra con un 5% w/ w de enzima.

3. Se tratan 40 µg de muestra con 20 µL de la disolución preparada de Termolisina (0.1 µg/ µL) en 80 µL de tampón N- Etilmorfolina/ acetato (50 mM, pH= 6.5).
4. Se deja que la reacción de digestión tenga lugar 16h a 25 °C.
5. Se para la digestión con 20 µL de la disolución: 9 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN con un 0.4% de TFA.
6. Se separan 20 µL de muestra digerida (6.6 µg) y se observan los péptidos de digestión obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 3. 1. 6.).
7. Como la digestión obtenida contenía péptidos interesantes de analizar, se inyectó el resto de la muestra (33.4 µg) en el HPLC y se colectó cada uno de los péptidos de digestión obtenidos.
8. Posteriormente se liofilizan para análisis por espectrometría de masas MALDI- TOF (III. D. 3. 1. 7) y secuenciación automática (III. D. 3. 1. 8).

#### **III. D. 3. 1. 5. DIGESTIÓN CON LYS- C.**

1. Se prepara una disolución stock de 1 mg/ mL de Lisil Endopeptidasa de *Achromobacter Lyticus* (Lys- C) en NH<sub>4</sub>AcO.
2. Antes de utilizar el enzima para el ensayo de digestión, se diluye una alícuota de la solución stock con el tampón de digestión que se va a utilizar (NH<sub>4</sub>AcO) a una concentración de 1 µg de enzima por 10 µL de disolución.  
En el ensayo hemos tratado la muestra con un 5% w/ w de enzima.
3. Se tratan los péptidos provenientes de la digestión con Termolisina, con 20 µL de la disolución preparada de Lys- C (0.1 µg/ µL) en 80 µL de tampón AcNH<sub>4</sub> (50 mM, pH= 8.0).
4. Se deja que la reacción de digestión tenga lugar 16h a 25 °C.
5. Se para la digestión con 20 µL de la disolución: 9 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN con un 0.4% de TFA.
6. Se separan 20 µL de muestra digerida y se observan los péptidos de digestión obtenidos por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 3. 1. 6.).
7. Se inyecta el resto de la muestra en el HPLC y se colecta cada uno de los péptidos de digestión nuevamente obtenidos.
8. Posteriormente se liofilizan para análisis por espectrometría de masas MALDI- TOF (III. D. 3. 1. 7) y secuenciación automática (III. D. 3. 1. 8).

#### **III. D. 3. 1. 6. SEPARACIÓN Y RECOLECCIÓN DE LAS FRACCIONES DIGERIDAS POR CROMATOGRAFIA (HPLC) DE FASE REVERSA.**

La columna utilizada para este análisis es una columna C18 (Vydac) analítica (diámetro de poro de 300 Å; un diámetro de partícula de 5 µm y un diámetro de 4.6 mm y una longitud de 150 mm) y el aparato de cromatografía líquida de alta presión utilizado en este caso es un Waters.

El protocolo cromatográfico general se describe el apartado III. C. 2., a continuación detallamos el gradiente utilizado para la separación y colección de los péptidos de digestión obtenidos:

1. Se equilibra la columna con una mezcla del 99% de fase móvil A y del 1% de fase móvil B a un flujo de 0.2 mL/ min al menos durante 15 minutos.
2. Se disuelve la muestra liofilizada en 2 mL de fase móvil A y se inyecta manualmente al HPLC.

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	99	1
15	99	1
80	30	70
90	30	70
95	99	1
105	99	1

El flujo de elución es constante a 0.2 mL/ min.

Se sigue la elución de los péptidos de digestión por absorción a 214 nm.

### III. D. 3. 1. 7. ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS DE DIGESTIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI.

Los péptidos anteriormente aislados se analizaron en un Espectrómetro de Masas MALDI 1700 (Novartis), en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de Ciba- Geigy (Basel, Suiza).

Este análisis nos ha dado información sobre la pureza de los péptidos separados por cromatografía (HPLC) de fase reversa y su peso molecular.

### III. D. 3. 1. 8. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA N- TERMINAL DE PÉPTIDOS.

Para poder conocer la posición de los puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento de PCI, es necesario analizar cual es la secuencia de aminoácidos de los péptidos de digestión obtenidos.

Por esta razón, se han analizado cada uno de ellos por secuenciación automática en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de Ciba- Geigy (Basel, Suiza) y en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto de Biología Fundamental (IBF) de la Universidad Autónoma de Barcelona. El laboratorio de Ciba- Geigy dispone de un Secuenciador Automático Applied Biosystems 470 A conectado a un Analizador de PTH, Hewlett- Packard 1090. En el laboratorio de del Instituto de Biología Fundamental se dispone de un Secuenciador Automático Beckman modelo LF3000 Protein Sequencer.

Los secuenciadores automáticos utilizan el método de degradación de Edman (Edman, 1950; 1956) con fenilisotiocianato (PITC). En primer lugar el PITC se acopla al grupo amino terminal de la proteína; seguidamente el enlace N- terminal se rompe en un medio ácido anhídrido, y se libera una anilina tiazolina (ATZ- aminoácido); esta es transformada en medio ácido acuoso en una feniltiohidantoina (PTH- aminoácido) estable y capaz de ser identificada cromatográficamente.

### III. D. 3. 2. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO POR REDUCCIÓN QUÍMICA PARCIAL.

En resultados y discusión (IV. B. 3. 3.) se explica detalladamente el principio de esta metodología utilizada para la caracterización de los intermediarios.

El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Inicialmente se desnaturalizan cada uno de los intermediarios de plegamiento del PCI disolviendo 50  $\mu\text{g}$  (10nmol) de muestra en 10  $\mu\text{L}$  de tampón citrato (0.1 M, pH= 3.0) que contiene Cloruro de Guanidinio (GdmCl) (6 M), (Boehringer- Mannheim Biochemicals) durante 30 minutos a 25°C.

2. Se reducen parcialmente las muestras adicionando 10  $\mu\text{l}$  (90 nmol) de una dilución 1/ 10 de una disolución stock 0.1 M de Tris (2- carboxietil) fosfina (TCEP). La reacción tiene lugar durante 15 minutos a 25°C, una vez evacuado el  $\text{O}_2$  mediante una pequeña corriente de  $\text{N}_2$ .

La disolución stock 0.1 M de TCEP (Pierce Chemical Co.) se prepara en tampón citrato 0.1 M a pH= 3.0 en el momento de la reacción.

3. Las muestras parcialmente reducidas se cianilan adicionando 6  $\mu\text{L}$  de una disolución stock 0.1 M de Tetrafluoroborato de 1- ciano-4 dimetilamino- piridinio (CDAP). La reacción tiene lugar durante 15 minutos a 25°C, una vez evacuado el  $\text{O}_2$  mediante una pequeña corriente de  $\text{N}_2$ .

La disolución stock 0.1 M de CDAP (Sigma) se prepara en tampón citrato 0.1 M a pH= 3.0 en el momento de la reacción.

4. Las muestras parcialmente reducidas y cianiladas se separan mediante cromatografía (HPLC) de fase reversa.

La columna utilizada para este análisis es una Vydac C18 analítica (III. C. 2. 3.) y el aparato de cromatografía líquida de alta presión es un Beckman (III. B. 4. 4. 3.).

El protocolo cromatográfico general se describe el apartado III. C. 2. y a continuación detallamos el gradiente utilizado para la separación y colección de los péptidos de digestión obtenidos:

- Se equilibra la columna con una mezcla del 80% de fase móvil A y del 20% de fase móvil B a un flujo de 1 mL/ min al menos durante 15 minutos.
- Se disuelve la muestra en 1 mL de fase móvil A y se inyecta manualmente al HPLC.

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	% A	% B
0	80	20
5	80	20
95	5	95
105	5	95
95	80	20

El flujo de elución es constante a 1 mL/ min.

Se sigue la elución de los péptidos de digestión por absorción a 214 nm.

5. Las fracciones del HPLC separadas se colectan manualmente y se determina su masa molecular por espectrometría de masas MALDI- TOF (III. D. 3. 2. 1.).

6. Posteriormente se evaporan las muestras en el Speed- Vac.

7. Se adiciona a las fracciones colectadas del HPLC 2  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa 1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  que contiene GdmCl (6 M) para disolver las muestras proteicas evaporadas.

8. Posteriormente se fragmentan específicamente adicionando 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1 M, pH= 12.0). La reacción tiene lugar durante 1h a 25°C.

9. Se diluyen 0.5  $\mu\text{L}$  de las muestras en 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 50% (v/ v) acetonitrilo/ agua al 0.1% TFA para ser analizadas. Se observan los productos de fragmentación por espectrometría de masas MALDI- TOF (III. D. 3. 2. 1.).

10. Cada uno de los péptidos obtenidos se reduce completamente adicionando a las muestras 2  $\mu\text{L}$  de la disolución stock de TCEP (0.1 M) en tampón citrato (0.1 M, pH= 3.0). La reacción tiene lugar durante 30 minutos a 37°C, una vez evacuado el  $\text{O}_2$  mediante una pequeña corriente de  $\text{N}_2$ .

11. Se diluyen las muestras en 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 50% (v/ v) acetonitrilo/ agua al 0.1% TFA para ser analizadas.

12. Finalmente se analizan las fracciones totalmente reducidas por espectrometría de masas MALDI- TOF de las muestras (III. D. 3. 2. 1.).

### III. D. 3. 2. 1. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI- TOF.

En el presente experimento, se determina la masa molecular de cada uno de los intermediarios parcialmente reducidos y cianilados; de los productos de fragmentación y de los péptidos totalmente reducidos utilizando un espectrómetro de masas MALDI- TOF .

El espectrómetro de masas MALDI-TOF utilizado es de la casa Bruker (Alemania), modelo BIFLEX provisto de un laser de  $\text{N}_2$  (337nm).

Una de las principales ventajas de este método es la aplicación de sólo 0.5  $\mu\text{L}$  de muestra conteniendo de 0.1 a 10 pmoles de proteína/ péptido.

La aplicación se realiza en unas placas metálicas que contienen 10 pocillos donde se colocan tanto las muestras como proteínas de masa molecular conocida que sirven de estándares para calibrar el espectrómetro. En el presente trabajo se han utilizado como patrones proteicos: el fragmento 18- 39 de la hormona Adrenocorticotrópica (AcTH) y Angiotensina II (AII) de masas moleculares 2465 y 1047 Da respectivamente. Y se han realizado calibraciones externas y/ o internas.

Las matrices utilizadas son: – ciano- 4 ácido hidroxicinámico (CCA) (Aldrich) o ácido sinapínico (Aldrich).

El protocolo de análisis seguido es:

1. Se prepara una solución de matriz saturada en una disolución acetonitrilo/ agua (50% v/ v) y 0.1% TFA.
2. Se mezclan volúmenes iguales de muestra y matriz, y se aplican sobre cada uno de los pocillos de las placas metálicas
3. Se deja secar la muestra aplicada y se introduce en el MALDI-TOF.
4. Se utilizan los siguientes parámetros de medida:
 

• Polaridad:	positiva
• Modo de adquisición:	lineal
• Voltaje de aceleración (Uis 1):	19.00 (kV)
• Voltaje secundario de la fuente de ionización (Uis 2):	17.5 (kV)
• Voltaje de la lente (U lens):	9.40 (kV)
• Voltaje del detector lineal (U delL):	1.45 (kV)
• Voltaje del deflector (U defl):	2.00 (kV)
• Frecuencia de adquisición:	5.00 (Hz)
• Atenuación del laser:	50- 60

### III. D. 4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

#### III. D. 4. 1. ESTUDIOS DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD).

El Dicroísmo Circular (CD) es un método espectroscópico que se basa en que ciertas moléculas interactúan de manera diferente con la luz polarizada circular. La luz polarizada circular es quiral, y como consecuencia tiene lugar en dos formas no superponibles que son imágenes especulares una de la otra. La molécula para poder discriminar entre las dos formas quirales debe de ser también quiral, hecho que ocurre en la mayoría de moléculas biológicas.

El Dicroísmo Circular puede detectar pequeñas diferencias entre dos formas no superponibles que son imágenes especulares una de la otra (enantiómeros), por lo tanto es un método muy sensible a la estructura tridimensional que presentan las moléculas, es decir a su conformación. Por ejemplo el espectro de CD de una cadena polipeptídica difiere dependiendo si el polipéptido presenta en su estructura hélices, láminas o es una estructura en "random coil".

En el presente experimento comparamos los espectros de CD de nuestra proteína nativa (PCI) y de su forma reducida con los espectros de CD de los intermediarios de plegamiento para observar la diferencia estructural entre ellos. También compararemos los espectros obtenidos de someter la proteína nativa a diferentes concentraciones de urea y a diferentes pH.

#### III. D. 4. 1. 1. COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE PCI NATIVO, PCI REDUCIDO Y LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO.

1. Se preparan alícuotas de 50 µg de PCI nativo, PCI reducido y de cada una de los intermediarios liofilizados para los análisis.
2. Se preparan los siguientes tampones:
  - **Tampón A:** Se preparan 25 mL de H<sub>2</sub>O milli-Q con 0.1% TFA y se ajusta el pH a 3.0 con 0.1 M NaOH.
  - **Tampón B:** Se preparan 25 mL de una disolución 25 mM de glicina (pH= 3.0) disolviendo 47 mg en 25 mL de agua milli-Q.
  - **Tampón C:** Se preparan 25 mL de una disolución 50 mM de fosfato sódico (pH= 7.0) disolviendo 253 mg en 25 mL de agua milli-Q.

El aparato de Dicroísmo Circular utilizado es un Jasco, modelo J- 715.

3. Se utilizan los siguientes parámetros de medida:
  - Rango del espectro: 195 –250 nm
  - Amplitud de banda: 2.0 nm
  - Resolución: 0.5 nm
  - Sensibilidad: 20 mdeg
  - Respuesta: 1 segundo
  - Velocidad: 20 nm/ min
  - Acumulación: 6
4. Se ajusta el Termostato acoplado a 25 °C.
5. Se hacen los blancos de cada uno de los tampones preparados adicionando 600 µL de cada uno de ellos a una cubeta de cuarzo.

6. Se realizan las siguientes series de experimentos:

- a) Se disuelven las muestras de PCI nativo, PCI reducido y cada uno de los intermediarios en 600  $\mu$ L de tampón A y se realiza el espectro dicróico de cada una de ellas.
- b) Se disuelven las muestras de PCI nativo, PCI reducido y cada uno de los intermediarios en 600  $\mu$ L de tampón B y se realiza el espectro dicróico de cada una de ellas.
- c) Se disuelven las muestras de PCI nativo, PCI reducido y cada uno de los intermediarios en 600  $\mu$ L de tampón C y se realiza el espectro dicróico de cada una de ellas.

7. Se resta el blanco del espectro dicróico de cada muestra teniendo en cuenta el tampón utilizado en cada caso.

### III. D. 4. 1. 2. COMPARACIÓN DE LOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE PCI NATIVO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE UREA Y A DIFERENTE pH.

1. Se preparan alícuotas de 50  $\mu$ g de PCI nativo liofilizadas para los análisis.

2. Se preparan los siguientes tampones:

- **Tampón A:** Se preparan 25 mL de una disolución 25 mM de glicina (pH= 3.0) que contiene urea (8 M) disolviendo 47 mg de glicina y 16 g de urea en agua milli- Q.

La urea utilizada es Aldrich de baja absorbancia en UV.

Se preparan 10 mL de las disoluciones 25 mM de glicina (pH= 3.0) que contienen urea 6 M, 4 M, 2 M y 0 M diluyendo las cantidades adecuadas de tampón A en glicina (25 mM, pH= 3.0).

- **Tampón B:** Se preparan 25 mL de una disolución 50 mM de fosfato sódico (pH= 7.0) que contiene urea (8M) disolviendo 253 mg de fosfato sódico y 16 g de urea en agua milli- Q.

Se preparan 10 mL de las disoluciones 50 mM de fosfato sódico (pH= 7.0) que contienen urea 6 M, 4 M, 2 M y 0 M diluyendo las cantidades adecuadas de tampón B en fosfato sódico (50 mM, pH= 7.0).

3. Se utilizan los siguientes parámetros de medida:

- Rango del espectro: 210–250 nm
- Amplitud de banda: 2.0 nm
- Resolución: 0.5 nm
- Sensibilidad: 20 mdeg
- Respuesta: 1 segundo
- Velocidad: 20 nm/ min
- Acumulación: 6

4. Se ajusta el Termostato acoplado a 25°C.

5. Se hacen los blancos de cada uno de los tampones preparados adicionando 600  $\mu$ L de cada uno de ellos a una cubeta de cuarzo de 600  $\mu$ L.

6. Se realizan las siguientes series de experimentos:

- a) Se disuelven 50  $\mu$ g PCI nativo en 600  $\mu$ L de tampón A y en cada una de las diluciones de tampón A preparadas. Posteriormente se realiza el espectro dicróico de cada una de ellas.

b) Se disuelven 50 µg PCI nativo en 600 µL de tampón B y en cada una de las diluciones de tampón B preparadas. Posteriormente se realiza el espectro dicróico de cada una de ellas.

7. Se resta el blanco del espectro dicróico de cada muestra teniendo en cuenta el tampón utilizado en cada caso.

#### IV. D. 4. 2. ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

Los estudios de Resonancia Magnética Nuclear fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Manuel Rico, del Instituto de Estructura de la Materia del CSIC por el Dr. Carlos Gonzalez.

Se utilizó un espectrómetro BRUKER de 600 MHz.

### III. D. 5. ESTUDIO DEL PROCESO DE REORDENAMIENTO (“RESHUFFLING”) DE LOS PUENTES DISULFURO DEL PCI.

#### III. D. 5. 1. ESTUDIO DEL EQUILIBRIO ENTRE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI y EL PCI NATIVO EN PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZANTES.

Estudio del equilibrio entre los intermediarios de plegamiento del PCI y la estructura nativa, en presencia de dos agentes desnaturalizantes distintos: urea y GdmCl.

El protocolo seguido en el experimento es el siguiente:

1. Se preparan alícuotas de 40 µg de PCI nativo liofilizado.
2. Se preparan ocho disoluciones de tampón Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5) que contengan β- Mercaptoetanol (β-ME) (0.2 mM) y urea a diferentes concentraciones: 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M, y 8 M.
3. Se preparan ocho disoluciones de tampón Tris/ HCl (0.1 M, pH= 8.5) que contengan β- ME (0.2 mM) y GdmCl a diferentes concentraciones: 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M, y 8 M.
4. Se disuelven ocho alícuotas de 40 µg de PCI liofilizado en 80 µL de cada una de las disoluciones de urea preparada anteriormente.
5. Se disuelven ocho alícuotas de 40 µg de PCI liofilizado en 80 µL de cada una de las disoluciones de GdmCl preparada anteriormente.
6. Se dejan las muestras equilibrarse durante 5h a 24 °C.
7. Se paran la reacciones añadiendo 160 µL de 4 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN 4% TFA.
8. Se analizan 10 µg cada una de las reacciones por cromatografía (HPLC) de fase reversa en las condiciones descritas en el apartado III. C. 2. 3.

#### III. D. 5. 2. EXPERIMENTOS DE "STOP/ GO" DE LA MEZCLA DE INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI Y DE CADA UNO DE ELLOS AISLADO.

1. Se dispone de alícuotas de 40 µg y 100 µg de la mezcla de intermediarios de PCI liofilizados y de cada uno de ellos aislados (apartado III. C. 1. 1. 1).
2. Se prepara la siguiente disolución (**disolución A**): Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5) que contenga β- ME (0.25 mM).
3. Se prepara la siguiente disolución (**disolución B**): Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5) que contenga **Cys (1 mM)**.

4. Se prepara la siguiente disolución (**disolución C**): Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5) que contenga **Cys (0.5 mM)**.
5. Se disuelve una alícuota de 100 µg de la mezcla de intermediarios y una alícuota de 100 µg de cada uno de ellos en 200 µL de la disolución A .
6. Se disuelve una alícuota de 100 µg de la mezcla de intermediarios y una alícuota de 100 µg de cada uno de ellos en 200 µL de la disolución B .
7. Se disuelve una alícuota de 100 µg de cada uno de los intermediarios en 200 µL de la disolución C.
8. Se toman alícuotas de 20 µL de cada una de las disoluciones A, B y C a los siguientes tiempos de reacción: 15 y 30 segundos; 1, 2, 3, 5 y 15 minutos; 1, 2, 4, 8. y 24 horas. Las reacciones se paran adicionando 90 µL de 4 H<sub>2</sub>O/ 1 CH<sub>3</sub>CN 4% TFA.
9. Se analizan 10 µg de cada una de las reacciones por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. C. 2. 3).

### **III. E. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DE PCI RECOMBINANTE.**

Se estudia la diferente producción de PCI según la influencia de diferentes agentes redox añadidos al medio de cultivo, durante el crecimiento bacteriano y al sobrenadante una vez finalizado el crecimiento y separadas las células. Para ello se ensayan los siguientes agentes redox: cistina (Cys), el par cistina/ cisteína (Cys/ Cys-Cys), glutatión reducido (GSH) y el par glutatión reducido/ oxidado (GSH/ GSSG) .

#### **III. E. 1. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE *E. COLI* A PEQUEÑA ESCALA.**

Inicialmente se ensayó la influencia de diferentes agentes redox en la producción de PCI recombinante en cultivos de *E. Coli* pequeños, del orden de 50 mL. Se ensayaron diferentes concentraciones de los agentes redox y tiempos de reacción con la finalidad de optimizar los resultados obtenidos. Finalmente se aplicaron las mejores condiciones para hacer un escalado del cultivo a 500 mL y posteriormente a fermentador; y para la producción de otras proteínas recombinantes del grupo.

##### **III. E. 1. 1. INFLUENCIA DE LOS AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DE rePCI.**

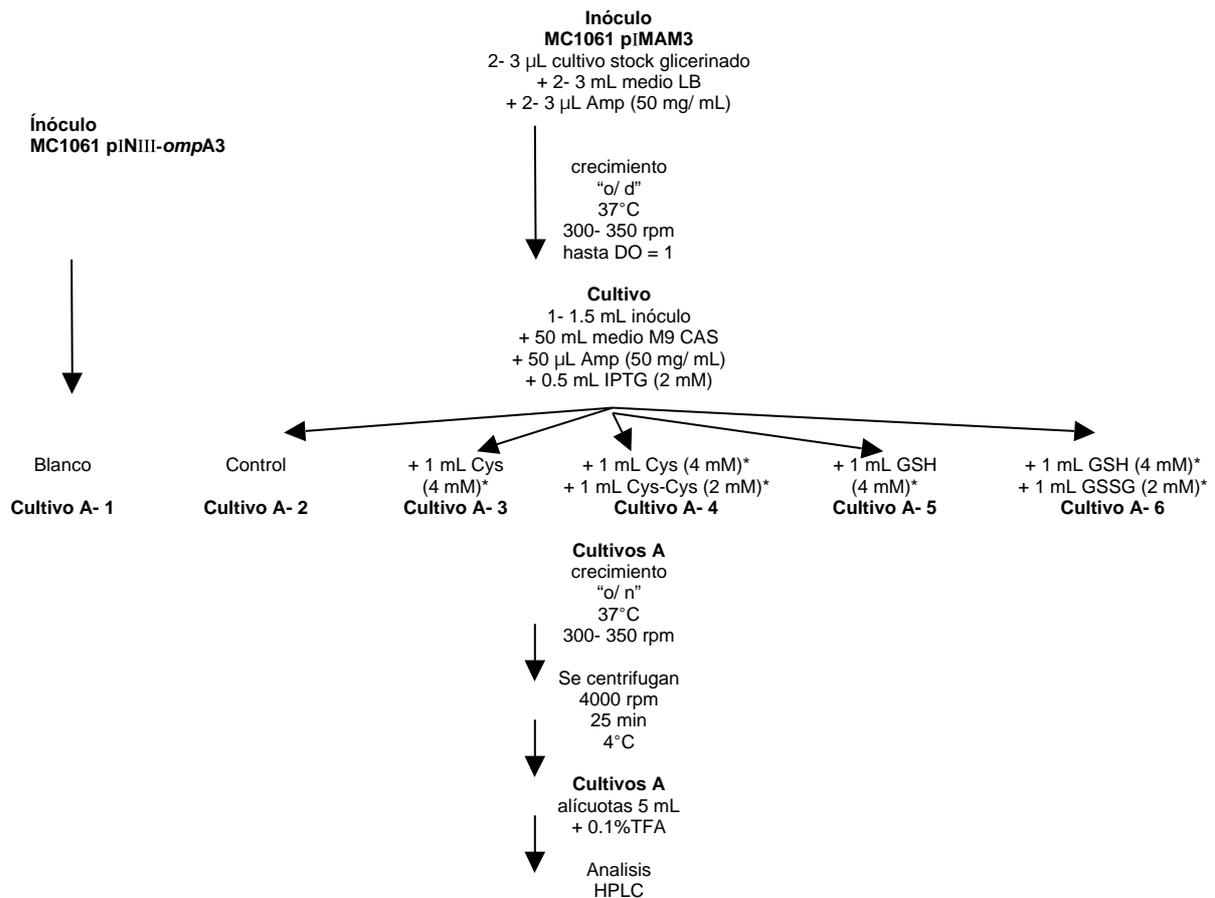
###### **III. E. 1. 1. 1. CULTIVO DE 50ML.**

###### **III. E. 1. 1. 1. 1. ENSAYOS DE ADICIÓN DE AGENTES REDOX DURANTE EL CULTIVO.**

Las condiciones de crecimiento de los cultivos de cepa bacteriana *E. Coli* MC1061 (III. B. 2. 1.) con el plásmido recombinante p MAM3 (III. B. 2. 2.) se resumen a continuación:

1. Se prepara un inóculo adicionando 2- 3 µL de un cultivo stock glicerinado a 2- 3 mL de medio LB que contiene Amp (50 µg/ mL) en un tubo estéril de 10 mL.
2. Se deja crecer durante el día (over/ day, "o/ d") a 37°C y 300- 350 rpm hasta una densidad óptica (DO) aproximada de 1.

El protocolo seguido queda esquematizado en la siguiente figura:



\* Las concentraciones indicadas corresponden a la concentración final del agente redox.

3. Con la finalidad de observar la diferente producción de PCI según la influencia de diferentes agentes redox en el medio de cultivo se preparan a la vez 6 cultivos añadiendo 0.5 mL del inóculo a 50 mL de medio M9 CAS, Amp (50 µg/ mL) y IPTG (2 mM) la concentración indicada de cistina, cistina /cisteína, glutatión reducido y glutatión reducido/ glutatión oxidado según el caso, en un erlenmeyer estéril de 250 mL.

Nomenclatura utilizada:

Nombre del cultivo	Adición del agente redox
<b>Cultivo A- 1*</b>	Blanco
<b>Cultivo A- 2**</b>	Control
<b>Cultivo A- 3</b>	Cys (4 mM)
<b>Cultivo A- 4</b>	Cys (4 mM)/ Cys-Cys (2mM)
<b>Cultivo A- 5</b>	GSH (4 mM)
<b>Cultivo A- 6</b>	GSH (4 mM)/ GSSG (2 mM)

- **Cultivo A- 1\***: Contiene el vector p N- *OmpA- 3* (III. B. 2. 2.) sin inserto.
  - **Cultivo A- 2\*\***: No se adiciona ningún agente redox al medio de cultivo.
4. Se dejan crecer los cultivos "o/ n" a 37°C y 300- 350 rpm.

5. Después de 18 horas de crecimiento celular aproximadamente ("o/ n") se sacan los cultivos del incubador y se mira la DO de estos a una absorbancia de 550 nm.

6. Se centrifugan las células a 4000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se separan y se guardan unos 20 mL del sobrenadante.

La centrifuga utilizada es una Heraeus modelo Sepatech Megafuge 2.0R.

7. Se separan 5 mL del sobrenadante cada uno de los cultivos y se adiciona 0.1% de TFA.

Estas alícuotas se rotulan como **Muestras A (A- 1, A- 2, A- 3, A- 4, A- 5 y A- 6)**.

Se centrifugan las muestras durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga de eppendorfs. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.

La centrifuga utilizada es la microcentrifuga de Eppendorfs, modelo 5415C (USA).

9. Se analizan cada uno de los cultivos por cromatografía (HPLC) de fase reversa.

La columna analítica utilizada de fase reversa es una Nova- pak C18 (Waters) con un diámetro de poro de 60A, un diámetro de 3.9 mm y una longitud de 150 mm.

Las condiciones cromatográficas generales se describen en el apartado II. C. 2. y a continuación detallamos el gradiente utilizado para este análisis:

Se equilibra la columna con fase móvil B al 21% a un flujo de elución de 1 mL/ min al menos durante 15 minutos.

Posteriormente se inyectan 100 µL del sobrenadante de cada uno de las muestras por inyección automática al HPLC.

Gradiente cromatográfico utilizado:

Tiempo (min)	Flujo (mL/ min)	% A	% B
0	0.5	79	21
5	0.5	79	21
50	0.5	71	29
50	1	5	95
60	1	5	95
62	1	79	21
75	0.5	79	21

El flujo de elución es 0.5 mL/ min durante la elución de la proteína y 1 mL/ min durante el lavado y equilibrado de la columna.

Se sigue la elución de la proteína por absorción a 214 nm.

### III. E. 1. 1. 1. 2. EVOLUCIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS EN PRESENCIA DE AGENTES REDOX TRAS AJUSTAR EL pH A 8.5.

1. Se separa otra alícuota de 5 mL del sobrenadante de cada uno de los cultivos anteriores y se ajusta el pH a 8.5 con NaOH (5 mM).

Se dejan evolucionar las muestras durante 8 horas a 25°C. Posteriormente se adiciona 0.1%TFA.

Estas alícuotas se rotulan como **Muestras B (B- 1, B- 2, B- 3, B- 4, B- 5 y B- 6)**.

Se centrifugan las muestras durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga de eppendorfs. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.

2. Se analizan cada uno de los cultivos por cromatografía (HPLC) de fase reversa ( III. E. 1. 1. 1. 1.).

### III. E. 1. 1. 1. 3. ENSAYOS DE ADICIÓN DE AGENTES REDOX DESPUÉS DEL CULTIVO.

1. Del **cultivo A- 2** (muestra control que no contiene ningún agente redox en el medio de cultivo) se separan cuatro alícuotas de 5 mL cada una y se ajusta el pH a 8.5.

Se adicionan los siguientes agentes redox y las alícuotas se rotulan como:

Nombre de las alícuotas	Adición del agente redox
<b>Muestra C- 3</b>	Cys (4 mM)
<b>Muestra C- 4</b>	Cys (4 mM)/ Cys-Cys (2 mM)
<b>Muestra C- 5</b>	GSH (4 mM)
<b>Muestra C- 6</b>	GSH (4 mM)/ GSSG (2 mM)

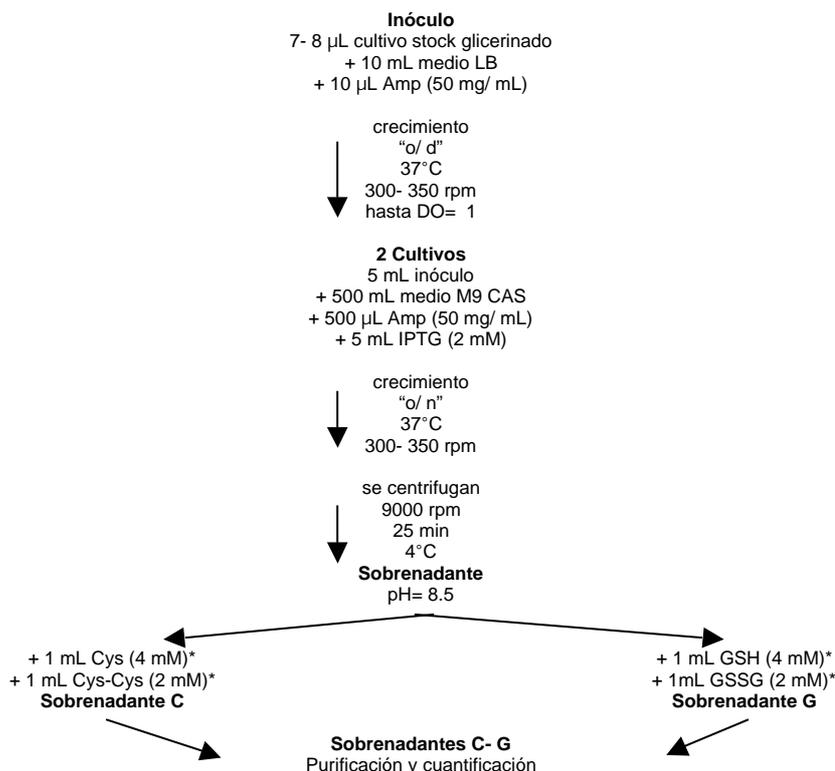
Se dejan evolucionar las muestras durante 8 horas a 25°C. Y posteriormente se adiciona 0.1%TFA.

Se centrifugan las muestras durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga de eppendorfs. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.

2. Se analizan cada uno de los cultivos por cromatografía de alta presión (HPLC) de fase reversa (III. E. 1. 1. 1. 1.).

### III. E. 1. 1. 2. CULTIVOS DE 500 ML Y PURIFICACIÓN DEL PCI OBTENIDO.

El protocolo seguido queda esquematizado en la siguiente figura:



\* Las concentraciones indicadas corresponden a la concentración final del agente redox.

Las condiciones de crecimiento de los cultivos de la cepa bacteriana *E. Coli* MC1061 (III. B. 2. 1.) con el plásmido recombinante p MAM3 (III. B. 2. 2.) se resumen a continuación:

1. Se prepara un inóculo adicionando 7- 8  $\mu$ L de un cultivo stock glicerinado a 10 mL de medio LB que contiene Amp (50  $\mu$ g/ mL) en dos tubos estériles de 50 mL.
2. Se dejan crecer "o/ d" a 37°C y 300- 350 rpm hasta una densidad óptica (DO) aproximada de 1.
3. Se preparan dos cultivo adicionando 5 mL del inóculo a 500 mL de medio M9 CAS que contiene Amp (50  $\mu$ g/ mL) y IPTG (2mM) en dos erlenmeyers estériles de 2 L respectivamente.
4. Después de 18 horas de crecimiento celular aproximadamente ("o/ n") se sacan los cultivos del incubador, se juntan y se mira la DO de éstos a una absorbancia de 550 nm.
5. Se centrifugan las células a 9000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se separan y se guarda el sobrenadante. La centrifuga utilizada es una Sorvall y el rotor empleado es un GS- 3.
6. Se separan cuatro alícuotas de 5 mL cada una y se analizan las siguientes condiciones.

Nomenclatura	Ajuste de pH	Tiempo de reacción	T <sup>ra</sup>
<b>Muestra 1</b>	-	8h	25°C
<b>Muestra 2</b>	-	72h	25°C
<b>Muestra 3</b>	8.5	8h	25°C
<b>Muestra 4</b>	8.5	72h	25°C

Posteriormente se adiciona 0.1% de TFA a cada una de las muestras y se congelan a -20°C para posterior análisis.

7. Se ajusta el pH del resto del medio de cultivo a 8.5 con NaOH y se adiciona 500 mL del mismo Cys (4 mM)/ Cys-Cys (2 mM) (**Sobrenadante C**) y los 500 mL restantes GSH (4 mM)/ GSSG (2 mM) (**Sobrenadante G**).

8. Se separa una alícuota de 5 mL de los sobrenadantes C y G después de 8 y 72 horas de evolución y se acidifican adicionando 0.1% TFA (**Muestras 5 y 6, 7 y 8 respectivamente**). Se congelan a -20°C para posterior análisis.

9. Al resto de los sobrenadantes C y G, tras 72 horas de evolución, se adiciona 0.1% de TFA (**Sobrenadantes C y G**).

10. Se centrifugan las muestras durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga de eppendorfs. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.

11. Se analizan cada una de las muestras (**Muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8**) por cromatografía de alta presión (HPLC) de fase reversa.

La columna analítica utilizada de fase reversa es una Nova- pak C18 y el protocolo seguido para el análisis cromatográfico es el mismo que describe en el apartado III. E. 1 .1 .1. 1.

12. Una vez analizadas todas las muestras obtenidas de cada sobrenadante se procede a la purificación y cuantificación de PCI producido en los **sobrenadantes C y G**:

a) El primer paso de purificación del PCI a partir del sobrenadante se realiza por cromatografía convencional a presión atmosférica utilizando columnas de fase reversa.

Para ello se han utilizado las minicolumnas preempaquetadas Sep- pak C18 de 35 cc (Waters) de fase reversa.

El protocolo seguido para la purificación de los cultivos en estas minicolumnas es el mismo que se describe en el apartado III. B. 4. 4. 1.

b) A continuación se purifican por cromatografía líquida de alta resolución (FPLC) utilizando columnas de intercambio aniónico.

La columna utilizada ha sido una TSK- DEAE 5PW Ultrapac de LKB con un diámetro de partícula de 10  $\mu$ m, diámetro de poro de 0.1  $\mu$ m y de medidas de 21.5  $\times$  150 mm.

El protocolo seguido para la purificación de los cultivos por cromatografía de intercambio aniónico es el mismo que se describe en el apartado III. B. 4. 4. 2.

c) Finalmente se determina la concentración de PCI purificado por métodos espectroscópicos como se describe en el apartado III. B. 4. 5.

### III. E. 1. 1. 3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y DEL TIEMPO DE REACCIÓN ÓPTIMOS DEL AGENTE REDOX.

Las condiciones de crecimiento de los cultivos de la cepa bacteriana *E. Coli* MC1061 con el plásmido recombinante pIMAM3 se resumen a continuación:

1. Se prepara un inóculo adicionando 2- 3  $\mu$ L de un cultivo stock glicerinado a 2- 3 mL de medio LB que contiene Amp (50  $\mu$ g/ mL) en un tubo estéril de 10 mL.
2. Se deja crecer "o/ d" a 37°C y 300- 350 rpm hasta una densidad óptica (DO) aproximada de 1.
3. Se prepara el cultivo adicionando 0.5 mL del inóculo a 50 mL de medio M9 CAS que contiene Amp (50  $\mu$ g/mL) y IPTG (2 mM) en un erlenmeyer estéril de 250 mL.
4. Se deja crecer el cultivo "o/ n" a 37°C y 300- 350 rpm.
5. Después de 18 horas de crecimiento celular aproximadamente ("o/ n") se sacan los cultivos del incubador y se mira la DO de éstos a una absorbancia de 550 nm.
6. Se centrifugan las células a 4000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.
7. Se separan 4 alícuotas de 5 mL cada una y de adicionan las siguientes concentraciones de Cys:

Rotulación de la alícuota	Concentración de Cys
Muestra C- 2	2 mM
Muestra C- 4	4 mM
Muestra C- 8	8 mM
Muestra C- 16	16 mM

8. Se separan 4 alícuotas más de 5 mL cada una y de adicionan las siguientes concentraciones del par redox Cys/ Cys-Cys:

Rotulación de la alícuota	Concentración de Cys/ Cys-Cys
Muestra C/ C- 2/ 2	2 mM/ 2 mM
Muestra C/ C- 2/ 4	2 mM/ 4 mM
Muestra C/ C- 2/ 8	2 mM/ 8 mM
Muestra C/ C- 2/ 16	2 mM/ 16 mM

9. Se paran cada una de las reacciones separando alícuotas de 1 mL a las 2, 4, 8, y 16 horas y adicionando 0.1 % de TFA respectivamente.

Se centrifugan las muestras durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga de eppendorfs. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.

10. Se analizan cada una de las muestras por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. E. 1. 1. 1. 1.).