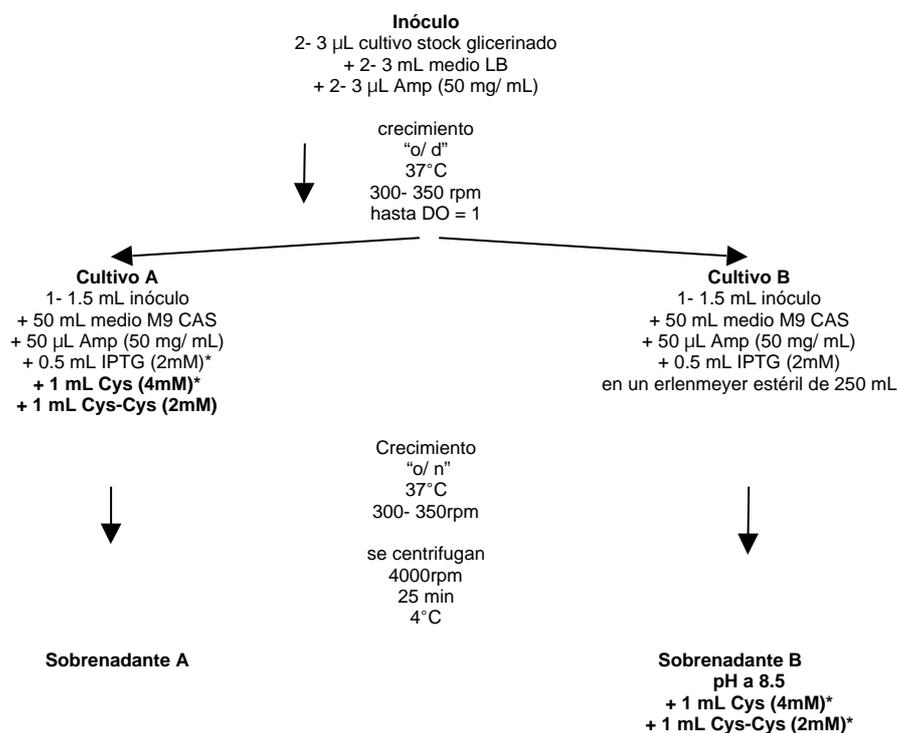


III. E. 1. 2. INFLUENCIA DE UN AGENTE REDOX EN LA PRODUCCIÓN MUTANTES DEL PCI DE EXPRESIÓN BAJA Y EN LA PRODUCCIÓN DE OTRA PROTEÍNA RECOMBINANTE.

Conocidos los resultados de los ensayos anteriores, ahora se estudia la influencia de los mismos agentes redox utilizados en la producción de mutantes de PCI y de otra proteína con puentes disulfuro, expresada en el mismo sistema de expresión.

1. Se analiza la influencia del agente redox durante el cultivo (**Cultivo A**).
2. Se analiza la influencia del agente redox después del cultivo (**Cultivo B**).

En el siguiente esquema resumimos el protocolo seguido:



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

III. E. 1. 2. 1. INFLUENCIA DE UN AGENTE REDOX EN LA PRODUCCIÓN DEL MUTANTE DELECCIÓN VAL- 38 Y GLY- 39 DEL PCI.

Las condiciones de crecimiento de los cultivos de la cepa bacteriana MC1061 (III. B: 2. 1.) con el plásmido recombinante pN- que tiene el inserto del gen de PCI mutado (pN- del2) (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 "o/ d" a 37°C y 300- 350 rpm hasta una densidad óptica (DO) aproximada de 1.

3. Se preparan dos cultivos adicionando 0.5 mL del inóculo a 50 mL de medio M9 CAS que contiene Amp (50 µg/ mL) y IPTG (2mM) en dos erlenmeyers estériles de 250 mL.
4. Se adiciona a uno de los dos cultivos Cys (4 mM)/ Cys-Cys (2 mM) y se rotula como **Cultivo del2- A**. El cultivo restante se rotula como **Cultivo del2- B**.
5. Se dejan crecer los cultivos “o/ n” a 37°C y 300- 350 rpm.
6. Después de 18 horas de crecimiento celular aproximadamente (“o/ n”) se sacan los cultivos del incubador (**Cultivo del2- A** y **Cultivo del2- B**) y se mira la DO de éstos a una absorbancia de 550 nm.
7. Se centrifugan las células a 4000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.
8. Se separan cuatro alícuotas de 5 mL cada una y se analizan las siguientes condiciones:

| Cultivo | Nomenclatura | Ajuste de pH | Tiempo de reacción |
|-----------|-------------------------|--------------|--------------------|
| Cultivo A | Muestra del2- A1 | - | - |
| Cultivo A | Muestra del2- A2 | - | 8h |
| Cultivo B | Muestra del2- B1 | - | - |
| Cultivo B | Muestra del2- B2 | 8.5 | 8h |

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

9. Se le ajusta el pH a 8.5 y se deja evolucionar 8 horas, después de las cuales se adiciona 0.1% de TFA y se congela a –20°C para posterior análisis (**Cultivo del2- A**).
10. Una vez ajustado el pH, se adiciona Cys (4 mM)/ Cys-Cys (2 mM) al cultivo B restante y se deja evolucionar durante 8 horas, después de las cuales se adiciona 0.1% de TFA y se congela a –20°C para posterior análisis (**Cultivo del2- B**).
11. Se centrifugan los cultivos durante 10 min a temperatura ambiente en una centrifuga de eppendorfs. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.
12. Se analizan cada uno de los cultivos 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.
13. Con la finalidad de identificar y cuantificar la proteína producida, se analizan los **cultivos del2- A** y **B** y las **muestras del2- A1, A2, B1 y B2** por cromatografía de HPLC en fase reversa inyectando manualmente 2 mL de cultivo respectivamente. El protocolo seguido para el análisis cromatográfico es el mismo que describe en el apartado III. E. 1. 1. 1.
14. Posteriormente se recogen manualmente los picos obtenidos de los cromatogramas y se identifica nuestra proteína analizando 0.5 µL de las fracciones por espectrometría de masas MALDI- TOF. El procedimiento seguido para este análisis se describe en el apartado III. D. 3. 2. 1.
15. Una vez identificada nuestra proteína se cuantifica la producción comparando las áreas cromatográficas con las áreas cromatográficas de patrones conocidos (II. C. 2. 5.).

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.

Las condiciones de crecimiento de los cultivos de la cepa bacteriana MC1061 con el plásmido recombinante p M- que tiene el inserto del gen de PCI mutado (p N- del3) se resumen a continuación:

1. Se prepara un inóculo adicionando 2- 3 μ L de un cultivo stock glicerinado 2- 3 mL de medio LB que contiene Amp (50 μ 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 preparan dos cultivos adicionando 0.5 mL del inóculo a 50 mL de medio M9 CAS que contiene Amp (50 μ g/ mL) y IPTG (2 mM) en dos erlenmeyers estériles de 250 mL.
4. Se adiciona a uno de los dos cultivos Cys (4 mM)/ Cys-Cys (2 mM) y se rotula como **Cultivo del3- A**. El cultivo restante se rotula como **Cultivo del3- B**.
5. Se dejan crecer los cultivos "o/ n" a 37°C y 300- 350 rpm.
6. Después de 18 horas de crecimiento celular aproximadamente ("o/ n") se sacan los cultivos del incubador (**Cultivo del3- A** y **Cultivo del3- B**) y se mira la DO de éstos a una absorbancia de 550 nm.
7. Se centrifugan las células a 4000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.
8. Se separan cuatro alícuotas de 5 mL cada una y se analizan las siguientes condiciones.

| Cultivo | Nomenclatura | Ajuste de pH | Tiempo de reacción |
|-----------|-------------------------|--------------|--------------------|
| Cultivo A | Muestra del3- A1 | - | - |
| Cultivo A | Muestra del3- A2 | - | 8 h |
| Cultivo B | Muestra del3- B1 | - | - |
| Cultivo B | Muestra del3- B2 | 8.5 | 8 h |

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

10. Se le ajusta el pH a 8.5 y se deja evolucionar 8 horas, después de las cuales se adiciona 0.1% de TFA y se congela a -20°C para posterior análisis (**Cultivo del3- A**).

11. Una vez ajustado el pH, se adiciona Cys (4 mM)/ Cys-Cys (2 mM) al cultivo B restante y se deja evolucionar durante 8 horas, después de las cuales se adiciona 0.1% de TFA y se congela a -20°C para posterior análisis (**Cultivo del3- B**).

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

13. Se analizan cada uno de los cultivos por cromatografía de alta presión (HPLC) de fase reversa.

14. 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.

15. Con la finalidad de identificar y cuantificar la proteína producida, se analizan los **cultivos del3- A** y **B** y las **muestras del3- A1, A2, B1 y B2** por cromatografía de HPLC en fase reversa inyectando manualmente 2 mL de cultivo respectivamente.

16. El protocolo seguido para el análisis cromatográfico es el mismo que describe en el apartado III. E. 1. 1. 1. 1.

17. Posteriormente se recogen manualmente los picos obtenidos de los cromatogramas y se identifica nuestra proteína analizando 0.5 μ L de las fracciones por espectrometría de masas MALDI- TOF. El procedimiento seguido para este análisis se describe en el apartado III. D. 3. 2. 1.

18. Una vez identificada nuestra proteína se cuantifica la producción comparando las áreas cromatográficas con las áreas cromatográficas de patrones conocidos (III. C. 2. 5.).

III. E. 1. 2. 3. INFLUENCIA DE AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DEL INHIBIDOR DE CARBOXIPEPTIDASA DE SANGUIJUELA (LCI).

Las condiciones de crecimiento de los cultivos de la cepa bacteriana *E. Coli* MC 1061 (III. B. 2. 1.) con el plásmido recombinante derivado de p N - *ompA3* (III. B. 2. 2.) se resumen a continuación:

1. Se prepara un inóculo adicionando 2- 3 μ L de un cultivo stock glicerinado a 2- 3 mL de medio LB que contiene Amp (50 μ 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 preparan dos cultivos adicionando 0.5 mL del inóculo a 50 mL de medio M9 CAS que contiene Amp (50 μ g/mL) en dos erlenmeyers estériles de 250 mL.

La composición del medio M9 CAS (III. B. 2. 3.) varía en el % de Glicerol para la producción de LCI, se adiciona un 0.3% del total.

4. Se adiciona a uno de los dos cultivos Cys (4 mM) /Cys-Cys (2 mM) y se rotula como **Cultivo LCI- A**. El cultivo restante se rotula como **Cultivo LCI- B**.

5. Se inducen los cultivos cuando la DO llega a 0.5, adicionando una concentración final de IPTG de 0.4 mM. Se dejan crecer los cultivos "o/ n" a 37°C y 300- 350 rpm.

6. Después de 18 horas de crecimiento celular aproximadamente ("o/ n") se sacan los cultivos del incubador (**Cultivo LCI- A** y **Cultivo LCI- B**) y se mira la DO de éstos a una absorbancia de 550 nm.

7. Se centrifugan las células a 4000 rpm durante 25 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular.

La centrifuga utilizada es una centrifuga Heraeus, modelo sephatech Megafuge 2.0 R.

8. Se separan cuatro alícuotas de 5 mL cada una y se analizan las siguientes condiciones.

| Cultivo | Nomenclatura | Ajuste de pH | Tiempo de reacción |
|-----------|------------------------|--------------|--------------------|
| Cultivo A | Muestra LCI- A1 | - | - |
| Cultivo A | Muestra LCI- A2 | - | 8 h |
| Cultivo B | Muestra LCI- B1 | - | - |
| Cultivo B | Muestra LCI- B2 | 8.5 | 8 h |

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

9. Se le ajusta el pH a 8.5 y se deja evolucionar 8 horas, después de las cuales se adiciona 0.1% de TFA y se congela a -20°C para posterior análisis (**Cultivo LCI – A**).

10. Una vez ajustado el pH del cultivo B restante, se adiciona Cys (4 mM)/ Cys-Cys (2 mM) y se deja evolucionar durante 8 horas, después de las cuales se adiciona 0.1% de TFA y se congela a -20°C para posterior análisis (**Cultivo LCI- B**).

11. Se centrifuga 1 mL de los cultivos 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).

12. 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 y el protocolo seguido para el análisis cromatográfico es el mismo que describe en el apartado III. E. 1. 1. 1. 1.

13. Con la finalidad de identificar y cuantificar la proteína producida, se analizan los **cultivos LCI- A y B** y las **muestras LCI- A1, A2, B1 y B2** por cromatografía de HPLC en fase reversa inyectando manualmente 2 mL de cultivo respectivamente.

14. El protocolo seguido para el análisis cromatográfico es el mismo que describe en el apartado III. E. 1. 1. 1. 1.

15. Posteriormente se recogen manualmente los picos obtenidos de los cromatogramas y se identifica nuestra proteína analizando 0.5 µL de las fracciones por espectrometría de masas MALDI- TOF. El procedimiento seguido para este análisis se describe en el apartado III. D. 3. 2. 1.

16. Una vez identificada nuestra proteína se cuantifica la producción comparando las áreas cromatográficas con las áreas cromatográficas de patrones conocidos (III. C. 2. 5.).

III. E. 2. APLICACIÓN A LA MEJORA DE PRODUCCIÓN DE rePCI POR FERMENTACIÓN.

Se consigue una mejora en la producción de PCI manipulando el crudo de fermentación posteriormente al proceso de fermentación. El protocolo utilizado para la producción de rePCI en fermentador es el mismo que el descrito en el apartado III. B. 3. 2.

El protocolo seguido después de la fermentación es el que se describe a continuación:

1. Se cogen muestras de 1 mL del crudo de fermentación a las 12 y 24 horas de crecimiento celular.

Se centrifugan durante 5 minutos, se recupera el sobrenadante y se elimina el precipitado celular. Se adiciona 0.1 % de TFA y se congelan a -20°C para posterior análisis (Muestras **Ft12** y **Ft24**).

La centrifuga utilizada es una microcentrifuga Eppendorfs modelo 5415C.

2. Una vez separado el sobrenadante del cultivo del fermentador se ajusta el pH de éste a 8.5 con NaOH (10 M) y se adiciona Cys (2 mM)/ Cys-Cys (2 mM), dejando evolucionar la reacción 2 h.

3. Posteriormente se procede a la purificación del PCI obtenido siguiendo el protocolo descrito en los apartados III. B. 4. 1. y III. B. 4. 4.

III. E. 3. CUANTIFICACIÓN DE LA MEJORA DE PRODUCCIÓN DE rePCI POR FERMENTACIÓN.

Se determinan los mg de rePCI obtenidos en la fermentación, antes de la adición de agente redox, después de la adición y el total purificado, mediante el análisis del área cromatográfica obtenida de las muestras en el HPLC de fase reversa.

1. Para ello se inyectan en el HPLC cantidades equivalentes de las muestras a analizar, teniendo en cuenta el volumen total de muestra en cada caso, y seguidamente se coinyectan dichas muestras con una muestra de PCI de concentración conocida.

Se coinyecta cada muestra con 10 µL y 20 µL de PCI patrón (1 mg/mL).

2. A partir de las áreas cromatográficas obtenidas (mínimo tres valores) se calcula la cantidad de PCI de cada muestra analizada.

3. Las muestras analizadas, el volumen total obtenido y el volumen inyectado al HPLC se resumen en la siguiente tabla:

| Muestra | Rotulación de la muestra | Volumen total | Volumen inyectado |
|--|---------------------------------|----------------------|--------------------------|
| Crudo de fermentación antes de adicionar el par redox. | Ferm- t₀ | 1.6 L | 133 μ L |
| Crudo de fermentación después de adicionar el par redox. | Ferm- t_F | 1.6 L | 133 μ L |
| Fracción purificada de FPLC. | FPLC | 120 mL | 16 μ L |

ÍNDICE

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

| | |
|--|-----|
| IV. A. OBTENCIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI. | 97 |
| IV. A. 1. Producción del Inhibidor proteico de Carboxipeptidasa de Patata recombinante (rePCI) mediante fermentación. | 97 |
| IV. A. 2. Obtención de los intermediarios a partir del PCI purificado. | 99 |
| IV. A. 3. Obtención a partir de cultivos de <i>E. Coli</i> que expresan PCI. | 103 |
| IV. B. CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI PURIFICADOS. | 107 |
| IV. B. 1. Análisis de la pureza de cada una de las fracciones scrambled. | 107 |
| IV. B. 2. Determinación de las constantes de inhibición de la carboxipeptidasa de los intermediarios del PCI. | 111 |
| IV. B. 2. 1. Ensayos preliminares. | 111 |
| IV. B. 2. 2. Determinación de la K_i del intermediario Xb por el método de Lineweaver- Burk. | 111 |
| IV. B. 2. 3. Determinación de la K_i de los intermediarios a partir de las IC_{50} . | 115 |
| IV. B. 3. Determinación de las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento del PCI. | 117 |
| IV. B. 3. 1. Introducción. Métodos de determinación del apareamiento de puentes disulfuro de proteínas. | 117 |
| IV. B. 3. 2. Determinación de puentes disulfuro por digestión con proteasas. | 118 |
| IV. B. 3. 3. Determinación de puentes disulfuro por reducción química parcial. | 123 |
| IV. B. 3. 4. Determinación de puentes disulfuro del primer intermediario de plegamiento de PCI, Xa. | 132 |
| IV. B. 3. 5. Determinación de puentes disulfuro del segundo intermediario de plegamiento de PCI, Xb. | 141 |
| IV. B. 3. 6. Determinación de puentes disulfuro del tercer intermediario de plegamiento de PCI, Xc. | 153 |
| IV. B. 3. 7. Determinación de puentes disulfuro del cuarto intermediario de plegamiento de PCI, Xd. | 163 |
| IV. B. 3. 8. Determinación de puentes disulfuro del quinto intermediario de plegamiento de PCI, Xe. | 175 |
| IV. B. 3. 9. Ventajas y problemas del método de reducción química parcial con TCEP frente al método de digestión proteolítica. | 183 |
| IV. B. 3. 10. Conclusiones finales. | 186 |

| | |
|--|-----|
| IV. B. 4. Caracterización estructural. | 191 |
| IV. B. 4. 1. Estudios de Dicroísmo Circular (DC). | 191 |
| IV. B. 4. 1. 1. Estudio de los espectros de DC del PCI nativo, PCI reducido y las especies scrambled. | 192 |
| IV. B. 4. 1. 2. Estudio de los espectros de DC del PCI nativo, PCI reducido y las especies scrambled en presencia de urea. | 195 |
| IV. B. 4. 2. Estudios de Resonancia magnética Nuclear (RMN). | 198 |
| | |
| IV. C. ESTUDIO DEL PROCESO DE REORDENAMIENTO ("RESHUFFLING") DE LOS PUENTES DISULFURO DEL PCI. | 205 |
| IV. C. 1. Introducción. | 205 |
| | |
| IV. C. 2. Estudio del equilibrio entre los intermediarios de plegamiento del PCI en presencia de agentes desnaturalizantes. | 206 |
| IV. C. 2. 1. Introducción. Estudios previos. | 206 |
| IV. C. 2. 2. Resultados de los experimentos con PCI. | 207 |
| | |
| IV. C. 3. Experimentos de "Stop/ Go" con la mezcla de intermediarios de plegamiento del PCI y con cada uno de ellos aislado. | 212 |
| | |
| IV. D. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DE PCI RECOMBINANTE. | 225 |
| IV. D. 1. Introducción. | 225 |
| | |
| IV. D. 2. Influencia de un agente redox en la producción de rePCI. | 226 |
| IV. D. 2. 1. Adición del agente redox durante y después del cultivo celular. | 226 |
| IV. D. 2. 2. Cultivo de 500 mL y purificación del PCI obtenido. | 231 |
| IV. D. 2. 3. Determinación de la concentración y del tiempo de reacción óptimos del agente redox. | 233 |
| IV. D. 2. 4. Aplicación a la mejora de producción de rePCI por fermentación. | 234 |
| IV. D. 2. 5. Influencia de un agente redox en la producción de mutantes del PCI de expresión baja y en la producción de otra proteína recombinante. | 236 |

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV. A. OBTENCIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.

IV. A. 1. PRODUCCIÓN DEL INHIBIDOR PROTEICO DE CARBOXIPEPTIDASA DE PATATA RECOMBINANTE (rePCI) MEDIANTE FERMENTACIÓN.

El PCI utilizado para el presente trabajo se obtuvo mediante fermentación de una cepa de *E. Coli* MC1061[p MAM3]. El plásmido [p MAM3] deriva del vector de secreción p N *ompA3* en el que se insertó un gen sintético que codifica la forma a del Inhibidor proteico de Carboxipeptidasa de Patata (PCI) (Molina, 1992).

La producción de una proteína mediante fermentación permite controlar la temperatura, la agitación, el pH, la oxigenación y la adición de sustratos, incrementando de manera importante los niveles de crecimiento celular (hasta DO_{550} de 30) i los niveles de expresión. Las condiciones consideradas óptimas para la fermentación de PCI son las descritas en material y métodos (III. B. 3. 2.).

El desarrollo de cada una de las fermentaciones se realizó mediante una alimentación en discontinuo, ajustando la mayor parte de las condiciones para obtener un crecimiento bacteriano óptimo para una producción de rePCI más elevada (Marino- Buslje, 1994).

Para el inicio de la fermentación se partió de un medio de cultivo (M9CAS + ampicilina (Amp) + Glicerol + oligoelementos) a una la temperatura de 37°C y un pH de 7.0, se fijaron los parámetros del fermentador para que las rpm de la agitación estuvieran subordinadas al mantenimiento de una pO_2 al 50%. A medida que el cultivo va creciendo (fase exponencial) va disminuyendo la pO_2 , que inicialmente se encuentra cerca del 100 %, hasta que al llegar al 50 % hace incrementar la velocidad de agitación para repartir mejor el oxígeno y mantener esta condición.

A diferentes tiempos se recogen muestras del cultivo para medir la absorbancia del crecimiento celular (DO_{550}) y controlar el crecimiento celular. Si en algún momento se observa disminución del crecimiento, se hacen adiciones de casaminoácidos 20% y glicerol 80%.

La expresión de PCI recombinante se induce desde el principio de la fermentación por la adición de Isopropil- β -D-galactopiranosido (IPTG).

Cuando la agitación llega cerca de 900 rpm se cambian las condiciones, se fija la velocidad de agitación a 900 rpm y se conecta la bombona de oxígeno al sistema de forma que el control básico se realiza mediante la monitorización del consumo de oxígeno. Si las bacterias continúan creciendo consumen cada vez más oxígeno que se suministrará para mantener la pO_2 al 50%. Cuando el cultivo llega a la fase estacionaria, el consumo de oxígeno disminuye por culpa de la parada de crecimiento y del ritmo metabólico.

Cuando la medida de la absorbancia de cultivo se encuentra alrededor de 20 (aproximadamente entre las 15- 18 horas del inicio) se vuelve a inducir el cultivo con IPTG, dejándose crecer hasta las 25- 30 horas del inicio, que llega a la fase estacionaria.

Una vez producido el PCI se procede a su purificación (III. B. 4.). A continuación mostramos dos cromatogramas obtenidos en los dos últimos pasos de la purificación de PCI, la cromatografía (FPLC) de intercambio iónico (figura IV. A. 1. 1.) y la cromatografía (HPLC) de fase reversa (figura IV. A. 1. 2.).

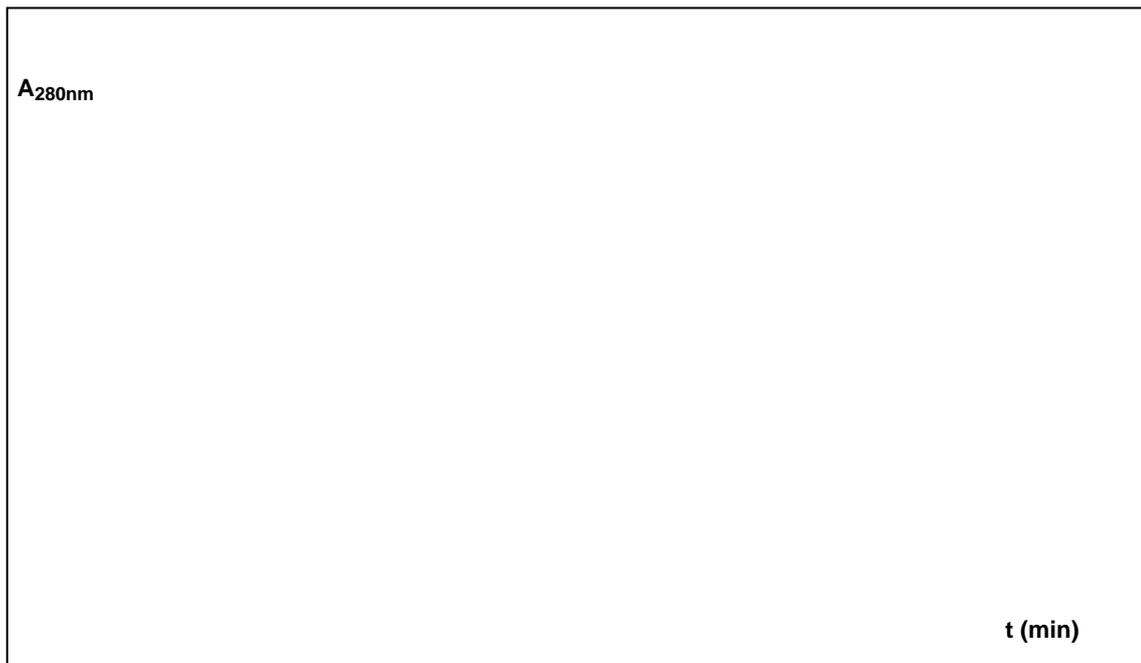


Figura IV. A. 1. 1. Cromatograma obtenido de la purificación por FPLC de intercambio iónico de una alícuota de 3. 5 mL (1/ 3 del total de proteína obtenida en una fermentación) que corresponde a la muestra evaporada y concentrada eluida en la fracción de isopropanol (30%) de la cromatografía previamente realizada en una minicolumna Sep- pak C18 (35cc).

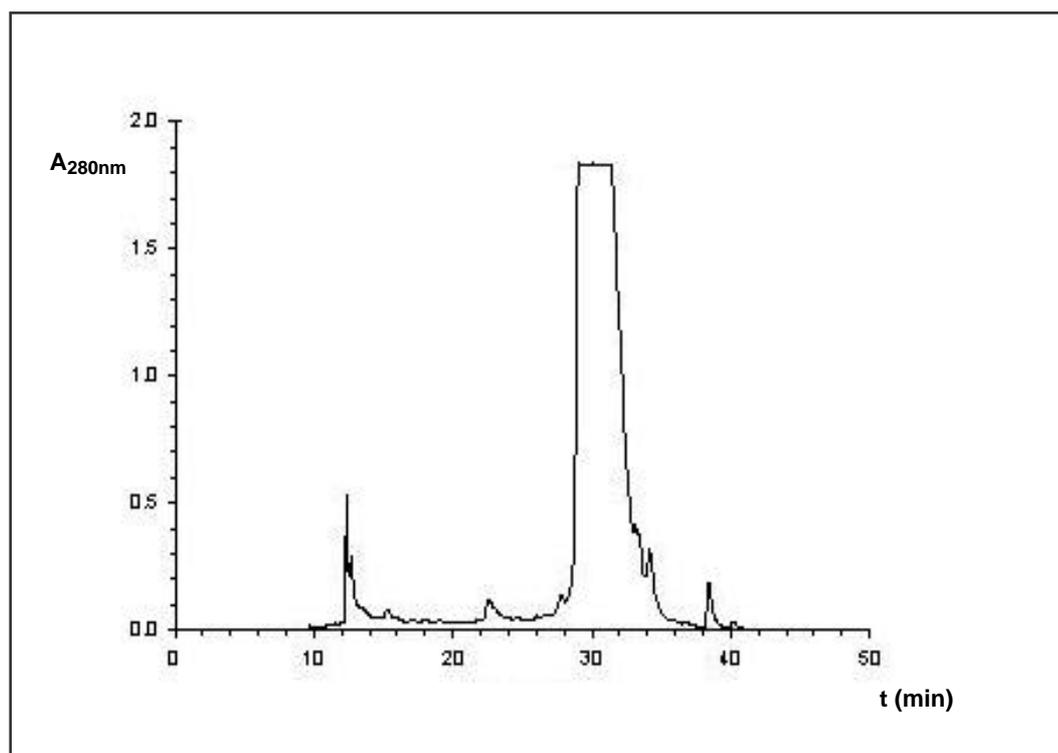


Figura IV. A. 1. 2. Cromatograma obtenido de la purificación por cromatografía (HPLC) de fase reversa de una alícuota de 10 mg de PCI (1/ 10 del total de proteína obtenida en una fermentación) previamente purificado por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico.

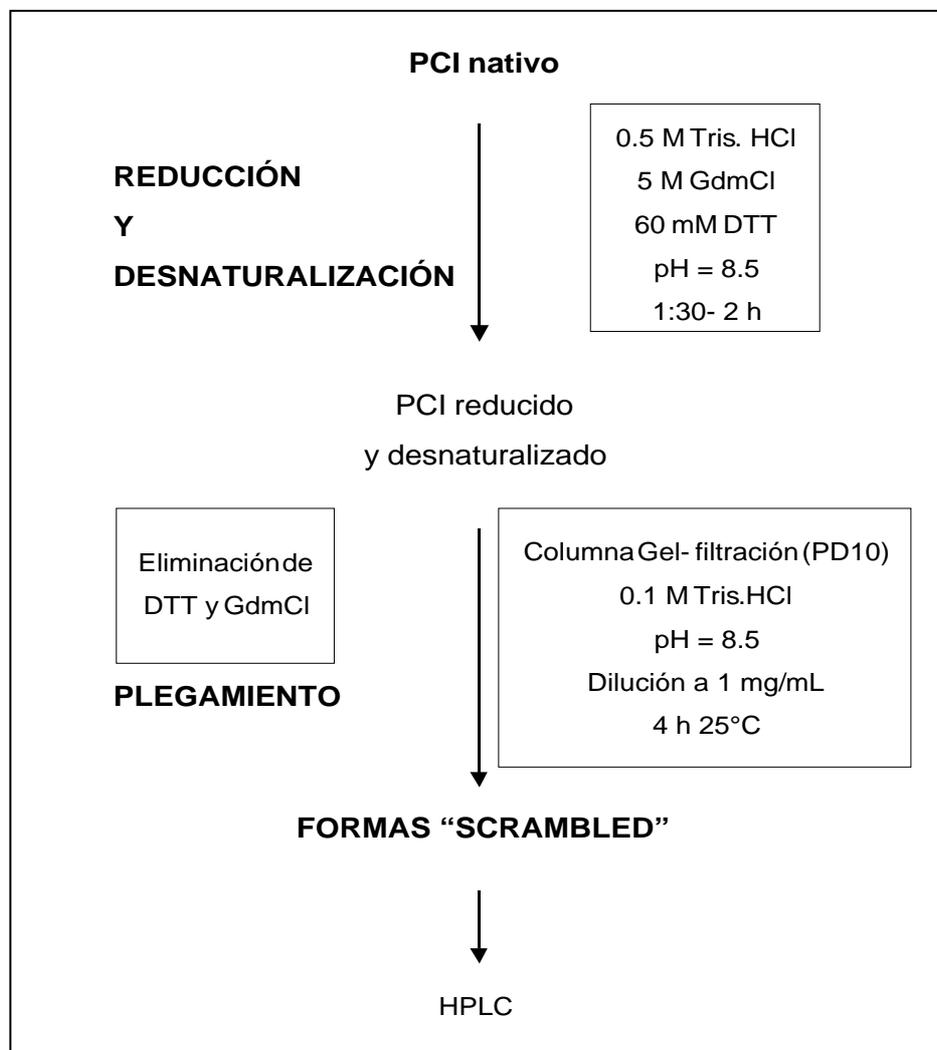
Algunos de los datos obtenidos después de una fermentación y posterior purificación por técnicas cromatográficas se muestran en la tabla IV. A. 1. 1. detallamos las densidades ópticas del cultivo (DO_{550}) obtenidas en tres fermentaciones; los mg de rePCI obtenidos por litro de cultivo en fermentador y los mg totales determinados por espectrofotometría a una absorbancia de 280nm (III. B. 4. 5.); los mg de rePCI obtenidos después de su purificación por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico (III. B. 4. 4. 2.) y cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. B. 4. 4. 3.) determinados por el mismo método; y finalmente el rendimiento de la purificación.

Tabla IV. A. 1. 1. DO_{550} del cultivo, mg/ L de rePCI obtenidos, mg totales, mg purificados y los rendimientos obtenidos en tres fermentaciones.

| DO_{550} | mg/ L cultivo | mg totales | mg purificados | Rendimiento |
|------------|---------------|------------|----------------|-------------|
| 40 | 131.3 | 197 | 80 | 40.60% |
| 36.5 | 120 | 180 | 120 | 66.66% |
| 32.5 | 106.6 | 160 | 70 | 43.74% |

IV. A. 2. OBTENCIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS A PARTIR DEL PCI PURIFICADO.

En los estudios previos de nuestro grupo de investigación sobre el mecanismo de plegamiento del PCI (Chang, *et al.* 1994), la obtención a escala analítica de los intermediarios de scrambled del PCI se había llevado a cabo mediante el protocolo que se muestra en el esquema IV. A. 2. 1.



Esquema IV. A. 2. 1. Esquema de la obtención de los intermediarios de PCI, a niveles analíticos.

El PCI se reduce y desnaturaliza disolviendo una muestra en tampón Tris.HCl (0.5 M, pH= 8.5) que contiene Cloruro de Guanidinio (GdmCl) y Ditiotreitól (DTT). A continuación, se eliminan por gel filtración el reductor y el desnaturalizante. El PCI reducido y desnaturalizado, en tampón Tris.HCl (0.1 M, pH= 8.5), inicia su plegamiento. En estas condiciones (ausencia de reactivos con grupos tiol), el proceso de replegamiento, en aproximadamente 4 horas, a temperatura ambiente, conduce a una mezcla en la que aproximadamente el 70 % de la proteína está atrapada en forma de especies scrambled. Dicha mezcla es estable y no evoluciona si no se añade algún catalizador con grupos tiol libres.

Para poder llevar a cabo los estudios propuestos en este trabajo era necesario disponer de cantidades importantes de los intermediarios scrambled (del orden de medio miligramo). Por ello hemos

intentado mejorar el rendimiento y realizar un escalado del procedimiento de obtención expuesto en el esquema anterior. En primer lugar, con el fin de intentar mejorar el rendimiento en especies scrambled respecto a la especie nativa, se ensayó la utilización para el proceso de replegamiento de un tampón Tris.HCl (0.1 M, pH= 8.5) previamente saturado de oxígeno. En estas condiciones, se observó un aumento significativo de la proporción de especies "scrambled" en la mezcla final del replegamiento de hasta un 70 %, frente al 40 % que se obtenía sin saturar el tampón con oxígeno. La proporción relativa entre las diferentes especies scrambled es similar en los dos casos. Este aumento del rendimiento de las formas scrambled probablemente es debido a que el oxígeno presente en el tampón Tris.HCl acelera la oxidación de los grupos tiol libres de las especies intermediarias de uno y dos puentes disulfuro que tiene lugar en la primera etapa de plegamiento del PCI. Dichos grupos tiol son los que actúan de catalizadores en la segunda etapa, la formación de la especie nativa a partir de los intermediarios de tres puentes disulfuro. Como consecuencia de la oxidación más rápida de estos grupos tiol existe una acumulación de las especies scrambled en una proporción mayor. Es de esperar que esta acumulación se produjese también si la reacción tuviera lugar en presencia de cualquier agente oxidante de tipo disulfuro (Chang, 1994a). Sin embargo, dicho reactivo podría dar lugar a la formación de intermediarios de tipo disulfuro mixto con el PCI que podrían interferir en la posterior purificación y análisis.

El escalado del protocolo de preparación de especies scrambled, para mayores cantidades de muestra dependerá de las dos etapas de separación cromatográfica:

a) La eliminación del reductor y del desnaturalizante.

b) Una vez formadas las especies scrambled, la separación de éstas se realizará mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando columnas de fase reversa.

Para aumentar la cantidad de muestra en la primera etapa mencionada, se ensayó la eliminación de los agentes reductores y desnaturalizantes del PCI nativo (GdmCl y DTT), mediante una columna Sep-pak C18 de fase reversa (35 cm³) (III. C. 1. 1. 2. 1) y una columna de gel filtración sobre Sephadex G 25 (III. C. 1. 1. 2. 2).

Como resultado de un primer ensayo, observamos que el desnaturalizante (GdmCl) no es eliminado completamente al utilizar columnas Sep-pak C18 de fase reversa. En consecuencia decidimos ensayar ambas cromatografías en ausencia de desnaturalizante, partiendo de PCI reducido con ditioneitol (DTT) a tiempos largos. Por resultados previos observados en nuestro grupo (Canals, F. resultados no publicados) sabíamos que el PCI totalmente reducido está presumiblemente desestructurado en ausencia de agentes desnaturalizantes.

Los rendimientos obtenidos en estos dos experimentos son muy bajos en ambos casos. De 9.5 mg y 15 mg de PCI nativo reducido cargados en una Sep-pak C18 y en una columna de Gel- filtración (G- 25) respectivamente, obtuvimos 1.5 mg y 1.3 mg de proteína después del proceso.

Con respecto a la segunda etapa de separación citada, se intentó la purificación de las especies scrambled en una columna C4 semipreparativa de fase reversa (III. C. 2. 1) por cromatografía (HPLC) de fase reversa. Como resultado de este ensayo observamos que de 5 mg de muestra iniciales inyectados solo se recogían de la columna unos 500 µg de las fracciones de intermediarios de plegamiento.

Las elevadas pérdidas de proteína tanto en la fase reversa como a la resina G- 25 de gel filtración se atribuyen tanto a la mayor absorción inespecífica como a la mucho menor solubilidad de las formas

reducida o scrambled del PCI con respecto a la forma nativa, que daría lugar a pérdidas por agregación en la cabeza de la columna.

Debido a ello se decidió desistir de la preparación a escala de varios miligramos a partir del PCI purificado de la fermentación y se llevó a cabo la purificación mediante sucesivas preparaciones a escala de 2.5 mg.

Para la obtención de cantidades equivalentes de cada una de las especies scrambled se prepararon los intermediarios de plegamiento en presencia de desnaturante (III. C. 1. 1. 1. 2.).

Cuando se trata el PCI nativo en un tampón que contiene desnaturante (GdmCl) y un reactivo con radicales tiol libres - Mercaptoetanol (- ME), éste se equilibra con sus formas scrambled (véase apartado IV. C. 2. 1.). La perturbación de este equilibrio debida a la presencia del desnaturante hace variar la proporción de intermediarios obtenidos en la muestra, observándose una disminución de la composición de ciertas fracciones y un aumento de otras. En estas condiciones, podemos obtener una concentración mayor de la especie scrambled Xe que en ausencia de desnaturante era una fracción minoritaria.

Una vez colectada cada una de las especies scrambled nos aseguramos de la pureza de la muestra colectada (III. D. 1.) y calculamos la cantidad obtenida total (III. C. 2. 5.). Para ello reinyectamos una pequeña cantidad de cada una de las muestras en la columna de HPLC de fase reversa, junto con una cantidad conocida de PCI (patrón).

Exponemos en la figura IV. A. 2. 1. y la tabla IV. A. 2. 1. los resultados de la preparación de una muestra de scrambled a partir de 10 mg de PCI inicial en ausencia y presencia de desnaturante en el tampón de reacción.

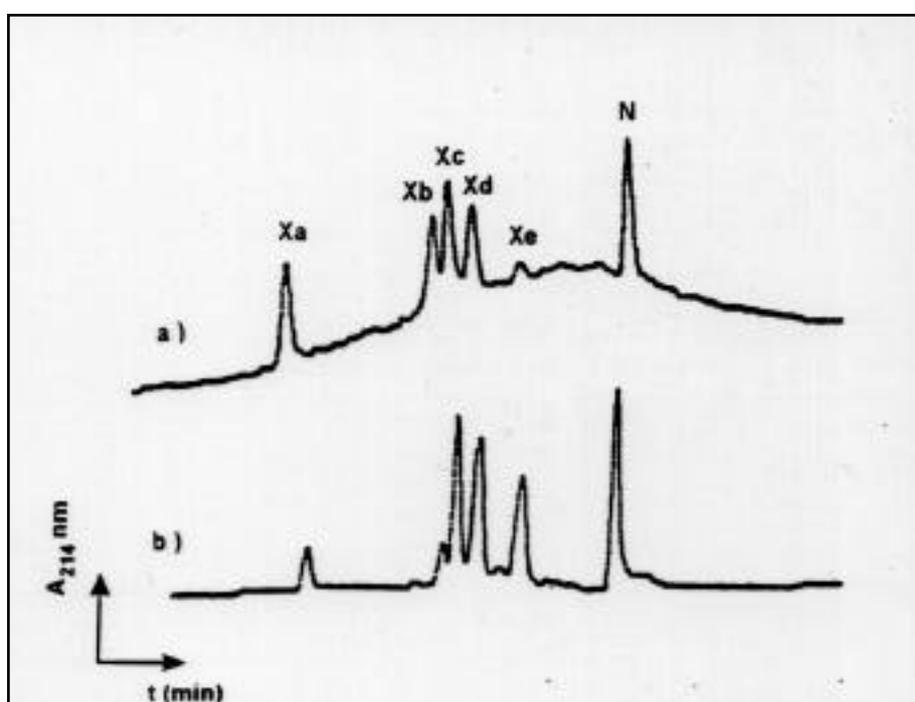


Figura IV. A. 2. 1. Cromatogramas obtenidos de la inyección de 500 μ g de especies scrambled preparados en ausencia (a) y en presencia de desnaturante (b).

Tabla IV. A. 2. 1. Cantidad obtenida de cada una de las especies scrambled preparadas a partir de 10 mg de PCI.

| Fracciones HPLC | Nomenclatura | Sin desnaturalizante (µg) | % | Con desnaturalizante (µg) | % |
|----------------------------|--------------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| 1 | Xa | 483 | 13.82% | 109 | 4.36% |
| 2 | Xb | 471 | 13.48% | 95.6 | 3.82% |
| 3 | Xc | 378 | 10.82% | 430 | 17.2% |
| 4 | Xd | 435 | 12.45% | 465 | 18.6% |
| 5 | Xe | 100 | 2.88% | 325 | 13% |
| 6 | N | 1626 | 46.55% | 1082 | 43.28% |
| Total por scrambled | | 1.87 mg | | 2.5 mg | |
| Total | | 3.5 mg | | 2.5 mg | |
| Recuperación global | | 35% | | 25% | |

La diferencia en los rendimientos de estos dos procesos es debido a la diferente metodología utilizada para la obtención de las especies scrambled, independientemente de la presencia o ausencia de desnaturalizante en el tampón de reacción. En el primer proceso partimos de PCI reducido con DTT, desalado en minicolumnas Sep-pak C18 (1 cm³) en fracciones de 1.5 mg (III. C. 1. 1. 1. 2.) y la separación de las fracciones se ha realizado en una columna Nova-pak C18 analítica separando 0.5 mg en cada cromatografía (III. C. 2. 2.). En el segundo proceso partimos de PCI nativo, que dejamos equilibrar con las formas scrambled en presencia de - Mercaptoetanol y GdmCl desalado con minicolumnas de gel- filtración (PD-10) en fracciones de 2 mg (III. C. 1. 1. 1. 1.), y la separación se ha realizado en una columna Vydac C18 analítica separando cada vez 0.5 mg (III. C. 2. 3.).

IV. A. 3. OBTENCIÓN A PARTIR DE CULTIVOS DE *E. COLI* QUE EXPRESAN PCI.

Al analizar por cromatografía (HPLC) de fase reversa el sobrenadante del crudo de fermentación del PCI se encontró que existía una parte de proteína atrapada en forma de sus intermediarios de plegamiento (figura IV. A. 3. 1.), formas scrambled. La proporción entre las especies scrambled y la nativa es variable según cada cultivo particular, oscilando entre un 30% y un 50% de proteína atrapada en formas scrambled. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de purificar y obtener las especies scrambled a partir del sobrenadante de la fermentación. La purificación se llevó a cabo de forma similar a la purificación de la especie nativa (III. C. 1. 2. 1), teniendo presente y controlando en todo momento donde se encontraban cada uno de los intermediarios en las diferentes etapas de la purificación. Para ello se analizaron por cromatografía (HPLC) de fase reversa alícuotas de cada una de las etapas.

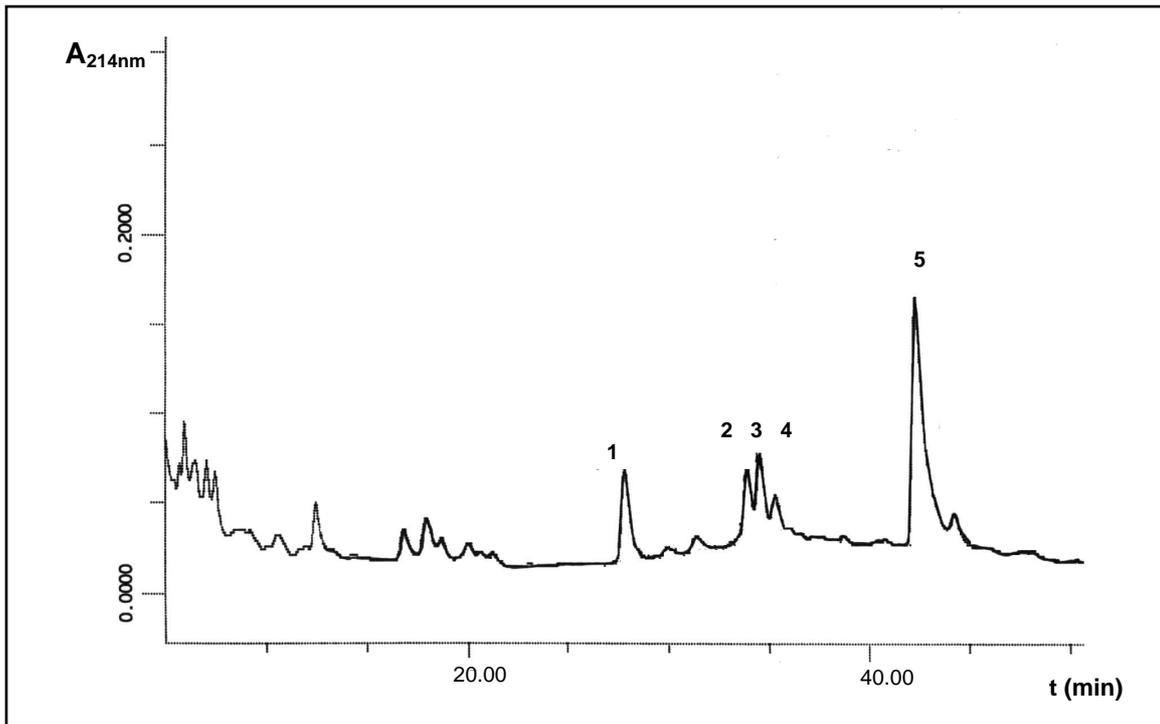


Figura IV. A. 3. 1. Cromatograma obtenido del análisis por HPLC de una alícuota (100 μ L) del sobrenadante del crudo de fermentación de la producción de PCI recombinante.

Comparando el cromatograma obtenido de una alícuota del sobrenadante del crudo de fermentación de la producción de PCI recombinante (figura IV. A. 3. 1.) con un cromatograma patrón de especies scrambled se observa que los picos 1, 2, 3, y 4 corresponden a los intermediarios de PCI: Xa, Xb, Xc, y Xd; y la fracción 5 corresponde a la especie nativa (PCI).

Se observa también en el cromatograma la presencia de picos adicionales correspondientes a otras proteínas u otros componentes no proteicos presentes en el medio de cultivo

La identificación de las especies scrambled se corroboró por análisis de las correspondientes fracciones colectadas por espectrometría de masas MALDI- TOF (III. D. 3. 2. 1).

Durante la purificación de las especies scrambled se analizaron por cromatografía (HPLC) de fase reversa las diferentes fracciones obtenidas en cada paso. Se comprobó que los intermediarios de plegamiento quedaban gran parte retenidos en la membrana del ultrafiltrador tangencial durante la concentración del medio extracelular (III. B. 4. 3.) y que prácticamente no quedaban retenidos por los filtros de baja retención de proteínas (III. B. 4. 1.), ni por las minicolumnas Sep-pak C18 (III. B. 4. 4. 1.). Consecuentemente durante la purificación de las especies scrambled a partir del crudo de fermentación se pasó de la obtención del medio extracelular a la cromatografía de fase reversa a presión atmosférica utilizando una columna Sep- pak C18 de 35 cc por cada medio litro de medio y evitando así la concentración por ultrafiltración tangencial. Posteriormente se llevo a cabo la cromatografía (FPLC) de intercambio iónico (III. B. 4. 4. 2.).

A continuación mostramos un cromatograma obtenido de la purificación de las especies scrambled por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico (figura IV. A. 3. 2.).

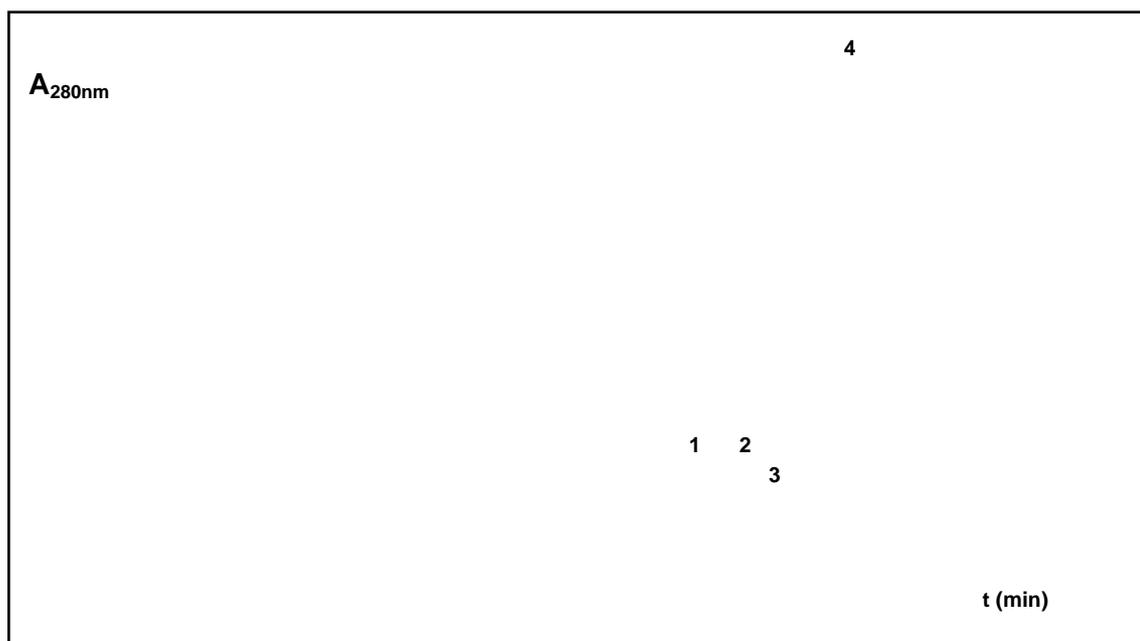


Figura IV. A. 3. 2. Cromatograma obtenido de la purificación de las especies scrambled por FPLC de intercambio iónico.

Se obtuvieron y se analizaron posteriormente por HPLC de fase reversa las fracciones 1, 2, 3 y 4. Se observó que las fracciones 1 y 2 correspondían a las especies scrambled Xb y Xa respectivamente, la fracción 3 correspondía a las especies scrambled Xc y Xd y la fracción 4 correspondía a la proteína nativa. Seguidamente tales fracciones de intermediarios se purificaron por HPLC de fase reversa en una columna C4 semipreparativa (III. C. 2. 1.).

En la tabla IV. A. 3. 1. mostramos la correspondencia entre las fracciones observadas por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico, analizadas posteriormente por cromatografía (HPLC) de fase reversa y las especies scrambled. También comparamos mg totales obtenidos después de la purificación por cromatografía (HPLC) de fase reversa de cada uno de los intermediarios según partimos de 2.5 mg de PCI puro (1) (IV. A. 2) o del sobrenadante del crudo de una fermentación (2).

Tabla. IV. A. 3. 1. Correspondencia entre las fracciones de FPLC observadas (figura IV. A. 3. 2.) y las especies scrambled. Cantidades purificadas por cromatografía de fase reversa (HPLC) de cada una de las especies scrambled según partimos de 2.5 mg de PCI puro (1) o del sobrenadante del crudo de una fermentación (2).

| Nº pico FPLC | Especie scrambled | µg obtenidos (1) | mg obtenidos (2) |
|--------------|-------------------|------------------|------------------|
| 1 | Xb | 48.3 | 6.09 |
| 2 | Xa | 47.1 | 5.65 |
| 3 | Xc y Xd | 37.8 y 43.5 | 2.33 |
| Total | | 176.7 µg | 14.07 mg |

Si comparamos las cantidades obtenidas en la purificación de las especies scrambled a partir del PCI purificado con las obtenidas en la purificación a partir del sobrenadante del crudo de fermentación, observamos que para obtener cantidades similares a las obtenidas a partir de la fermentación deberíamos realizar la obtención y purificación de especies scrambled a partir de 2.5 mg de PCI puro unas 80 veces aproximadamente. Esto implicaría además el gasto de unos 200 mg de PCI puro, mientras que partiendo de una fermentación obtendríamos las especies scrambled y unos 90 mg aproximadamente de PCI purificado (tabla IV. A. 1. 1).

Si es verdad que existe entre un 30- 50% de proteína atrapada en forma de especies scrambled, esperaríamos obtener cantidades del orden de 30- 45 mg de especies scrambled. Como se observa en el cromatograma de FPLC de intercambio aniónico (figura IV. A. 3. 2.), las especies scrambled se eluyen en una proporción muy inferior a la especie nativa. Estas pérdidas de proteína en la columna de intercambio aniónico se atribuyen, igual que en el apartado anterior (IV. A. 2.), a la mayor absorción inespecífica y a la menor solubilidad de estas especies respecto la forma nativa.

De todas formas la purificación de los intermediarios de plegamiento del PCI a partir del crudo de fermentación permite obtener cantidades de Xa, Xb, Xc y Xd suficientes para realizar su caracterización y los estudios cinéticos.

IV. B. CARACTERIZACIÓN DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI PURIFICADOS.

IV. B. 1. ANÁLISIS DE LA PUREZA DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES SCRAMBLED.

Para poder determinar si una fracción cromatográfica denominada como especie scrambled contiene una o más especies puras se realizaron análisis utilizando diferentes técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas. Así se intentó separar las seis fracciones inicialmente colectadas por cromatografía (HPLC) de fase reversa utilizando la misma técnica pero con columnas y gradientes diferentes a los usados para el fraccionamiento preparativo. También se intentó obtener una mejor resolución por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico y finalmente por Electroforesis Capilar (EC).

- **Cromatografía (HPLC) de fase reversa.**

Se han ensayado, para encontrar posibles formas coeluyentes en las fracciones aisladas de los intermediarios de plegamiento del PCI, las columnas y los gradientes de separación por cromatografía (HPLC) de fase reversa que se muestran en las tablas IV. B. 1. 1. y IV. B. 1. 2.

Tabla IV. B. 1. 1. Gradientes y columnas ensayadas para encontrar formas coeluyentes de los intermediarios de plegamiento del PCI.

| Nº.Gradiente | %B inicial | %B final | t (min) | Columna | Tipo de HPLC |
|--------------|------------|----------|---------|---------|--------------|
| 1 | 20 | 45 | 80 | 1 | A |
| 2 | 20 | 32.5 | 40 | 1 | A |
| 3 | 20 | 32.5 | 45 | 1 | A |
| 4 | 20 | 32.5 | 50 | 1 | A |
| 5 | 22 | 31.5 | 45 | 1 | A |
| 6 | 22 | 32.5 | 45 | 1,2 | A |
| 7 | 24 | 45 | 45 | 3 | B |
| 8 | 20 | 40 | 45 | 4 | A |

Únicamente anotamos en la descripción del gradiente, la pendiente para la separación de la muestra. El tiempo de equilibrado inicial y el tiempo de lavado final de la columna son los mismos en todos los casos (III. C. 2.).

HPLC A: HPLC Beckman modelo *System Gold* 126 (III. B. 4. 4. 3.).

HPLC B: HPLC Waters acoplado a un detector modelo Photodiode Array detector 994

Tabla IV. B. 1. 2. Características de las columnas utilizadas.

| Nº. Columna | Tipo | Dimensiones | ϕ de partícula | ϕ de poro |
|-------------|---------------------|-----------------|---------------------|----------------|
| 1 | Nova-pak C18 | 3.9 mm × 150 mm | 4 μ m | 60 Å |
| 2 | Vydac C4 semiprep. | 10 mm × 250 mm | 10 μ m | 300 Å |
| 3 | Vydac C18 analítica | 4.6 mm × 150 mm | 5 μ m | 300 Å |
| 4 | Zorbax C3 | 4.6 mm × 150 mm | 5 μ m | 300 Å |

En ningún caso la utilización de diferentes columnas cromatográficas de fase reversa y gradientes de separación, ha revelado heterogeneidad de las especies scrambled previamente separadas.

Además, como resultado de estos experimentos hemos encontrado las condiciones óptimas de separación para una más fácil recolección de cada una de las especies scrambled por cromatografía de fase reversa.

Utilizando para el análisis un HPLC Beckman y una columna Nova-pak C18, inicialmente se ensayaron gradientes largos (Gradiente 1, de 80 min de duración) con la finalidad de mejorar la pureza de nuestras fracciones.

Posteriormente, una vez conocidas sus posiciones cromatográficas, se acortó la duración del gradiente y se ensayaron gradientes con menor pendiente, mejorando la separación de los intermediarios. Por ejemplo, se ensayaron gradientes tales como los n^o 2, 3 y 4, donde la única diferencia entre ellos son los 5 y 10 minutos de duración adicionales al n^o 2.

Se ensayaron además, gradientes con mayor % de fase móvil B inicial, mejorando así la elución de las fracciones a tiempos cortos de análisis. Por ejemplo, se ensayaron gradientes como los n^o 5 y 6, donde iniciamos la pendiente de separación con un 22% de tampón B, un 2% más que el inicialmente ensayado.

Algunos de los gradientes anteriores también se ensayaron con la columna Zorbax C3 de fase reversa. Esta columna debido a sus características (III. C. 2. 4.) es interesante por su elevada resolución y reproducibilidad pero en el caso de la separación de especies scrambled no nos reveló ninguna heterogeneidad adicional.

Como resultado llegamos a la conclusión de que el gradiente n^o 6 es un gradiente óptimo encontrado para la separación de especies scrambled utilizando las columnas Nova-pak C18 analítica (III. C. 2. 2.) y Vydac C4 analítica (III. C. 2. 1.) en un HPLC Beckman; de la misma forma que el gradiente n^o 7 ensayado es el óptimo encontrado para la misma separación utilizando la columna Vydac C18 analítica (III. C. 2. 3.) en un HPLC Waters; y el gradiente n^o 8 es un gradiente óptimo encontrado para la separación utilizando la columna C3 Zorbax (III. C. 2. 4.) en un HPLC Beckman.

- **Cromatografía (FPLC) de intercambio iónico.**

Con los intermediarios de plegamiento del PCI obtenidos por HPLC, hemos realizado diferentes análisis de pureza por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico utilizando una columna analítica de intercambio aniónico TSK- DEAE (III. D. 1. 2.). Esta técnica separativa no tiene una mayor resolución

que la cromatografía (HPLC) de fase reversa, pero la elución de las muestras se basa en otros principios de separación y su capacidad de carga es mucho mayor. Por esta razón pensamos que si existieran

algunas especies que coeluyeran en las fracciones obtenidas por cromatografía (HPLC) de fase reversa, podrían ser separadas por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico si estas se diferenciaban entre ellas por su carga superficial.

Inicialmente se realizó un análisis de la separación de una mezcla de intermediarios de plegamiento y se observó que eluían únicamente tres fracciones F1, F2 y F3 (figura IV. B. 1. 1.).

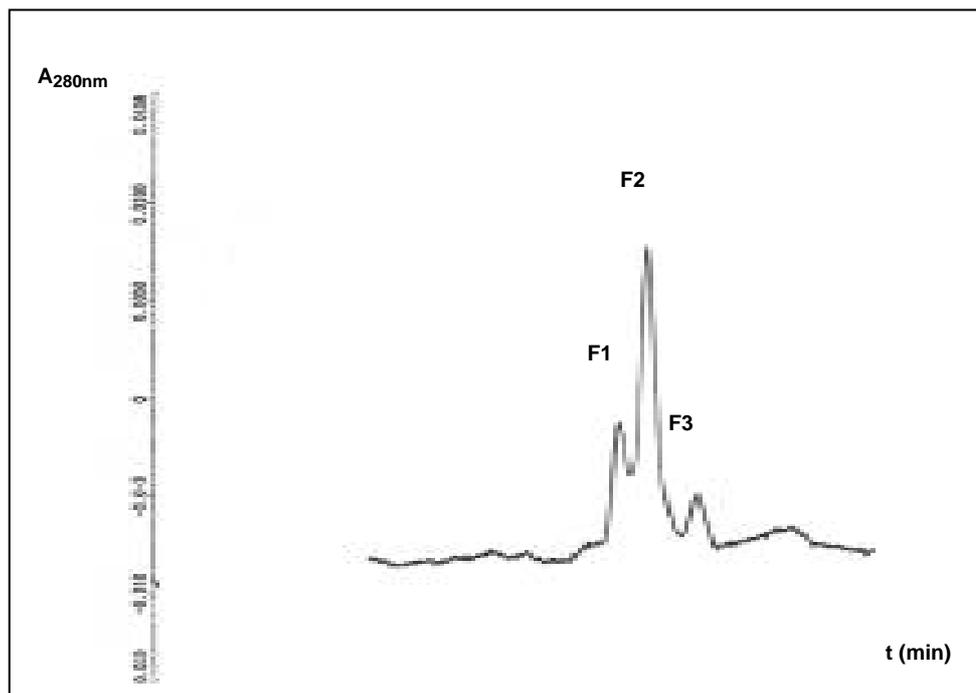


Figura IV. B. 1. 1. Cromatograma de la separación de las especies scrambled por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico.

Cuando inyectamos cada una de las fracciones scrambled identificadas y separadas por cromatografía (HPLC) de fase reversa en el FPLC observamos que cada especie inyectada nos da una única fracción por cromatografía de intercambio iónico. Como consecuencia, por esta técnica no se detecta heterogeneidad en ninguna de las especies scrambled previamente recogidas por HPLC.

Este último análisis nos permite establecer una correspondencia entre las fracciones obtenidas por HPLC y FPLC, correspondencia que se muestra en la tabla IV. B. 1. 3.

Finalmente para corroborar estos resultados, colectamos cada una de las fracciones de scrambled resuelta por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico y posteriormente la analizamos por cromatografía (HPLC) de fase reversa. En este experimento observamos que las especies scrambled que coelúan por cromatografía (FPLC) de intercambio iónico son resueltas por cromatografía (HPLC) de fase reversa.

Tabla IV. B. 1. 3. Correspondencia entre las fracciones obtenidas del HPLC y el FPLC.

| Fracciones FPLC | Fracciones HPLC |
|-----------------|-----------------|
| F1 | Xa y Xb |
| F2 | Xc y Xd |
| F3 | N |

Hay que señalar que la separación cromatográfica por intercambio observada en estos experimentos es diferente a la mostrada con las fracciones obtenidas cuando obtenemos intermediarios de plegamiento a partir del crudo de fermentación (figura. IV. A. 3. 2.). Esta diferencia se explica por las diferentes columnas de intercambio iónico utilizadas en este experimento (columna analítica) y en la purificación (columna semipreparativa); y en consecuencia por los diferentes gradientes cromatográficos utilizados. En este experimento partimos de un 0% de fase móvil B y llegamos hasta un 30% en 70 minutos y para la purificación del crudo de fermentación llegamos hasta un 20% de fase móvil B en el mismo tiempo.

En ninguno de los dos casos la cromatografía de intercambio iónico indica heterogeneidad de las fracciones de scrambled aisladas por HPLC de fase reversa.

- **Electroforesis capilar (EC).**

Con los mismos objetivos que antes, hemos realizado experimentos similares de separación y análisis de pureza utilizando la electroforesis capilar. Para este ensayo se ha utilizado un capilar de sílica fundida sin recubrir de 50 cm de longitud y 75 μm de diámetro interno. Se ha equilibrado con una disolución de Tricina/ Borato a pH 8.5 y la separación ha tenido lugar en 20 minutos (III. D. 1. 3).

Inicialmente analizamos una muestra que contiene la mezcla de especies scrambled en la electroforesis capilar. Esta se resuelve en cuatro fracciones en el electroferograma (figura IV. B. 1. 2.). Por esta técnica tampoco obtenemos mayor resolución de las especies scrambled, ya que obtenemos cinco fracciones resueltas de las seis fracciones identificadas por cromatografía (HPLC) de fase reversa.

Posteriormente, cada una de las especies scrambled colectada y separada por fase reversa la inyectamos en la electroforesis capilar. En este ensayo obtenemos información sobre la correspondencia entre fracciones, información resumida en la tabla IV. B. 1. 4.

Tabla IV. B. 1. 4. Correspondencia entre las fracciones colectadas en el HPLC e inyectadas en la EC.

| Fracción EC | Fracción HPLC |
|-------------|---------------|
| E1 | Xa |
| E2 | Xb y Xd |
| E3 | Xc y Xd |
| E4 | Xe |
| E5 | N |

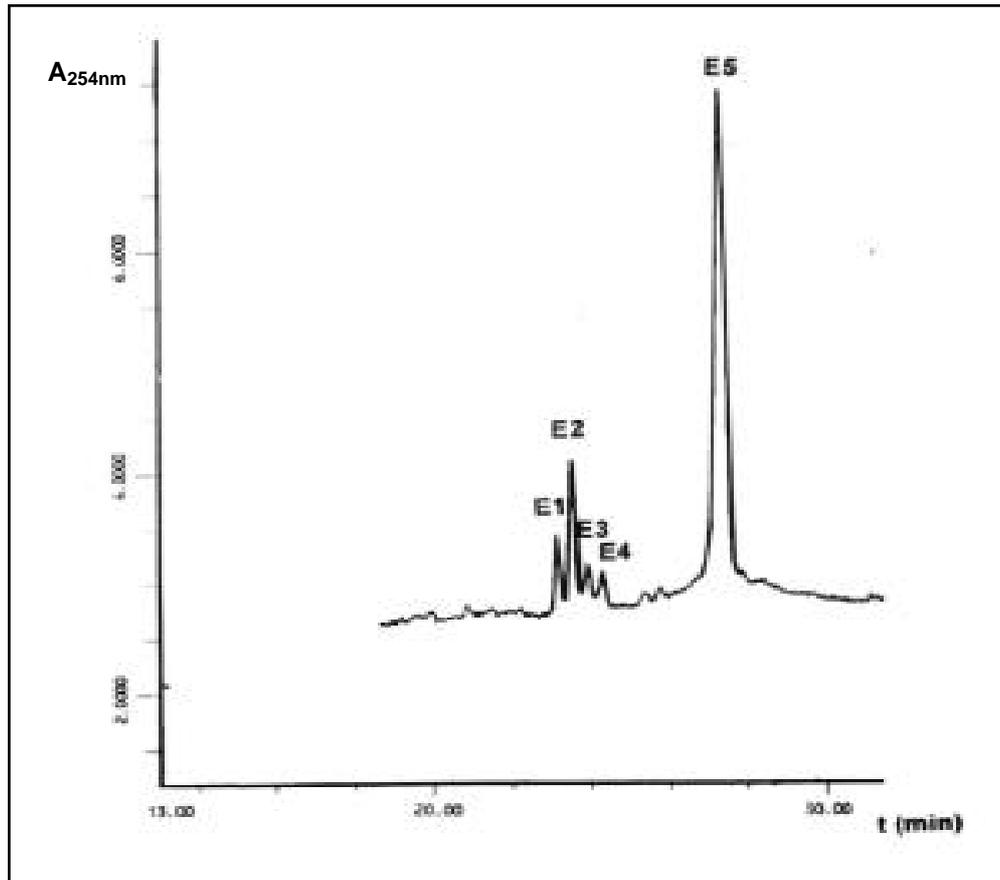


Figura IV. B. 1. 2. Electroferograma de la mezcla de especies scrambled.

Cada una de las fracciones scrambled separadas por cromatografía de fase reversa nos dan una única fracción en la electroforesis capilar, con excepción de Xd. Se podría decir que por esta técnica separativa no existe coelución de dos o más especies scrambled en las fracciones Xa, Xb, Xc, y Xe colectadas previamente por HPLC. La fracción Xd aparece en el electroferograma como dos picos perfectamente separados y con tiempos de retención similares a las fracciones E2 y E3 identificadas en la electroforesis capilar respectivamente. Puesto que la fracción Xd analizada era pura se descarta que alguno de estos picos pueda ser debido a contaminación de Xb o Xc. Por lo tanto el análisis por EC permite concluir que la fracción Xd está formada por al menos dos especies scrambled distintas.

De hecho, esta es la única técnica separativa alternativa que ha mostrado, para dicha fracción, una mayor capacidad separativa que la cromatografía (HPLC) de fase reversa.

IV. B. 2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE INHIBICIÓN DE LA CARBOXIPEPTIDASA DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.

IV. B. 2. 1. ENSAYOS PRELIMINARES

Con el fin de determinar el método más adecuado para la medida de las constantes de inhibición de los intermediarios de plegamiento del PCI se realizaron unos ensayos preliminares para determinar el orden de magnitud de las constantes de inhibición (K_i).

Dicha estimación se realizó mediante la determinación de la actividad inhibidora de CPA de distintas diluciones de las preparaciones de distintas formas de PCI purificadas hasta hallar una que diese un porcentaje apreciable de inhibición (entre el 30 y 60%), tal y como se describe en el apartado de material y métodos III. D. 2. 1.

El resultado de las estimaciones fue que la K_i de los intermediarios de plegamiento de PCI está por encima de 10 nM a diferencia de la K_i de la forma nativa (1.8 nM) (Molina *et al.*, 1992) y por ello, método de Lineweaver- Burk (Palmer, 1985) puede resultar adecuado para la determinación de las K_i . Sin embargo, dado el orden de magnitud estimado para los valores de K_i de los intermediarios (μM), la determinación por este método requeriría cantidades grandes de los intermediarios. Debido a las dificultades de obtención de éstos, únicamente se determinó por este método la K_i de intermediario Xb (IV. B. 2. 3.) con el fin de corroborar que éste se comportaba como un inhibidor competitivo. Para los restantes intermediarios, se asume que la inhibición es asimismo competitiva, y la K_i se estima a partir de la IC_{50} (concentración que resulta en la inhibición del 50% de la actividad enzimática) (IV. B. 2. 4.).

Para calcular los valores de las constantes de inhibición se ha de tener también en cuenta si la unión CPA-Inhibidor es instantánea o no. Si no es instantánea, debería aumentar la actividad inhibidora cuando preincubamos el enzima y el inhibidor durante tiempos relativamente cortos, entonces decimos que la unión enzima- inhibidor es del tipo unión lenta ("slow- binding").

Para comprobarlo se realizaron estudios de la actividad inhibidora de uno de los intermediarios de plegamiento (Xd) sometiendo la mezcla CPA-Xd a diferentes tiempos de preincubación (1. 5, 15 y 30 minutos) antes de realizar las determinaciones de la actividad (III. D. 2. 2.).

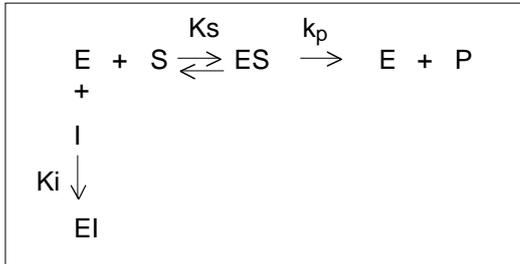
El resultado fue que la actividad inhibidora no aumentaba respecto a la obtenida en ausencia de preincubación para dichos tiempos de preincubación. Por lo tanto la unión CPA- Inhibidor se puede deducir que es instantánea y no una inhibición tipo unión lenta ("slow- binding").

IV. B. 2. 2. DETERMINACIÓN DE LA K_i DEL INTERMEDIARIO Xb POR EL MÉTODO DE LINEWEAVER- BURK.

Con el fin de determinar si el tipo de inhibición de los intermediarios de plegamiento es una inhibición competitiva como el caso de PCI nativo, se ensayó la actividad inhibidora de uno de los intermediarios de plegamiento (Xb) frente distintas concentraciones de sustrato (Hipuril-L-fenilalanina) (III. D. 2. 3.)

Un inhibidor competitivo es una sustancia capaz de unirse a un enzima de forma que impide que se una el sustrato a éste. Es decir que el inhibidor y el sustrato son mutuamente incompatibles, debido la mayoría de veces a que están en competencia por el mismo sitio de unión al enzima.

A continuación mostramos el equilibrio que describe una inhibición competitiva.



E: enzima

I: inhibidor

S: sustrato

P: producto

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{constante de inhibición}$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{constante de formación de ES}$$

$$k_p \quad \text{constante de rotura de ES en E+ P.}$$

Sabemos que la velocidad en ausencia de inhibidor es proporcional en el estado estacionario a la concentración del complejo ES:

$$v = k_p [ES]$$

Y podemos encontrar una expresión que nos relacione v , V_{\max} , S , K_M , I y K_i :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

donde

$$K_{Mapp} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

V_{\max} velocidad inicial máxima en ausencia de I.

K_M concentración de S requerida para obtener 1 / 2 de la V_{\max}

Si representamos las inversas de las velocidades iniciales ($1/v_i$) (v_i , velocidad en presencia de inhibidor) frente a las inversas de la concentración de sustrato ($1/[S]$) para distintas concentraciones de inhibidor. Se puede observar como las pendientes de las rectas se incrementan con la concentración de inhibidor y cortan en un punto diferente al eje de las X, como es de esperar para inhibidores competitivos (figura IV. B. 2. 2. 1.).

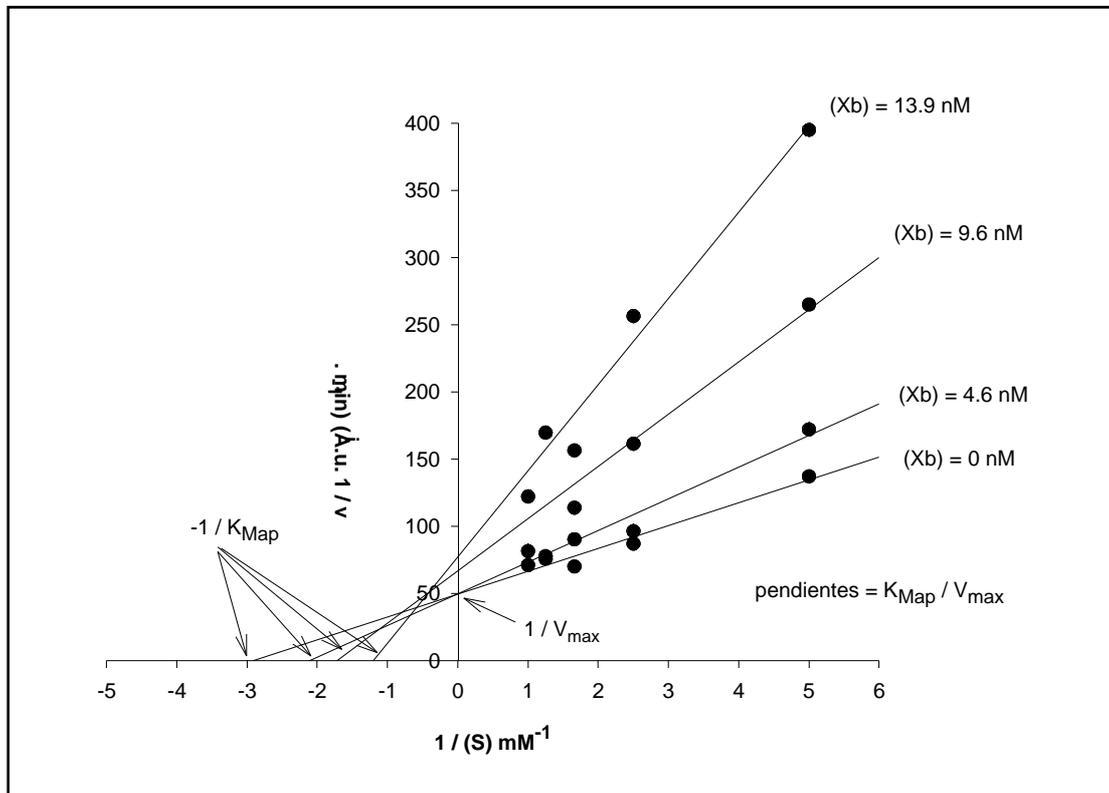


Figura IV. B. 2. 2. 1. Representación de las inversas de las velocidades iniciales ($1/v_i$) frente a las inversas de la concentración de sustrato ($1/[S]$) para distintas concentraciones de inhibidor.

De la misma forma, observamos que las rectas no se cruzan en el eje de las Y, como esperaríamos teóricamente en un inhibidor competitivo, lo que puede ser debido al grado de error experimental.

De la representación gráfica podemos obtener el valor de las K_{Map} como las inversas del punto de intersección de las rectas con el eje de las X ($-1/K_M$) y el valor de V_{max} , como la inversa del punto de intersección de las rectas con el eje de las Y ($1/V_{max}$). Estos resultados se muestran en la tabla IV. B. 2. 2. 1.

Tabla IV. B. 2. 2. 1. Valores obtenidos del cálculo de las K_{Map} y V_{max} para cada concentración de Xb ensayada.

| Concentración de Xb (nM) | K_{Map} (mM) |
|--------------------------|-------------------|
| 0 | 0.64 |
| 4.6 | 2.11 |
| 9.6 | 1.20 |
| 13.9 | 1.71 |
| V_{max} | 0.02 (A. u./ min) |

Finalmente para obtener el valor de la K_i de Xb se representan las pendientes de dichas rectas frente a la concentración de inhibidor, el punto de intersección de dicha recta con el eje X nos da la K_i y el punto de intersección con el eje de las Y nos da el valor de K_M (figura IV. B. 2. 2.).

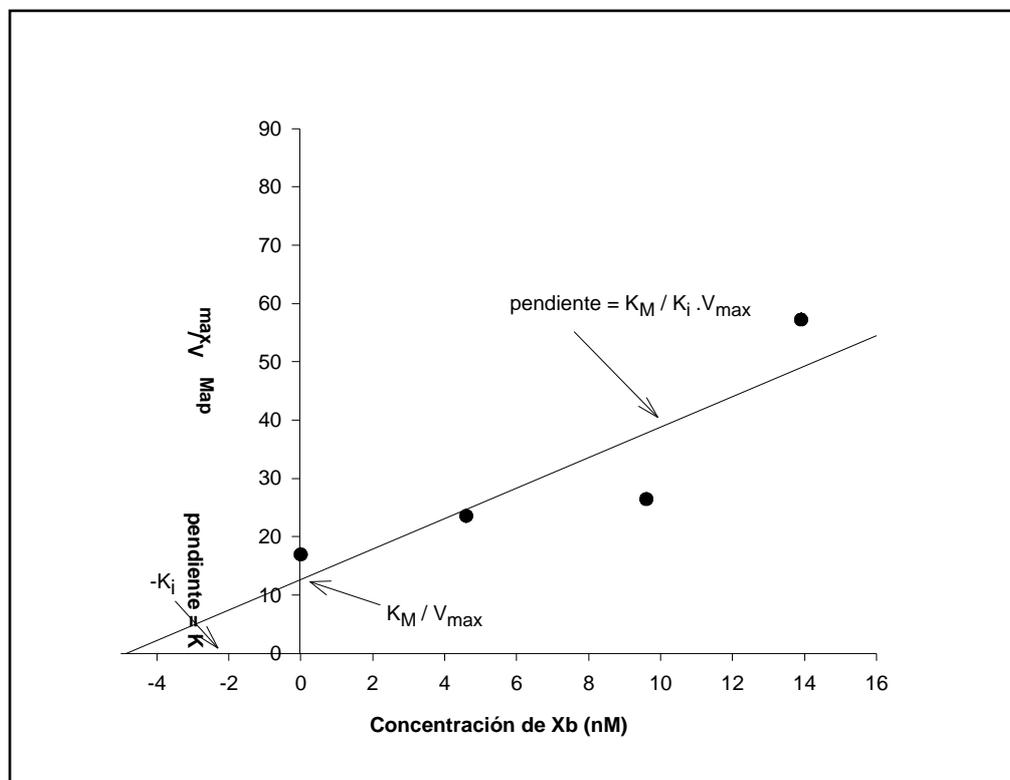


Figura IV. B. 2. 2. Representación de las pendientes de las gráficas de Lineweaver- Burk frente a la concentración de inhibidor (Xb).

La constante de inhibición de Xb obtenido por este método nos da un valor de $4.86 \mu\text{M}$ y la K_M nos da un valor de 634.65 mM .

IV. B. 2. 3. DETERMINACIÓN DE LAS K_i DE LOS INTERMEDIARIOS A PARTIR DEL MÉTODO IC_{50} .

Como se ha señalado antes, al no disponer de cantidad suficiente de todos los intermediarios para determinar las K_i por Lineweaver- Burk, se estimaron las K_i a partir de las IC_{50} , incluyendo también el intermediario Xb para poder comparar los resultados obtenidos por ambos métodos.

La IC_{50} se determinó a partir de medidas de inhibición de la actividad de la CPA llevadas a cabo a una misma concentración de sustrato ($S = 1\text{mM}$) y a varias concentraciones de cada intermediario.

Asumiendo que la inhibición es competitiva la IC_{50} puede relacionarse con la K_i según la ecuación:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_M}}$$

donde S es la concentración de sustrato (en este caso es 1 mM) y K_M corresponde a la unión del sustrato utilizado al enzima en las condiciones del ensayo. El valor descrito para K_M en estas condiciones es de 1mM (Ako, 1976).

En la figura IV. B. 2. 3. 1. se muestran los valores de las pendientes obtenidas en los ensayos de actividad de CPA (pendientes de los incrementos lineales de absorbancia) en presencia de las diferentes especies scrambled frente a la concentración de éstas. Del ajuste lineal de estas gráficas se determinó la IC_{50} para cada especie. Los valores obtenidos, así como las K_i calculadas a partir de estos se muestran en la tabla IV. B. 2. 3. 1.

Tabla IV. B. 2. 3. 1. Valores obtenidos de las IC_{50} y las K_i de cada uno de los intermediarios de plegamiento del PCI.

| Intermediario | IC_{50} (μM) | K_i (μM) |
|---------------|-----------------------------|-------------------------|
| Xa | 14.1 | 7.05 |
| Xb | 9.7 | 4.85 |
| Xc | 20.4 | 10.02 |
| Xd | 5.3 | 2.65 |

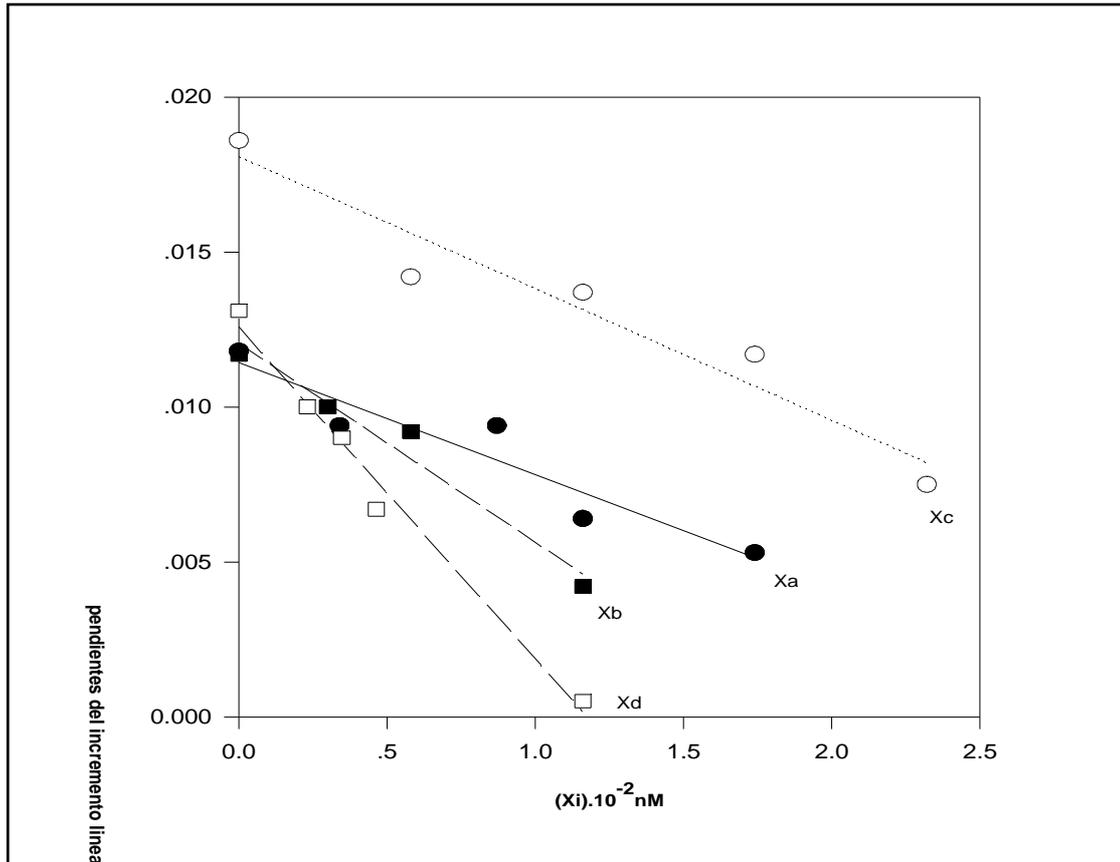


Figura IV.B. 2. 3. 1. Representación de las pendientes del incremento lineal en absorbancia de las muestras versus las concentraciones de éstas.

Como se observa las K_i de los intermediarios son del orden de 1000 veces mayores que la de PCI nativo, que es del orden de nM. Recordemos que cuanto mayor es la K_i de un inhibidor menor es la afinidad que presenta por su enzima y por lo tanto peor inhibidor resulta.

Por tanto los intermediarios de plegamiento del PCI presentan un descenso de su capacidad inhibidora que es más acusado para Xc, seguido de Xa y Xb, y por último de Xd.

IV. B. 3. DETERMINACIÓN DE LAS CISTEINAS IMPLICADAS EN LOS PUENTES DISULFURO DE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI.

Como primera forma de caracterizar estructuralmente las especies scrambled del PCI, nos propusimos la determinación de los apareamientos de las cisteínas implicadas en cada una de ellas.

El conocimiento de la estructura de las diferentes formas scrambled nos puede dar información importante sobre la implicación de los diferentes puentes disulfuro en el mecanismo de plegamiento del PCI.

IV. B. 3. 1. INTRODUCCIÓN. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL APAREAMIENTO DE PUENTES DISULFURO EN PROTEÍNAS.

Aunque existen buenos métodos para cuantificar el número de puentes disulfuro de una proteína, aún queda ambigua y de difícil aplicación en algunos casos la determinación de la localización o del apareamiento de los puentes disulfuro.

Según la metodología actual (Smith & Zhou, 1990; Hirayama & Akashi, 1994) para la determinación de los puentes disulfuro de una proteína es necesario la rotura de la cadena proteica entre residuos de cisteína, obteniendo así péptidos que sólo contienen un puente disulfuro. Una vez separada la mezcla de péptidos obtenida se determina la secuencia de aminoácidos por el método de degradación de Edman (Edman, 1950, 1956) o el peso molecular de los péptidos por espectrometría de masas. Finalmente se determinan los apareamientos de puentes disulfuro relacionando los péptidos identificados con segmentos específicos de la proteína. Esta metodología presenta problemas debido a que implica varias digestiones enzimáticas o fragmentaciones químicas que raramente dan lugar a los fragmentos deseados debido a que la rotura específica es difícil de conseguir (Smith & Zhou, 1990). Además las condiciones más frecuentemente utilizadas para obtener digestiones enzimáticas específicas favorecen la reducción y posterior oxidación de los puentes disulfuro (reacción de reordenación de puentes disulfuro, "reshuffling") (Ryle & Sanger, 1955). Finalmente si una proteína presenta un par de cisteínas adyacentes o próximas en su estructura primaria es imposible conseguir péptidos con un único puente disulfuro (Hirayama & Akashi, 1994).

Se han descrito otras metodologías que no implican una fragmentación específica de la proteína, como la hidrólisis ácida parcial (Zhou & Smith, 1990) para eliminar el problema de reorganización entre puentes disulfuro. Bauer *et al.* (1993) combina la hidrólisis ácida con ácido oxálico y la identificación de los péptidos que contienen puentes disulfuro por espectrometría de masas de "Ion- Spray".

Gray (1993 a y b) describe una metodología que permite determinar los puentes disulfuro de péptidos con cisteínas muy próximas o adyacentes. Para ello tales péptidos son parcialmente reducidos y los tioles formados inmediatamente alquilados, consecuentemente las posiciones de los radicales formados son reconocidos después del análisis de la secuencia.

Wu & Watson (1997) describen una nueva metodología que permite la caracterización de los puentes disulfuro de cualquier proteína de secuencia conocida mediante una fragmentación química específica.

En esta metodología la proteína desnaturalizada es sometida a una reducción parcial dando lugar a una mezcla de isómeros parcialmente reducidos. Los grupos sulfidrilos que se han formado son cianilados y tales isómeros son separados por cromatografía (HPLC) de fase reversa. En condiciones alcalinas, se produce una fragmentación del enlace peptídico por el N- terminal de las cisteínas cianiladas y posteriormente se reducen totalmente el resto de puentes disulfuro de los isómeros obtenidos. Un análisis por espectrometría de masas MALDI- TOF de los fragmentos obtenidos permite localizar el puente disulfuro que ha sido inicialmente reducido, cianilado y fragmentado. Esta metodología es muy interesante porque minimiza la posibilidad de reorganización de puentes disulfuro de la proteína (proceso de “reshuffling”) y además es aplicable tanto a proteínas con puentes disulfuro adyacentes o no.

En el presente trabajo para la determinación de los puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento del PCI se han utilizado dos de las metodologías descritas: la descrita por Smith & Zhou, (1990) y Hirayama & Akashi (1994), proteólisis específica por digestión con proteasas (IV. B. 3. 2.) y la descrita por Wu & Watson (1997), reducción química parcial de un puente disulfuro (IV. B. 3. 3.).

IV. B. 3. 2. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO POR DIGESTIÓN CON PROTEASAS.

Este tipo de aproximación fue la primera que se ensayó en el análisis del PCI y de sus formas scrambled (III. D. 3. 1.).

Para facilitar explicación del proceso seguido, mostramos a continuación (figura IV. B. 3. 2. 1.) la secuencia de aminoácidos y las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro del PCI.

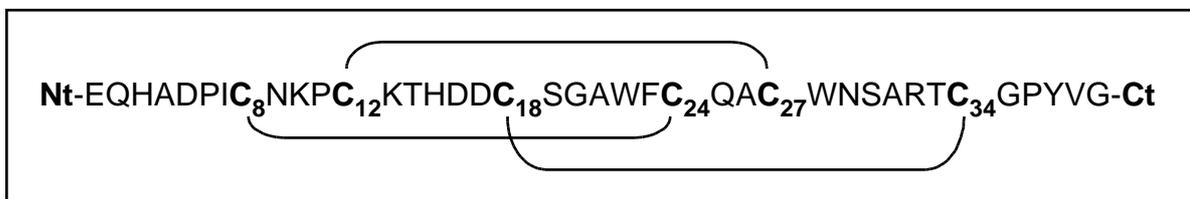
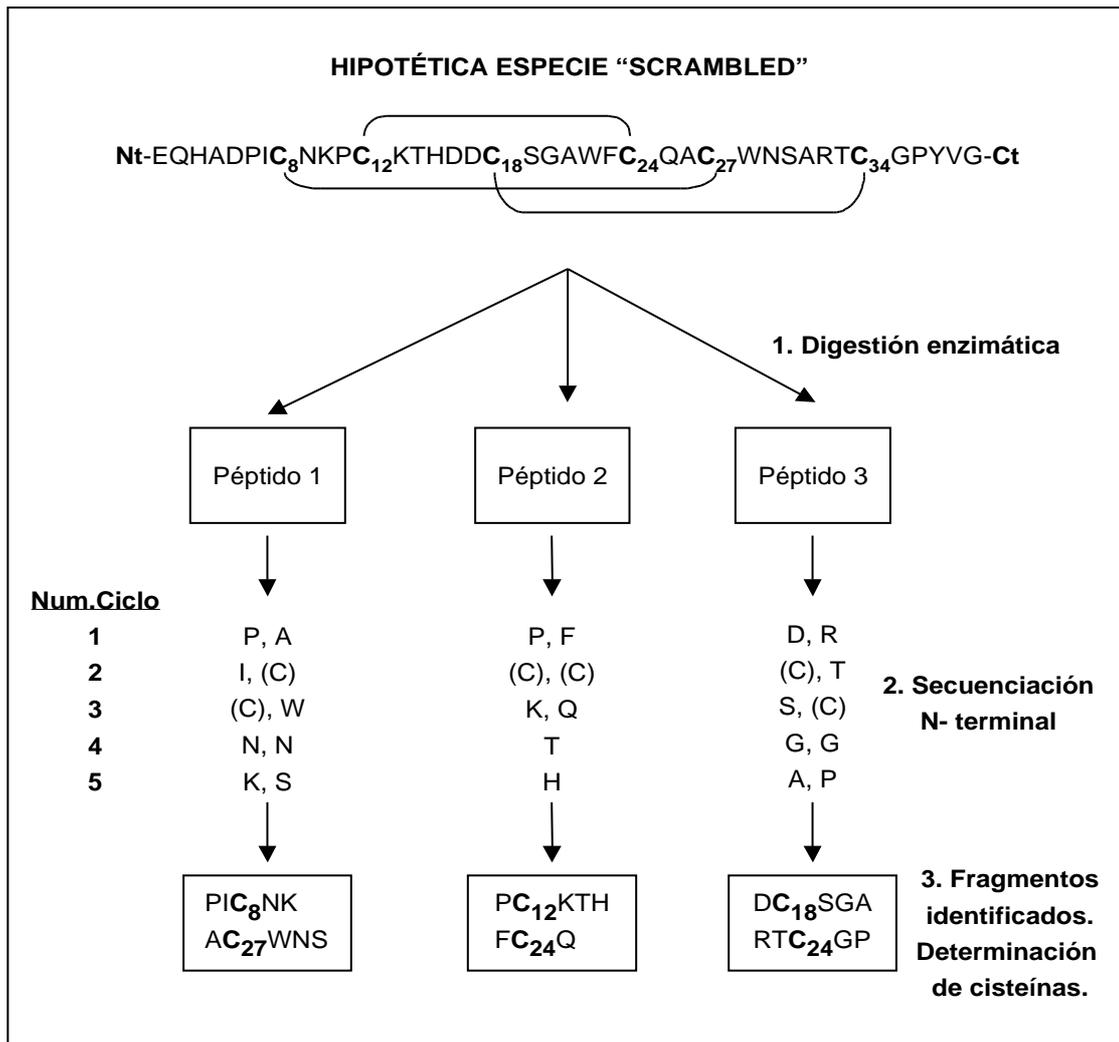


Figura IV. B. 3. 2. 1. Secuencia de aminoácidos del PCI.

Una vez obtenidos, aislados y separados cada uno de los intermediarios de plegamiento del PCI, procedemos a su determinación de los puentes disulfuro por digestión con proteasas. Queremos determinar cuáles son las seis cisteínas implicadas en los tres puentes disulfuro en cada una de las especies scrambled. La estrategia seguida para ello se muestra en el esquema IV. B. 3. 2. 1.

En primer lugar se fraccionan cada uno de los intermediarios mediante digestión proteolítica en diferentes péptidos. Idealmente estos péptidos de digestión, deben contener cada uno un solo puente disulfuro para poder extraer información sobre la unión entre cada una de las cisteínas de la molécula (todos estos análisis se realizaron en ausencia de reductores, para asegurar que los puentes disulfuro permanecen formados).



Esquema IV. B. 3. 2. 1. Esquema de la metodología seguida para la determinación de los puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento del PCI por digestión con proteasas.

Una vez obtenidos y aislados los péptidos resultantes de la digestión de cada intermediario mediante métodos separativos, se puede encontrar que cisteínas están implicadas en cada puente disulfuro a través de secuenciación automática por el método de degradación de Edman o análisis de aminoácidos de dichos péptidos y espectrometría de masas MALDI-TOF.

El análisis por secuenciación automática de un péptido que contenga un puente disulfuro da una secuencia doble de aminoácidos. Se obtiene la secuencia simultánea de los dos aminoácidos N-terminales de cada uno de los fragmentos unidos por el puente disulfuro en el péptido. Hemos de anotar que al analizar la secuencia del péptido por degradación de Edman no se obtiene ninguna señal cuando el aminoácido del ciclo de secuencia es una cistina. Esto es debido a que los PTH derivados de tales aminoácidos no dan señal cromatográfica si no están previamente modificados (estabilizados) químicamente. Conocida la secuencia de aminoácidos de la proteína podemos localizar los fragmentos secuenciados y como consecuencia las cisteínas implicadas en el puente disulfuro presente en el péptido analizado. El análisis posterior de los péptidos por espectroscopía de masas MALDI-TOF nos da información sobre el peso y pureza del péptido.

Es conocido que el PCI es muy resistente a la digestión con proteasas. En el trabajo experimental inicial realizado para la determinación de las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro del PCI (Leary, 1979), se realizó una hidrólisis ácida parcial y específica entre residuos de aspártico para facilitar la posterior proteólisis con Termolisina y Subtilisina.

Los experimentos de digestión por nosotros realizados sobre los intermediarios de plegamiento del PCI muestran que éstos son mucho menos resistentes a la digestión proteolítica, no requiriendo una hidrólisis parcial previa para que tenga lugar la digestión. Es interesante constatar que los intermediarios de plegamiento de PCI son más accesibles a la acción de los enzimas proteolíticos. Esto nos indica que su estructura será menos compacta o más fluctuante que la del PCI nativo.

Existen numerosos enzimas proteolíticos capaces de fraccionar una proteína en péptidos, pero son pocos los enzimas que digieren en secuencias o aminoácidos específicos. Además la acción proteolítica de un enzima dependerá tanto de la secuencia de aminoácidos como de la estructura tridimensional de la proteína a digerir. Por ello es difícil prever con exactitud cuales serán los péptidos obtenidos en una digestión. Como consecuencia, en el presente trabajo se ensayaron para la digestión proteolítica enzimas que aunque teóricamente no darían lugar a digestión entre todos los puentes disulfuro de los intermediarios si podrían conseguirla mediante una combinación de ellos o en determinadas condiciones experimentales.

Hay que destacar que se han ensayado digestiones sobre el primer intermediario (Xa) con varios enzimas proteolíticos: Tripsina, Quimotripsina, Elastasa, Subtilisina y Termolisina, realizándose digestiones con una o combinaciones de ellas. En el caso de la Subtilisina y de la Termolisina se han probado además diferentes condiciones de digestión.

Concretamente se ensayaron, a nivel analítico, con el primer intermediario de plegamiento: digestiones con Tripsina, Quimotripsina y ambos enzimas (III. D. 3. 1. 1.); una digestión con Elastasa (III. D. 3. 1. 2.); varios ensayos con Subtilisina (III. D. 3. 1. 3.); la digestión en tampón Tris/ CaCl₂ y la digestión en tampón N- Etilmorfolina; y finalmente se realizaron varios ensayos con Termolisina (III. D. 3. 1. 4.): la digestión en tampón NH₄HCO₃/ CaCl₂, la digestión en tampón N- Etilmorfolina y la digestión simultanea con Subtilisina en tampón Tris/ CaCl₂.

Para obtener una idea inicial de los péptidos que se podrían obtener de la digestión de cualquier intermediario del PCI con cada una de las enzimas ensayadas, en la tabla IV. B. 3. 2. 1. damos una relación teórica de dichos péptidos.

Realizadas cada una de las digestiones, se separaron los péptidos de digestión mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa (figura IV. B. 3. 2. 1.). El gradiente aplicado fue amplio y de baja pendiente (se inicia en 0% de fase móvil B y finaliza en 70% de fase móvil B, después de 65 minutos) para optimizar la separación y posterior recolección de cada uno de los péptidos de digestión (III. D. 3. 1. 6.).

Tabla IV. B. 3. 2. 1. Relación teórica de los péptidos que se podrían obtener de una digestión enzimática sobre cualquier intermediario del PCI.

| PROTEASA | Punto de corte | Péptidos teóricos obtenidos | |
|----------------------|---|--|---|
| Tripsina | C- terminal: AA básicos, Lys y Arg | EQHADPIC ₈ NKPC ₁₂ K THDDC ₁₈ SGAWFC ₂₄ QAC ₂₇ WNSAR TC ₃₄ GPYVG | |
| Quimotripsina | C- terminal: Met, Leu, Phe, Tyr, Trp, Ala, Asp y Glu | EQHA C ₁₈ SGA C ₂₇ W RTC ₃₄ GPY | DPIC ₈ NKPC ₁₂ KTHD C ₂₄ QA NSA |
| Elastasa | C- terminal: AA no aromáticos, no cargados como Ala, Val, Leu, Ile, Gly y Ser | EQHA C ₈ NKPC ₁₂ KTHDDC 18S C ₂₇ WNS PYV | DPI WFC ₂₄ QA RTC ₃₄ G |
| Subtilisina | C- terminal: Asp, Glu, Ala, Gly y Val. | EQHA C ₁₈ SG C ₂₇ WNSA PYVG | PIC ₈ NKPC ₁₂ KTHD WFC ₂₄ QA RTC ₃₄ G |
| Termolisina | N- terminal: Val, Leu, Ile, Phe, Asn, Trp, Ala | EQHADP NKPC ₁₂ KTHDDBC ₁ 8SG AC ₂₇ | IC ₈ FC ₂₄ Q ARTC ₃₄ GPY |

| | | |
|---------------------------------|---|--|
| Tripsina/ Quimotripsina | EQHADPIC ₈ NKPC ₁₂ K C ₂₄ QAC ₂₇ W TC ₃₄ GPY | THDDC ₁₈ SGAW NSAR |
| Termolisina/ Subtilisina | EQHA THD FC ₂₄ QAC ₂₇ RTC ₃₄ G | PINC ₈ NKPC ₁₂ K C ₁₈ SG WNSA |

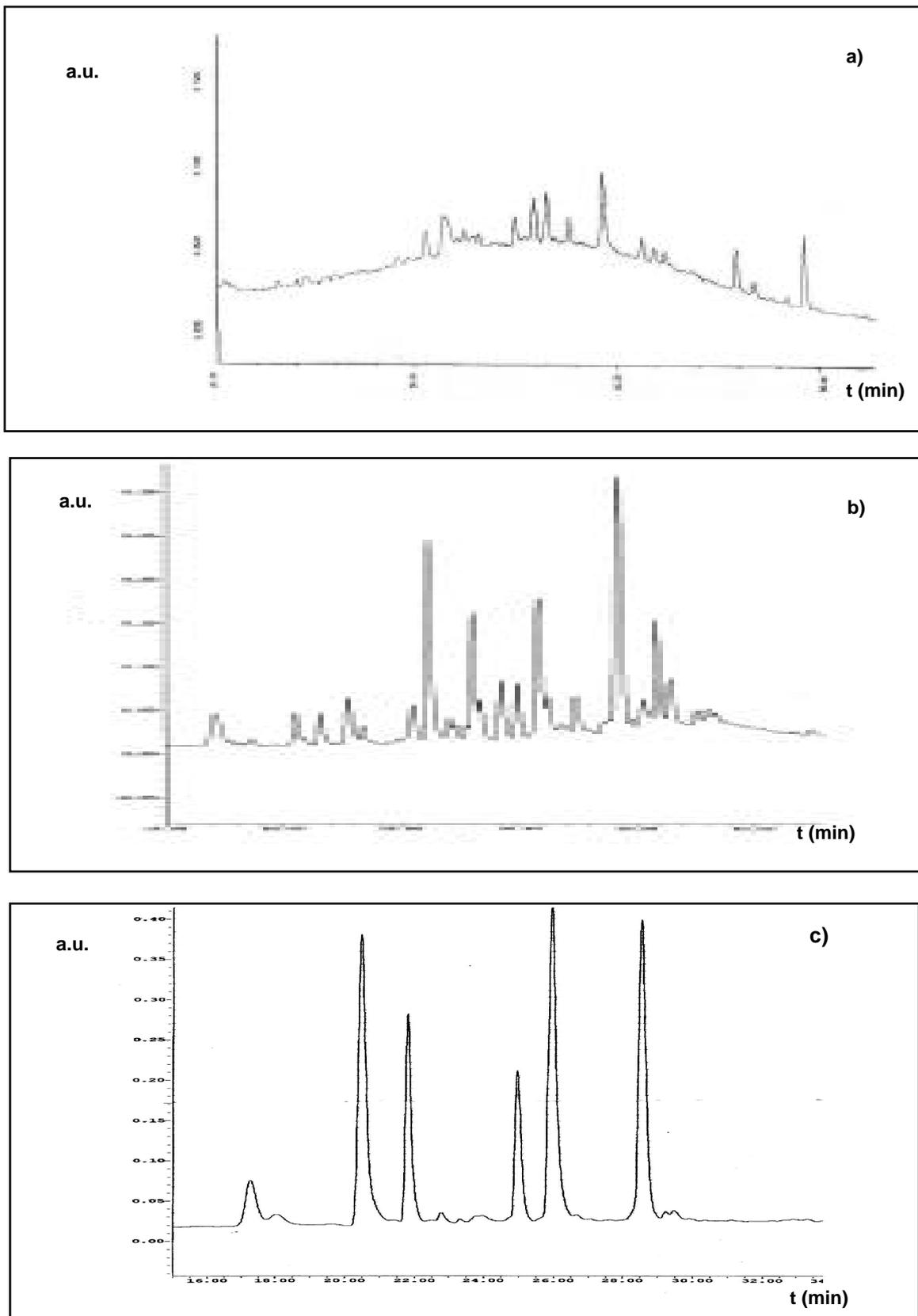


Figura IV. B. 3. 2. 1. Cromatogramas resultado de los ensayos de digestión de Xa con diferentes proteasas y condiciones de digestión: (a) Tripsina + Quimiotripsina en tampón Tris/ HCl, (b) Subtilisina en el mismo tampón y (c) Termolisina en tampón N- Etilmorfolina.

Existen varios criterios que nos permiten escoger la proteasa óptima para realizar el experimento a nivel preparativo. La digestión debe ser precisa y específica en algunos puntos de la proteína. Como consecuencia, en el análisis cromatográfico deberemos observar pocos fragmentos de digestión y de elevada concentración cada uno.

Si realizamos la misma digestión sobre dos intermediarios, que únicamente se diferencian entre ellos en la posición de sus puentes disulfuro, podemos saber que picos del cromatograma de la digestión contienen puentes disulfuro ya que serán los únicos que variarían de posición cromatográfica. Esto es debido a que en las mismas condiciones de digestión, la proteasa actúa entre los mismos aminoácidos para las dos moléculas, pero los apareamientos de péptidos (y por tanto su elución) serán distintos.

Así la comparación entre cromatogramas de digestión de los diferentes intermediarios, nos da idea de cuáles son los péptidos de digestión que contienen puentes disulfuro. Estos serán los primeros péptidos analizados por secuenciación automática.

Una vez se escogió la proteasa y sus condiciones de digestión, se realizó la digestión (a nivel preparativo) para cada uno de los intermediarios de plegamiento del PCI.

En el presente trabajo se escogió la Termolisina en N- etilmorfolina como enzima proteolítico y en algunos casos se utilizó la Lisil Endopeptidasa de *Achromobacter Lyticus* (Lys- C) para la digestión específica de algunos péptidos obtenidos. Los resultados obtenidos de cada proteólisis para cada intermediario de plegamiento se describen del apartado IV. B. 3. 4. al IV. B. 3. 8.

IV. B. 3. 3. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO POR REDUCCIÓN QUÍMICA PARCIAL.

Como estrategia alternativa para la determinación de puentes disulfuro se ha utilizado la metodología descrita por Wu & Watson (1997), que permite la caracterización de los puentes disulfuro de cualquier proteína de secuencia conocida mediante una rotura química específica.

Seguidamente mostramos un esquema del método utilizando con un péptido modelo que tiene dos puentes disulfuro en su estructura (esquema IV. B. 3. 3. 1.).

En dicho procedimiento (III. D. 3. 2.), inicialmente la proteína desnaturalizada se reduce parcialmente con tris (2- carboxiethyl) fosfina (TCEP) en una disolución tamponadora a pH 3.0. De la reducción parcial se obtiene una mezcla de isómeros proteicos parcialmente reducidos y parte de nuestra proteína intacta (las condiciones de la reacción han de ser las óptimas para que los isómeros que se produzcan contengan sólo uno de los puentes disulfuro reducido). Los residuos sulfidrilos que se han creado son cianilados inmediatamente con tetrafluoroborato de 1- ciano- 4- dimetilamino- piridinio (CDAP) (Wakselman & Guibe- Jampel, 1976). Tales isómeros proteicos parcialmente reducidos y cianilados se separan por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa. Las fracciones se recogen manualmente y se analizan por espectrometría de masas MALDI- TOF para determinar cuáles son las fracciones que contienen los isómeros parcialmente reducidos y cianilados. Estas fracciones cromatográficas deben de presentar una masa molecular que corresponde a la de la proteína nativa adicionando 52 Da que corresponden a los dos grupos CN incorporados. Una vez identificados los isómeros, se secan y se someten a fragmentación química específica con hidróxido amónico. Los

péptidos resultantes, que contienen aún un puente disulfuro en su estructura, se reducen totalmente con tris (2- carboxiethyl) fosfina (TCEP). Finalmente se obtiene una mezcla de péptidos cuyas masas analizadas por espectroscopía de masas MALDI- TOF se relacionan para la localización del puente disulfuro que inicialmente se había reducido y cianilado.

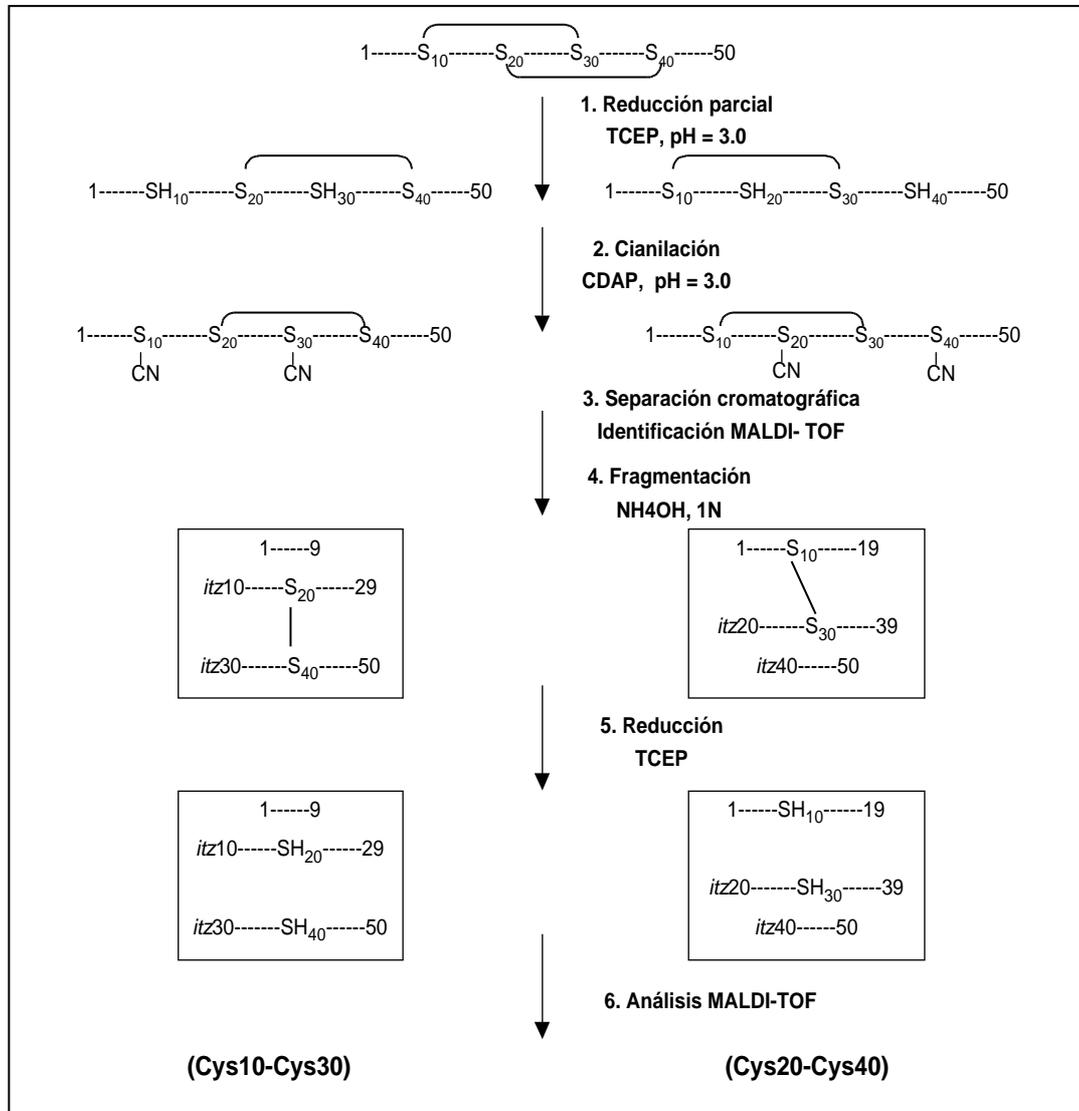


Figura IV. B. 3. 3. 1. Determinación de puentes disulfuro de un péptido modelo por reducción química parcial de un puente disulfuro.

Esta metodología ofrece varias ventajas frente a las otras metodologías descritas. En primer lugar los datos experimentales obtenidos son fáciles de interpretar debido a que se producen pocos isómeros con un puente disulfuro reducido (tantos como puentes disulfuro tiene la proteína) y en cantidades suficientes para los análisis. En segundo lugar no hay problemas de reorganización de los puentes disulfuro (“reshuffling”) debido a que tanto la reducción como la cianilación tienen lugar en medio ácido. En tercer lugar el método también puede ser aplicado a proteínas que tienen cisteínas adyacentes o muy próximas.

Se ha aplicado la metodología descrita a los intermediarios de plegamiento del PCI para conocer cuales son los puentes disulfuro que determinan su estructura. Además y como control se ha ensayado con una proteína previamente descrita y analizada, la Ribonucleasa A (Wu & Watson, 1997).

A continuación detallamos las condiciones en que se llevan a cabo cada una de las reacciones y los resultados obtenidos:

a) Reducción parcial de las proteínas.

Como se ha descrito en el método es necesario realizar una reducción parcial de la proteína bajo unas determinadas condiciones ya que únicamente deseamos la reducción parcial de algunos puentes disulfuro, no de todos. Aunque cada puente disulfuro tiene el mismo potencial redox y desde el punto de vista termodinámico podrían ser todos ellos reducidos de la misma manera, desde el punto de vista cinético la reducción de varios puentes disulfuro de una proteína en solución depende de la accesibilidad del agente reductor a la proteína y de la energía conformacional de cada puente disulfuro (Reeve & Pierce, 1981; Kuwajima *et al.*, 1990; Gray, 1993a; Takeda *et al.*, 1995). Por dichas cuestiones y para minimizar la diversidad estructural de los puentes disulfuro permitiendo una igual accesibilidad del agente redox (TCEP), las proteínas estudiadas son previamente desnaturalizadas en una disolución de Cloruro de Guanidinio (6 M).

La reducción parcial con tris (2- carboxietil) fosfina (TCEP) tiene lugar a pH ácido (pH= 3.0) por lo que eliminamos cualquier posibilidad de reorganización de puentes disulfuro de la proteína (“reshuffling”) y además a este pH la reacción esta cinéticamente controlada (Gray, 1993a).

Según resultados experimentales sobre otras proteínas (Wu & Watson, 1997) podemos considerar que aunque la estequiometría del TCEP y el tiempo de incubación afectan la velocidad de reducción y la proporción entre las diferentes isoformas reducidas, la adición de un equivalente de TCEP por cada cistina de la proteína proporciona predominantemente isómeros con un puente disulfuro reducido. Esto es fácilmente explicable si tenemos en cuenta que si en estas condiciones existe un 10% de reducción para un puente disulfuro, consecuentemente la probabilidad de reducir dos y tres puentes disulfuro de la misma proteína son $10\% \times 10\% = 1\%$ y $10\% \times 10\% \times 10\% = 0.1\%$ respectivamente.

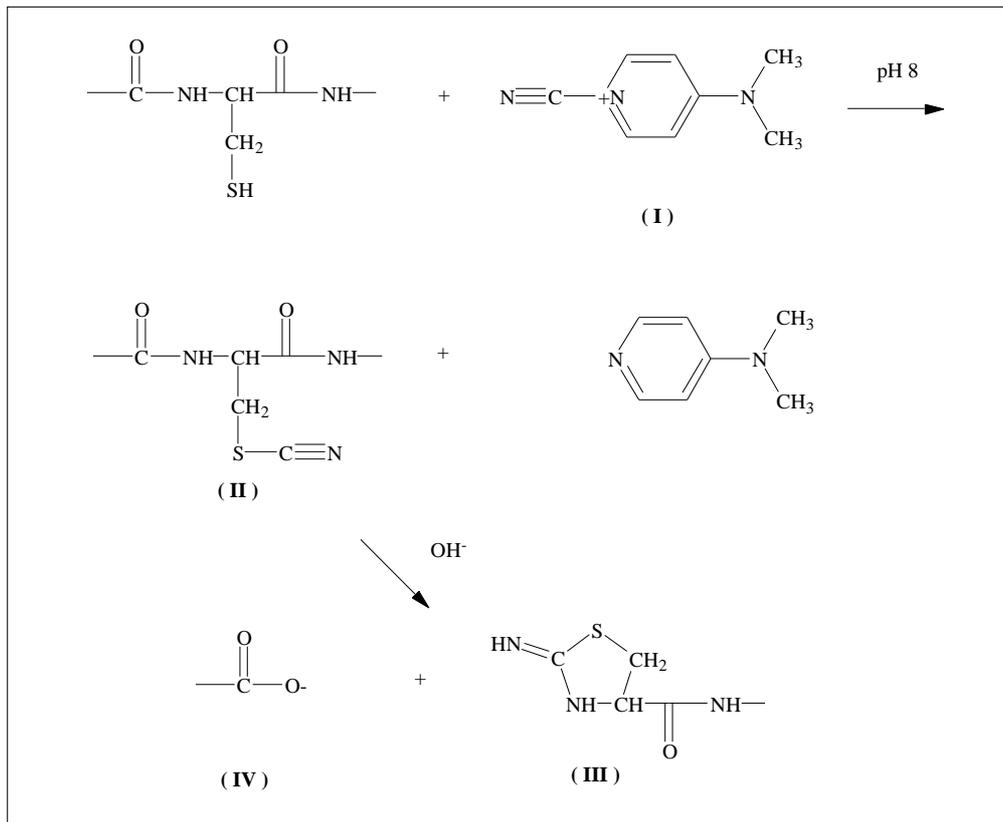
b) Cianilación de los grupos sulfidril.

El reactivo tetrafluoroborato de 1- ciano- 4- dimetilamino- piridinio (CDAP) es un agente cianilante específico de cisteínas en condiciones ácidas (Waxselman & Guibe- Jampel, 1976; Nakagawa *et al.*, 1994a y b).

En la figura IV. B. 3. 3. 1. mostramos la reacción de cianilación que tiene lugar entre un residuo de cisteína y el reactivo cianilante CDAP.

La cianilación completa tiene lugar utilizando un exceso cinco veces molar de reactivo a pH 3.0- 5.0 y a temperatura ambiente, sin necesidad de eliminar el exceso de TCEP, cambiar de tampón o de reajustar el pH.

Estudios realizados (Wu & Watson, 1997) indican que sí es necesario controlar la estequiometría de la reacción debido a que un elevado exceso de reactivo (50 veces molar) o un prolongado tiempo de incubación (más de 2 horas) puede modificar las cadenas laterales de otros aminoácidos.



- (I) tetrafluoroborato de 1- ciano- 4- dimetilamino- piridinio (CDAP)
 (II) proteína S- cianilada
 (III) residuo amino terminal iminotiazolidina- 4- carboxil (itc-)
 (IV) grupo - carboxil

Figura IV. B. 3. 3. 1. Reacción de cianilación de un residuo de cisteína con tetrafluoroborato de 1- ciano- 4- dimetilamino- piridinio (CDAP).

c) Separación por cromatografía (HPLC) de fase reversa de los isómeros proteicos parcialmente reducidos y cianilados.

Se separan por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa la mezcla de isómeros parcialmente reducidos y cianilados, y parte de proteína nativa.

d) Fragmentación de las cadenas peptídicas.

Se realiza una fragmentación por N- terminal de los residuos cisteínicos cianilados con NH₄OH (1 M, pH= 12.0). Previamente se resuspenden los péptidos separados por HPLC, que habían sido evaporados al Speed-Vac, con GdmCl (6 M).

Bajo estas condiciones existe una reacción secundaria que tiene lugar muy frecuentemente, la β -eliminación. El producto de β -eliminación de la cianil cisteína equivale a la eliminación formal de SH₂ a partir de la cisteína, representando una pérdida de 34 unidades de masa.

Wu & Watson (1997) han estudiado sistemáticamente la cinética de la fragmentación en función del pH con polipéptidos que contienen diferentes aminoácidos adyacentes a los residuos cisteínicos

cianilados en N- terminal. Sus resultados indicaron que a pH elevados se aceleraban considerablemente las reacciones de fragmentación y - eliminación. Pero a pH= 12.0 o por encima, la reacción de - eliminación ya no aumenta significativamente, mientras que en estas condiciones la reacción de fragmentación tiene lugar completamente en una hora a temperatura ambiente.

La reacción de fragmentación también podría tener lugar en NaOH (0.01 M) pero la ventaja del NH₄OH en disolución acuosa es que puede ser eliminado posteriormente con facilidad.

Una vez fragmentado el péptido y eliminado el NH₄OH, se reducen totalmente los puentes disulfuro restantes con un exceso de TCEP. Finalmente se diluye la mezcla peptídica resultante para minimizar el efecto del GdmCl en el análisis por espectrometría de masas MALDI- TOF.

e) Interpretación de los resultados.

El mapa de masas moleculares de los péptidos de fragmentación obtenidos nos da información específica sobre el número y la localización de los grupos sulfidrilo existentes en la proteína, y como consecuencia información sobre los puentes disulfuro formados en su estructura.

Debido a que la fragmentación tiene lugar únicamente en los residuos de cisteínas cianilados, sólo esperaremos encontrar tres péptidos de fragmentación por cada isómero parcialmente reducido y cianilado (supuesto un único puente disulfuro reducido). La masa molecular de cada uno de estos péptidos esta relacionada con la posición de los dos residuos de cisteína cianilados, por lo tanto resulta fácil deducir el puente disulfuro que formaban.

Como hemos comentado cuando tiene lugar la reacción de - eliminación la masa del péptidos resultante corresponde a la masa del mismo péptido menos el grupo SH₂ (34u de masa). Este dato nos sirve para confirmar la asignación de los puentes disulfuro de la proteína estudiada.

• Ribonucleasa A (RNasa A).

A continuación exponemos los resultados obtenidos del primer ensayo de determinación de los puentes disulfuro de la Ribonucleasa A utilizando esta metodología.

La Ribonucleasa A (M_r= 13.683) (Smyth *et al.*, 1963) es una proteína de 124 aminoácidos y cuatro puentes disulfuro: Cys 26- Cys 84, Cys 40- Cys 95, Cys 58- Cys 110 y Cys 65- Cys 72.

En la figura IV. B. 3. 3. 2. mostramos la separación de cromatográfica de fase reversa obtenida de los productos de reducción parcial y cianilación de la Ribonucleasa A.

En dicho cromatograma de separación se observa que detrás de la fracción principal, que corresponde a la proteína nativa, observamos 3 fracciones (marcadas R- 1- 2, R- 3 y R- 4) que corresponden a especies con una masa de 52 Da superior a la nativa. Estas fracciones son las atribuidas a los isómeros parcialmente reducidos y cianilados. Como sabemos la Ribonucleasa A tiene cuatro puentes disulfuro en su estructura, por lo tanto deberían haber 4 fracciones separadas por fase reversa. Comparando nuestros resultados con los ya descritos (Wu & Watson, 1997), observamos que la primera fracción cromatográfica después de la proteína nativa corresponde a dos isómeros parcialmente reducidos y cianilados. En nuestro análisis la separación de los isómeros R- 1 y R- 2 por fase reversa no ha sido posible, pero como veremos a continuación, este hecho no interfiere en la interpretación de los resultados.

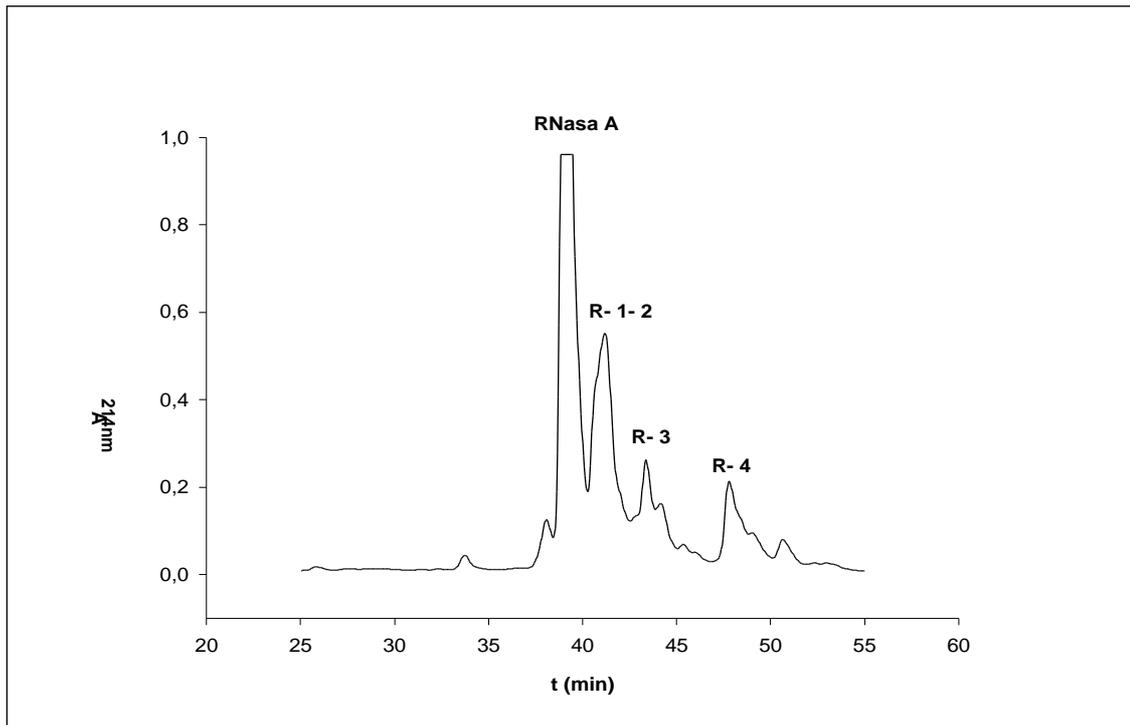


Figura IV. B. 3. 3. 2. Cromatograma obtenido de la separación por HPLC (fase reversa) de Ribonucleasa A y sus isómeros parcialmente reducidos y cianilados.

Seguidamente mostramos el mapa de masas moleculares de los péptidos de reducción total del primero y del segundo isómero reducido y cianilado de RNasa A (R- 1- 2) (figura IV. B. 3. 3. 3.).

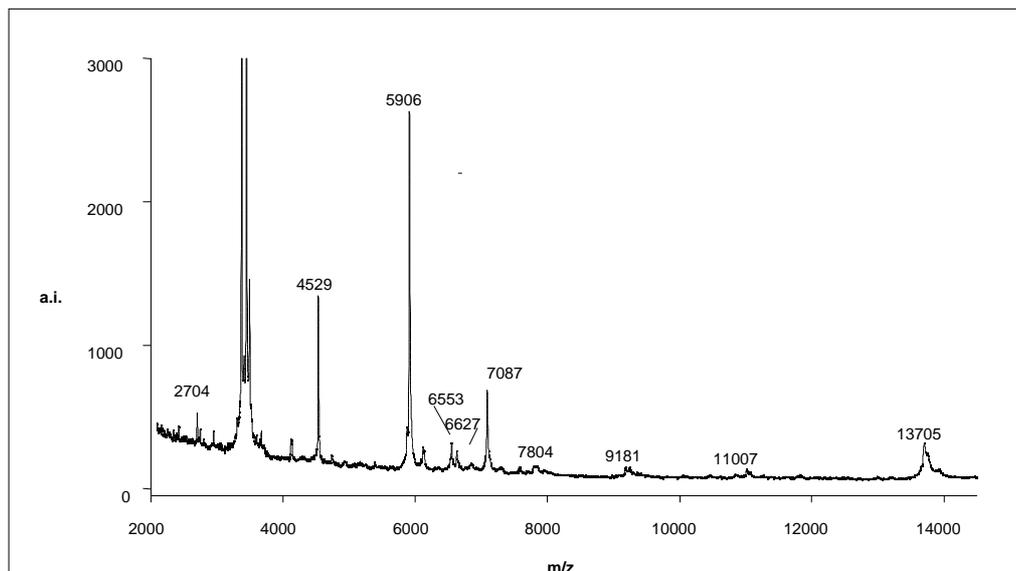


Figura IV. B. 3. 3. 3. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del primero y del segundo isómeros, reducidos y cianilados de RNasa A (R- 1- 2).

En las siguientes figuras mostramos los espectros reducción total del tercer (R- 3) (figura IV. B. 3. 3. 4.) y del cuarto (R- 4) isómero reducido y cianilado (figura IV. B. 3. 3. 5.).

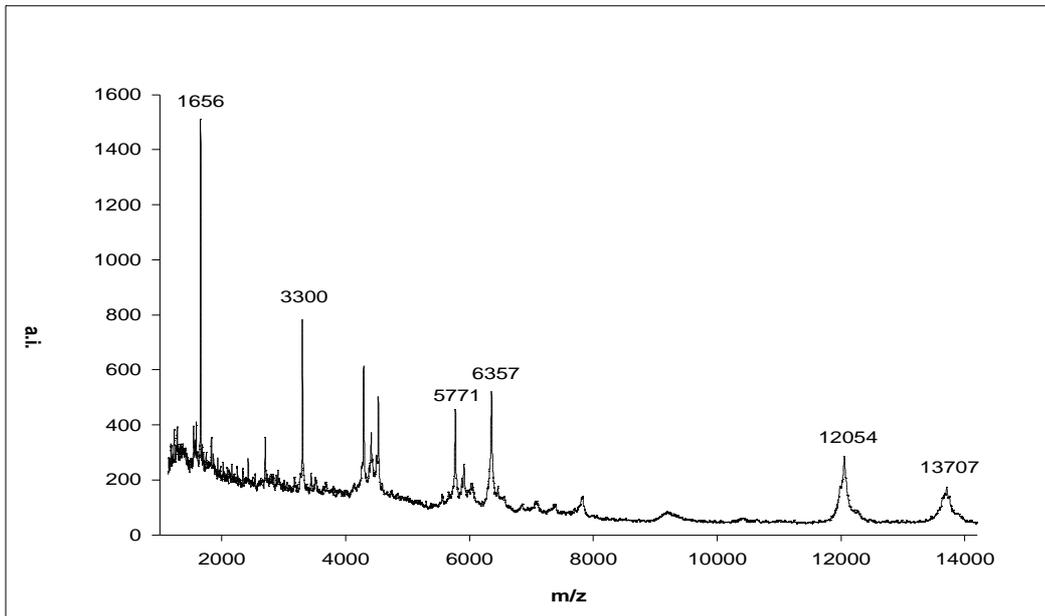


Figura IV. B. 3. 3. 4. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del tercer isómero reducido y cianilado de RNasa A (R- 3).

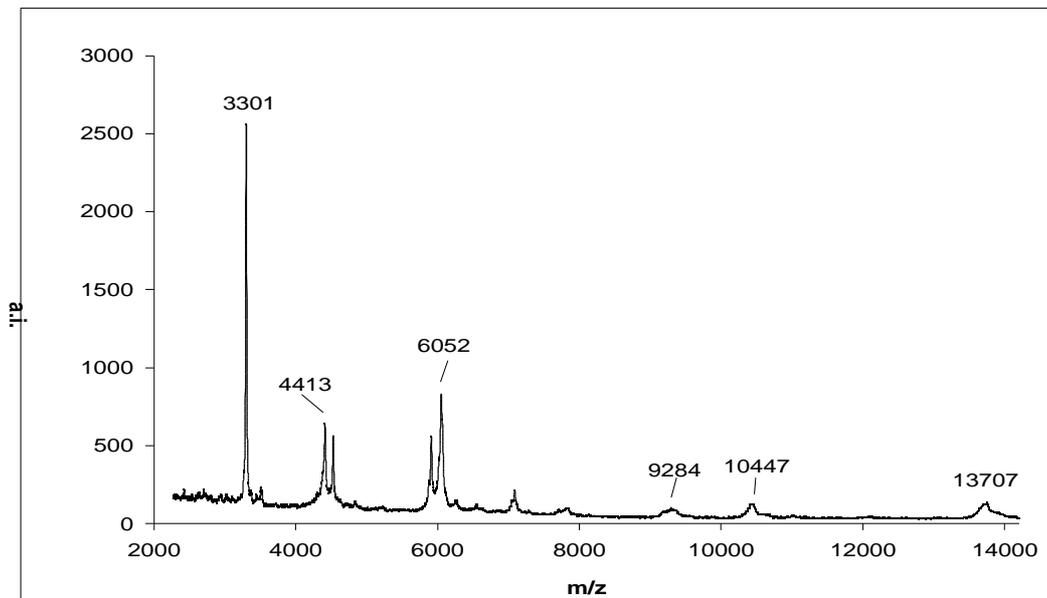


Figura IV. B. 3. 3. 5. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del cuarto isómero reducido y cianilado de RNasa A (R- 4).

Finalmente en la tabla IV. B. 3. 3. 1. exponemos las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente de cada uno de los isómeros obtenidos, como resultado de la fragmentación y de la reducción total posterior de la proteína dependiendo del puente disulfuro que sea reducido y cianilado.

Tabla IV. B. 3. 3. 1. Valores calculados de M/z de los posibles fragmentos teóricos y los observados de cada uno de los isómeros de la Rnasa A obtenidos, como resultado de la reducción total de la proteína dependiendo del puente disulfuro que sea reducido y cianilado.

| (S- S) reducido | Fragmento | M/z teórico | M/z observado |
|----------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|
| Rnasa A (R- 1) | | | |
| Cys 26- Cys 84 | 1- 25 | 2706 | 2704 |
| | itz26- 83 | 6547 | 6553 |
| | itz84- 124 | 4526 | 4529 |
| | (1- 83) | 9176 | 9181 |
| | (itz26- 124) | 10995 | 11007 |
| Rnasa A(R- 2) | | | |
| Cys 65- Cys 72 | 1- 64 | 7084 | 7087 |
| | itz65- 71 | 790 | - |
| | itz72- 124 | 5906 | 5910 |
| | (1- 71) | 7796 | 7804 |
| | (itz65- 124) | 6618 | 6627 |
| Isómero Rnasa A(R- 3) | | | |
| Cys 58- Cys 110 | 1- 57 | 6353 | 6357 |
| | itz58- 109 | 5767 | 5771 |
| | itz110- 124 | 1660 | 1656 |
| | (1- 109) | 12042 | 12054 |
| | (itz58- 124) | 7349 | - |
| Rnasa A(R- 4) | | | |
| Cys 40- Cys 95 | 1- 39 | 4414 | 4413 |
| | itz40- 94 | 6064 | 6052 |
| | itz95- 124 | 3303 | 3301 |
| | (1- 94) | 10399 | 10447 |
| | (itz40- 124) | 9288 | 9284 |

Como resultado de este primer ensayo de determinación de puentes disulfuro por reducción química parcial con una proteína con apareamiento de cisteínas conocido, decidimos que esta metodología podría ser válida para la determinación de puentes disulfuro de los intermediarios del PCI.

- **Intermediarios del plegamiento del PCI.**

Previamente a la asignación de puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento de PCI hemos de tener en cuenta que debido a que el PCI tiene tres puentes disulfuro en su estructura, existen 14 configuraciones de puentes disulfuro posibles además de la configuración adoptada por la proteína nativa (tabla IV. B. 3. 3. 2.).

Tabla IV. B. 3. 3. 2. Apareamientos de puentes disulfuro que puede adoptar una proteína con seis cisteínas localizadas en las mismas posiciones que las cisteínas del PCI formando tres puentes disulfuro. Las cisteínas del PCI están localizadas en las posiciones: 8, 12, 18, 24, 27 y 34.

| Configuración | 1º (S- S) | 2º (S- S) | 3º (S- S) |
|---------------|-----------|-----------|-----------|
| C 1 | 8- 12 | 18- 24 | 27- 34 |
| C 2 | 8- 12 | 18- 27 | 24- 34 |
| C 3 | 8- 12 | 18- 34 | 24- 27 |
| C 4 | 8- 18 | 12- 24 | 27- 34 |
| C 5 | 8- 18 | 12- 27 | 24- 34 |
| C 6 | 8- 18 | 12- 34 | 24- 27 |
| C 7 | 8- 24 | 12 18 | 27- 34 |
| C 8 | 8- 24 | 12- 27 | 18- 34 |
| C 9 | 8- 24 | 12- 34 | 18- 27 |
| C 10 | 8- 27 | 12- 18 | 24- 34 |
| C 11 | 8- 27 | 12- 24 | 18- 34 |
| C 12 | 8- 27 | 12- 34 | 18- 24 |
| C 13 | 8- 34 | 12- 18 | 24- 27 |
| C 14 | 8- 34 | 12- 24 | 18- 27 |
| C 15 | 8- 34 | 12-27 | 18- 24 |

C8- Configuración adoptada por la estructura nativa del PCI.

Los resultados obtenidos de los experimentos de reducción química parcial de cada intermediario de plegamiento del PCI se muestran del apartado IV. B. 3. 4. al IV. B. 3. 8.

IV. B. 3. 4. DETERMINACIÓN DE LOS PUENTES DISULFURO DEL PRIMER INTERMEDIARIO DE PLEGAMIENTO DE PCI, Xa.

- **Determinación de los puentes disulfuro por digestión con proteasas.**

De todas las condiciones de digestión con diferentes proteasas ensayadas a nivel analítico con el intermediario Xa (III. D. 3. 1. y IV. B. 3. 2.) se escogió Termolisina en tampón N- Etilmorfolina como el procedimiento idóneo para la proteólisis de los intermediarios de plegamiento del PCI.

En el cromatograma de digestión de Xa con dicho enzima (figura IV. B. 3. 4. 1.) se obtuvieron únicamente tres picos con tiempos de retención iguales (picos 1, 3 y 6) a los observados en la digestión de los otros intermediarios. Estas fracciones podrían corresponder a péptidos sin cistinas, o con cistinas comunes para cada una de las estructuras de los intermediarios.

Se obtuvieron también tres picos mayoritarios no comunes (fracciones 4, 5 y 8) a las observados en la digestión de los otros intermediarios. Esto puede indicar que cada una de estas fracciones corresponde a un péptido que contiene como mínimo un puente disulfuro.

Finalmente se observan tres picos minoritarios no comunes (fracciones 2, 7 y 9), su análisis también nos puede dar información útil para la determinación de puentes disulfuro.

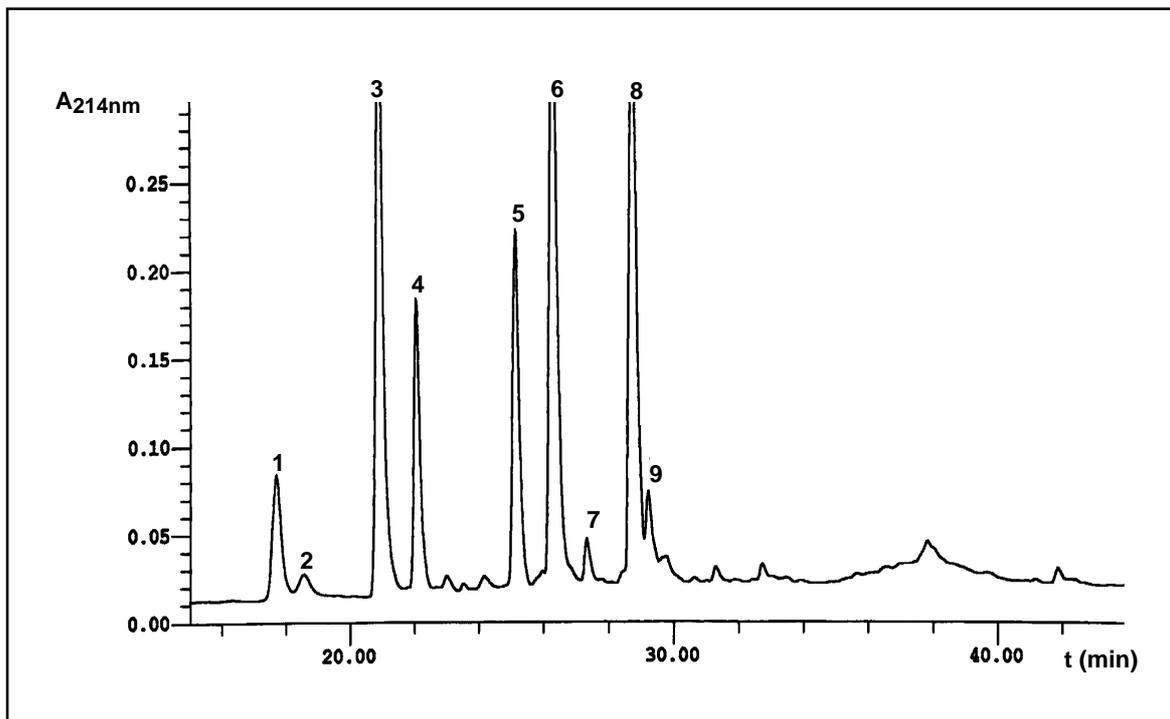


Figura IV. B. 3. 4. 1. Cromatograma obtenido de la digestión de Xa con Termolisina en tampón N- Etilmorfolina.

Las fracciones obtenidas de la digestión se analizaron inicialmente por espectrometría de masas MALDI (III. D. 3. 1. 7.). Este análisis nos da información sobre la pureza y el peso molecular de los

péptidos separados. Esta información es de elevada utilidad en el momento de escoger un péptido determinado para su secuenciación y en el momento de resolver el "rompecabezas" que supone obtener la estructura de cada intermediario a partir de la estructura conocida de los péptidos de digestión. Posteriormente a este análisis, se procedió a la secuenciación automática de los péptidos de digestión escogidos (III. D. 3. 1. 8.).

Detallamos en la tabla IV. B. 3. 4. 1. los resultados obtenidos del análisis por espectrometría de masas y secuenciación automática de los péptidos de digestión considerados más interesantes del primer intermediario de plegamiento Xa. Se muestra la fracción cromatográfica analizada (Fracción N), la masa molecular obtenida, la secuencia N- terminal realizada, las cisteínas encontradas en el fragmento y finalmente, la posición del fragmento en la secuencia total del PCI.

Tabla IV. B. 3. 4. 1. Resultados obtenidos del análisis por espectrometría de masas MALDI y secuenciación automática de algunos péptidos de digestión de Xa.

| Fracción N | Masa | Secuencia | Cys- Cys | Posición |
|------------|------|---|-----------------|--------------------|
| 3 | 406 | W N S | | 28- 30 |
| 4 | 1708 | I C ₈ N K P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G A C ₂₇ | 8, 12, 18 27 | 7- 20 26- 27 |
| 5 | 1991 | A D P I C ₈ N K P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G A C ₂₇ | 8, 12, 18 27 | 4- 20 26- 27 |
| 6 | 2032 | A D P I C ₈ N.. I C ₈ N K P C ₁₂ .. A W.. | 8 8, 12 | 4- 7- 21- 22 |
| 7 | 2096 | I C ₈ N K P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G A C ₂₇ W N S | 8, 12, 18 27 | 7- 20 26- 30 |
| 8 | 1161 | F C ₂₄ Q A R T C ₃₄ G P Y | 24- 34 | 23- 25 31- 37 |
| 9 | 2379 | A D P I C ₈ N K P C ₁₂ K T H D D C ₁₈ S G A C ₂₇ W N S | 8, 12, 18 27 | 4- 20 26- 30 |

Como resultado de la digestión, del análisis de masas y secuencia subsiguientes de la fracción Xa con Termolisina se deduce cuales son las cisteínas implicadas en uno de los puentes disulfuro de su estructura. En particular la secuenciación automática de fracción 8 revela que son las cisteínas 24 y 34 las implicadas en uno de los puentes disulfuro del péptido de digestión.

A excepción de la fracción 3, las demás fracciones obtenidas contienen más de un único puente disulfuro y ello impide distinguir los apareamientos entre sus cisteínas. Como consecuencia fue necesario realizar una nueva digestión sobre alguna de estas fracciones que contienen los dos puentes disulfuro restantes implicados en la estructura de Xa. Para realizar esta segunda digestión podrían escogerse proteasas como la Lisil Endopeptidasa de *Achromobacter Lyticus* (Lys- C) o Tripsina debido a la presencia de lisinas entre las cisteínas 8- 12 y 12- 18. Pero se ha de tener en cuenta que la presencia

de la prolina que sigue a la K₁₀ podía dificultar la proteólisis con Tripsina, así que se escogió la Lys- C (III. D. 3. 1. 5.).

Como resultado de la digestión de la fracción 4 con Lys- C se obtuvo un nuevo péptido de M/z 1078 y secuencia P **C₁₂K** / T H D D **C₁₈S** G que nos revela que son las cisteínas 12 y 18 las implicadas en el puente disulfuro de este péptido de digestión.

Con estos resultados podemos deducir que las cisteínas implicadas en cada uno de los puentes disulfuro del intermediario Xa son: Cys 24- Cys 34, Cys 12- Cys 18 y, por exclusión, Cys 8- Cys 27.

- **Determinación de los puentes disulfuro por reducción química parcial.**

A continuación discutiremos los resultados obtenidos de los experimentos de reducción química parcial de los puentes disulfuro de Xa.

En la figura IV. B. 3. 4. 2. mostramos la separación cromatográfica de isómeros parcialmente reducidos y cianilados obtenida del intermediario de plegamiento Xa. Se observa que existe una fracción mayoritaria (Xa) que corresponde al intermediario de plegamiento no reducido y tres fracciones (Ia- 1, Ia- 2 y Ia- 3) que corresponden a especies con una masa de 52 Da superior a la nativa. Por lo tanto Xa sólo presenta tres isómeros cianilados, uno por cada puente disulfuro reducido y cianilado de su estructura nativa.

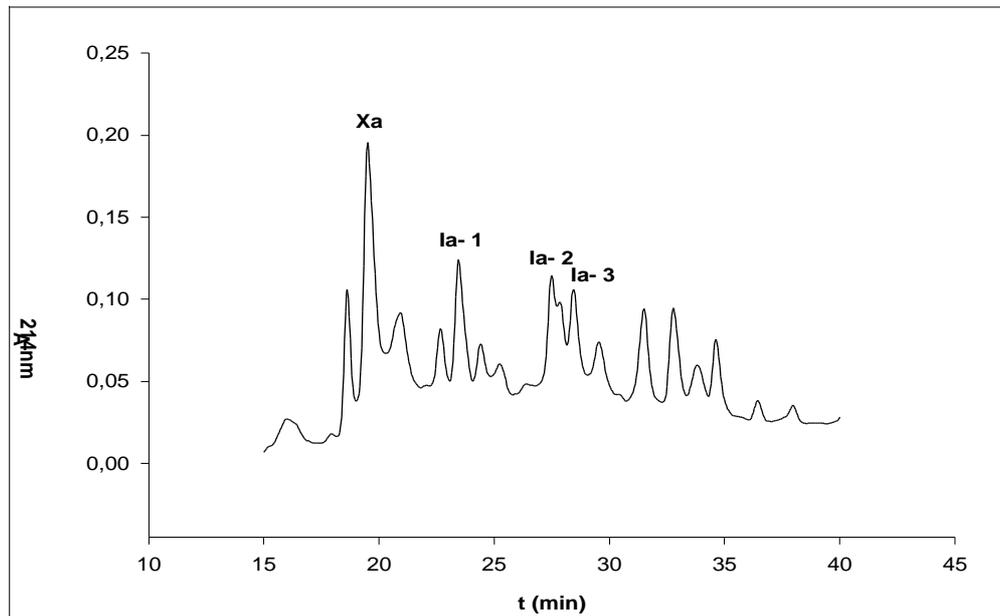


Figura IV. B. 3. 4. 2. Cromatograma obtenido de la separación por HPLC (fase reversa) de la mezcla de isómeros de Xa, parcialmente reducidos por un puente disulfuro y posteriormente cianilados.

Se observa que la intensidad de los picos que corresponden a los tres isómeros es la misma, esto sugiere que bajo nuestras condiciones de reacción las velocidades de reducción de los tres puentes disulfuro de Xa son comparables.

Se observa también que el porcentaje de proteína nativa reducida es superior al 10 % estimado, por lo tanto no es de sorprender que existan otros picos en el cromatograma. Éstos corresponden a isómeros con dos puentes disulfuro reducidos y cianilados, que presentan una masa de 104 Da superior a la nativa, como se observó en su análisis por espectrometría de masas MALDI- TOF (III. D. 3. 2. 1.) o bien a especies parcialmente cianiladas (masa correspondientes a la incorporación de uno o tres grupos cianilo).

Seguidamente presentamos los resultados obtenidos de la fragmentación y reducción total posterior de cada uno de los isómeros parcialmente reducidos y cianilados de Xa.

- **Isómero (Ia- 1).**

En la figura IV. B. 3. 4. 3. mostramos el mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación y de la reducción total posterior respectivamente del primer isómero de Xa, (Ia- 1).

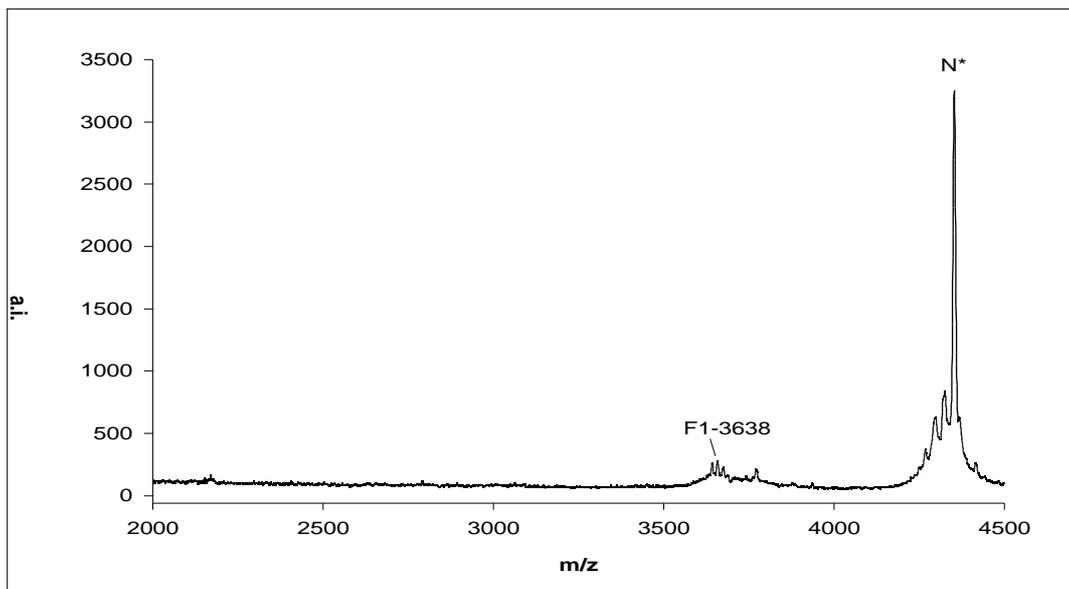


Figura IV. B. 3. 4. 3a. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación del primer isómero reducido y cianilado de Xa (Ia- 1).

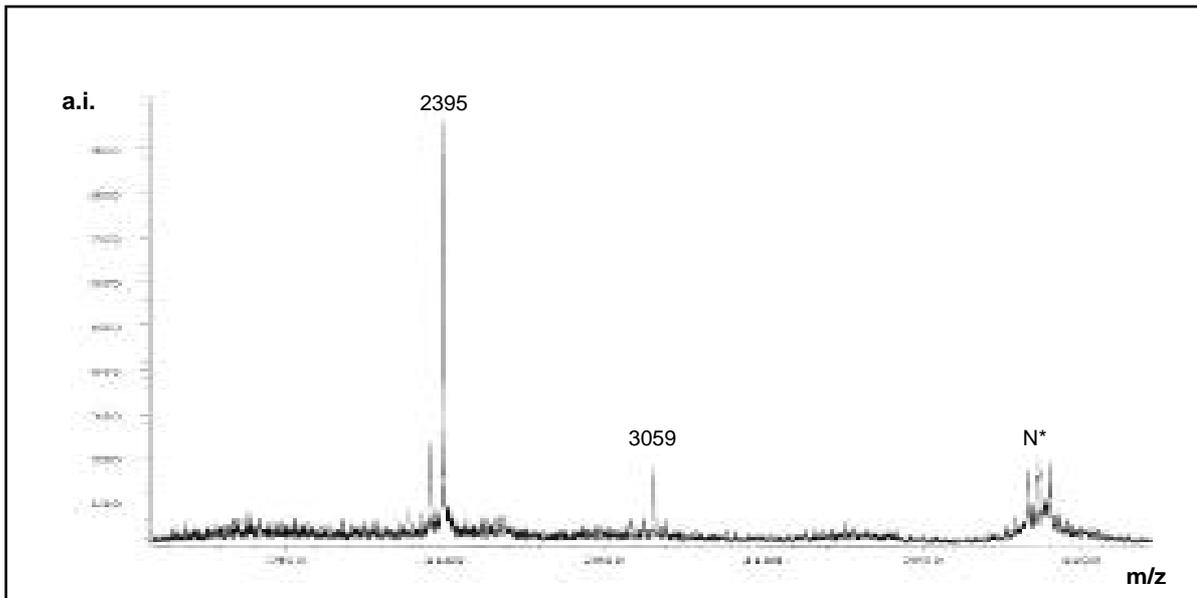


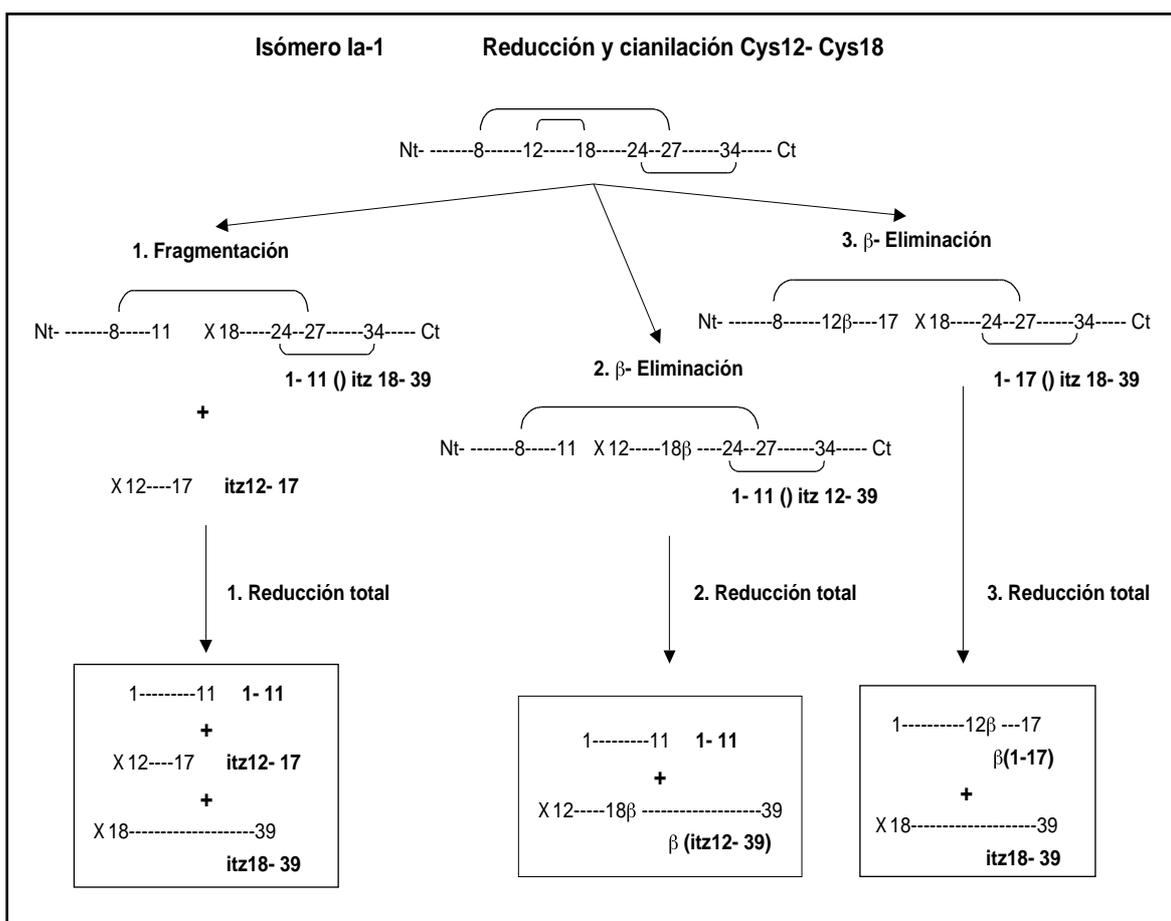
Figura IV. B. 3. 4. 3b. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total posterior del primer isómero reducido y cianilado de Xa (Ia- 1).

En los espectros de fragmentación nombramos como F_N , los picos de fragmentación del isómero correspondiente; y en los espectros de reducción total R_N , los picos de reducción obtenidos.

Se observa en algunos espectros que además de los picos de fragmentación y de reducción total, existe un pico de masa 4352 que corresponde al isómero cianilado y no fragmentado (N^*).

Del estudio de los espectros obtenidos en este ensayo y en otros ensayos realizados podemos deducir que las cisteínas implicadas en uno de los puentes disulfuro de Xa son Cys 12 y Cys 18.

En el esquema IV. B. 3. 4. 1. se muestran esquemáticamente los diversos fragmentos que pueden derivar de la especie scrambled Xa, con el apareamiento de disulfuros indicado en la figura, tras la reducción y la cianilación del puente disulfuro Cys12- Cys18. Se muestran los fragmentos que derivan de la fragmentación en ambos grupos cianil- cisteína y de la fragmentación en una cianil- cisteína junto la - eliminación en la otra. Estos fragmentos son los que podrían observarse en el primero de los dos espectros de masas (fragmentación, figura IV. B. 3. 4. 3. a). Se indican también los fragmentos que derivarían de la posterior reducción de los tres fragmentos anteriores, que son los que se observarían en el segundo espectro de masas (figura IV. B. 3. 4. 3. b).



Esquema IV. B. 3. 4. 1. Esquema de los fragmentos que pueden derivar tras la reducción y la cianilación del puente disulfuro Cys12- Cys18 de la especie scrambled Xa.

A continuación mostramos una tabla resumen (tabla IV. B. 3. 4. 2.) de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente del isómero (Ia- 1) previamente asignado.

Tabla IV. B. 3. 4. 2. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ia- 1).

| Isómero (Ia- 1) (Cys 12- Cys 18) | Fragmento asignado | M/ z teórico | Nomenclatura Picos MS | M/z observado |
|-------------------------------------|--------------------|--------------|-----------------------|---------------|
| Fragmentación. | Itz12-17 | 743 | | - |
| | 1-11()itz18-39 | 3640 | (Ia- 1) F1 | 3638 |
| | (1-17) | 1917 | | - |
| | (itz12-39) | 3055 | | - |
| Reducción Total. | 1-11 | 1252 | | - |
| | Itz12-17 | 743 | | - |
| | itz18-39 | 2392 | (Ia- 1) R1 | 2395 |
| | (1-17) | 1918 | | - |
| | (itz12-39) | 3058 | (Ia- 1) R2 | 3059 |

En dicha tabla detallamos las masas M/z teóricas de fragmentación y de reducción total que correspondería obtener del isómero estudiado, que podemos comparar con las masas M/z observadas en los espectros correspondientes.

La nomenclatura utilizada en estas tablas para designar los péptidos es la indicada en la tabla IV. B. 3. 1. (Rnasa A) y en la figura IV. B. 3. 4. 3.

Para cada especie scrambled se realizaron varios experimentos de reducción parcial, en la tabla anterior se resumen los picos observados en varios espectros de masas (aunque no se vean en los espectros de fragmentación y reducción que muestran en las figuras).

Hay que señalar que, tal como puede verse en la figura IV. B. 3. 4. 4., los fragmentos correspondientes a la reducción total dependen únicamente del par de cisteínas cianiladas y no de la configuración de puentes disulfuro de la que se parte. Por tanto estos fragmentos proporcionan información directa sobre la existencia de un puente entre dos cisteínas determinadas. Sin embargo, los fragmentos formados tras la fragmentación inicial (antes de la reducción final) dependerán no sólo del par de cisteínas cianiladas sino de la configuración del resto de puentes presentes en la molécula. Por tanto en las tablas resumen que se exponen para cada forma scrambled, la relación de fragmentos teóricos que se presenta (en la parte superior de la tabla) es la que corresponde a la configuración que se ha asignado como probable tras el estudio de los diversos productos de cianilación correspondientes a la forma scrambled analizada.

- **Isómero (Ia- 2).**

En la figura IV. B. 3. 4. 4. mostramos el mapa de masas de los péptidos obtenidos de la reducción total del segundo isómero de Xa (Ia- 2).

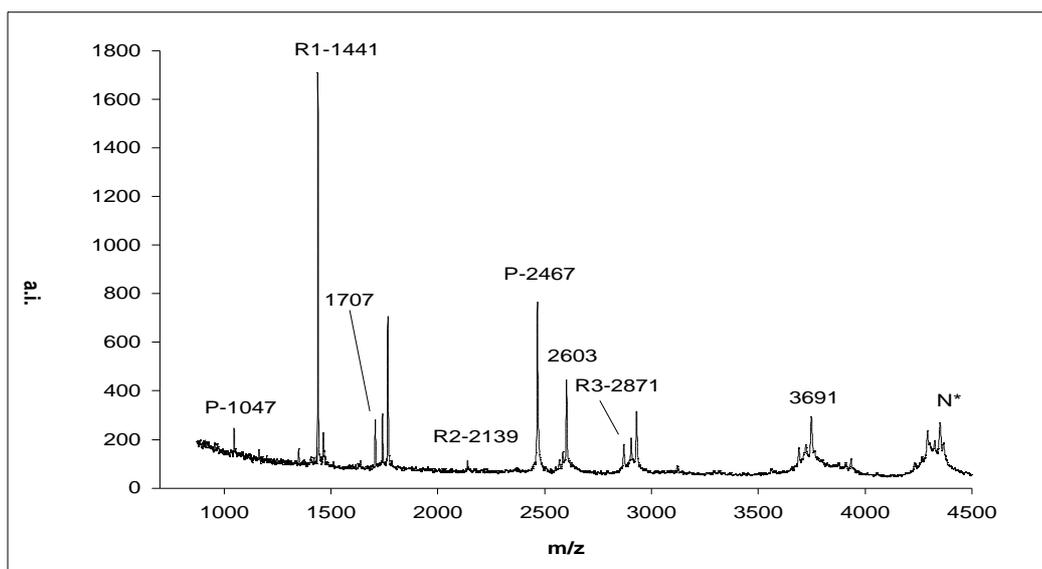


Figura IV. B. 3. 4. 4. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del segundo isómero reducido y cianilado de Xa (Ia- 2).

Los picos indicados como (P) corresponden a patrones proteicos, Angiotensina (A) y al fragmento 18-39 de la Hormona Adrenocorticotrófica (AcTH) de masas moleculares 1047 y 2467 respectivamente, utilizados para la calibración interna del espectro.

En el espectro también observamos otros picos de m/z : 1707, 2603 y 3691. Estos corresponden a fragmentos de reducción total y - eliminación del tercer isómero de Xa (Ia-3) debido a que la separación de estos isómeros por cromatografía (HPLC) de fase reversa (figura IV. B. 3. 4. 2.) no es completa.

Del estudio del espectro de reducción total del isómero (Ia-2) podemos deducir que las cisteínas implicadas en otro de los puentes disulfuro de Xa son Cys 8 y Cys 27.

Finalmente en la tabla IV. B. 3. 4. 3. mostramos el resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los observados experimentalmente.

Tabla IV. B. 3. 4. 3. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ia-2).

| Isómero (Ia-2) (Cys 8- Cys 27) | Fragmento asignado | M/ z teórico | Nomenclatura Picos MS | M/z observado |
|-----------------------------------|--------------------|--------------|--------------------------|---------------|
| Fragmentación. | 1-7 | 810 | | - |
| | itz8itz-39 | 3573 | | - |
| | (1-26) | 2869 | | - |
| | (itz8-39) | 3497 | | - |
| Reducción Total. | 1-7 | 810 | | - |
| | itz8-26 | 2139 | (Ia-2) R2 | 2139 |
| | itz27-39 | 1439 | (Ia-2) R1 | 1441 |
| | (1-26) | 2872 | (Ia-2) R3 | 2871 |
| | (itz8-39) | 3501 | | - |

- **Isómero (Ia-3).**

Finalmente del estudio de los espectros obtenidos de las muestras fragmentadas y reducidas (figura IV. B. 3. 4. 5. y tabla IV. B. 3. 4. 4.) podemos deducir que las cisteínas implicadas en el último puente disulfuro de Xa son Cys 24 y Cys 34.

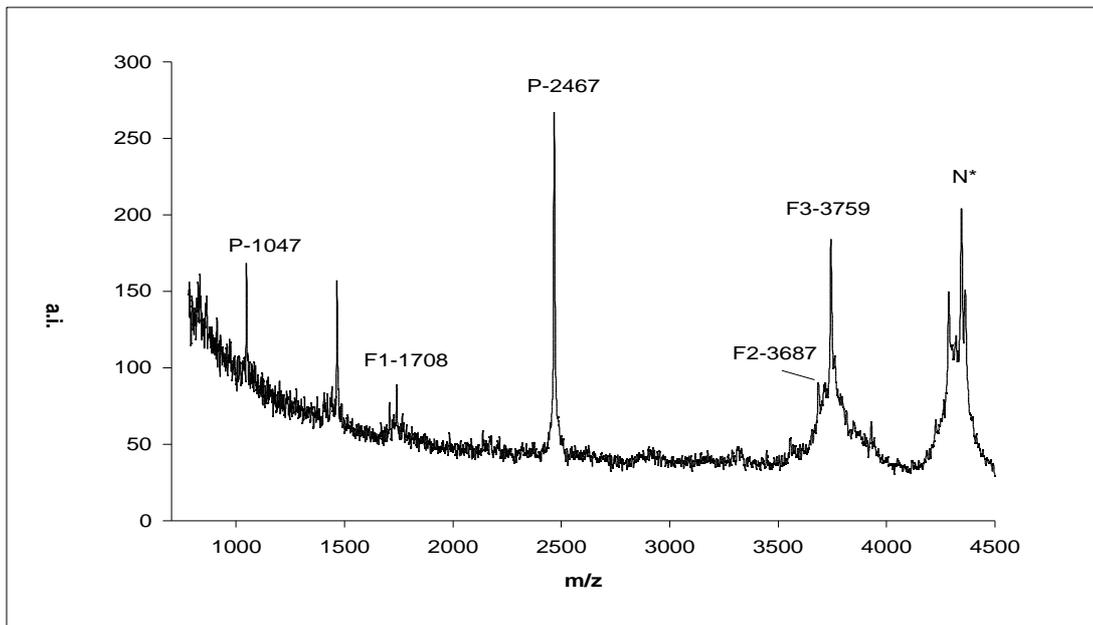


Figura IV. B. 3. 4. 5a. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la fragmentación del tercer isómero reducido y cianilado de Xa (a- 3).

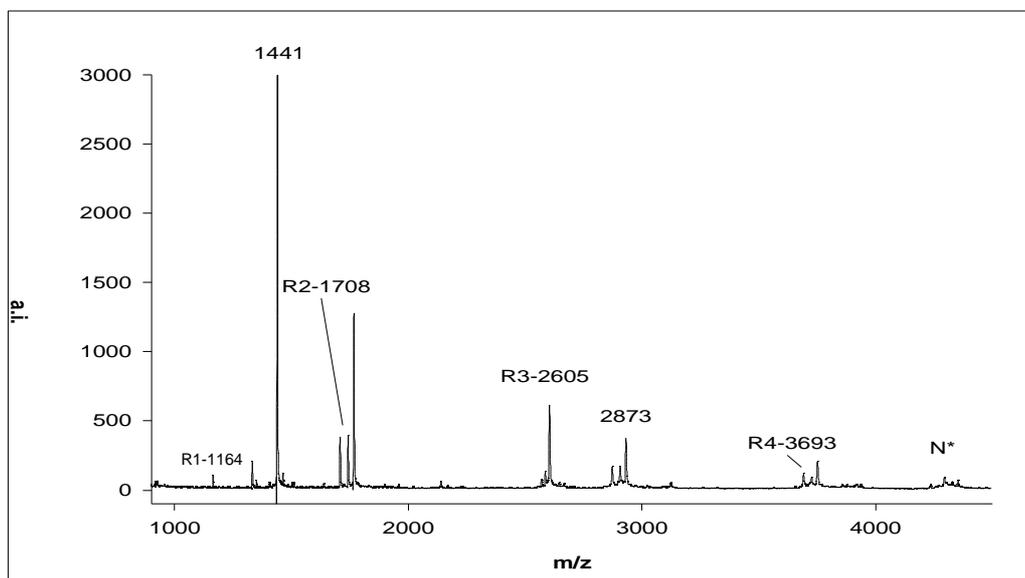


Figura IV. B. 3. 4. 5b. Mapa de masas moleculares de los péptidos obtenidos de la reducción total del tercer isómero reducido y cianilado de Xa (la- 3).

En el espectro de reducción total también observamos otros picos de m/z: 1441 y 2873 que corresponden a fragmentos de reducción total y -eliminación del segundo isómero de Xa (a- 2).

Tabla IV. B. 3. 4. 4. Tabla resumen de las masas moleculares de los fragmentos teóricos y los obtenidos experimentalmente como resultado de la reacción de fragmentación y de la reducción total posterior del isómero (Ia- 3).

| Isómero (Ia- 3) (Cys 24- Cys 34) | Fragmento asignado | M/ z teórico | Nomenclatura Picos MS | M/z observado |
|-------------------------------------|--------------------|--------------|--------------------------|---------------|
| Fragmentación. | 1-33 | 3763 | (Ia. 3) F3 | 3759 |
| | itz34-39 | 620 | | - |
| | (1-33) | 3687 | (Ia. 3) F2 | 3687 |
| | (itz24-39) | 1706 | (Ia. 3) F1 | 1708 |
| Reducción Total. | 1-23 | 2604 | (Ia. 3) R3 | 2605 |
| | itz24-33 | 1165 | (Ia. 3) R1 | 1164 |
| | itz34-39 | 620 | | - |
| | (1-33) | 3691 | (Ia. 3) R4 | 3693 |
| | (itz24-39) | 1707 | (Ia. 3) R2 | 1708 |

En resumen, las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro del intermediario de plegamiento Xa son (12- 18) (8- 27) y (24- 34). Utilizando esta metodología se confirma la asignación de puentes disulfuro que se obtenía en las digestiones proteolíticas.