

## IV. C. ESTUDIO DEL PROCESO DE REORDENAMIENTO (“RESHUFFLING”) DE LOS PUENTES DISULFURO DEL PCI.

### III. C. 1. INTRODUCCIÓN.

Durante mucho tiempo se ha discutido si existe un control cinético o un control termodinámico sobre la formación de la estructura nativa de las proteínas (Wetlaufer and Ristow, 1973), es decir, si el estado nativo de una proteína es el estado de mínima Energía de Gibbs, o es el estado que cinéticamente se forma más rápidamente. Los argumentos a favor de un control termodinámico son claros, por lo menos en lo que respecta a proteínas pequeñas. En el proceso de desnaturalización se observa un equilibrio termodinámico entre el estado totalmente desestructurado y el estado nativo de la proteína. Por otro lado, el control cinético debe ser muy importante para alcanzar el estado nativo a tiempos cortos.

Ambos aspectos son compatibles en lo que se denomina “rutas de plegamiento ordenadas”, en el que una sucesión de estados intermedios definidos, va reduciendo el espacio conformacional accesible y permite así la formación del estado más favorecido termodinámicamente, de una forma rápida después de la biosíntesis. Resumiendo, existe un control cinético en la búsqueda del estado de mínima energía (Creighton, 1992c).

Estas “rutas ordenadas” asegurarían que el estado nativo es alcanzado de forma rápida y eficiente, y proveerían barreras de energía elevadas hacia otras rutas no productivas, que conducirían a estructuras “abortivas”. En este contexto se ha discutido si las especies scrambled observadas en el plegamiento de proteínas con puentes disulfuro son intermediarios productivos de plegamiento o por el contrario representan estructuras “abortivas” (Chang, 1994a).

Desde el punto de vista estrictamente cinético, cuando analizamos la formación de puentes disulfuro en el plegamiento de estas proteínas, las especies scrambled pueden ser consideradas productos finales de caminos muertos del plegamiento (caminos que no llevan a la estructura nativa final), puesto que su conversión a estructura nativa solo puede tener lugar a través de la reorganización (“reshuffling”) de sus puentes disulfuro, y por lo tanto deben retroceder a la formación de estructuras de dos y un puente disulfuro. Sin embargo la formación de los puentes disulfuro no define la ruta de plegamiento sino que es utilizada como señal para trazarla. Desde el punto de vista termodinámico (Anfinsen, 1973), puede entenderse la presencia de especies scrambled como intermediarios de plegamiento.

Si recordamos el modelo del mecanismo de plegamiento que se describió para proteínas como la EGF, Hirudina y PCI (Chang *et al*, 1994), existe una primera etapa de plegamiento no específico que permite la formación de especies scrambled (especies con tres puentes disulfuro en su estructura) como intermediarios de plegamiento a partir de las especies de dos, uno y ningún puente disulfuro en su estructura. Esta primera etapa es seguida de una reorganización y consolidación de estas especies scrambled para dar la estructura nativa. Según este modelo, las especies scrambled solo representan estados de empaquetamiento más avanzados y de menos energía libre que los intermediarios de dos puentes disulfuro. Su conversión a estructura nativa aunque requiere una reorganización de los puentes

disulfuro, no requiere necesariamente un despegamiento sustancial de la estructura compacta ya alcanzada.

### **III. C. 2. ESTUDIO DEL EQUILIBRIO ENTRE LOS INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI Y EL PCI EN PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZANTES.**

#### **III. C. 2. 1. INTRODUCCIÓN. ESTUDIOS PREVIOS.**

Cuando una proteína se reducida y desnaturalizada se le eliminan *in vitro*, los agentes perturbadores de su conformación se inicia un proceso de replegamiento se ésta (“refolding”) para formar de nuevo su estructura nativa. Si este proceso tiene lugar en presencia de diferentes concentraciones de agentes desnaturalizantes, la capacidad de reconversión a la estructura nativa dependerá de dos factores: de la potencia del desnaturalizante y de la presencia de radicales tiol libres en el proceso.

Se han realizado diferentes experimentos en proteínas como la Hirudina, EGF y el PCI para analizar la influencia de estos dos factores sobre el proceso de “refolding” (Chang, 1995a, Chang *et al.*, 1994b, Chang *et al.*, 1995b.).

El - Mercaptoetanol o cualquier reactivo con radicales tiol libres (Cys, GSH,..), actúan de catalizadores durante el proceso de “reshuffling”, permitiendo la conversión de las especies scrambled de la proteína a la conformación nativa. Experimentalmente se ha observado que no actúan acelerando el flujo de intermediarios de plegamiento, de especies desestructuradas (especies con uno o dos puentes disulfuro) a especies scrambled (especies con tres puentes disulfuro); ni actúa alterando la composición de los intermediarios de plegamiento. Únicamente se observa que el nivel de acumulación de especies scrambled y la reconversión a estructura nativa es diferente cuando el proceso de “refolding” tiene lugar en presencia o ausencia de -Mercaptoetanol (Chang *et al.*, 1994b).

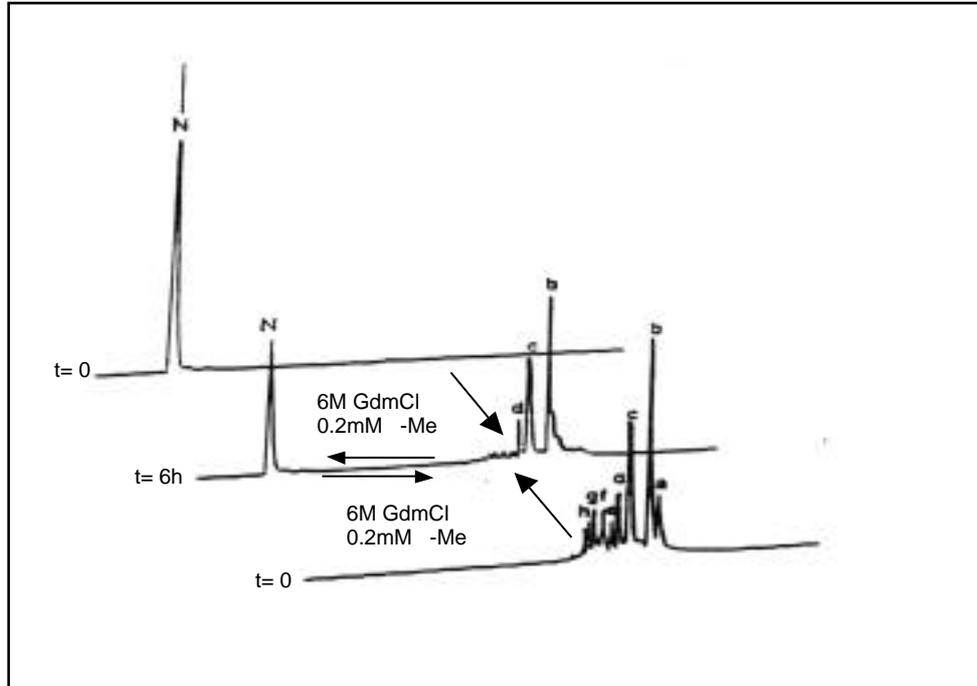
En el presente trabajo, nos hemos centrado en el análisis más detallado de la influencia de agentes desnaturalizantes sobre el proceso de “reshuffling”.

Estudios experimentales anteriores, sobre las proteínas anteriormente mencionadas, indican que los agentes desnaturalizantes influyen notablemente el la etapa final del plegamiento (“reshuffling”), cuando las especies scrambled se reorganizan para formar la estructura nativa. Por ejemplo, se ha descrito que la conversión de las especies scrambled de la Hirudina a estructura nativa puede disminuir de un 50% a un 9% (en presencia de 8 M urea y en ausencia de - Mercaptoetanol, Chang, 1995a). En cambio la composición en intermediarios de plegamiento con uno y dos puentes disulfuro es prácticamente igual cuando el plegamiento tiene lugar en presencia o ausencia de desnaturalizante (Chang *et al.*, 1995b).

Las especies scrambled y la forma nativa se encuentran en equilibrio a lo largo de la vía de plegamiento. En las condiciones de renaturalización (pH= 8- 8.5, en ausencia de desnaturalizante) existe una gran diferencia de energía entre la forma nativa y los isómeros scrambled, de manera que el equilibrio favorece la formación de la especie nativa. La conversión de las formas scrambled a la nativa tiene lugar de manera espontanea e irreversible (Chang, 1995a). Este estado de equilibrio es perturbado por la presencia de desnaturalizante. El desnaturalizante, primero, altera el equilibrio existente entre los intermediarios de plegamiento, de forma que algunas especies scrambled se presentan en menor

proporción y otras en mayor. En segundo lugar, la presencia de desnaturante disminuye la diferencia de energía antes descrita, de forma que ahora la proporción de especies scrambled en el equilibrio es mucho mayor.

Ambos efectos pueden verse en el siguiente experimento descrito para la Hirudina.



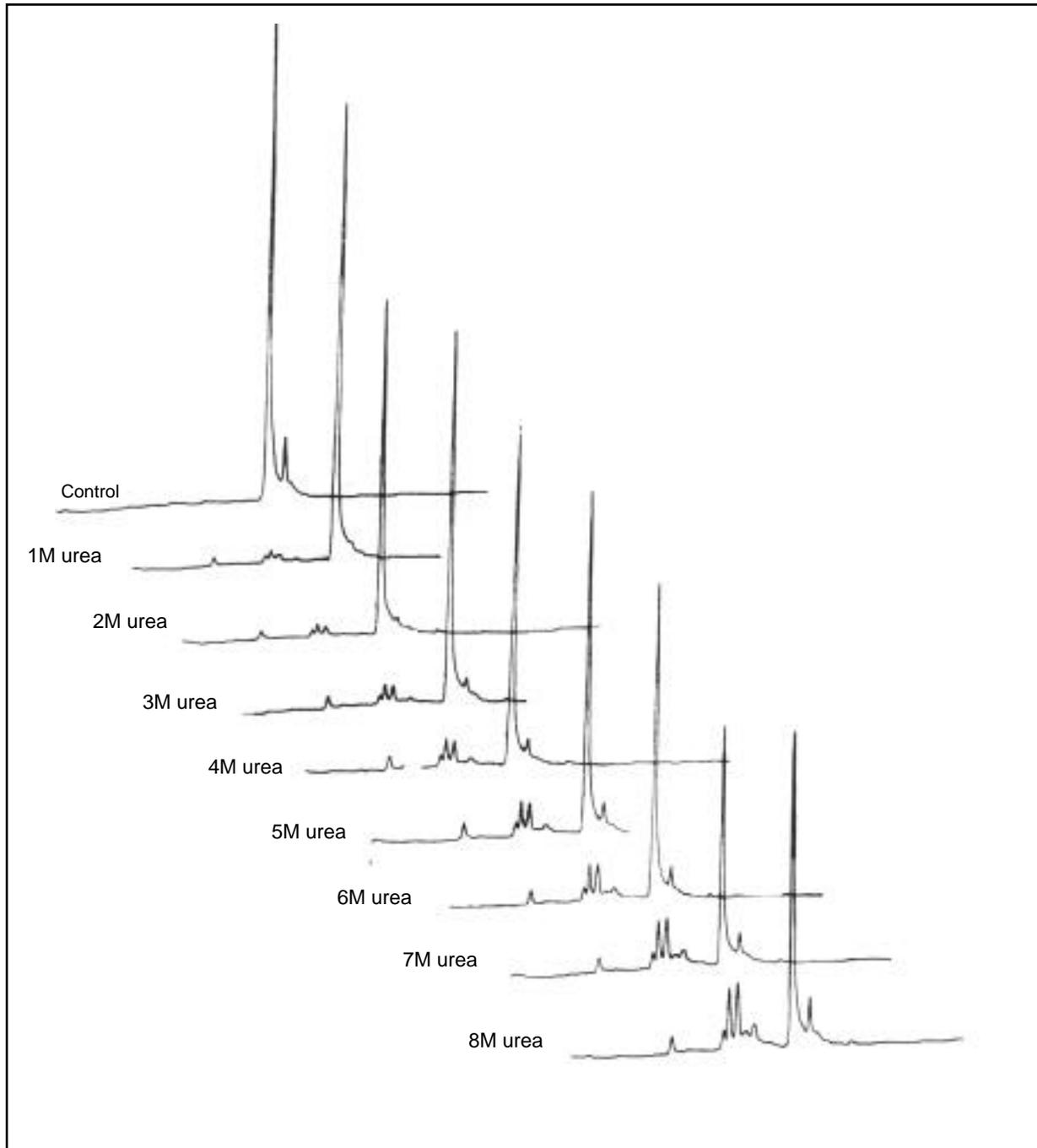
**Figura IV. C. 2. 1. 1. Equilibrio entre el estado nativo y las especies scrambled de la Hirudina.**

Cuando una mezcla de especies scrambled se deja consolidar en un tampón Tris.HCl que contiene GdmCl (6 M) y - Mercaptoetanol (2mM) obtenemos un 41 % de estructura nativa. Si dejamos una muestra de Hirudina nativa en el mismo tampón, evoluciona hacia una mezcla de idéntica composición a la anterior (Chang, 1995a).

### III. C. 2. 2. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS CON PCI.

Se ha estudiado el proceso de “reshuffling” del PCI en presencia de diferentes concentraciones (de 1 M hasta 8 M) de urea y GdmCl. La reacción se llevó a cabo partiendo de PCI nativo en tampón Tris.HCl (pH= 8.0) conteniendo - Mercaptoetanol (0.25 mM). Después de 5 horas de incubación, se paró la reacción mediante la adición de ácido trifluoroacético (TFA) y se analizaron las muestras mediante cromatografía de fase reversa (HPLC) (III. D. 5. 1.).

En la figura IV. C. 2. 2. 1. mostramos la secuencia de cromatogramas obtenidos del proceso de “reshuffling” en presencia de diferentes concentraciones de urea.



**Figura IV. C. 2. 2. 1. Secuencia de cromatogramas obtenidos del proceso de “reshuffling” del PCI en presencia de diferentes concentraciones de urea.**

En las figuras IV. C. 2. 2. 2 y IV. C. 2. 2. 3. representamos la composición de cada una de las mezclas obtenidas frente a la concentración de desnaturizante presente en el proceso de “reshuffling”.

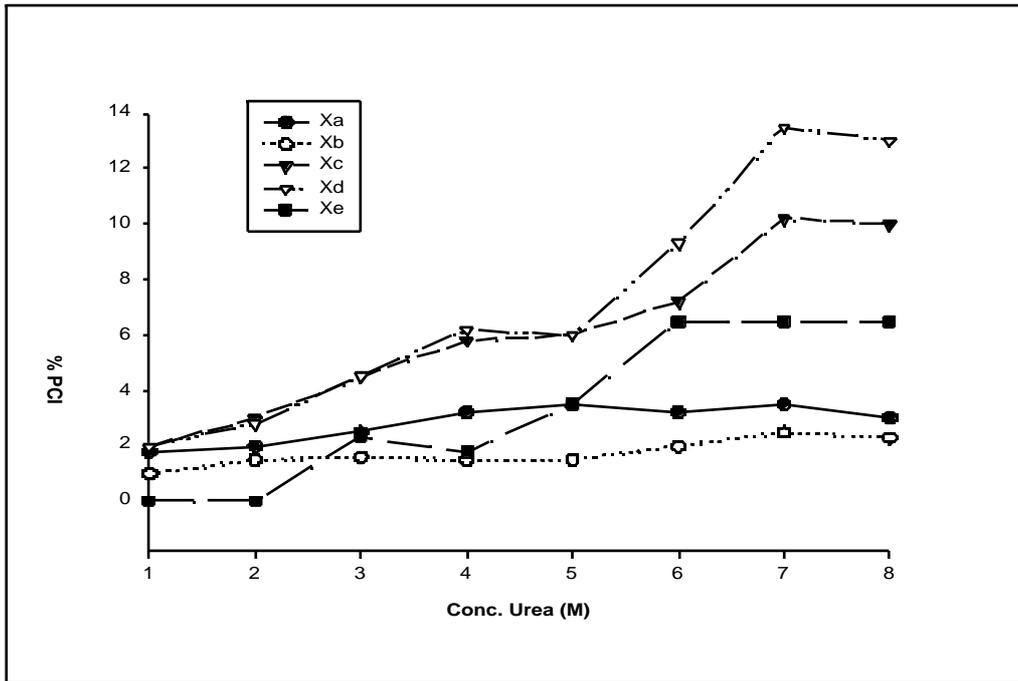


Figura IV. C. 2. 2. 2. Representación de la composición de % de cada especie scrambled versus la concentración de urea ensayada.

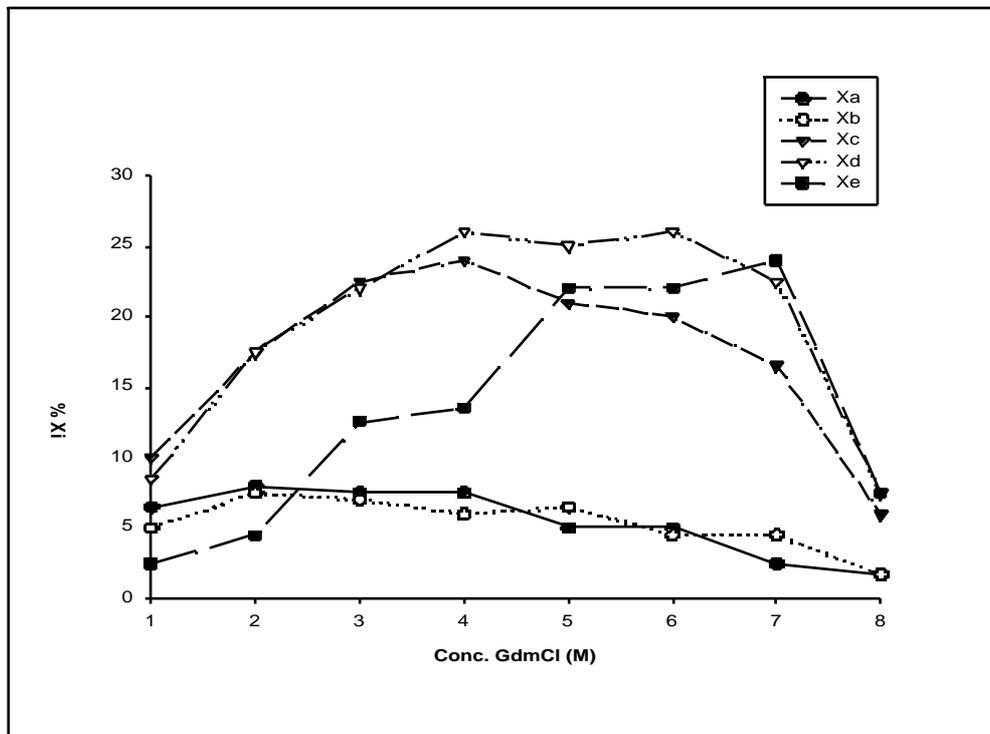
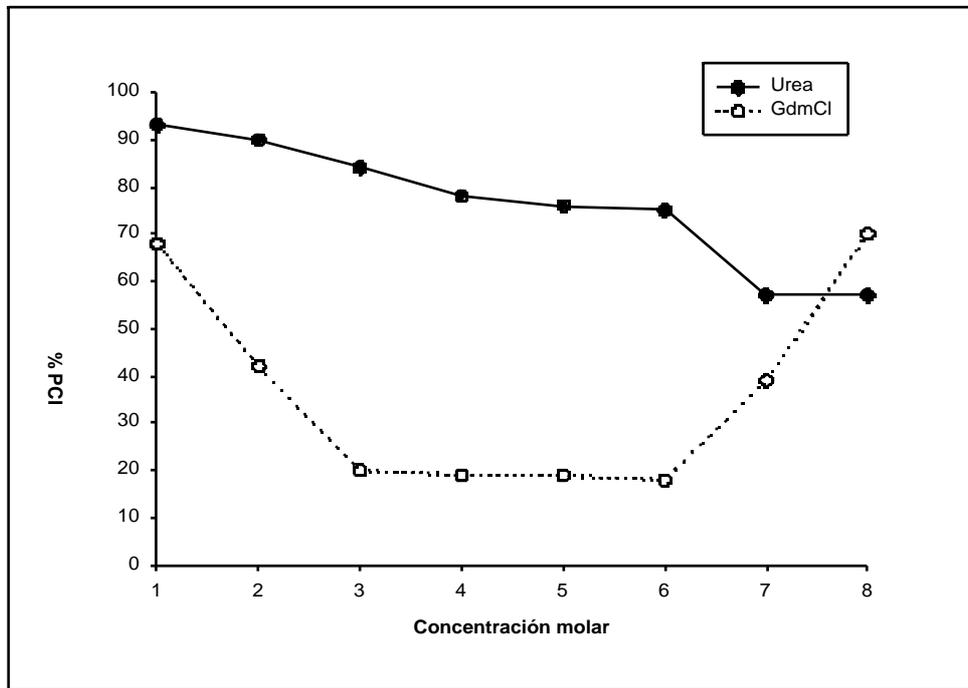


Figura IV. C. 2. 2. 3. Representación de la composición de % de cada especie scrambled versus la concentración de GdmCl ensayada.

En la figura IV. C. 2. 2. 4. se muestra el porcentaje de PCI nativo que se recupera en la mezcla final, frente a la concentración de desnaturalizante.



**Figura IV. C. 2. 2. 4. Representación de la composición de % de PCI obtenido versus la concentración de urea u GdmCl ensayadas.**

Las recuperaciones de PCI (figura IV. C. 2. 2. 4.) cuando el proceso de “reshuffling” tiene lugar en presencia de 8 M urea y 5 mM GdmCl son del 0% y del 20% respectivamente. Experimentos similares realizados en un tampón Tris.HCl que contienen - Mercaptoetanol (0.1 mM) y urea (8 M) o GdmCl (5 M) generaron reconversiones a PCI, después de 7 horas del 30 % y 2 % respectivamente (Chang *et al.*, 1994b). Estos datos indican que el proceso de “reshuffling” del experimento aún no han llegado al equilibrio después de 5 horas de reacción.

Por otra parte, si comparamos los valores obtenidos del % de reconversión a PCI cuando el proceso de “reshuffling” tiene lugar en presencia de elevada concentración de desnaturalizante (entre 7M y 8M), observamos que para estas concentraciones de GdmCl el % de reconversión del PCI aumenta sorprendentemente (desde un 20 % a un 70 %). Estos resultados se explican también por el hecho de que en estos experimentos no hemos llegado al equilibrio. El elevado % de conversión de PCI obtenido a 7 M y 8 M GdmCl nos sugiere que por alguna razón el camino al equilibrio en estas condiciones es más lento. Para demostrarlo hemos repetido el proceso de “reshuffling” en presencia de 8M GdmCl aumentando el tiempo de reacción unas 12 horas. La recuperación de PCI nativo en estas condiciones baja del 70 % al 20 %, mostrando claramente que tras 5 horas de reacción ni se había llegado al equilibrio entre las especies scrambled y el PCI nativo.

Sin embargo, a la hora de interpretar los resultados de estos experimentos, no es tan importante el hecho de que en las diferentes condiciones se haya alcanzado o no el equilibrio, como las diferentes

tendencias observadas en la composición de la mezcla en función de la concentración de desnaturalizante.

La diferencia en el % de recuperación de PCI de los dos procesos (en presencia de urea y en presencia de GdmCl) probablemente es debida a que el GdmCl es un agente desnaturalizante más potente que la urea (Pace, 1986). Esta representación se repite cuando analizamos las composiciones de las especies scrambled obtenidas a diferentes concentraciones de desnaturalizante. Éstas llegan a un mínimo o a un máximo para una determinada concentración de desnaturalizante. Si comparamos a que concentraciones de GdmCl y urea se alcanzan estos mínimos y máximos, observamos que la concentración de GdmCl necesaria es menor. Por ejemplo, Xc alcanza el valor máximo a 4M en GdmCl y a 7M en urea.

Como hemos dicho anteriormente, cuando el proceso de “reshuffling” tiene lugar en presencia de desnaturalizante, el equilibrio entre las formas scrambled se perturba, como podemos observar comparando las composiciones de especies scrambled en equilibrio obtenidas en el proceso de “reshuffling” en ausencia de desnaturalizante y en presencia de 6 M urea (figura IV. A .2. 1.).

Observamos que las concentraciones de las fracciones Xa y Xb disminuyen considerablemente cuando el proceso tiene lugar en presencia de urea; en las mismas condiciones las fracciones Xc, Xd y Xe aumentan. Esta disminución y este aumento de la concentración en las fracciones es proporcional al aumento de la concentración de desnaturalizante utilizado en el proceso. Estos resultados nos sugieren que las especies scrambled que han sido eluidas en las fracciones Xa y Xb poseen interacciones no covalentes que son afectadas o desestabilizadas (“abrogated”) por el desnaturalizante de la misma forma en que afecta a la estructura nativa.

Un estudio de la estructura de las especies scrambled es interesante para obtener información sobre si las conformaciones que llevan a la estructura nativa contienen interacciones no covalentes como los de la nativa o no. De los estudios estructurales sobre la fracción Xa sabemos que no contiene ningún puente disulfuro en su estructura como los de la especie nativa. Como consecuencia es difícil pensar que sus interacciones no covalentes sean similares a las nativas, aunque no imposible. De los estudios estructurales sobre la fracción Xb sabemos que contiene tres especies, de las cuales dos de ellas contienen un puente disulfuro como los de la especie nativa. Como consecuencia podríamos pensar que sus interacciones no covalentes serían más similares a las interacciones no covalentes de la especie nativa que Xa.

Estudios experimentales del mismo estilo realizados en la Hirudina, después de la elucidación de las cisteínas implicadas en los puentes disulfuro de las especies scrambled (Chang, 1995c) muestran que cinco de las especies sensibles a la acción del desnaturalizante (disminuye su concentración cuando el proceso de “reshuffling” tiene lugar en presencia de desnaturalizante) no contienen ningún puente disulfuro similar a los de la estructura nativa mientras que otras especies si que los tienen.

### IV. C. 3. EXPERIMENTOS DE “STOP/ GO” CON LA MEZCLA DE INTERMEDIARIOS DE PLEGAMIENTO DEL PCI Y CON CADA UNO DE ELLOS AISLADO.

Denominamos experimentos de “stop/ go” sobre el proceso de plegamiento de cualquier proteína a los experimentos que implican obtener inicialmente muestras de los intermediarios de plegamiento, aislarlos y separarlos para posteriormente continuar con el plegamiento en otras condiciones de análisis.

En el presente trabajo, hemos realizado varios experimentos de "stop/ go" sobre el proceso de "reshuffling" del PCI antes descrito partiendo de una muestra de la mezcla de especies scrambled y muestras de cada una de las especies aisladas y separadas de las demás por cromatografía (HPLC) de fase reversa (III. D. 5. 2.). Una vez obtenidas y aisladas las muestras, éstas son estables en la disolución tampón Tris.HCl Como consecuencia es necesaria la adición de tioles libres para que se inicie el proceso descrito de "reshuffling" y se continúe el proceso de plegamiento. Estos tioles libres actúan de catalizadores y son importantes para empujar el inicio de la reacción.

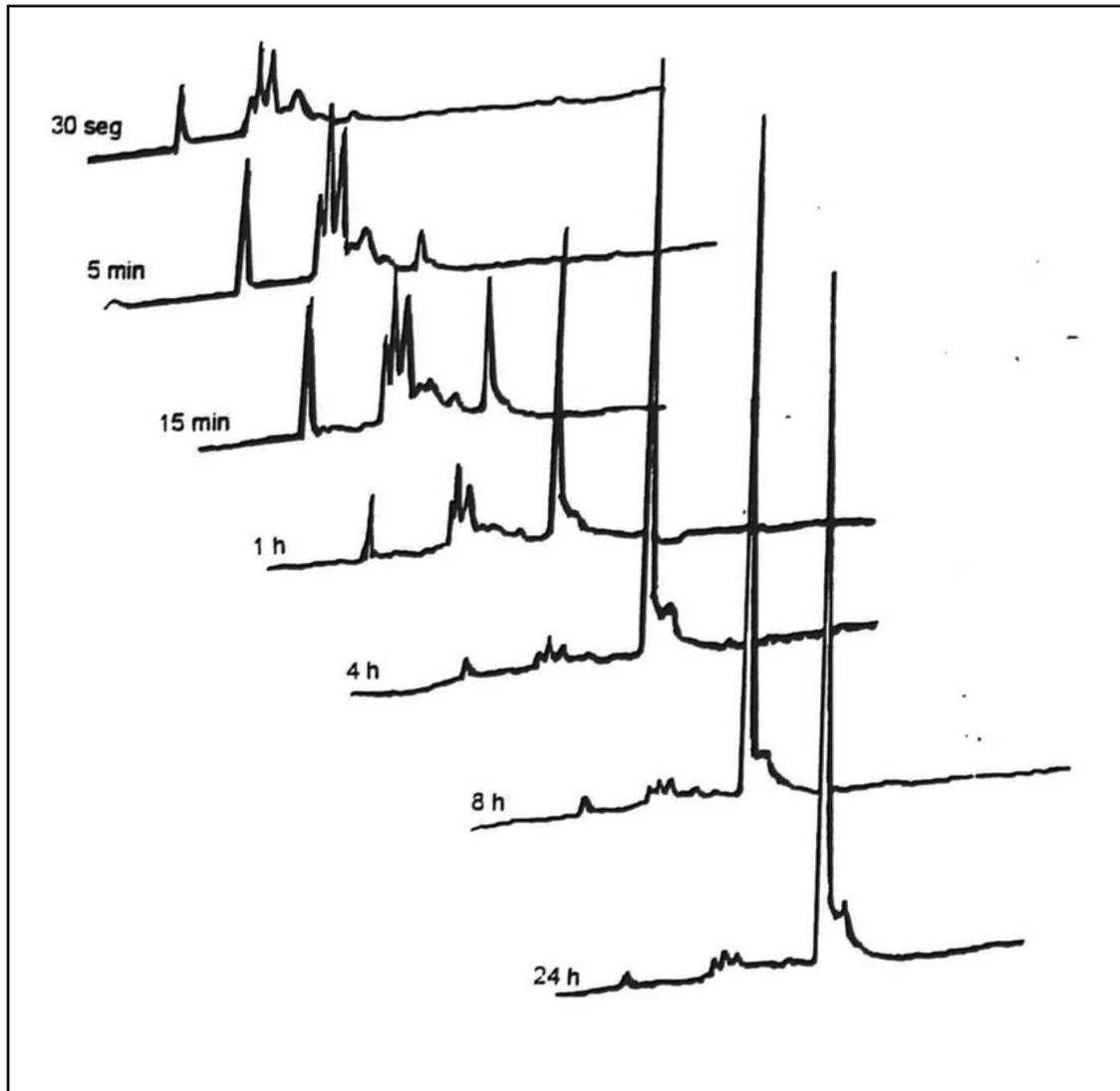
La eficacia de estos reactivos con radicales tiol libres, depende de su potencial redox y de su concentración. Si el potencial de reducción es demasiado elevado, como el del DTT reducido, no es eficaz porque es capaz de reducir las especies scrambled a especies de 2, 1, y 0 puentes disulfuro. Si el potencial de reducción del reactivo es menor existe un límite máximo en la concentración del reactivo que si es superado este será capaz de reducir las especies scrambled.

- **Influencia de los diferentes reactivos tiol en los intermediarios de plegamiento**

En este experimento, se ha ensayado la capacidad de las especies scrambled del PCI para estructurarse y obtener finalmente la especie nativa en presencia de Cys o - Mercaptoetanol. El proceso de consolidación tiene lugar 24 horas desde el inicio de la reacción, obteniendo diferentes muestras durante el curso de ésta (15 y 30 segundos; 1, 2, 5, 10 y 30 minutos; 1, 2, 4, 8, y 24 horas). Una vez obtenidas las muestras paramos la reacción mediante la adición de una disolución de ácido trifluoroacético (4%).

Con los datos que podemos obtener del análisis por cromatografía de las muestras, podemos observar el efecto de la Cys como el - Mercaptoetanol en la velocidad de conversión de las especies scrambled a especies nativa.

Mostramos a continuación la secuencia de cromatogramas obtenidos en la reacción de conversión de las especies scrambled a especie nativa en presencia de - Mercaptoetanol (0.1mM) (figura IV. C. 3. 1.) y la secuencia de cromatogramas obtenidos de la misma reacción de conversión a partir de una única especie scrambled inicial, Xa (figura IV. C. 3. 2.).



**Figura IV. C. 3. 1. Secuencia de cromatogramas obtenidos en la reacción de conversión de las especies scrambled a especie nativa en presencia de  $\beta$ - Mercaptoetanol (0.1 mM).**

En la figura IV. C. 3. 1. puede observarse como el proceso de consolidación de la mezcla de especies scrambled para dar la forma nativa, las diferentes especies scrambled se mantienen en equilibrio entre si, manteniendo una composición relativa idéntica.

Es imposible observar que en ninguna de las reacciones obtenidas con Cys y  $\beta$ - Mercaptoetanol, las especies scrambled del PCI se equilibran con especies intermediarias de 2, 1, ó 0 puentes disulfuro.

Se observa (figura IV. C. 3. 2.) como, a partir de una especie scrambled aislada, ésta evoluciona rápidamente para formar el resto de las especies scrambled en equilibrio y simultáneamente hacia la forma nativa. Por su parte, el resto de especies scrambled formadas pueden convertirse también a la forma nativa.



• **Influencia de los diferentes reactivos tiol en la velocidad de conversión de la mezcla de intermediarios a especie nativa.**

En primer lugar, se ha estudiado la influencia de los diferentes reactivos tiol, a diferentes concentraciones, en la velocidad de conversión de la mezcla de intermediarios a especie nativa. Para ello, representamos el % de conversión de PCI obtenido a partir del inicio de la reacción de "reshuffling" de la mezcla de intermediarios, en presencia de Cys (1mM, 2mM y 3 mM) y de  $\beta$ - Mercaptoetanol (0.1mM y 0.25mM) (figura IV. C. 3. 3.).

Podemos calcular las constantes de velocidad inicial si tenemos en cuenta que a tiempos cortos la reacción se comporta como una ecuación cinética de pseudo- primer orden, donde el intermediario (Xi) va a especie nativa (PCI).

$$X_i \rightarrow PCI$$

Y la constante de velocidad (K) viene relacionada por la ecuación deducida:

$$\ln \left( 1 - \frac{PCI}{X_{i0}} \right) = -Kt$$

donde el cociente PCI /  $X_{i0}$  se define como el % de conversión de  $X_i$  a PCI.

Calculamos la constante de velocidad calculando la pendiente de la representación gráfica del ln frente el tiempo (a tiempos cortos) (figura IV. C. 3. 3a.). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla IV. C. 3. 1.

**Tabla IV. C. 3. 1. Tabla de constantes de velocidad inicial de la conversión de la mezcla de especies scrambled a PCI según los diferentes reactivos tiol utilizados.**

Ensayos	Constantes de velocidad (h <sup>-1</sup> )
Cys (1mM)	0.77
Cys (2mM)	2.07
Cys (3mM)	2.52
$\beta$ - ME (0.1mM)	0.97
$\beta$ - ME (0.25mM)	2.07

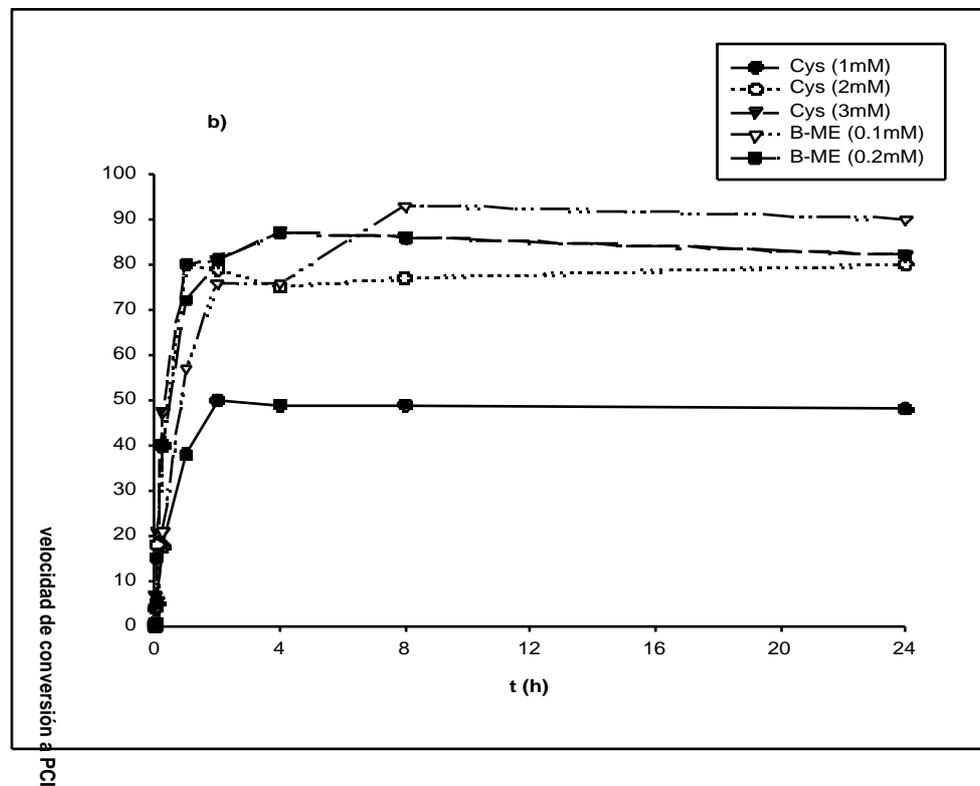
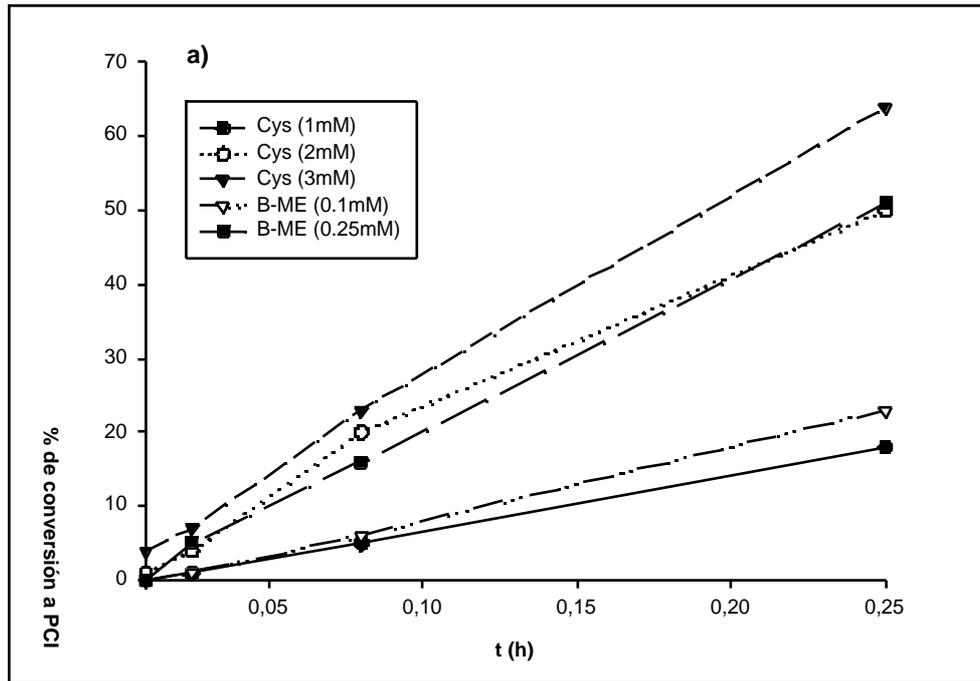


Figura IV. C. 3. 3. Representación del % de conversión de PCI versus tiempo (gráfica a) para tiempos cortos) obtenido a partir del inicio de la reacción de "reshuffling" de la mezcla de intermediarios, en presencia de Cys (1 mM, 2 mM y 3 mM) y de  $\beta$ - Mercaptoetanol (0.1 mM y 0.25 mM).

La velocidad de conversión de los intermediarios del PCI a especie nativa depende del potencial redox del reactivo tiol utilizado y de su concentración. Así vemos que el potencial reductor del  $\gamma$ -Mercaptoetanol es superior al potencial reductor de la Cys, porque adicionándolo a concentraciones menores inicia conversiones a velocidad igual o más elevada. En los dos casos el potencial reductor aumenta cuando aumenta la concentración del reactivo (Cys o  $\gamma$ -Mercaptoetanol) siendo las concentraciones de 3 mM y 0.25 mM respectivamente las concentraciones limitantes para la realización del experimento, ya que por encima de éstas podrían aparecer especies de uno y dos puentes disulfuro en el análisis.

• **Estudio de la velocidad con que cada una de las especies scrambled llega al equilibrio con las demás.**

Para elucidar los posibles caminos preferentes de interconversión, se estudió la velocidad con que cada una de las especies scrambled llega al equilibrio con las demás. En primer lugar, para determinar la concentración de Cys óptima a utilizar en este experimento se analizó la conversión (desaparición) de cada especie scrambled y formación de PCI a diferentes concentraciones de Cys (0.5mM, 1mM y 2mM).

De la misma forma que antes se pueden obtener los valores de las constantes de desaparición de cualquier especie scrambled ( $X_i$ ) y las constantes de formación de PCI a tiempos cortos de reacción. Los resultados obtenidos se representan para la especie scrambled  $X_a$  (figura IV. C. 3. 4.), siendo comportamiento del resto de especies scrambled similar.

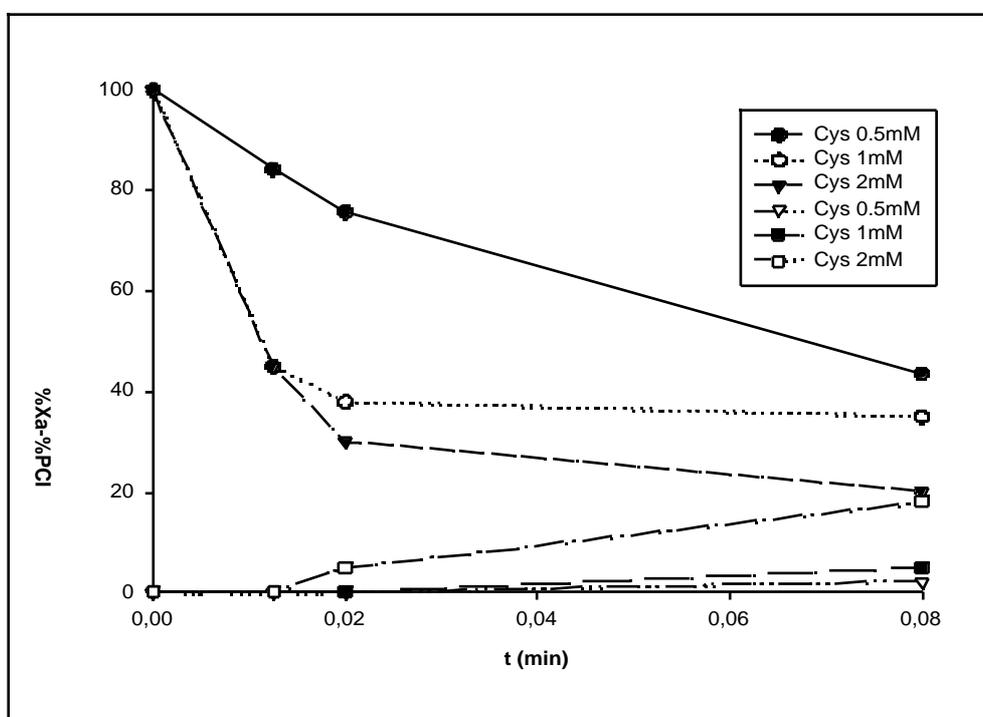


Figura IV. C. 3. 4. Porcentaje de desaparición de una especie scrambled  $X_i$  y la aparición de PCI nativo a diferentes concentraciones de Cys en el medio.

En la tabla IV. C. 3. 2 mostramos las constantes de desaparición calculadas de cada una de las especies scrambled y las correspondientes constantes de formación de PCI a diferentes concentraciones del agente redox.

**Tabla IV. C. 3. 2. Constantes de desaparición de cada una de las especies scrambled y las correspondientes constantes de formación de PCI a diferentes concentraciones de Cys.**

Especie scrambled	[Cys] mM	K desaparición (h <sup>-1</sup> )	K formación (h <sup>-1</sup> )
<b>Xa</b>	0.5	10.03	0.32
	1	49.96	0.70
	2	60.57	2.60
<b>Xb</b>	0.5	33.85	0.35
	1	40.63	1.40
	2	45.28	3.34
<b>Xc</b>	0.5	51.04	0.77
	1	62.12	0.81
	2	67.51	1.93
<b>Xd</b>	0.5	62.01	1.40
	1	-	-
	2	65.45	1.58

Se observa a medida que aumenta la concentración del agente redox aumenta la constante de velocidad de desaparición de la especie scrambled y la constante de velocidad de aparición de la especie nativa. Se escogió para el estudio de la velocidad con que cada una de las especies scrambled llega al equilibrio con las demás una concentración de 1 mM de Cys.

Para dicho estudio representaremos (figura IV. C. 3. 5), para cada especie scrambled, la evolución a lo largo del tiempo de su fracción respecto a la suma de todas las especies scrambled, es decir el cociente:

$$\frac{\% X_i}{\% X_a + \% X_b + \% X_c + \% X_d + \% X_e}$$

Este cociente debe ser constante en cuanto se haya alcanzado el equilibrio. Podemos observar que esto sucede transcurrida aproximadamente 1 hora de reacción. La velocidad en la cual cada especies scrambled llega a este equilibrio es proporcional a lo lejos que se encuentre cada una de éste. Por ejemplo, la composición de equilibrio de Xa es del 40 %, su velocidad de llegada al equilibrio es mucho más lenta que la velocidad de Xe que tiene una composición de equilibrio del 5 %. Estas velocidades pueden ser obtenidas calculando la pendiente entre el cociente de desaparición y el tiempo, a tiempos cortos de reacción.

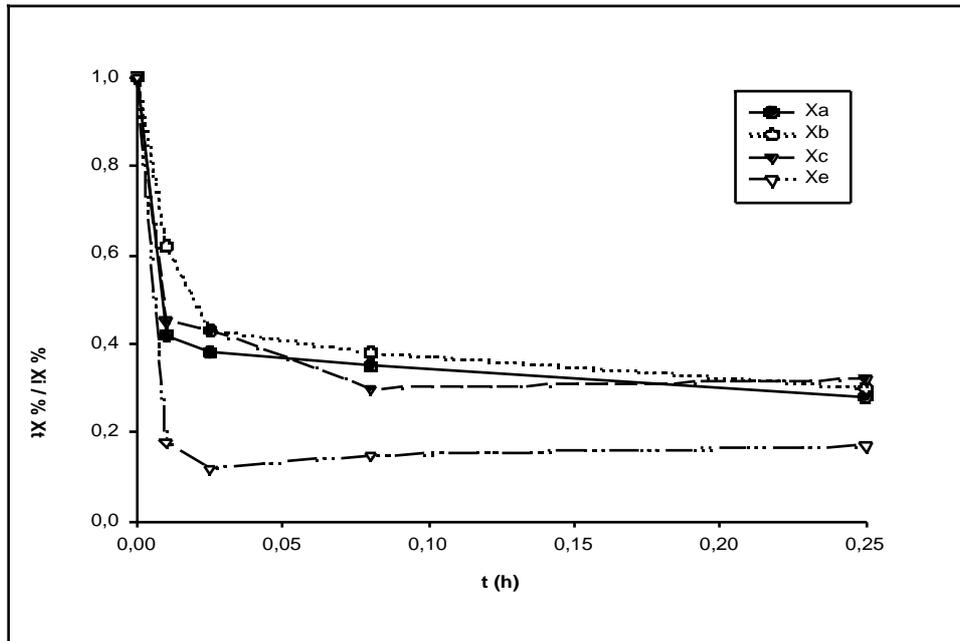


Figura IV. C. 3. 5a. Porcentaje de desaparición de cada una de las especies scrambled y el % de desaparición de las demás, en tampón Cys 1 mM, versus el tiempo (a tiempos cortos).

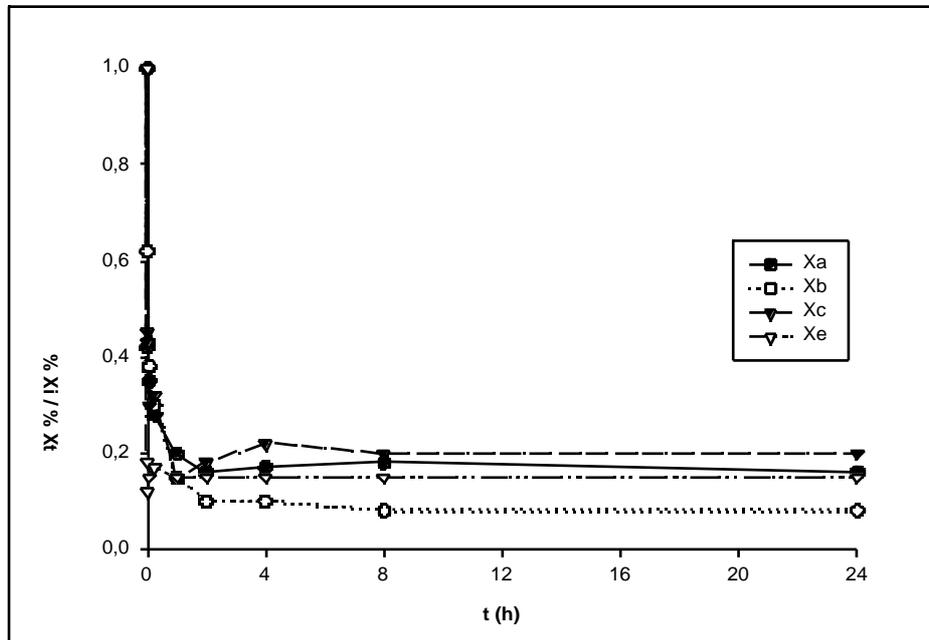


Figura IV. C. 3. 5b. Porcentaje de desaparición de cada una de las especies scrambled y el % de desaparición de las demás, en tampón Cys 1 mM, versus el tiempo.

En la representación IV. C. 3. 6. representamos el porcentaje de conversión a PCI a partir de cada una de las especies scrambled versus el tiempo. Se observa que el % de conversión a PCI final obtenido es diferente para cada una de las especies scrambled.

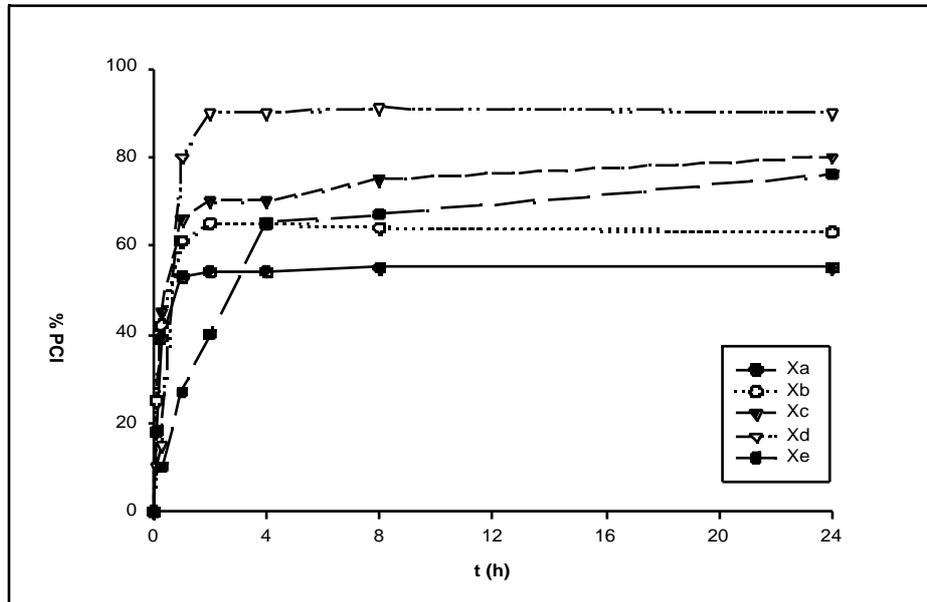


Figura IV. C. 3. 6. Porcentaje de conversión a PCI a partir de cada una de las especies scrambled, en tampón Cys 2 mM, versus el tiempo.

Esta diferencia nos da idea de la velocidad relativa a que cada especie scrambled es capaz de convertirse directamente en la forma nativa. Si la conversión de una forma scrambled a las restantes para alcanzar la composición de equilibrio fuera mucho más rápida que su conversión directa a PCI, el % de conversión a PCI final deberá ser el mismo partiendo de cualquiera de las especies scrambled aisladas. Los resultados observados muestran claramente que, por lo menos para las especies Xd, Xc y Xe existe una conversión directa a PCI, antes de haber alcanzado el equilibrio entre todas las especies scrambled.

- **Estudio de las constantes de velocidad que corresponden al proceso de reorganización a partir de cada especie aislada.**

Partiendo de cada especie scrambled aislada en presencia de Cys se han estudiado las constantes de velocidad que corresponden al proceso de “reshuffling” para obtener el resto de intermediarios del PCI y para obtener PCI nativo paralelamente. En este experimento se ha escogido una concentración de Cys del 0.5 mM debido a que nos interesa que las reacciones vayan lo más lentas posible para poder calcular sus velocidades iniciales. En la figura IV. C. 3. 7. se muestran los resultados del análisis para la especie scrambled Xa.

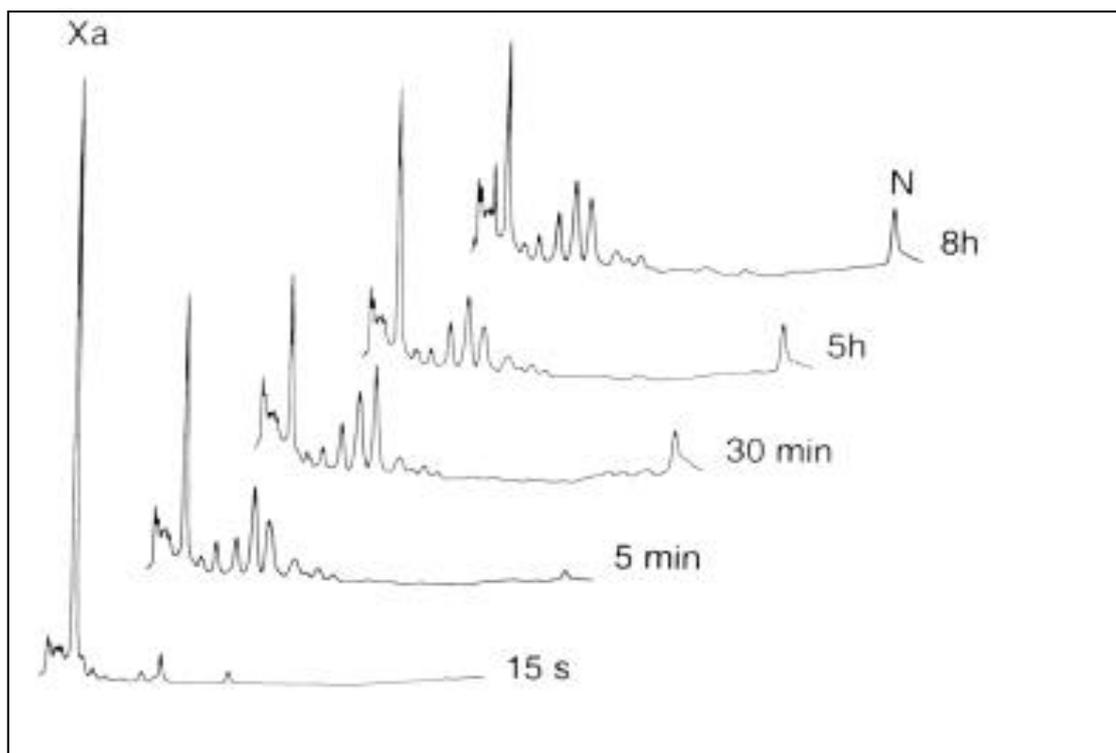
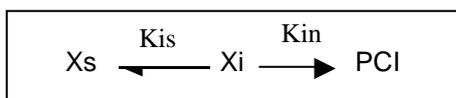


Figura IV. C. 3. 7. Secuencia de cromatogramas obtenidos de la reacción de conversión de la especie scrambled Xi a las demás y a PCI nativo simultáneamente en presencia de Cys (0.5 mM).

Se considera que a tiempos cortos puede aplicarse un esquema cinético simplificado a dos reacciones simultaneas partiendo de la especie scrambled Xi para dar el PCI nativo y el resto de especies scrambled consideradas globalmente.

De este modo partiendo de la especie aislada Xi y para tiempos cortos de la reacción, el esquema cinético del proceso será:



Donde Xs representa el sumatorio de formas scrambled.

$K_{in}$  es la constante de velocidad del proceso de “reshuffling” de la especie scrambled Xi a estructura nativa, PCI.

$K_{is}$  es la constante de velocidad de reorganización de la especie scrambled Xi a las demás especies.

$K_t$  es la constante de velocidad suma de  $K_{in}$  y  $K_{is}$ , y puede medirse a través de la desaparición de la especie Xi.

Para cada especie scrambled se ha calculado el % de desaparición y el % de formación de PCI nativo a tiempos muy cortos de la reacción. A continuación mostramos las gráficas que representan estos valores experimentales obtenidos (figuras IV. C. 3. 8. y IV. C. 3. 9.).

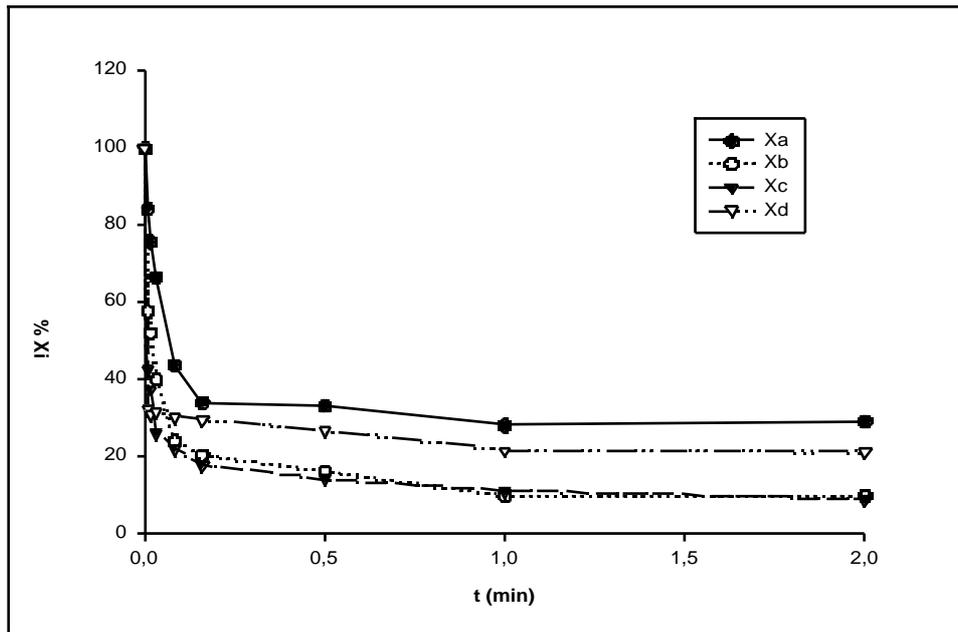


Figura IV. C. 3. 8. Porcentaje de desaparición de cada especie scrambled aislada en presencia de Cys (0.5 mM).

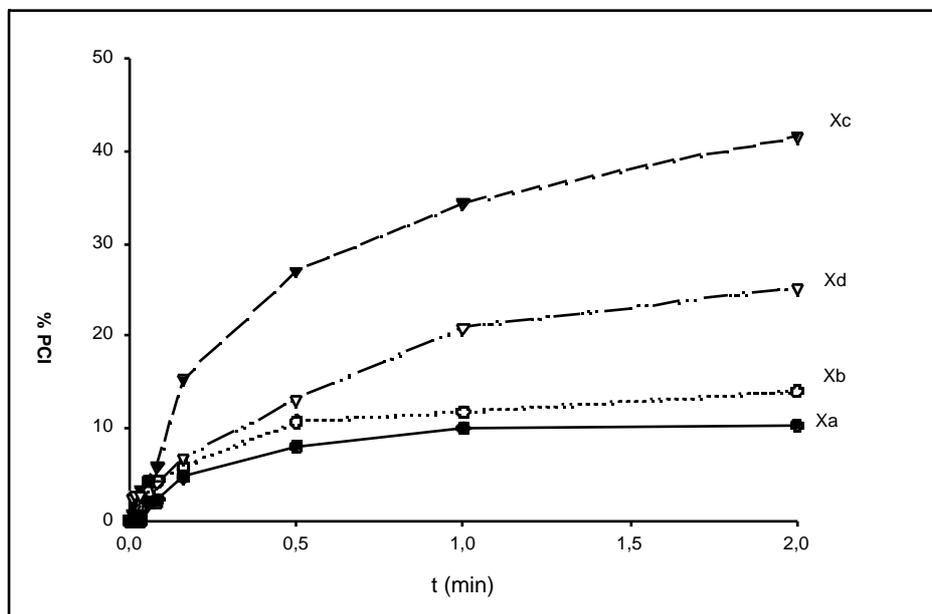


Figura IV. C. 3. 9. Porcentaje de aparición de PCI partiendo de cada especie scrambled aislada en presencia de Cys (0.5 mM).

Con estos datos se han calculado los valores de las constantes de desaparición de cada uno de los intermediarios ( $K_T$ ), los valores de las constantes de formación del PCI ( $K_{in}$ ) y por diferencia los valores de las constantes de conversión de una forma scrambled a las restantes ( $K_{is}$ ). Resultados mostrados en la tabla IV. C. 3. 3.

**Tabla IV. C. 3. 3. Valores calculados de  $K_{is}$ ,  $K_{in}$  y  $K_t$  para cada especie scrambled.**

$X_i$	$K_t$	$K_{in}$	$K_{is}$
<b>Xa</b>	10.43	0.32	10.11
<b>Xb</b>	23.11	0.43	22.68
<b>Xc</b>	34.35	0.78	33.57
<b>Xd</b>	40.22	1.70	38.52

De los resultados obtenidos podemos observar que las constantes de velocidad de desaparición de cada una de las especies scrambled aisladas son del orden de unas 40 veces superiores a las constantes de formación de PCI, y por tanto que la cinética de equilibrado entre especies scrambled es mucho más rápida que la conversión de cada especie scrambled a la forma nativa.

Podemos deducir que las especies scrambled Xa y Xb, especies sensibles a la presencia de desnaturalizante; son cinéticamente las más lentas. Para Xa tanto su velocidad en el proceso de reshuffling a especie nativa como su velocidad en el proceso de reestructuración a las demás especies es del orden de cuatro veces inferior respecto las especies Xc y Xd (especies no sensibles a la presencia de desnaturalizante). Para la especie Xb su velocidad es del orden de 2 veces inferior respecto Xd.

Estos resultados indican que estas dos especies son cinéticamente más “productivas” que Xa y Xb, es decir que su velocidad de conversión directa a PCI es mayor. Este resultado contrasta con el caso de la Hirudina (Chang, 1995 a) en el que se ha descrito que todas las especies scrambled conducen a la forma nativa a velocidades muy similares. Es de destacar que Xc, Xd y Xe son las tres especies menos sensibles a la desnaturalización por urea o GdmCl según lo expuesto en el capítulo anterior. El diferente comportamiento de Xa y Xb cabría interpretarlo en función de su mayor sensibilidad a desnaturalizantes. El hecho de poseer una mayor estructuración haría que su evolución hacia la forma nativa requiera una previa desestructuración, que no sería necesaria en el caso de Xc, Xd o Xe, lo que explicaría su diferente comportamiento cinético.

Estos resultados, muestran claramente que en la segunda etapa del plegamiento del PCI, el proceso de “reshuffling” de los puentes disulfuro, no existe una ruta preferente sino que el plegamiento sigue varias rutas alternativas.

## IV. D. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DE PCI RECOMBINANTE.

### IV. D. 1. INTRODUCCIÓN.

Los puentes disulfuro son una de las características típicas de las proteínas secretoras y se considera que contribuyen significativamente a su estabilidad (Goldenberg, 1993; Matsumura *et al.*, 1989). La formación de puentes disulfuro *in vivo* es una modificación proteica postraduccional e implica una reacción redox que esta catalizada por una proteína denominada Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI) (Freedman, 1992; Noiva and Lennarz, 1992; Lang, 1988; Creighton, 1992).

En sistemas eucariotas, el plegamiento de estas proteínas tiene lugar en el retículo endoplasmático (ER). En este compartimento, la proporción entre las concentraciones de glutatión reducido y glutatión oxidado determina las condiciones redox dependientes de agentes tiol (Hwang *et al.*, 1992).

En sistemas bacterianos como *E. Coli*, el plegamiento de proteínas tiene lugar en el periplasma y se han identificado dos proteínas que parece ser que tienen un papel similar a la Proteína Disulfuro Isomerasa descrita para eucariotas, DbsA y DbsB (Bardwell, 1991, 1993; Kamitani, 1992). Si en el periplasma bacteriano existe un medio redox y una catálisis de plegamiento muy diferentes a los existentes en el ER eucariota, podría ser que no hubiera oxidación o bien que la velocidad de plegamiento fuera demasiado lenta. Además la presencia de proteasas provoca que las proteínas desplegadas tengan que adoptar rápidamente formas de plegamiento resistentes a éstas para no ser degradadas (Oliver, 1987). Es decir, existe una competencia cinética entre el plegamiento y la degradación proteolítica. En consecuencia, la expresión de proteínas eucariotas ricas en puentes disulfuro en sistemas bacterianos es difícil y no se consiguen niveles de expresión elevados.

Estudios realizados *in vitro* sobre el mecanismo de plegamiento de proteínas eucariotas revelan que el plegamiento de una cadena polipeptídica en un tampón redox que contiene GSH y GSSG ocurre espontáneamente por un intercambiando de disulfuros entre GSH/ GSSG y la cadena polipeptídica (Saxena and Wetlaufer, 1970; Jaenicke and Rudolph, 1989). Además el mejor plegamiento se consigue cuando el tampón redox tiol/ disulfuro existen en una concentración óptima de oxidante y reductor (Lyes, 1991; Weissman & Kim, 1993; Huth, 1993). Aunque un oxidante como GSSG es esencial para la formación de puentes disulfuro, una concentración demasiado alta puede atrapar los sulfidrilos libres e inhibir la formación de puentes disulfuro intramoleculares. Por otra parte, la presencia de elevada concentración de un reductor como GSH es esencial para obtener máxima velocidad de plegamiento y una buena producción de proteína nativa.

A diferencia de lo que ocurre para el ER, no se conoce exactamente cuales son las especies moleculares que proporcionan un entorno similar en el periplasma de *E. Coli* parece ser que diferentes ditioles y el oxígeno molecular son los agentes oxidantes de las cisteínas en el periplasma, aunque se sabe que la membrana exterior del periplasma de *E. Coli* es permeable a moléculas con menos de 500 Da (Payne and Gilvarg, 1968; Decad and Nikaido, 1976). Consecuentemente el agente oxidante

responsable de la formación de puentes disulfuro en *E. Coli* debe depender de las condiciones del cultivo y de la composición del medio.

Dicha permeabilidad de la membrana exterior de *E. Coli* a moléculas pequeñas permite utilizar la zona periplasmática como “recipiente de reacción” y aproximar este medio al existente en el ER mediante la adición de GSH y GSSG al medio de cultivo (Glockshuber and Wunderlich, 1993).

Existen en la bibliografía estudios sobre la influencia de la adición de agentes redox al medio de cultivo con el fin de mejorar la producción de proteínas recombinantes (Wunderlich, 1993), consiguiéndose mejorar los rendimientos de proteína nativa. Por ejemplo en el caso de la expresión del Inhibidor - amilasa/ tripsina de *Ragi* (RBI), por la adición al medio de GSH (5 mM) se consiguió un incremento en la concentración intracelular de la proteína de 5.3 veces, y por la adición del par GSH/ GSSG (5 mM/ 1mM) la concentración se incrementó 3.6 veces.

#### **IV. D. 2. INFLUENCIA DE AGENTES REDOX EN LA PRODUCCIÓN DE rePCI.**

En el análisis cromatográfico del sobrenadante del crudo de fermentación (IV. A. 2) de la producción de PCI recombinante, se observó que en la fermentación además de producirse la especie nativa se producen también las especies intermediarias del plegamiento, especies scrambled. Este hecho nos llevó pensar en la posibilidad de encontrar un camino que permitiera que tales intermediarios no se acumularan en la fermentación como hasta ahora y fueran a especie nativa, optimizando así la producción de PCI. Dicho camino implica la adición en el medio de cultivo de un agente redox que permita que las especies scrambled reorganicen sus puentes disulfuro para dar irreversiblemente la especie nativa.

A continuación se describen los ensayos realizados y los del estudio de la diferente producción de PCI según la influencia de los siguientes agentes redox: cistina (Cys), el par cistina/ cisteína (Cys/Cys-Cys), glutatión reducido (GSH) y el par glutatión reducido/ oxidado (GSH/GSSG). Estos agentes se adicionaron en diferentes condiciones o momentos del cultivo celular: durante el cultivo celular sin ajustar el pH de éste; durante el cultivo celular, ajustando a continuación el pH a 8.5 y dejando evolucionar la mezcla; y después del cultivo celular.

##### **IV. D. 2. 1. ENSAYOS DE ADICIÓN AGENTES REDOX DURANTE O DESPUÉS DEL CULTIVO CELULAR.**

Como se describe en el apartado correspondiente de material y métodos (III. E. 1. 1. 1. 1.), para observar la influencia de los agentes redox durante el cultivo celular se preparó un cultivo inicial de *E. Coli* (p MAM3) que se utilizó para inocular cinco cultivos a los que se añaden los diferentes agentes redox: uno de ellos se utilizó como control y a los demás se adicionaron los agentes redox en las siguientes concentraciones a cada una de ellas: cistina (4mM), el par cistina/ cisteína (4mM/ 2mM), glutatión reducido (4mM) y el par glutatión reducido/ oxidado (4mM/ 2mM). Se indujo la expresión de PCI por adición de IPTG y se dejó el cultivo “over/night” a 37°C. Una vez acabado el crecimiento celular se

dividieron cada una de las muestras anteriores en dos alícuotas. A la primera alícuota se adicionó a una de ellas ácido trifluoroacético (TFA) hasta obtener un pH ácido para asegurarnos que las proporciones entre especies intermediarias y PCI fueran las mismas desde el momento que finaliza el cultivo. A la segunda alícuota, se ajustó el pH a 8.5 y se dejaron evolucionar las muestras durante 8 horas más (III. E. 1. 1. 1. 2.). Una vez finalizadas las 8 horas se adicionó a cada una de las alícuotas TFA para un posterior análisis cromatográfico.

Finalmente para observar la influencia de los agentes redox después del cultivo celular (III. E. 1. 1. 1. 3.) partimos del sobrenadante final del cultivo control anterior (en ausencia de agentes redox). De este sobrenadante se separaron cinco alícuotas, de las cuales una era el control y a las restantes se ajustó el pH a 8.5 y se adicionaron los mismos agentes redox, dejando evolucionar las muestras 8 horas más. Una vez finalizadas las 8 horas se adicionó a cada una de las alícuotas TFA para su posterior análisis.

Una vez finalizados los diferentes ensayos se analizaron por cromatografía (HPLC) de fase reversa las diferentes alícuotas, comparándose la producción de especies intermediarias y de PCI según el momento de la adición del agente redox y el agente redox utilizado.

En la figura IV. D. 2. 1. 1. mostramos como ejemplo los diferentes cromatogramas obtenidos de los ensayos anteriormente descritos, para el caso de la adición del par glutatión oxidado/ glutatión reducido.

La acción del agente redox inicia y potencia la reorganización de puentes disulfuro de las especies intermediarias para dar proteína nativa (IV. C). Por esta razón dicha adición tendría que favorecer la producción de PCI nativo, a la vez que disminuiría la acumulación de especies scrambled.

En el cromatograma control (a) observamos que el cultivo en ausencia de agentes redox se forma una elevada cantidad de especies scrambled mientras que el PCI sólo representa un 1.7%. Si se ajusta el pH a 8.5 y se deja evolucionar la muestra (cromatograma b) la producción relativa de PCI aumenta mientras que disminuye la producción de intermediarios, pero el ajuste del pH no es suficiente para conseguir la reorganización total de los puentes disulfuro pues aún quedan especies scrambled en la muestra.

Cuando adicionamos el agente redox durante el cultivo celular (cromatograma c) la proporción de especies scrambled disminuye para dar proteína nativa, pero seguimos observando una proporción alta de intermediarios en la muestra. Cuando a dicha alícuota le ajustamos el pH a 8.5 (cromatograma d) conseguimos que haya una evolución total de los intermediarios a PCI nativo.

Finalmente cuando adicionamos el agente redox después del cultivo celular y ajustamos el pH a 8.5 (cromatograma e) también conseguimos que haya una reorganización total de los puentes disulfuro de las especies scrambled para dar proteína nativa.

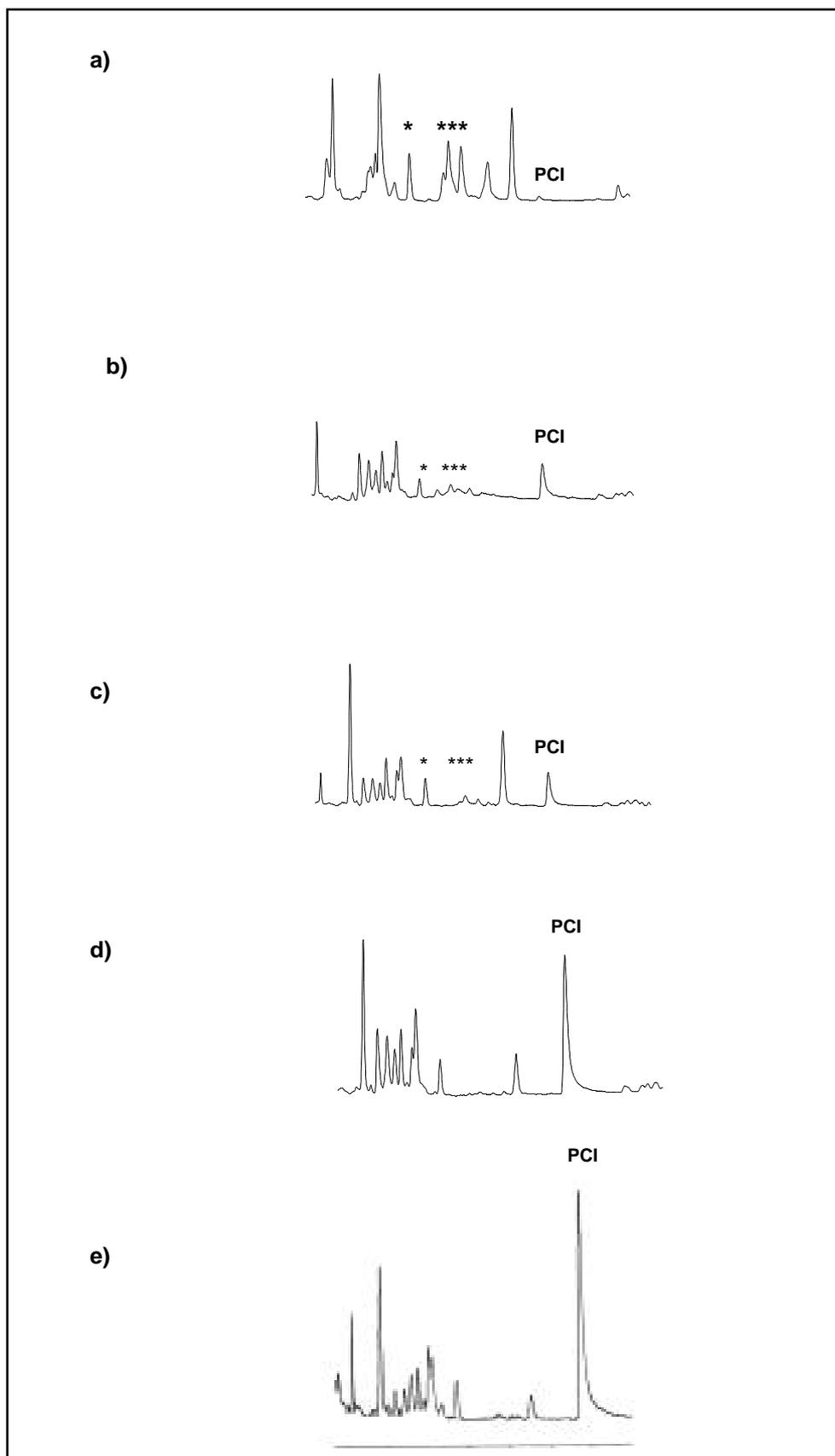


Figura IV. D. 2. 1. 1. a) Cromatograma control, producción de PCI en un cultivo en batch en ausencia de agentes redox. b) Cromatograma obtenido al ajustar el pH a 8.5 a una alícuota del cultivo anterior una vez

finalizado el crecimiento celular y dejar evolucionar 8h. c) Cromatograma obtenido al adicionar el par glutatión reducido (4mM)/ oxidado (4mM/ 2mM) durante el cultivo celular. d) Cromatograma obtenido al adicionar el par glutatión reducido (4mM)/ oxidado (4mM/ 2mM) durante el cultivo celular, posteriormente ajustar el pH a 8.5 y dejar evolucionar 8h. e) Cromatograma obtenido después de 8 horas de adicionar el par glutatión reducido (4mM)/ oxidado (4mM/ 2mM) después del cultivo celular y ajustar el pH a 8.5. (\*- Especies scrambled)

Se observa en los cromatogramas anteriores la existencia de otros picos del cultivo celular a diferentes tiempos de retención, la presencia o ausencia de estos picos no identificados del cultivo probablemente también es el resultado de la influencia del agente redox. Este hecho, y además una baja proporción de especies scrambled en algunas muestras hace difícil la integración de los intermediarios, por ello el error en la cuantificación puede ser de un  $\pm 5\%$  en algunos casos.

A continuación se compara la producción de PCI nativo según los diferentes agentes redox adicionados durante el cultivo celular. Representamos en la figura IV. D. 2. 1. 2. los resultados obtenidos en mg/ L y en % de especies scrambled, de PCI y de proteína total.

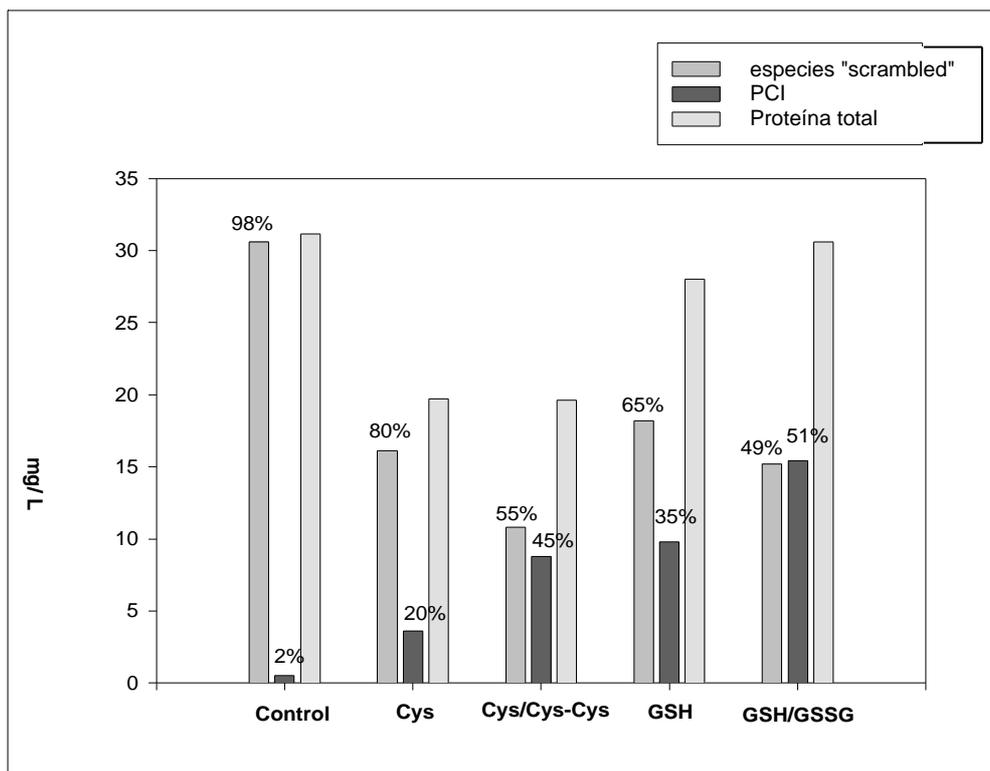
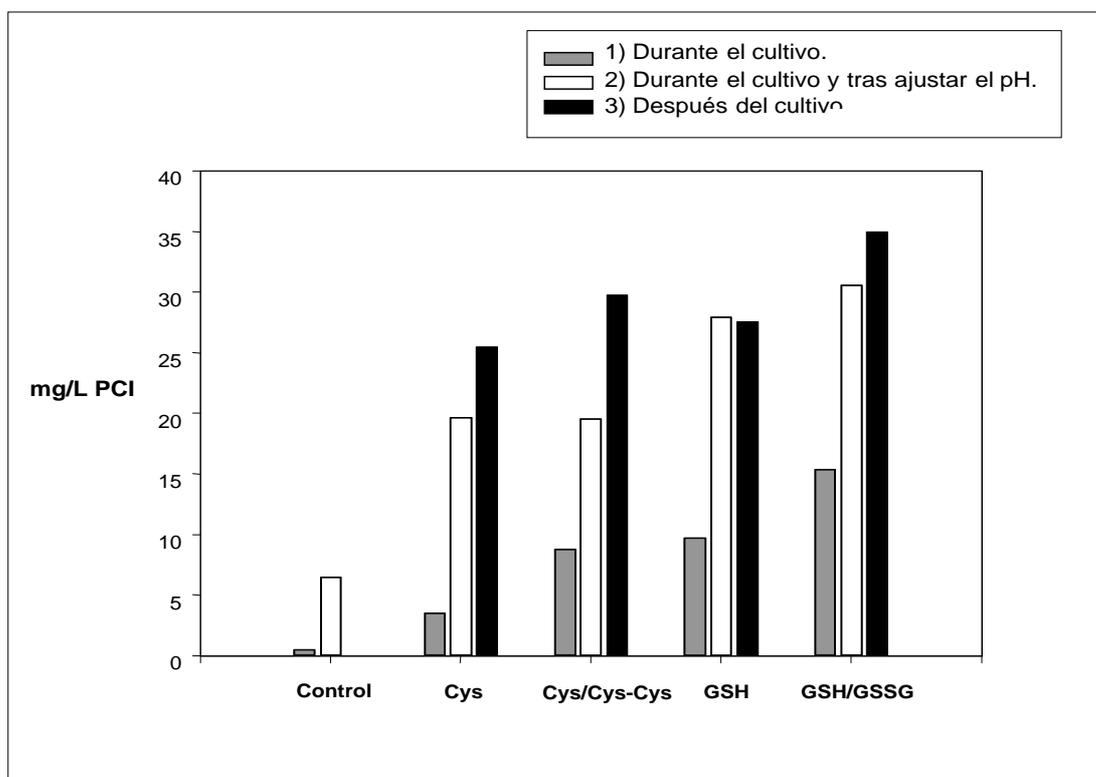


Figura IV. D. 2. 1. 2. Producción de PCI y intermediarios de plegamiento (mg/L y %) según la adición de cistina (4mM), el par cistina/ cisteína (4mM/ 2mM), glutatión reducido (4mM) y el par glutatión reducido/ oxidado (4mM/ 2mM) durante el cultivo celular.

Se ha de destacar, en primer lugar, que cualquiera de los agentes redox utilizados durante el cultivo no es capaz de reorganizar totalmente los puentes disulfuro de las especies scrambled, ya que finalizado

el crecimiento celular aún existen entre un 49 y un 80% de intermediarios. En segundo lugar, obtenemos diferentes proporciones de proteína nativa según el agente redox utilizado, se observa que la adición del par glutatión reducido/ oxidado durante el cultivo celular es la que más favorece la producción de proteína nativa. En tercer lugar, la cantidad de proteína total obtenida al adicionar cistina o el par cistina/ cisteína durante el cultivo es menor que en caso del glutatión. Esto nos hace pensar que aunque el agente redox adicionado al medio es capaz de iniciar el “reshuffling” durante el crecimiento puede influir en la producción total de proteína recombinante, ya que esta depende del agente redox añadido.

En la figura IV. D. 2. 1. 3. mostramos los resultados obtenidos del estudio de la producción de PCI según la adición de los diferentes agentes redox se realice durante el cultivo, la evolución posterior tras ajustar el pH a 8.5 y después del cultivo.



**Figura IV. D. 2. 1. 3. Representación de la producción de PCI nativo (mg/ L) después de la adición de los diferentes agentes redox en diferentes momentos del cultivo celular.**

Se observa en la anterior representación que si no adicionamos ningún agente redox al cultivo celular la producción de PCI nativo en flask es muy baja (barra control gris). Si a este cultivo le ajustamos el pH a 8.5 existe una mejora pero aún obtenemos cantidades de PCI muy por debajo de las obtenidas en condiciones (barra control blanca). La adición del agente redox durante el cultivo celular no es suficiente para que tenga lugar un “reshuffling” total de los puentes disulfuro de los intermediarios para dar proteína nativa (barras de color gris). Si posteriormente al cultivo se ajusta el pH se ve favorecida dicha reorganización de puentes disulfuro (barras de color blanco), pero en el caso de que la adición sea de cistina o cistina/ cisteína durante el cultivo la producción de PCI es inferior a la producción conseguida al

adicionar glutatión. Esto es debido, como comentábamos anteriormente, a que la adición de dicho agente durante el crecimiento celular puede influenciar negativamente en la producción de proteína total. Cuando la adición del agente redox se realiza después del crecimiento celular y tras ajustar el pH (barras de color negro) no se modifica el medio de cultivo durante el crecimiento de *E. Coli* y expresión de PCI consecuentemente no se influencia la producción de proteína total, con lo cual obtenemos la máxima producción de proteína nativa. Además no existen diferencias significativas entre la adición de un agente redox u otro.

#### IV. D. 2. 2. CULTIVO DE 500 mL Y PURIFICACIÓN DEL PCI OBTENIDO.

Cuando analizamos los resultados anteriores a nivel analítico, la integración resulta dificultosa debido a que en algunos casos la proporción de especies intermediarias frente al PCI es muy baja, quedando enmascarados los picos de HPLC de especies scrambled por otros picos de HPLC de otros componentes del cultivo celular que tienen tiempos de retención similares. Por esta razón, y además para obtener datos sobre la reproducibilidad del experimento, se llevó a cabo una cuantificación del PCI purificado en cultivos de 500 ml en flask.

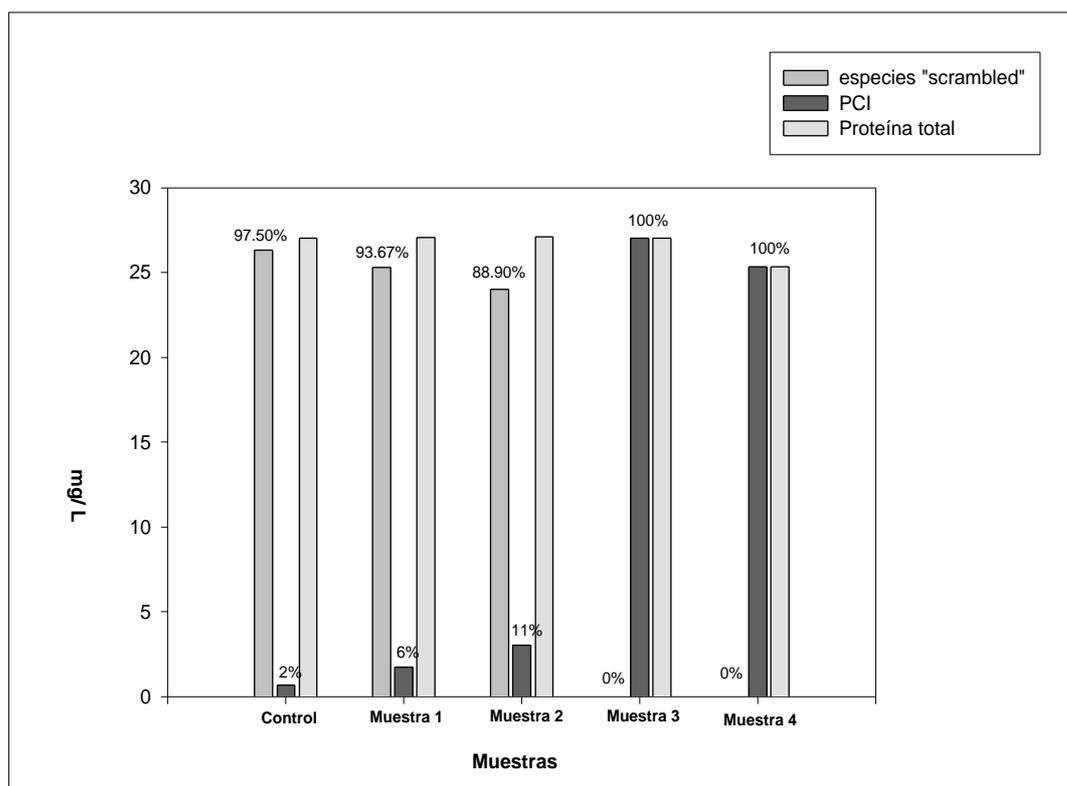
Las condiciones del cultivo se escogieron según los resultados obtenidos en ensayos anteriores. Así a 500 mL del sobrenadante de un cultivo después del crecimiento celular (III. E. 1. 1. 2) se le adicionaron cistina/ cisteína (cultivo C) y a otros 500 mL del mismo sobrenadante se adicionaron glutatión reducido/ oxidado (cultivo G).

A su vez se recogieron varias alícuotas que nos dan una idea de la evolución del ensayo, su análisis por cromatografía se resumen en la tabla IV. D. 2. 2. 1. La primera alícuota es la muestra control del cultivo que nos indica la producción de PCI justo en el momento de parar el crecimiento celular; la segunda alícuota se deja evolucionar 72 horas (muestra 1); la tercera alícuota se le ajusta el pH a 8.5 y se deja evolucionar 8 horas (muestra 2) y finalmente, dos alícuotas más que tras ajustar el pH se les adicionan los agentes redox respectivamente (muestra 3 y 4).

**Tabla IV. D. 2. 2. 1. Tabla de los ensayos realizados y analizados posteriormente por cromatografía (HPLC) de fase reversa.**

Nomenclatura	Agente redox	Ajuste del pH	Tiempo de reacción
Control	-	-	-
Muestra 1	-	-	72h
Muestra 2	-	8.5	8h
Muestra 3	Cistina/ cisteína	8.5	72h
Muestra 4	Glutatión reducido/oxid	8.5	72h

A continuación exponemos los resultados del análisis (figura IV. D. 2. 2. 1.), para ello representamos los mg/L obtenidos de especies scrambled, PCI y de proteína total, el porcentaje por cien de cada uno de ellos.



**Figura IV. D. 2. 2. 1. Cambios en la producción de especies scrambled, PCI y de proteína total obtenidos y porcentaje obtenidos según las condiciones descritas en la tabla IV. D. 2. 2. 1.**

Se observa que una vez finalizado el cultivo celular realizado a 37°C, si éste se deja a temperatura ambiente (25°C) en las mismas condiciones redox durante unas horas, existe una mínima evolución de las formas scrambled a especie nativa, existe únicamente un incremento del 4% en la producción de PCI al cabo de 72 horas (muestra 1). Se obtienen mejores resultados si se ajusta el pH a 8.5 después del crecimiento celular obteniendo un incremento del 9% en la producción de PCI respecto el control (muestra 2). De ninguna de las dos maneras se consigue un "reshuffling" total de las especies scrambled. Cuando se adiciona el agente redox después del crecimiento celular, se consigue la total reorganización de los puentes disulfuro de las formas scrambled para dar en su totalidad especie nativa.

Una vez analizadas las alícuotas se procedió a purificar el PCI obtenido (III. E. 1. 1. 3.) para cuantificar el aumento de producción debido a la adición del agente redox, obtener datos de reproducibilidad y verificar si la producción es mejor para el par redox cistina/ cisteína o glutatión reducido/ oxidado.

Al final de la purificación obtuvimos unos 27 mg/ L de PCI cuando adicionamos cisteína/cistina la cultivo y unos 25 mg/ L cuando adicionamos glutatión reducido/ oxidado. Los rendimientos de purificación fueron del 62% y 65% respectivamente.

Comparando dichos resultados con los publicados por Molina et al, 1997 donde obtenía del orden de 1-2 mg/ L de PCI en un cultivo en flask, vemos que la adición de un agente redox al medio después del crecimiento celular permite incrementar la producción de proteína nativa una 25 veces.

Cuantificando las cantidades totales purificadas de PCI se confirma que los resultados son similares utilizando un agente redox o el otro. Por ello decidimos trabajar en los posteriores ensayos con el par cisteína/ cistina dado que su uso es más económico.

#### **IV. D. 2. 3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y DEL TIEMPO DE REACCIÓN ÓPTIMOS DEL AGENTE REDOX.**

Habiendo determinado que el agente redox a utilizar para el escalado a un cultivo en fermentador es la cistina/ cisteína se hicieron una serie de ensayos adicionales para confirmar los resultados obtenidos y con el fin de optimizar las condiciones en las que se realiza el "reshuffling".

Para ello se realizan series de experimentos con cultivos celulares de 50 mL en los cuales se adicionan cistina o cisteína/cistina, una vez finalizado en cultivo, a diferentes concentraciones y parando la evolución a diferentes tiempos (III. E. 1. 1. 3).

En la tabla IV. D. 2. 3. 1. exponemos los resultados obtenidos en la producción de PCI de la adición de cistina a diferentes concentraciones y parando la evolución a diferentes tiempos. En dicha tabla mostramos los valores en incremento de área del pico correspondiente al PCI en un cromatograma de fase reversa analítico respecto la muestra control (muestra que no se adiciona ningún agente redox).

**Tabla IV. D. 2. 3. 1. Resultados obtenidos en la producción de PCI de la adición de cistina diferentes concentraciones y parando la evolución a diferentes tiempos. Cocientes correspondientes a cantidad de PCI/ cantidad de PCI en la muestra control.**

(Cys)	2h	4h	8 h	16h
<b>2 mM</b>	15.23	28.08	29.07	<b>34.74</b>
<b>4 mM</b>	14.93	-	23.88	-
<b>8 mM</b>	2.89	-	12.60	-
<b>16mM</b>	0.84	-	1.18	-

En la tabla se observan dos cosas, la primera es que al aumentar el tiempo de evolución de la muestra sigue aumentando la producción de PCI, incluso pasadas las 8 horas. La segunda es que al aumentar la concentración del agente redox parece que se desfavorezca el aumento de producción de PCI. Esto puede ser debido a que a medida que al aumentar la concentración de cistina aumenta la posibilidad de que además de iniciar el "reshuffling" de las especies scrambled, se inicie la reducción de algunos puentes disulfuro, dando especies de dos y un puente disulfuro en lugar de la especie nativa.

En la tabla IV. D. 2. 3. 2. se muestran los resultados obtenidos en la producción de PCI tras la adición del par cistina/ cisteína para una concentración de cistina 2 mM y a diferentes concentraciones de cistina y parando la evolución a diferentes tiempos.

**Tabla IV. D. 2. 3. 2. Resultados obtenidos en la producción de PCI de la adición de cistina/ cisteína a diferentes concentraciones de cisteína y parando la evolución a diferentes tiempos. Cocientes correspondientes a cantidad de PCI/ cantidad de PCI en la muestra control.**

<b>2mM (Cys)/ (Cys-Cys)</b>	<b>2h</b>	<b>4h</b>	<b>8h</b>	<b>16h</b>
<b>2 mM</b>	<b>61.16</b>	61.30	-	-
<b>4 mM</b>	62.12	-	-	-
<b>8 mM</b>	36.91	-	40.08	-
<b>16mM</b>	31.43	-	32.55	34.49

Si comparamos las dos tablas confirmamos los resultados obtenidos hasta ahora. La producción de PCI está mucho más favorecida cuando se adiciona el par redox, aumentando la producción del orden de 4 veces respecto a la adición de Cys únicamente. También se observa que al aumentar la concentración de cisteína disminuye la producción de PCI, y al aumentar el tiempo de reacción aumenta ligeramente la producción. Según estos resultados podemos ajustar los parámetros de los posteriores experimentos a la máxima producción de PCI con la mínima concentración de agente redox y al mínimo tiempo de reacción, es decir adicionaremos cistina/ cisteína (2mM/ 2mM) después de ajustar el pH y dejaremos evolucionar la reacción durante 2 horas.

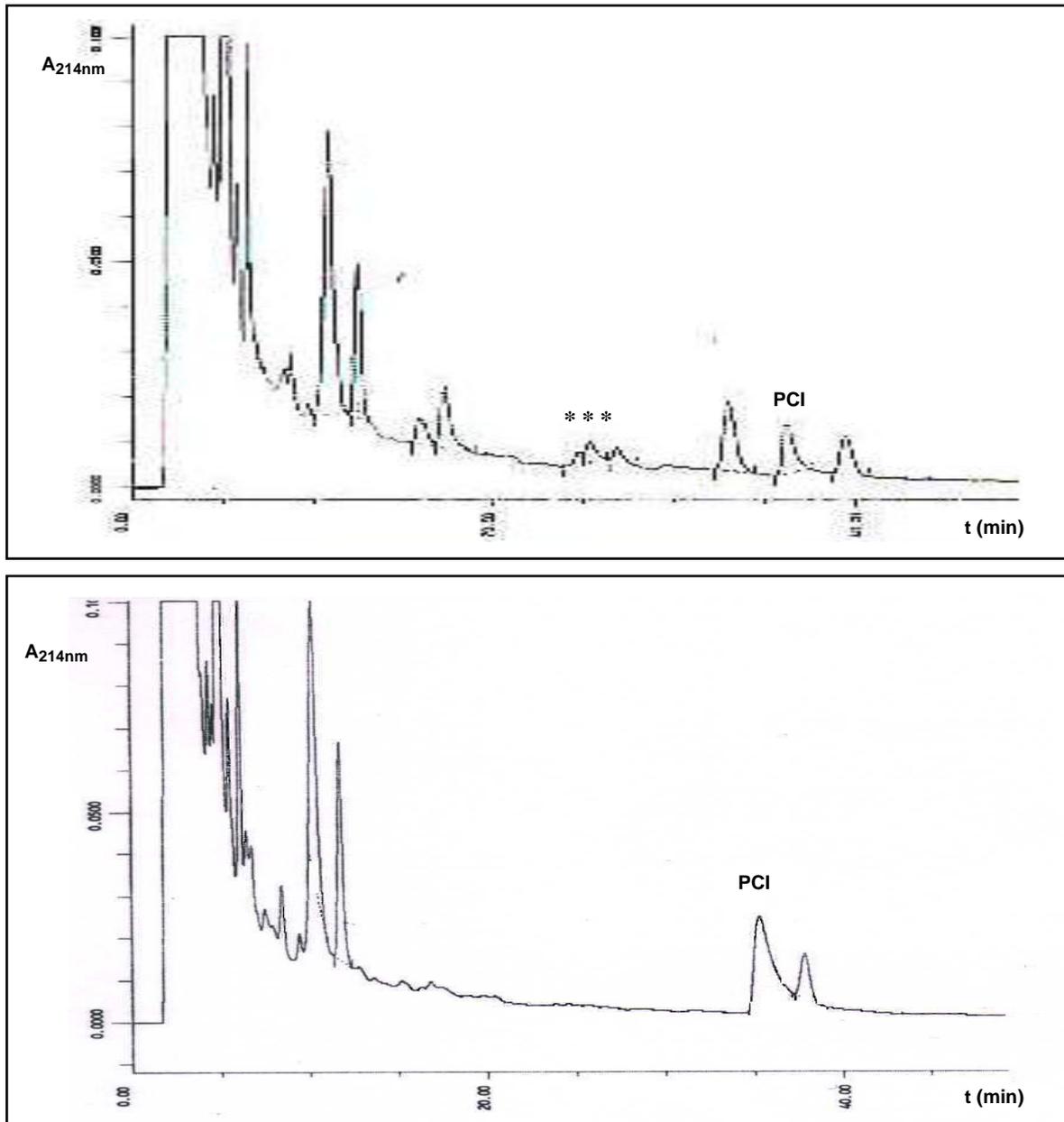
#### **IV. D. 2. 4. APLICACIÓN A LA MEJORA DE PRODUCCIÓN DE rePCI POR FERMENTACIÓN.**

Finalmente, estudiamos la aplicación del método de adición de agentes redox a escala de fermentador.

Según se describe en el apartado de material y métodos (III. E. 2) se realizó una fermentación de PCI y se cuantificó la cantidad de proteína obtenida al adicionar posteriormente a ésta el par redox cistina/ cisteína. Las condiciones de la fermentación fueron las utilizadas habitualmente (III. B. 3. 2. 2.). Al sobrenadante final obtenido se ajusta el pH, se adiciona cistina/ cisteína (2mM/ 2mM) y se deja evolucionar la reacción durante 2 horas. Se toman muestras para analizarlas por cromatografía (HPLC) de fase reversa al finalizar la fermentación, al finalizar el "reshuffling" y finalmente se cuantifica el PCI obtenido. A continuación en la figura IV. D. 2. 4. 1. mostramos los cromatogramas obtenidos de estos análisis.

En este análisis se observa que en la fermentación existe una proporción de PCI nativo mucho más elevada respecto las formas scrambled a la obtenida de un cultivo en flask. Esto puede ser debido a que durante la fermentación hay un control continuo de pH de ésta, manteniéndose en todo momento a un valor de 7.0. Las especies scrambled a este pH ven favorecido el proceso de "reshuffling" y evolucionan hacia la producción de proteína nativa.

En el cromatograma obtenido del análisis de una alícuota de la fermentación finalizada, existe aproximadamente un 40% de proteína en forma de intermediarios de plegamiento y mientras que en un cultivo en flask obteníamos del orden del 98% de proteína en forma de especies scrambled. Tras la adición de cistina/ cisteína se consigue convertir todo el PCI a la forma nativa (figura IV. D. 2. 4. 1b.).



\*- Especies scrambled

**Figura IV. D. 2. 4. 1. Cromatogramas obtenidos del análisis de una alícuota obtenida al finalizar la fermentación (a) y otra alícuota obtenida al finalizar el proceso de “reshuffling” tras adicionar un agente redox (b).**

De la cuantificación de los resultados, según el área de proteína nativa que aparece en el cromatograma (III. E. 3), obtenemos que al final de la fermentación tendríamos unos 86 mg de PCI nativo; tras ajustar el pH y adicionar cistina/ cisteína tendríamos unos 138 mg de PCI y finalmente purificados del FPLC obtenemos unos 121 mg de PCI. En resumen, se consigue aumentar la producción de PCI 1.6 veces gracias a la acción del agente redox.

#### 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.

Se estudió a continuación la influencia de los mismos agentes redox en la producción recombinante de mutantes del PCI de expresión baja y en otra proteína recombinante. Se ensayó la adición durante el cultivo celular y posterior al crecimiento celular del par redox cistina/ cisteína a los mutantes: delección val- 38 y gly- 39 (Del 2), y delección tyr- 37, val- 38 y gly-39 (Del 3) del PCI; y en el Inhibidor de Carboxipeptidasa de sanguijuela (Leech Carboxipeptidase Inhibitor (LCI), Reverter D. *et al.*, 1998).

El objetivo de estos ensayos era por una parte investigar si el bajo nivel de expresión observado para estos mutantes podía ser el resultado de la acumulación de especies scrambled y por otra parte estudiar la aplicabilidad del método a otras proteínas.

Aunque los mejores resultados para la producción de PCI se han obtenido cuando la adición del par redox se realiza posteriormente al cultivo, se ensayaron de forma comparativa la adición durante y después del cultivo.

Partiendo de un mismo inóculo (III. E. 1. 2), se realizaron dos cultivos paralelos, el cultivo A donde se adicionó el par redox en el momento de inducir el cultivo y el cultivo B, que se adiciona el par redox al finalizar el crecimiento celular. A lo largo del experimento se separaron varias alícuotas que en un posterior análisis por cromatografía (HPLC) de fase reversa nos dan información sobre la evolución de los cultivos. De esta manera se separó una primera alícuota del cultivo A al finalizar el crecimiento celular y se adicionó TFA para asegurarnos que las proporciones proteicas se mantuvieran hasta su análisis. Se separó una segunda alícuota del mismo cultivo y se ajustó el pH a 8.5 dejándola evolucionar durante 8 horas, tras las cuales se adicionó TFA. Se separó una primera alícuota del cultivo B y se adicionó TFA. Finalmente se separó una segunda alícuota del mismo cultivo y se adicionó el par redox tras ajustar el pH, se dejó evolucionar durante 8 horas y se adicionó TFA.

Para la identificación de la proteína analizada y de sus intermediarios de plegamiento se realizaron análisis de coinyección de la muestra del cultivo y la proteína; se recogieron los picos que tienen tiempos de retención próximos al de nuestra proteína y sus intermediarios, y posteriormente se identifican determinando sus masas moleculares por espectroscopía de masas.

A continuación exponemos (Tabla IV. D. 2. 5. 1.) los resultados obtenidos para cada una de las proteínas ensayadas y para el PCI.

**Tabla IV. D. 2. 5. 1. Producción de proteína obtenida cuando adicionamos el agente redox durante y después del cultivo celular.**

Proteína ensayada	Control (sin agente redox)	Cys/ Cys-Cys durante el cultivo + pH	Cys/ Cys-Cys después del cultivo + pH
<b>Del 2</b>	< 0.1 mg/ L	< 0.1 mg/ L	6 mg/ L
<b>Del 3</b>	< 0.1 mg/ L	< 0.1 mg/ L	2.6 mg/ L
<b>LCI</b>	0.42 mg/ L	2.1 mg / L	2.0 mg/ L
<b>PCI</b>	0.52 mg/ L	20 mg/ L	30 mg/ L

De estos análisis hay que destacar en primer lugar que la adición del par redox durante el cultivo celular influye negativamente en la producción de los mutantes delección 2 y 3 del PCI pues no se observa proteína cuando analizamos una muestra después del crecimiento celular, una vez ajustado el pH y dejándola evolucionar. El mismo análisis para el LCI nos da un resultado diferente. En este caso, al igual que ocurre para el PCI se obtienen resultados similares cuando la adición se realiza durante o después del cultivo.

En los tres casos, la adición de los agentes después del cultivo permite mejorar el nivel de producción de la correspondiente proteína nativa, de forma similar a lo observado para el PCIwt. Esto quiere decir que el par redox es capaz de iniciar y potenciar completamente el proceso de “reshuffling de los intermediarios de los mutantes y del LCI.

Para los dos mutantes de PCI estudiados, mutante delección 2 y delección 3, aunque la adición de un agente redox permita aumentar la producción de proteína nativa el nivel de expresión total es muy inferior al de PCIwt. En un cultivo en flask de 50 mL de PCIwt obteníamos, después de adicionar el par redox cistina/ cisteína al finalizar el crecimiento celular, unos 30 mg/ L. Mientras que en las mismas condiciones para el mutante delección 2 obtenemos 6 mg/ L y para el mutante delección 3 obtenemos 2.6 mg/ L. Parece pues que la delección de los dos o los tres aminoácidos de la cola N- terminal de la proteína nativa influye negativamente en la expresión de estos mutantes, lo que podría debido a una mayor accesibilidad a la acción de proteasas como el resultado de un plegamiento menos eficiente (Venhudova, res. no public.).

## IV. CONCLUSIONES.

1. Se ha optimizado el procedimiento de obtención de intermediarios en el plegamiento del PCI, necesarios para realizar estudios biofísicos y funcionales. Mediante la utilización de un tampón Tris. HCl (0.1 M, pH= 8.5) previamente saturado de oxígeno se ha mejorado el rendimiento a un 70 % en la producción de intermediarios "scrambled" respecto a la especie nativa, frente al 40 % que se obtenía mediante otros procedimientos.

La realización de un escalado del proceso analítico optimizado no ha sido posible debido a las elevadas pérdidas de proteína por absorción inespecífica tanto en columnas de filtración molecular como de fase reversa.

2. Durante la producción de PCI en bioreactor, se observa que una parte de proteína se encuentra retenida en forma de intermediarios de plegamiento en el crudo de la fermentación. Se han podido obtener cantidades, del orden de mg, de especies "scrambled" mediante la purificación de estas directamente de dicho crudo.

3. Se evidencia que técnicas separativas como la cromatografía de intercambio iónico y la electroforesis capilar no presentan una mayor resolución que la cromatografía de fase reversa para la separación de la mezcla de intermediarios "scrambled" del PCI.

No se ha detectado ningún tipo de heterogeneidad en las fracciones "scrambled" aisladas, a excepción de Xd, en el análisis por cromatografía de intercambio iónico, por cromatografía de fase reversa y por electroforesis capilar. La fracción Xd está formada por al menos dos especies "scrambled" distintas según su análisis por electroforesis capilar.

4. La caracterización de los puentes disulfuro por reducción química parcial permite detectar la heterogeneidad conformacional en otras fracciones purificadas como Xa, Xb, Xc, Xd y Xe. Según este procedimiento analítico la fracción Xa es la única especie pura, la fracción Xb presenta tres especies, la fracción Xc presenta dos especies, la fracción Xd presenta tres especies y, finalmente, la fracción Xe tres especies más. Hemos detectado, por tanto, una importante heterogeneidad subyacente.

---

**5.** Los intermediarios "scrambled" son más accesibles a enzimas proteolíticas que el PCI, de lo cual podría deducirse que tienen una estructura menos compacta o más fluctuante que la estructura nativa.

**6.** Se ha caracterizado el apareamiento de disulfuros y realizado análisis conformacional (por DC y por RMN) de casi todas las especies "scrambled" purificadas de las fracciones Xa, Xb, Xc, Xd y Xe.

Dichos análisis conformacionales confirman que la estructura tridimensional de las formas "scrambled" es distinta a la nativa, con un menor grado de empaquetamiento y mayor grado de flexibilidad conformacional (mayores fluctuaciones).

**7.** Cuando la última etapa del camino de plegamiento del PCI, etapa de reorganización o consolidación, tiene lugar en presencia de agentes desnaturalizantes se perturba el equilibrio entre las formas "scrambled". En estas condiciones, el porcentaje composicional de las especies Xa y Xb es menor, mientras que el de las especies Xc, Xd, y Xe es mayor cuando el proceso tiene lugar en presencia de concentraciones crecientes de Urea o GdmCl.

Esto podría deberse a la existencia de interacciones no covalentes que estabilizaran parcialmente las formas Xa y Xb que serían sensibles a desnaturalizantes.

**8.** Cuando las especies "scrambled" se encuentran en equilibrio su conversión en especie nativa tiene lugar a una velocidad de conversión que depende del potencial redox del reactivo tiol utilizado y de su concentración. Se han obtenido velocidades máximas cuando el proceso ha tenido lugar en presencia de 3 mM Cys o 0.25 mM - Mercaptoetanol.

**9.** La velocidad de conversión de las especies scrambled Xa y Xb a la especie nativa en presencia de tiol libre como catalizador es unas X y Z veces respectivamente inferior a la de las especies Xc, Xd y Xe. Puesto que Xa y Xb son especies sensibles a desnaturalizante, esta menor velocidad de conversión podría explicarse por la existencia en estas especies de interacciones estabilizantes que hubieran de romperse para permitir la evolución hacia la forma nativa.

---

## BIBLIOGRAFÍA.

### A

Anfinsen, C. B. (1973). *Science* **181**, 223- 230.

Ako, H., Hass, M., Grahn, D. T., & Neurath, H. (1976). *Biochemistry* **15**, 2573- 2576.

### B

Baker, D., *et al.* (1992). *Nature* **356**, 263- 265.

Baldwin, R. L. (1989). *Trends Biochem. Sci.* **14**, 291- 294.

Bardwell, J. C. A. *et al.* (1991). *Cell* **67**, 581- 589.

Bardwell, J. C. A. *et al.* (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3120- 3125.

### C

Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. (1980). *J. Mol. Biol.* **138**, 179- 207.

Chang, J. -Y. (1994a). *Biochem. J.* **300**, 643- 650.

Chang, J. -Y. (1995a). *J. Biol. Chem.* **270**, 25661- 25666.

Chang, J. -Y. (1996). *Biochemistry* . **36**, 11702- 11709.

Chang, J. -Y. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 69-75.

Chang, J. -Y. (1998). *Biochemistry* . **37**, 6745- 6751.

Chang, J. -Y. (1999a). *Analytical Biochemistry.* **268**, 147- 150.

Chang, J. -Y. (1999b). *J. Biol. Chem.* **274**, 123- 128.

Chang, J. -Y. Schindler, P., Ramseier, U., Lai, P. H. (1995b). *J. Biol. Chem.* **270**, 9207- 9216.

Chang, J. -Y. Schindler, P., Chatrenet, B. (1995c). *J. Biol. Chem.* **270**, 1- 6.

Chang, J. -Y., Canals, F., Schindler, P., Querol, E., Avilés, F. X. (1994b). *J. Biol. Chem.* **269**, 22087- 22094.

Chang, J. -Y., Chatrenet, B. (1993b). *J. Biol. Chem.* **268**, 20988- 20996.

Chang, J. -Y., Knecht, R. (1991a). *Anal. Biochem.* **197**, 52- 58.

Chang, J. -Y., Märki, W. And Por- Hsiung, L. (1999c). *Prot. Sci.* **8**, 1463- 1468.

Chatrenet, B., Chang, J. -Y. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 20988- 20996.

- Chatrenet, B., Chang, J. -Y. (1999c). *J. Biol. Chem.* **274**, 123-128.
- Clore, G. M. and col. (1987). *Biochemistry* **26**, 8012- 8023.
- Creighton, T. E. (1978). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **33**, 231- 297.
- Creighton, T. E. (1979). *J. Mol. Biol.* **129**, 411- 431.
- Creighton, T. E. (1986). *Methods Enzymol.* **131**, 83- 106.
- Creighton, T. E. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5802- 5806.
- Creighton, T. E. (1990). *Biochemistry* **270**, 1- 16.
- Creighton, T. E. (1992a). *Bio Essays* **14**, 192- 199.
- Creighton, T. E. (1992b). *Science* **256**, 111- 112.
- Creighton, T. E. and Goldenberg D. P. (1984). *J. Mol. Biol.* **179**, 497- 526.
- Creighton, T. E. Ed. (1992c). *Protein Folding*. Library of Congress Cataloging- in- Publication Data.
- Creighton, T. E., Darby, N. J. and Kemmink, J. (1996) *FASEB. J.* **10**. 110- 118.
- Creighton, T. E. and Ewbank, J. J. (1994). *Biochemistry* **33**, 1534- 1538.

## D

- Dadlez, M. and Kim, P. S. (1995). *Nat. Struct. Biol.* **2**, 674- 679.
- Davis, L. G. and col. (1986). *Elsevier Science Publishers B. V.*
- Decad, G. M. and Nikaido, H. (1976). *J. Bacteriol.* **128**, 325- 336.
- Dill, K. A. (1990). *Biochemistry* **29**, 7133- 7155.
- Dill, K. A. *et al.* (1995). *Protein. Sci.* **4**, 561- 602.
- Dobson, C. M. (1992). *Curr. Biol.* **2**, 343- 345.
- Dobson, C. M., Evans, P. A. (1988). *Nature* **335**, 666- 667.

## E

- Edman, P. (1950). *Acta Chem. Scand.* **4**, 283- 293.
- Edman, P. (1956). *Acta Chem. Scand.* **10**, 761- 768.

## F

- Freedman, R. B. (1984). *Trends Biochem. Sci.* **9**, 438-441.
- Freedman, R. B. (1992). In: Creighton, T. E. Ed. *Protein Folding*. Library of Congress Cataloging- in- Publication Data. pp 455- 540.

**G**

Ghrayeb, J. and col. (1984). *EMBO J.* **3**, 2437- 2442.

Givol, D., Delorenzo, F., Goldberger, K. F. and Anfinsen, C. B. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **53**, 676- 684.

Goldenberg, D. P. (1992). *TIBS.* **17**, 257- 261.

Goldenberg, D. P. (1992). *Protein folding* (Creighton, T. E. ed), 353- 403.

Gray, W. R. (1993a). *Protein Sci.* **2**, 1732- 1748.

Gray, W. R. (1993b). *Protein Sci.* **2**, 1749- 1755.

**H**

Haber, E. and Anfinsen, C. B. (1962). *J. Biol. Chem.* **237**, 1839- 1844.

Hardy, P. M. *et al.* (1971). *J. Chem. Soc. Sect. C. Org. Chem.* 1722- 1731.

Harrison, S. C. and Durbin, R. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4028- 4030.

Hass, G. M. and Ryan, C. A. (1979). *Plant Physiol.* **64**, 1022- 1028.

Hass, G. M. and Ryan, C. A. (1981). *Meth. Enzymol.* **80**, 778- 791.

Heaton, G. S. *et al.* (1956). *J. Chem. Soc.* 3157- 3168.

Hirayama, K. & Akashi, S. (1994). *Biological mass spectrometry: Present and future.* 299- 312.

Huth, J. R. *et al.* (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 16472- 16482.

Hwang, C. *et al.* (1992). *Science* **257**, 1496- 1502.

**J**

Jaenicke, R. and Rudolph, R. (1989). *Protein Structure* (Creighton, T. E. ed), 191- 223.

Jarvis, D. *et al.* (1961). *J. Chem. Soc.* 1752- 1756.

**K**

Karplus, M. and Weaver, D. L. (1994) *Protein. Sci.* **3**, 650- 668.

Kamitani, S, *et al.* (1992) *Protein* **11**, 57- 62.

Kim, P. S. and Baldwin, R. L. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459- 489.

Konishi, Y. *et al.* (1981) *Biochemistry* **18**, 2252- 2256.

---

Kuwajima, K. *et al.* (1990). *Biochemistry* **29**, 8240- 8249.

## L

Levinthal, C. (1968). *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45.

Lang, K. & Schimid, F. X. (1988). *Nature* **331**, 261-265.

Lyles, M. M. and Gilbert, H. F. (1991). *Biochemistry* **30**, 613- 619.

## M

Marino- Bluslje,C., Molina, M. A., Canals, F., Avilés, F. X., Querol, E. (1994). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 632- 637.

Marino- Bluslje, C., Venhudova, G., Molina, M. A., Oliva, B., Jorba, X., Canals, F., Avilés, F. X., Querol, E.. (2000). *Eur. J. Biochem.* **267**, 1- 9.

Molina, M. A. *et al.* (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 21467- 21472.

Molina, M. A., Avilés, F. X., Querol, E. (1992). *Gene (Amst).* **116**, 129- 138.

Matsumura, M. *et al.* (1989). *Nature* **342**, 291- 293.

## N

Nakagawa, S. *et al.* (1994 a). *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5513- 5514.

Nakagawa, S. *et al.* (1994 b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1735- 1741.

Noiva, R. and Lennarz, W. J. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 3553- 3556.

## O

Oliver, D. B. (1987) in *E. Coli. And Salmonella typhimurium*, 55- 69.

## P

Pace, C. N. (1986). *Methods Enzymol.* **131**, 266- 282.

Palmer, T. (1985). *Undertanding Enzimes 2ª Ed.*, 154- 147. Ellis Horwood Ltd. Chichester, Inglaterra.

Payne, J. W. And Gilvarg, C. (1986). *J. Biol. Chem.* **243**, 6291- 6299.

Ptitsyn, O. B. (1987). *J. Prot. Chem.* **6**, 273- 293.

## R

Radford, S. E. *et al.* (1992). *Nature* **358**, 302- 307.

- 
- Rees, D. C. and Libscomb, W. N. (1982). *J. Mol. Biol.* **160**, 474- 498.
- Reeve, J. R. & Pierce, J. G. (1981). *Int. J. Pept. Protein Res.* **18**, 79.
- Reverter, D. *et al.* (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 32927-32933.
- Roder, H. *et al.* (1988). *Nature* **335**, 700- 704.
- Rothwarf, D. M. and Sheraga, H. A. (1993). *Biochemistry* **32**, 2671- 2679.
- Ryle, A. P. & Sanger, F. (1955). *Biochem. J.* **60**, 535- 540.

## S

- Sambrook, J. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> Ed.
- Sardana, M. *et al.* (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 13560- 13566.
- Saxena V. P. and Wetlaufer, D. B. (1970). *Biochemistry* **9**, 5015- 5023.
- Schmid, F. X. (1992). In: Creighton, T. E. Ed. *Protein Folding*. Library of Congress Cataloging- in- Publication Data. pp 197- 242.
- Sheraga, H. A. *et al.* (1984). *Adv. Biophys.* **18**, 21- 41.
- Sheraga, H. A. *et al.* (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5740- 5744.
- Smith, D. L. & Zhou Z. (1990). *Methods Enzymol.* **193**, 374- 389.
- Smyth, D. G. *et al.* (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 227- 234.

## T

- Takeda, K. *et al.* (1995). *J. Protein Chem.* **14**, 679- 684.

## U

- Udgaonkar, J. B. and Baldwin, R. L. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8197- 8201.

## V

- Vendrell, J. S., Avilés, F. X. (1986). *J. Chromatogr.* **358**, 401- 413.

## Z

- Zapun, A. Creighton, T. E. *et al.* (1992) *Protein* **14**, 10- 15.

## W

- Walker. K. W. and Gilbert. H. F. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 28487- 28493.

- 
- Wakselman, M. & Guibe- Jampel, E. (1976). *J. C. S. Chem. Commun.* 21- 22.
- Waxman, L. *et al.* (1990). *Science* **248**, 593- 596.
- Weissman, J. S. and Kim, P. S. (1991). *Science* **253**, 1386- 1392.
- Weissman, J. S. and Kim, P. S. (1992a). *Science* **256**, 112- 114.
- Weissman, J. S. and Kim, P. S. (1992b). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 9900- 9940.
- Weissman, J. S. and Kim, P. S. (1992c). *Cell.* **71**, 185- 188.
- Weissman, J. S. and Kim, P. S. (1993). *Nature.* **365**, 841- 851.
- Weissman, J. S. and Kim, P. S. (1995). *Nature Struct. Biol.* **2** 1123-1130.
- Wetlaufer, D. B. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 697- 701.
- Wu, J. & Watson, J. T. (1997). *Protein Sci.* **6**, 391- 398.
- Wu, J. *et al.* (1996). *Anal. Biochem.* **235**, 161- 174.
- Wunderlich, M. and Glockshuber, R. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 24547- 24550.

**10.** Parecen existir múltiples rutas en el mecanismo de replegamiento del PCI a partir de su forma reducida. Esta visión concuerda con la que se tiene actualmente para el replegamiento de proteínas, en general.

**11.** La adición del un par redox, Cys/Cys-Cys o GSH/ GSSG durante el cultivo de E. Coli para la producción de PCI recombinante, o bien la adición al sobrenadante final del cultivo en ausencia de agentes redox, permiten conseguir la total reorganización de puentes disulfuro de los intermediarios de plegamiento y su canalización hacia la obtención de especie nativa. Con este procedimiento se puede conseguir una mejora en la producción de PCI del orden de 10 veces para cultivos en “flask” y de 2 veces para el cultivo en fermentador.

Esta metodología parece ser de aplicabilidad general, como se ha comprobado para formas mutantes del PCI o para el inhibidor de Carboxipeptidasa de sanguijuela (LCI).

**12.** Se ha comprobado que el bajo nivel de expresión para formas mutantes del PCI no es el resultado únicamente de la acumulación de formas scrambled sino que el nivel de proteína total también es menor.

Además se ha observado que el nivel de expresión es menor cuando la adición de agentes redox se realiza durante el cultivo.